

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Ústav pro hydrodynamiku AV ČR, v. v. i.

**Interakce mezi proteiny a huminovými látkami
při koagulaci**

*Interactions between proteins and humic substances
during coagulation*



Kateřina Novotná

Vedoucí: RNDr. Martin Pivokonský, Ph.D.

Květen 2015

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím uvedené literatury a informací, na něž odkazuji. Svoluji k jejímu zapůjčení s tím, že veškeré (i přejeté) informace budou řádně citovány. Rovněž prohlašuji, že předložená diplomová práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze dne 30. 4. 2015

Kateřina Novotná

Děkuji všem, kteří přispěli ke vzniku této diplomové práce. Zvláště pak oceňuji podmínky, které mi byly poskytnuty Ústavem pro hydrodynamiku AV ČR, v. v. i.

Obsah

Abstrakt	5
1 Úvod a cíl práce	7
2 Literární přehled	9
2.1 Organické látky v povrchových vodách	9
2.1.1 Huminové látky	9
2.1.2 AOM	10
2.1.2.1 Proteinová složka AOM	11
2.2 Organické látky při úpravě vody	12
2.2.1 Důvody odstraňování organických látek	12
2.2.1.1 DBPs	13
2.2.1.2 Toxiny	14
2.2.2 Metody a principy odstraňování organických látek	14
2.2.2.1 Koagulace NOM	14
2.2.2.2 Huminové látky a koagulace	16
2.2.2.3 AOM a koagulace	17
2.2.2.4 Další metody odstraňování organických látek	20
3 Materiály a metodika	22
3.1 Příprava BSA	22
3.2 Příprava huminových látek	22
3.3 Analýza rozpuštěného organického uhlíku (DOC)	22
3.4 Stanovení podílu HL a BSA na DOC	23
3.5 Stanovení molekulových hmotností	23
3.6 Titrace HL a BSA	24
3.7 Optimalizační sklenicové zkoušky	24
3.8 Stanovení zbytkových koncentrací hliníku, stanovení pH, stanovení KNK	25
4 Výsledky a diskuse	26
4.1 Koagulace HL a BSA samostatně	26
4.1.1 Vliv dávky koagulačního činidla	26
4.1.2 Vliv hodnoty pH	28
4.1.3 Mechanismy koagulace	30
4.2 Koagulace HL a BSA současně – s koagulačním činidlem	35
4.2.1 Vliv dávky koagulačního činidla	36
4.2.2 Vliv hodnoty pH	36
4.2.3 Mechanismy koagulace	38
4.3 Koagulace HL a BSA současně – bez koagulačního činidla	38
4.3.1 Vliv hodnoty pH a poměru BSA / HL	38
4.3.2 Mechanismy koagulace	41
4.4 Srovnání BSA se sinicovými proteiny	43
5 Závěr	45
6 Seznam použitých veličin a zkratk	47
7 Seznam použité literatury	49

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá koagulací huminových látek (HL) a proteinu BSA (Bovine Serum Albumin), který reprezentuje proteinovou složku AOM (Algal Organic Matter – látky produkované sinicemi a řasami). Studovány jsou také vzájemné interakce HL a BSA během koagulace. Bylo zjištěno, že pro odstranění huminových látek je potřebná podstatně vyšší dávka koagulačního činidla než pro stejné množství BSA. Nejvyšší účinnosti koagulace bylo pro obě látky dosaženo v oblasti mírně kyselého pH, hlavními mechanismy jsou patrně nábojová neutralizace a adsorpce. Za optimálních podmínek bylo dosaženo odstranění až 70 % huminových látek a až 80 % proteinu. Dále se ukázalo, že přítomnost BSA příznivě ovlivňuje koagulaci HL (znatelně snižuje potřebnou dávku koagulačního činidla) a naopak, přičemž protein BSA byl vždy odstraňován s vyšší účinností než HL. Bylo prokázáno, že mezi organickými látkami dochází ke vzájemným interakcím, a to (při určitých hodnotách pH) i bez účasti koagulačního činidla. Podílí se na nich patrně zejména hydrofobní efekt a tvorba vodíkových můstků. Interakce jsou silně závislé na hodnotě pH, která je určující pro nábojové charakteristiky daných látek. Ze srovnání BSA se sinicovými proteiny vyplývá, že jejich chování při koagulaci je obdobné a BSA se tak jeví jako vhodná modelová látka zastupující proteinovou složku AOM, a to zejména její vysokomolekulární frakci.

Klíčová slova

BSA (Bovine Serum Albumin); huminové látky; interakce NOM (přírodních organických látek); koagulace; sinicové proteiny.

Abstract

This diploma thesis is focused on coagulation of humic substances (HS) and BSA (Bovine Serum Albumin) protein which was chosen as a representative of proteins contained in AOM (Algal Organic Matter). Additionally, possible interactions between these compounds were also investigated. It was found that the optimal dosage of coagulant is much higher for HS compared to BSA. The best removal of both HS and BSA was reached in slightly acidic pH range and it is attributed mainly to charge neutralization and adsorption mechanisms. The maximum removal rate was 70 % for humic substances and 80 % for BSA. The results show that BSA has a positive effect on coagulation of HS (resulting in a lower coagulant demand) and vice versa while BSA was removed more efficiently than HS. The existence of interactions between BSA and humic substances during coagulation was demonstrated in certain pH ranges and it can occur even without the presence of coagulant. These interactions are highly dependent on pH that determines charge properties (and hence reactivity) of organic matters. Finally, the comparison of BSA and cyanobacterial proteins shows that their behavior during coagulation is similar. Consequently, BSA can be used as a model compound representing AOM proteins, especially their high molecular weight fraction.

Keywords

BSA (Bovine Serum Albumin); humic substances; NOM (Natural Organic Matter) interactions; coagulation; cyanobacterial proteins.

1 Úvod a cíl práce

V povrchových vodních tělesech se běžně vyskytují přírodní organické látky (NOM - Natural Organic Matter) různého původu a vlastností (Sharp a kol., 2006). Velký podíl zpravidla tvoří huminové látky (HL) (Marhaba a Van, 2000; Lin a kol., 2014). Zanedbatelný není také obsah látek, které jsou produkovány během života a odumírání sinic a řas (AOM - Algal Organic Matter) (Her a kol., 2004), a to zejména sezónně v souvislosti s eutrofizací vod (Cheng a Chi, 2003). Velká část AOM (až 65 %) je tvořena peptidy a proteiny (Pivokonský a kol., 2006, 2014). Dále se na složení AOM podílejí např. polysacharidy, aminocukry, aminokyseliny a enzymy (Li a kol., 2012).

Pro výrobu pitné vody je přítomnost organických látek nežádoucí, a to z několika důvodů. Během hygienického zabezpečení vody pomocí chloru vznikají reakcemi s NOM zdraví škodlivé látky, tzv. desinfection by-products – DBPs (Jung a kol., 2005; Yang a kol., 2015). U mnoha z nich byly prokázány karcinogenní nebo genotoxické účinky (Richardson a kol., 2007). Organické látky také zhoršují organoleptické vlastnosti vody (Matilainen, 2010). Dále mohou způsobovat technologické problémy při některých fázích úpravy (Carroll a kol., 2000; Her a kol., 2004) nebo v distribučním systému vody (Volk a kol., 2000; Jung a kol., 2005). AOM může navíc obsahovat toxiny (Chow a kol., 1999; Harada, 2004), často hepatotoxické (Prakash a kol., 2009) nebo neurotoxické (Rositano a kol., 2001).

Běžnou metodou úpravy vody využívanou i pro odstraňování NOM je koagulace ve spojení s následnou sedimentací, filtrací (Jung a kol., 2005; Matilainen a kol., 2010), případně flotací (Henderson a kol., 2008b). Koagulace organických látek je založena na interakcích s koagulačními činidly. Tradičními a běžně využívanými jsou hydrolyzující soli hliníku nebo železa (Matilainen a kol., 2010). Pro účinnou koagulaci je nezbytné vhodné nastavení parametrů, jako je dávka koagulačního činidla a pH, přičemž optimální hodnoty se mohou lišit v závislosti na složení a charakteru NOM (Volk a kol., 2000; Sharp a kol., 2006). S uvedenými reakčními podmínkami souvisí také to, jaké mechanismy koagulace se uplatňují (Duan a Gregory, 2003). Docházet může patrně i k interakcím mezi jednotlivými složkami NOM (Tian a kol., 2013; Myat a kol., 2014; Wang a kol., 2015).

Různé typy NOM jsou v laboratorních studiích mnohdy reprezentovány modelovými látkami (Kim a Dempsey, 2013; Tian a kol., 2013). Vedle lepší dostupnosti jsou výhodou také jasně definované charakteristiky těchto látek. V této práci je proteinová složka AOM zastupována proteinem BSA (Bovine Serum Albumin). Jako látku

reprezentující NOM využívá BSA např. Her a kol. (2003), Mo a kol. (2008), Hashino a kol. (2011), Jiao a kol. (2015).

Cílem této diplomové práce je:

- 1) Stanovit optimální parametry koagulace huminových látek, proteinu BSA a kombinace těchto látek.
- 2) Určit, zda dochází k interakcím mezi huminovými látkami a BSA. Popsat, jak případné interakce ovlivňují účinnost koagulace a jaké mechanismy se na nich mohou podílet.
- 3) Srovnat chování BSA při koagulaci s chováním AOM, zejména se sinicovými proteiny. Posoudit, zda je BSA vhodnou modelovou látkou dostatečně reprezentující proteinovou složku AOM.

2 Literární přehled

2.1 Organické látky v povrchových vodách

Organické látky (NOM) se přirozeně vyskytují v povrchových vodních zdrojích. Jedná se o heterogenní směs látek s různými vlastnostmi, které se liší v závislosti na místě i čase (Marhaba a Van, 2000; Sharp a kol., 2006). Největší podíl je zpravidla tvořen huminovými látkami (HL) (Marhaba a Van, 2000; Lin a kol., 2014), významnou složkou NOM jsou také produkty metabolických procesů sinic a řas (AOM), jejichž dynamický rozvoj může způsobovat velké výkyvy ve kvalitě vody (Leloup a kol., 2013). Koncentrace NOM v povrchových vodách se různí, jako obvyklé jsou uváděny hodnoty v rozmezí 1-5 mg.l⁻¹ DOC (McDonald a kol., 2004) až 2-15 mg.l⁻¹ DOC (Volk a kol., 2000). V průběhu roku množství NOM ve vodě často velmi kolísá i v rámci jedné lokality, maximální koncentrace mohou dosahovat až násobků koncentrací minimálních (Sharp a kol., 2006).

2.1.1 Huminové látky

Huminové látky v povrchových vodách běžně tvoří 50-65 % NOM (Marhaba a Van, 2000; Lin a kol., 2014). Vznikají přeměnou odumřelého organického materiálu (McDonald a kol., 2004) a typicky způsobují žluté až hnědé zbarvení vody (Lu a kol., 1999). HL jsou heterogenní směsí organických makromolekul, kterou lze dělit na následující složky: fulvokyseliny, huminové kyseliny a huminy (Jones a Bryan, 1998).

Fulvokyseliny (FA - Fulvic Acid) jsou rozpustné ve vodě při celé škále pH (Jones a Bryan, 1998) a v povrchových vodách jsou nejvíce zastoupenou složkou HL (Lin a kol., 2014). **Huminové kyseliny** (HA - Humic Acid) mají oproti fulvokyselinám hydrofobnější charakter (Domany a kol., 2002), podíl hydrofobní frakce byl stanoven až na cca 94 %. S tím korespondují vysoké hodnoty SUVA (7,4 l.m⁻¹mg⁻¹), což svědčí o velké aromaticitě - HA mají aromatičtější charakter než FA (Rodríguez a kol., 2014). V kyselém prostředí (pod pH 2,0) jsou HA nerozpustné (Jones a Bryan, 1998). FA mají menší molekulovou hmotnost než HA, hodnoty se ale pro obě tyto frakce HL pohybují řádově v jednotkách kDa. **Huminy** nejsou ve vodě rozpustné při žádné hodnotě pH (Jones a Bryan, 1998; Domany a kol., 2002; McDonald a kol., 2004).

Přesné stanovení chemické struktury HL je obtížné, zcela známé nejsou ani mechanismy vzniku huminových látek, existují dvě základní teorie: 1) tvorba HL

rozkladem ligninu z odumřelých rostlin a 2) vznik HL polymerizací nebo kondenzací nízkomolekulárních látek pocházejících z degradace organického materiálu. Oba zmiňované procesy mohou zřejmě probíhat simultánně. HL patrně do jisté míry odrážejí strukturu výchozích organických látek (McDonald a kol., 2004). V prvkovém složení převažuje uhlík, kyslík a vodík, může se vyskytovat dusík, fosfor, síra (Jones a Bryan, 1998). Fulvokyseliny mají oproti huminovým kyselinám nižší obsah uhlíku a naopak vyšší obsah kyslíku (Baigorri a kol., 2007). Obecně jsou huminové látky tvořeny alifatickými i aromatickými úseky, obsahují velké množství kyslíkatých funkčních skupin, zejména karboxylové a fenolové (Jones a Bryan, 1998; Siéliechi a kol., 2008). Vzhledem k obsahu těchto ionizovatelných skupin převažuje u HL při pH nad hodnotu 4,0 záporný náboj (Duan a Gregory, 2003). Konformace huminových látek vykazuje změny v závislosti na pH, koncentraci vlastních HL, iontové síle roztoku. Agregace HL je podporována při klesajícím pH, rostoucí koncentraci HL a velké iontové síle. Huminové látky jsou schopny tvořit supramolekulární struktury, případně micelární struktury (McDonald a kol., 2004). Změny v konformaci HL nastávají také díky interakcím s dalšími látkami (Siéliechi a kol., 2008).

2.1.2 AOM

U povrchových vodních zdrojů je v současné době v souvislosti s eutrofizací hojně pozorován rozvoj sinic a řas, což vede k přítomnosti zvýšeného množství jejich produktů (AOM) ve vodě. Dochází tak ke změnám v koncentraci i charakteru NOM (Cheng a Chi, 2003). Mezi velmi často se vyskytující sinice patří např. zástupci rodu *Microcystis* (Jurczak a kol., 2005; Li a kol., 2012).

AOM je různorodá směs látek, obsahuje např. peptidy, proteiny, aminokyseliny, enzymy, polysacharidy, aminocukry, toxiny atd. (Li a kol., 2012). AOM se dělí na EOM (Extracellular Organic Matter) a IOM (Intracellular Organic Matter). EOM je produkován během života daných mikroorganismů v důsledku jejich metabolických procesů, IOM je označení pro materiál vznikající odumíráním organismů (Takaara a kol., 2007). Někdy je jako další kategorie uváděn materiál zadržovaný na povrchu buněk (Surface-retained Organic Matter – SOM) (Takaara a kol., 2010).

Produkce AOM se liší v závislosti na druhu a také stadiu životního cyklu organismu (Pivokonský a kol., 2006; Henderson a kol., 2008a; Leloup a kol., 2013). Ten sestává ze čtyř fází. Délka jejich trvání se může pro různé druhy lišit, ale průběh je

obdobný. Počáteční lag fáze, kdy dochází k adaptaci organismu na dané prostředí, je následována exponenciální fází, během které se populace velmi rychle rozrůstá. Poté se z důvodu úbytku živin v prostředí prudký rozvoj zastaví a velikost populace se stabilizuje – nastává stacionární fáze. Cyklus je zakončen fází úpadku, kdy dochází k odumírání buněk daných organismů. Množství vznikajících organických látek (OL) se v jednotlivých fázích mění. Výrazně stoupá při exponenciální fázi a maxima dosahuje ve stacionární fázi, při které jsou OL uvolňovány jednak v důsledku metabolické aktivity žijících organismů, jednak lýzou buněk. Ve fázi úpadku pak míra produkce OL opět klesá, organismy odumírají a metabolická aktivita je utlumena (Leloup a kol., 2013).

V závislosti na druhu a růstové fázi organismu se mění nejen množství, ale také charakter AOM. Např. sinice obsahují více proteinové složky oproti zeleným řasám. IOM obecně obsahuje více proteinové složky než EOM. Nezávisle na druhu byl během životního cyklu pozorován rostoucí podíl proteinové složky EOM. Celkově ale ve složení EOM převažují látky neproteinového charakteru, zejména monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy (Pivokonský a kol., 2006).

Charakter AOM je převážně hydrofilní. Dominantní podíl hydrofilní frakce byl prokázán u různých druhů mikroorganismů pro IOM i EOM. U IOM byl stanoven cca na 90 %, pro EOM o něco nižší, cca 60-70 %. Hydrofobní frakce u IOM činí kolem 10 %, u EOM cca do 30 %. Pouze malá část AOM je transfilní (pod 10 %) (Li a kol., 2012; Pivokonský a kol., 2014). Pro AOM jsou typické nízké hodnoty SUVA, které se mírně liší v závislosti na druhu a fázi životního cyklu organismu, pohybují se cca v rozmezí 0,1-1,8 l.m⁻¹mg⁻¹. Tyto hodnoty odpovídají hydrofilnímu (Pivokonský a kol., 2014) a málo aromatickému charakteru (Her a kol., 2004; Henderson a kol., 2008a). AOM obsahuje látky o různých molekulových hmotnostech a jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými druhy. Např. AOM *Microcystis aeruginosa* obsahuje 55% podíl OL nad 30 kDa a 38% podíl pod 1 kDa, *Chlorella vulgaris* 62% nad 30 kDa a 30% pod 1 kDa, *Asterionella formosa* 9% nad 30 kDa a 81% pod 1 kDa, *Melosira sp.* 28% nad 30 kDa a 53% podíl pod 1 kDa (Henderson a kol., 2008a).

2.1.2.1 Proteinová složka AOM

Proteinová složka tvoří podstatnou část IOM i EOM. Její podíl na složení IOM sinic činí 50-65 %, např. cca 50 % pro *Anabaena flos-aqua*, cca 65 % pro *Microcystis aeruginosa*. U zelených řas byl stanoven podíl proteinové složky na IOM nižší, cca 30 %

pro *Scenedesmus quadricauda* (Pivokonský a kol., 2006), podobně pro *Chlamydomonas geitleri* (Pivokonský a kol., 2014). U EOM závisí množství obsahu proteinů na fázi životního cyklu organismu, během kterého se zvyšuje. U sinic (*Anabaena flos-aqua*, *Microcystis aeruginosa*) dosahuje ve stacionární fázi podíl proteinové složky na EOM cca 30 %, u řas (*Scenedesmus quadricauda*) cca 20 %. AOM obsahuje různé druhy proteinů o molekulových hmotnostech (MH) v rozmezí jednotek až stovek kDa, přičemž proteinové složení IOM a EOM se liší. Např. z IOM *Anabaena flos-aqua* byly izolovány proteiny o molekulových hmotnostech kolem 18, 73, 190, 360 a více než 900 kDa, z EOM proteiny s MH 18 kDa a více než 900 kDa. IOM *Microcystis aeruginosa* obsahuje proteiny o MH 21, 85, 234, 359, 470, 900 kDa, EOM proteiny kolem 21 kDa a více než 900 kDa. V IOM *Scenedesmus quadricauda* byly stanoveny proteiny s MH 16, 73, 223, 900 kDa, v EOM kolem 16 kDa (Pivokonský a kol., 2006). S průběhem životního cyklu mikroorganismů stoupá diverzita proteinů v EOM (Pivokonský a kol., 2014). Různé hodnoty izoelektrických bodů pro proteiny obsažené v AOM svědčí o rozdílných nábojových charakteristikách jednotlivých proteinů, ale nad pH 4,0 obecně převažuje záporný náboj (Pivokonský a kol., 2012).

2.2 Organické látky při úpravě vody

2.2.1 Důvody odstraňování organických látek

Přítomnost NOM ve vodě negativně ovlivňuje její organoleptické vlastnosti (barvu, chuť, zápach) (Matilainen, 2010). Organické látky dále fungují jako prekurzory vzniku zdravotně závadných látek během hygienického zabezpečení (tzv. desinfection by-products - DBPs) (Bolto a kol., 2002; Jung a kol., 2005), v případě AOM je navíc problematický obsah sinicových toxinů (Harada, 2004). NOM mohou také podporovat nárůst mikroorganismů ve vodním distribučním systému (Volk a kol., 2000) a komplikovat některé metody úpravy vody. Za přítomnosti NOM bylo pozorováno např. zanášení membrán (Carroll a kol., 2000; Her a kol., 2004) nebo iontoměníčů (Bolto a kol., 2002). V případě dočišťování vody pomocí aktivního uhlí je nežádoucí kompetice NOM s látkami, které mají být touto technologií primárně odstraněny (Rodríguez a kol., 2014).

2.2.1.1 DBPs

Ke vzniku vedlejších produktů hygienického zabezpečení vody dochází za přítomnosti organických látek během chlorace, případně chloraminace (Marhaba a Van, 2000; Yang a kol., 2015) nebo při desinfekci vody pomocí bromu (Pu a kol., 2013). Chlor je obvyklý pro hygienické zabezpečení pitné vody (Marhaba a Van, 2000), brom je používán např. pro desinfekci bazénů (Pu a kol., 2013). DBPs zahrnují několik stovek látek (Yang a kol., 2015), přičemž mnoho z nich má škodlivé účinky na zdraví, zejména karcinogenní nebo genotoxické (Richardson a kol., 2007).

Mezi významné skupiny DBPs patří:

- trihalogenmethany (THMs) (Marhaba a Van, 2000; Yang a kol., 2015), např. chloroform (CHCl_3), bromoform (CHBr_3), bromdichlormethan (CHBrCl_2), dibromchlormethan (CHBr_2Cl) (Marhaba a Van, 2000)
- N-nitrosodimethylaminy (NDMAs) (Yang a kol., 2015; Li a kol., 2012)
- halogenoctové kyseliny (haloacetic acids - HAAs), např. kyselina bromoctová ($\text{C}_2\text{H}_3\text{BrO}_2$), dibromoctová ($\text{C}_2\text{H}_2\text{Br}_2\text{O}_2$), chloroctová ($\text{C}_2\text{H}_3\text{ClO}_2$), dichloroctová ($\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$) (Richardson a kol., 2007)
- halogenované acetonitrily (HANs), např. dichloracetonitril ($\text{C}_2\text{H}_2\text{NCl}_2$) nebo dibromacetonitril ($\text{C}_2\text{H}_2\text{NBr}_2$) (Pu a kol., 2013)
- halogenované furanony, např. MCA ($\text{C}_4\text{H}_2\text{Cl}_2\text{O}_3$), MX ($\text{C}_5\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_3$) (Zheng a kol., 2015).

Existuje ale celá řada dalších DBPs, přičemž jejich účinky na zdraví v mnoha případech nejsou známy (Richardson a kol., 2007). Množství vznikajících DBPs je úměrné koncentraci NOM ve vodě, např. potenciál pro tvorbu THMs během chlorace dosahuje desítek μg na mg DOC, potenciál pro tvorbu NDMAs během chloraminace řádově ng na mg DOC. Vliv má také charakter NOM. Např. pro AOM sinice *Microcystis aeruginosa* byl pozorován větší potenciál pro tvorbu DBPs u IOM oproti EOM. Velký význam má i typ a množství desinfekčního činidla. Při chloraminaci vzniká obecně méně THMs a HAAs než při chloraci, ale naopak roste tvorba NDMAs (Li a kol., 2012). Za využití bromu vznikají ve zvýšené míře oproti využití chloru HANs, které jsou obecně toxičtější než THMs. Se zvýšenou koncentrací desinfekčního činidla při neměnné koncentraci NOM byl pozorován vznik většího množství DBPs. Určujícím faktorem při tvorbě DBPs je

i hodnota pH, např. pro desinfekci vody pomocí volného bromu bylo pozorováno rostoucí množství vznikajících DBPs se stoupajícím pH od 5,0 do 9,0 (Pu a kol., 2013).

2.2.1.2 Toxiny

Sinice produkující toxiny škodící lidskému zdraví jsou běžnou součástí fytoplanktonu povrchových vod (Harada, 2004). V souvislosti s eutrofizací dochází k jejich rozvoji a nárůstu sinicové biomasy (Cheng a Chi, 2003) a úměrně tak stoupá i množství toxinů. Více jich je obsaženo v IOM oproti EOM (Li a kol., 2012). Aby se zamezilo jejich uvolňování, je žádoucí odstraňovat buňky sinic nepoškozené (Chow a kol., 1999). K desintegraci doposud celistvých buněk může docházet např. během chlorace (Li a kol., 2012; Zamyadi a kol., 2013), naopak porušení buněk působením koagulačního činidla ani mechanickými postupy při koagulaci (míchání) nebylo pozorováno (Chow a kol., 1999).

Mezi velmi běžně se vyskytující toxiny patří hepatotoxické microcystiny, běžným typem je microcystin-LR (Prakash a kol., 2009; Zamyadi a kol., 2013), dále např. MC-RR, MC-YR (Jurczak a kol., 2005). Microcystiny jsou produkovány např. rody *Microcystis*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Planktoniella*, *Oscillatoria*. Vedle akutní toxicity podporují microcystiny při chronickém působení vznik rakoviny jater (Prakash a kol., 2009). Hepatotoxicky působí i nodulariny a cylindrospermopsiny. Často se vyskytují také neurotoxické anatoxiny, např. anatoxin-a, homoanatoxin-a (Aráoz a kol., 2010) nebo saxitoxiny (Rositano a kol., 2001).

2.2.2 Metody a principy odstraňování organických látek

Obvyklým postupem pro odstraňování NOM při úpravě vody je koagulace za využití činidel na bázi kovů (typicky hliníku nebo železa) následovaná sedimentací, filtrací (Duan a Gregory, 2003) nebo flotací (Henderson a kol., 2008b). Existují i další metody (viz kapitola 2.2.2.4), které je mnohdy možné s koagulací kombinovat (Matilainen a kol., 2010).

2.2.2.1 Koagulace NOM

Při koagulaci jsou suspendované částice znečišťujících látek destabilizovány a agregují ve větší (odstranitelné) celky (Bernhardt a kol., 1985; Gregor a kol., 1997) -

vločky různých parametrů (velikost, struktura, pevnost) (Gonzalez-Torres a kol., 2014). Tímto postupem jsou běžně odstraňovány anorganické nečistoty, při optimalizaci podmínek je ale vhodný právě i pro NOM. Zásadními faktory, které v závislosti na charakteru NOM determinují účinnost koagulace, jsou hodnota pH (Gregor a kol., 1997) a typ a koncentrace koagulačního činidla (Volk a kol., 2000). Mezi běžně využívaná koagulační činidla patří např. síran hlinitý, chlorid hlinitý, síran železitý, chlorid železitý (Matilainen a kol., 2010). Z koagulačního činidla jsou disociací uvolňovány hlinité (Al^{3+}) resp. železité (Fe^{3+}) ionty, které následně podléhají hydrolyze, přičemž průběh hydrolyzy je silně závislý na hodnotě pH. Vznikat mohou i polymerní hydroxokomplexy, případně amorfni sraženina (Stumm a Morgan, 1996). Existují také činidla, která obsahují kov už v předpolymerizované podobě, např. polyaluminium chlorid (PACl) (Lin a kol., 2014), polyferric chlorid (Wang a kol., 2012) nebo polyferric sulfát (PFS) (Jiang a kol., 1993). Přítomnost organických látek v upravované vodě zpravidla vyžaduje zvýšené spotřeby koagulačních činidel a následně pak vzniká větší množství kalů (Matilainen, 2010; Wang a kol., 2014).

Většina znečišťujících částic (včetně NOM) nese při pH běžném pro povrchové vody záporný náboj, což vede k jejich koloidní stabilitě v důsledku elektrostatických repulzí (Stumm a Morgan, 1996). Jedním z hlavních mechanismů koagulace je nábojová neutralizace. Produkty hydrolyzy kovů z koagulačních činidel nesou v určitém rozmezí pH kladný náboj, který umožňuje interakce se zpravidla záporně nabitými částicemi znečišťujících příměsí (NOM). K nábojové neutralizaci obvykle dochází ve slabě kyselém pH při poměrně nízkých dávkách koagulačního činidla. Při určitých (vyšších) dávkách koagulačního činidla byla ale v některých případech pozorována nežádoucí restabilizace znečišťujících částic, která zabraňuje agregaci. Optimální dávka činidla závisí jak na množství a charakteru NOM, tak na hodnotě pH a bylo prokázáno, že souvisí s hodnotami zeta potenciálu interagujících složek systému. Při koagulaci se za určitých podmínek může uplatňovat také adsorpce NOM na povrchu hydrolytických produktů činidla (Duan a Gregory, 2003).

Dalším významným mechanismem koagulace je tzv. „sweep flocculation“ (Duan a Gregory, 2003; Matilainen a kol., 2010), v literatuře nazývaný také jako „sweep coagulation“ (Duan a kol., 2014) nebo „enmeshment“ (Huang a Shiu, 1996), kdy jsou při zvýšených dávkách koagulačního činidla částice nečistot zachycovány do „sraženiny“ hydroxidů kovu (Stumm a Morgan, 1996). K tomuto jevu dochází zpravidla v neutrálním nebo mírně zásaditém pH. V rámci koagulace nachází uplatnění také tvorba polymerních

můstků nebo hydrofobní interakce (Matilainen a kol., 2010). Průběh koagulace může být ovlivňován přítomností některých iontů, např. HCO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} (Duan a Gregory, 2003).

Jednotlivé složky NOM koagulují s různou účinností. Lépe koagulují velké molekuly, řádově nad 3-5 kDa, a hydrofobní molekuly (Cheng a Chi, 2003; Sharp a kol., 2006). Účinnost koagulace je v některých případech narušována tvorbou rozpuštěných komplexů mezi kovy a organickými látkami (Cheng, 2002; Šafaříková a kol., 2013). Charakter NOM obecně ovlivňuje účinnost koagulace – je tedy žádoucí optimalizovat parametry koagulace v závislosti na odstraňovaných látkách (Bolto a kol., 2002; Jung a kol., 2005).

2.2.2.2 Huminové látky a koagulace

Při koagulaci huminových látek se uplatňují různé mechanismy v závislosti na podmínkách koagulace (Duan a Gregory, 2003). Interakce HL s dalšími látkami jsou ovlivněny hodnotou pH, koncentrací vlastních HL, iontovou silou roztoku (Jones a Bryan, 1998). Zvýšená koncentrace elektrolytu může snižovat agregátní stabilitu HL (Baigorri a kol., 2007). V důsledku interakcí může docházet i ke změnám v konformaci huminových látek (Siéliéchi a kol., 2008).

Optimální pH pro koagulaci HA (za využití různých koagulačních činidel) se obvykle nachází v mírně kyselé oblasti, kdy je jako hlavní mechanismus uváděna nábojová neutralizace (Cheng, 2002; Lin a kol., 2014). Při použití činidel na bázi železa (obdobně pro FeCl_3 a PFS) bylo pozorováno rozšíření optimálního pH z rozmezí 4,0-5,0 na 4,0-7,0 se zvyšující se dávkou činidla (ze 2 mg.l^{-1} na 10 mg.l^{-1} Fe pro výchozí koncentraci HA 6 mg.l^{-1}). Větší množství činidla v tomto případě zřejmě kompenzuje změnu nábojových charakteristik s průběhem pH (rostoucí záporný náboj HA, klesající kladný náboj produktů hydrolyzy Fe). Pro vyšší dávky činidla pod pH 4,5 byl pozorován pokles v účinnosti koagulace v důsledku částečné restabilizace. Za optimálních podmínek byly HA odstraněny s více než 80% účinností, za hranicí optima ale následoval pokles pod 20 %, znatelně prudší pro PFS než pro FeCl_3 , patrně z důvodu rozdílného průběhu hydrolyzy jednotlivých činidel (Cheng, 2002). Rostoucí spotřeba činidla (FeCl_3) se stoupajícím pH při koagulaci HA byla pozorována i ve studii dalších autorů (Siéliéchi a kol., 2008). Jako možný důvod je vedle změn nábojových poměrů uváděna i změna konformace HA v závislosti na pH – při vyšších hodnotách pH poskytují HA více vazebných míst pro interakce s činidlem.

Optimální pH pro koagulaci HA za využití předpolymerizovaných činidel na bázi Al (polyaluminium chlorid – PACl- Al_{13} a PACl-C) bylo při konstantní dávce $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ Al na HA o koncentraci DOC 5 mg.l^{-1} stanoveno na 4,5-5,5 (odstranění až cca z 80 %), přičemž od určitého pH nastal prudký pokles účinnosti odstranění HA. Pro jednotlivá činidla (PACl- Al_{13} a PACl-C) byly ale pozorovány odlišnosti. Zatímco při pH 6,0 bylo dosaženo účinné koagulace pomocí PACl- Al_{13} při dávce odpovídající $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ Al, za využití PACl-C bylo pro srovnatelné zbytkové koncentrace HA potřebné množství odpovídající $4,0 \text{ mg.l}^{-1}$ Al a vyšší. Při daném pH se uplatňují tedy zřejmě rozdílné mechanismy – nábojová neutralizace pro PACl- Al_{13} a „sweep flocculation“ pro PACl-C (Lin a kol., 2014). Rozdílná účinnost různých předpolymerizovaných činidel (polyaluminium chlorid - PACl, tři varianty polyaluminium silicate chlorid - PASiC) byla pozorována také při koagulaci HA současně s kaolinovými částicemi. Nejlepšího odstranění organických látek bylo dosaženo pomocí PASiC, a to v mírně kyselém pH (cca mezi pH 5,0 a 6,0). Vedle nábojové neutralizace se při využití PASiC zřejmě uplatňuje i tvorba polymerních můstků (Yang a kol., 2013).

Při koagulaci huminových látek pomocí síranu hlinitého ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$) bylo dosaženo lepší účinnosti při pH 4,5 ve srovnání s pH 7,0, což naznačuje dominantní význam nábojové neutralizace (Wang a kol., 2014). Podobné výsledky byly zjištěny i při koagulaci HA za využití síranu hlinitého ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$), kdy bylo jako optimální stanoveno pH 5,0, přičemž byl pozorován stechiometrický vztah mezi výchozí koncentrací HA a potřebnou dávkou činidla (Huang a Shiu, 1996). Bylo zjištěno, že při koagulaci HA pomocí síranu hlinitého má význam i přítomnost SO_4^{2-} iontů a vedle nábojové neutralizace se uplatňují i interakce mezi HA a SO_4^{2-} (Duan a kol., 2014).

Vliv na koagulaci HA byl prokázán také pro fosforečnany. Při pH 4,0 byla s rostoucí koncentrací fosforečnanů při konstantní dávce činidla (síranu hlinitého) pozorována vyšší účinnost koagulace, zřejmě díky potlačení restabilizace částic. Naopak při hodnotách pH 7,0 a 8,0 s rostoucí koncentrací fosforečnanů účinnost koagulace klesala z důvodu kompetice mezi HA a fosforečnany o kladně nabitě hydrolytické produkty Al, kterých se stoupajícím pH ubývá (Cheng a kol., 2004).

2.2.2.3 AOM a koagulace

Sezónní výkyvy v množství a složení AOM mohou výrazně ovlivňovat kvalitu vody (Leloup a kol., 2013), což následně vyžaduje její adekvátní úpravu. Nastavení

optimálních podmínek koagulace AOM může být ale vzhledem k variabilním fyzikálním a chemickým vlastnostem této skupiny látek obtížné. Bylo např. prokázáno, že pro účinné odstranění AOM různých druhů mikroorganismů (*Chlorella vulgaris*, *Asterionella formosa*, *Melosira sp.*) jsou potřebné rozdílné dávky koagulačního činidla (Henderson a kol., 2010).

Neproproteinová složka AOM koaguluje oproti proteinové složce podstatně hůř (Pivokonský a kol., 2009). Zatímco proteiny obsahují řadu funkčních skupin (např. -OH, -COOH, -SH, -NH₃⁺, =NH₂⁺), které způsobují různé nábojové charakteristiky proteinů v závislosti na pH (Šafaříková a kol., 2013), neproteinová složka AOM je tvořena z velké části polysacharidy, které jsou elektricky neutrální. Navíc u nich dochází ke vzniku kompaktní hydratační vrstvy důsledkem přítomnosti velkého množství hydroxidových iontů (Pivokonský a kol., 2009). Zásadními faktory ovlivňujícími účinnost koagulace AOM jsou obdobně jako pro HL hodnota pH a dávka koagulačního činidla. Tyto parametry určují zbytkové koncentrace organických látek a koagulačního činidla ve vodě upravené koagulací (Pivokonský a kol., 2009; Šafaříková a kol., 2013).

Při koagulaci IOM *Microcystis aeruginosa* pomocí síranu železitého bylo nejnižších zbytkových koncentrací DOC dosaženo v rozmezí pH 4,5-6,5. Optimální pH bylo shodné pro různé výchozí koncentrace IOM i rozdílné dávky koagulačního činidla. Nejnižší zbytkové koncentrace Fe pak byly naměřeny při pH 5,5-7,0 (Pivokonský a kol., 2009). Obdobné hodnoty byly zjištěny pro koagulaci proteinové složky IOM pomocí síranu železitého. Nejnižší zbytkové koncentrace DOC byly dosaženy při pH cca 4,0-6,0; nejnižší zbytkové koncentrace Fe mezi hodnotami pH 4,0 a 7,0 v závislosti na výchozí koncentraci proteinů. Mezi pH 4,0 a 6,0 je jako hlavní mechanismus koagulace uváděna nábojová neutralizace mezi záporně nabitými proteiny a kladně nabitými Fe-hydroxopolymery. Nad pH 6,0 se pak může na koagulaci podílet adsorpce proteinů na povrchu hydrolytických produktů Fe, což ale závisí i na koncentraci AOM. Pod pH 4,0 a nad pH 7,0 byl pozorován prudký vzestup zbytkových koncentrací DOC i Fe – koagulace při tomto pH už zřejmě neprobíhá vůbec nebo minimálně (Pivokonský a kol., 2012).

Optimální dávka koagulačního činidla roste s výchozí koncentrací IOM (Pivokonský a kol., 2009), stejný trend vykazuje i proteinová složka IOM (Pivokonský a kol., 2012). Pro IOM *Microcystis aeruginosa* o koncentraci DOC 3 mg.l⁻¹ bylo dosaženo účinného odstranění už při dávce síranu železitého odpovídající 6 mg.l⁻¹ Fe, zatímco pro IOM o koncentraci DOC 7 mg.l⁻¹ byly nutné dávky podstatně vyšší. Při překročení určité koncentrace koagulačního činidla, kdy už se zvýšením dávky nedochází k lepšímu

odstranění AOM, byl ale pozorován prudký vzrůst zbytkových koncentrací kovu. Např. pro IOM o DOC 3 mg.l⁻¹ tomuto jevu odpovídá dávka 9 mg.l⁻¹ Fe a více, pro IOM o DOC 7 mg.l⁻¹ 18 mg.l⁻¹ Fe a více (Pivokonský a kol., 2009). Při koagulaci různých koncentrací IOM proteinů pomocí stejné dávky síranu železitého (odpovídající 7 mg.l⁻¹ Fe) byl pozorován posun optimálního pH pro dosažení nejnižších koncentrací zbytkového železa. Spodní hranice pH pro účinné odstranění Fe při koncentraci proteinů 8 mg.l⁻¹ DOC odpovídala pH 4,0; pro 1 mg.l⁻¹ DOC pH 5,5. To je vysvětlováno (při nízkém pH) nedostatkem záporně nabitých míst na povrchu proteinů, které by umožnily interakce s kladně nabitými produkty Fe (Pivokonský a kol., 2012).

Pro koagulaci EOM druhů *Anabaena flos-aquae* a *Asterionella formosa* byla stanovena rozdílná účinnost různých koagulačních činidel (síran hlinitý, síran železitý, PACl, PFS), a to při pH 7,5 a dávce činidla odpovídající 0,2 mmol.l⁻¹ Al nebo Fe. Největší podíl DOC byl za daných podmínek odstraněn pomocí PFS (70 %), nejmenší naopak pomocí PACl (34 %). Rozdíl mezi činidly byl pozorován i pro kombinaci EOM a HL, přičemž se stoupající koncentrací huminových látek (1-5 mg.l⁻¹) účinnost odstranění organických látek za jinak stejných podmínek klesala (Jiang a kol., 1993).

AOM může také ovlivňovat koagulaci anorganických nečistot (Takaara a kol., 2007; Takaara a kol., 2010; Šafaříková a kol., 2013). Za přítomnosti AOM *Microcystis aeruginosa* a jinak nezměněných podmínek (pH, typ a dávka činidla) byla pozorována podstatně horší koagulace kaolinových částic. Účinky IOM byly výraznější než EOM (Takaara a kol., 2007). Velký inhibiční efekt na koagulaci kaolinu může mít také SOM (Takaara a kol., 2010). Hodnoty pH potřebné pro účinné odstraňování kaolinu samostatně a pro kombinaci kaolinu a AOM se zřejmě liší, což dokládá studie srovnávající optima. Vhodné pH bylo za využití činidla na bázi Al stanoveno na 7,0-8,5 pro kaolin, zatímco pro proteiny (izolované z IOM *Microcystis aeruginosa*) + kaolin na 5,0-6,5; za využití činidla na bázi Fe pak na 6,4-8,0 pro kaolin, pro proteiny + kaolin na 4,0-6,0. Vyhovující hodnoty pH byly obdobné pro různé testované koncentrace proteinů (1-8 mg.l⁻¹ DOC). Ke koagulaci při současném obsahu kaolinu a proteinů docházelo i bez použití koagulačního činidla, a to při pH pod 4,5. Odstranění organických látek ale bylo méně účinné (jen asi 45%). Je zřejmé, že za určitých podmínek dochází k (zejména elektrostatickým) interakcím mezi produkty hydrolýzy koagulačního činidla (na bázi Al i Fe), kaolinem a proteiny. AOM tedy může mít v závislosti na koncentraci a také na parametrech koagulace i příznivé účinky na odstraňování znečišťujících látek (Šafaříková a kol., 2013).

Účinnost koagulace může být při určitých hodnotách pH narušována tvorbou rozpuštěných komplexů mezi kovy (Fe, Al) a AOM. Tento jev byl pozorován u proteinů izolovaných z IOM *Microcystis aeruginosa* při hodnotách pH cca 6,0 při využití činidla na bázi Fe a při pH cca 6,8 pro Al (Šafaříková a kol., 2013). Tvorba rozpuštěných komplexů snižuje množství činidla dostupného pro koagulaci a zároveň blokuje záporně nabitá místa na povrchu AOM, které by se mohly účastnit nábojové neutralizace nebo adsorpce. Komplexy zřejmě vznikají vazbou mezi (při daném pH) disociovanými karboxylovými skupinami proteinů a kladně nabitými produkty hydrolyzy kovu. Jako komplexotvorné byly určeny proteiny *Microcystis aeruginosa* s molekulovou hmotností cca 1; 2,8; 6; 6,8; 8; 8,5; 10; 52 kDa (Pivokonský a kol., 2012). Komplexotvorné proteiny byly izolovány i např. z AOM *Anabaena flos-aqua*. Za určitých podmínek koagulace (optimální pH, dostatečná dávka koagulačního činidla) lze ale tyto komplexy odstranit mechanismem „sweep flocculation“ (Pivokonský a kol., 2006).

2.2.2.4 Další metody odstraňování organických látek

Vedle koagulace existují i další metody pro odstraňování NOM, které mohou být alternativou nebo doplněním pro eliminaci složek NOM, které koagulují obtížně. Jednou z možností je využití aktivního uhlí (ve formě prášku nebo granulí), které funguje jako účinný adsorbent. Tato metoda je vhodná zejména pro velmi malé molekuly (pesticidy apod.), zajímavá je její aplikace pro odstranění nízkomolekulární složky NOM (Matilainen a kol., 2010). Další metodou je membránová filtrace. U membrán s porozitou v řádu kDa bylo ale v případě jejich samostatného použití pozorováno nedostatečné odstranění NOM (Domany a kol., 2002). Pro membrány s menší porozitou (mikrofiltrace, nanofiltrace) pak některé frakce NOM způsobují jejich ucpávání a snižování průtoku (Carroll a kol., 2000; Her a kol., 2004). Tento negativní efekt může být minimalizován zařazením koagulace před membránovou filtrací (Carroll a kol., 2000). S koagulací lze také kombinovat metody na bázi iontové výměny, které jsou vhodné zejména pro menší, silně nabitě částice (Bolto a kol., 2002). Další možností je využití předoxidace NOM za účelem zvýšení účinnosti následné koagulace. Jako předoxidační činidlo lze využít např. železan draselný (Ma a Liu, 2002), manganistan draselný, ozon nebo chlor; v některých případech je ale diskutabilní vznik DBPs v důsledku předoxidace (Henderson a kol., 2008b).

Koagulace zůstává zásadním a také ekonomicky přijatelným krokem při odstraňování NOM (Matilainen a kol., 2010). Je tedy žádoucí další výzkum objasňující její

principy a mechanismy v závislosti na charakteru znečišťujících látek aktuálně přítomných v surové vodě, jejich kombinacích a podmínkách koagulace. Organické látky navíc zřejmě mohou interagovat jak s anorganickými částicemi (Šafaříková a kol., 2013), tak mezi sebou (Tian a kol., 2013; Myat a kol., 2014).

3 Materiály a metodika

3.1 Příprava BSA

Jako modelová látka reprezentující proteinovou složku AOM byl použit protein BSA (Bovine Serum Albumin – hovězí sérový albumin). BSA je často využívaným zástupným proteinem pro laboratorní studie (Estey a kol., 2006; Ang a kol., 2007; Myat a kol., 2014), a to právě i jako látka představující organické látky přítomné ve vodě (Her a kol., 2003; Mo a kol., 2008; Hashino a kol., 2011; Tian a kol., 2013; Jiao a kol., 2015).

V této práci byl použit práškový standard BSA (Bovine Serum Albumin $\geq 98\%$, A7096, Sigma-Aldrich, USA). Výrobce deklarovaná molekulová hmotnost je 66 kDa, což souhlasí s údaji o BSA nalezenými v literatuře (Hirayama a kol., 1990) i vlastním měřením (viz kap. 4.1.3). Rozpuštěním příslušného množství v demineralizované vodě byl vytvořen roztok obsahující 1g.l^{-1} BSA. Koncentrace DOC tohoto roztoku byla stanovena na $571,5\text{mg.l}^{-1}$. Požadované experimentální koncentrace byly následně získávány ředěním demineralizovanou vodou.

3.2 Příprava huminových látek

Jako zdroj huminových látek byla použita přírodní vláknitá rašelina (Aqua Exotic, Slovensko). Rašelina byla louhována po dobu dvou měsíců v demineralizované vodě, vzniklý výluh byl následně filtrován (filtr $1,2\ \mu\text{m}$). Koncentrace DOC rašelinného výluhu byla stanovena na $18,6\text{mg.l}^{-1}$ DOC. Potřebné experimentální koncentrace byly poté připravovány ředěním demineralizovanou vodou.

3.3 Analýza rozpuštěného organického uhlíku (DOC)

Obsah rozpuštěného organického uhlíku byl stanoven pomocí analyzátoru Shimadzu TOC-V_{CPH} (Shimadzu Corporation, Japonsko). Rozpuštěný organický uhlík (DOC – Dissolved Organic Carbon) byl počítán jako rozdíl mezi celkovým obsahem uhlíku (TC – Total Carbon) a anorganickým uhlíkem (IC – Inorganic Carbon). Jako kalibrační standard pro stanovení TC byl použit hydrogenftalát draselný, pro stanovení IC hydrogenuhličitan sodný a bezvodý uhličitan sodný. Slepým vzorkem byla demineralizovaná voda, všechny měřené vzorky byly filtrovány přes $0,22\ \mu\text{m}$ membránový

filtr (Millipore, USA). Stanovení byla prováděna třikrát, přičemž chyba měření byla vždy menší než 2 %.

3.4 Stanovení podílu HL a BSA na DOC

Podíl huminových látek na zbytkových koncentracích DOC byl stanoven pomocí UV absorpance při 254 nm. Pro měření absorpance byl využit UV/VIS 8452A spektrofotometr (Agilent Technologies, USA) s 1 cm kyvetou. Při dané vlnové délce je absorpance zapříčiněna zejména přítomností aromatických jader a konjugovaných dvojných vazeb ve struktuře HL (Volk a kol., 2000; Wang a kol., 2014). Absorbance BSA při vlnové délce 254 nm je naopak zanedbatelná (pod hranicí meze detekce), což potvrzují i informace uváděné v literatuře (Myat a kol., 2014). Stanovení byla prováděna u vzorků po filtraci přes 0,22 µm membránový filtr (Millipore, USA). Jako slepý vzorek byla použita demineralizovaná voda. Stanovení byla prováděna vždy třikrát, chyba měření byla pod 5 %. Podíl BSA byl vypočten jako rozdíl mezi celkovou zbytkovou koncentrací DOC a zbytkovou koncentrací DOC HL podle rovnice (1).

$$\text{DOC}_{\text{BSA}} = \text{DOC}_{\text{celkem}} - \text{DOC}_{\text{HL}} \quad (1)$$

3.5 Stanovení molekulových hmotností

Relativní molekulové hmotnosti byly stanoveny pomocí HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography). Využity byly kolony Agilent Bio SEC-5 100 Å, 300 Å a 500 Å zapojené do série, přičemž separační rozsah byl 100-1 250 000 Da. Jako mobilní fáze byl použit 0,15 M fosfátový pufr (pH 7,0), průtok byl 1 ml.min⁻¹, teplota 23 °C. Nástřik vzorku byl o objemu 60 µl. HPSEC analýzy byly prováděny na HPLC (High Performance Liquid Chromatography) systému (1260 series, Agilent Technologies, USA) s použitím fluorescenčního detektoru (FLD - Fluorescence Detector). Detekce probíhala při vlnových délkách (excitační/emisní záření) 280/350 nm pro stanovení BSA (Her a kol., 2003; Myat a kol., 2012) a 320/450 nm pro stanovení HL (Her a kol., 2003; Rodríguez a kol., 2014). Molekulové hmotnosti byly určeny pomocí kalibrační křivky SEC standardů (Sigma-Aldrich, USA) o známých molekulových hmotnostech v rozmezí 224 Da a 900 kDa (D-Biotin; cyanocobalamin; aprotinin; cytochrom c; karboanhydráza; albumin; alkohol dehydrogenáza; apoferritin; thyroglobulin;

imunoglobulin). Kontrolními vzorky byly ovalbumin a γ -globulin (BioRad Laboratories, USA). Všechna měření byla prováděna třikrát, odchylka měření byla vždy pod 3 %.

3.6 Titrace HL a BSA

Za účelem stanovení množství funkčních skupin, které mohou při daném pH nést náboj, byly sestrojeny titrační křivky studovaných organických látek. Byl použit automatický titrátor Orion 960 (Thermo Scientific, USA), potenciometrická titrace byla provedena v prostředí dusíkové atmosféry při teplotě $25,0 \pm 0,2$ °C. Vzorky HL/BSA byly připraveny ředěním jejich zásobních roztoků (viz kap. 3.1 a 3.2) s 0,1 M roztokem NaCl, který byl použit i pro slepé stanovení. Titrace probíhaly z pH 11,0 (vzorky byly alkalizovány za využití 1 M NaOH) do pH 2,0 pomocí 0,05 M HCl. Body ekvivalence (pEq) a disociační konstanty (pK) byly určeny na základě derivace titrační křivky. Počty specifických funkčních skupin byly vypočteny jako rozdíl přijatých H^+ iontů mezi dvěma sousedními body ekvivalence dle rovnice (2) (Chang, 2005).

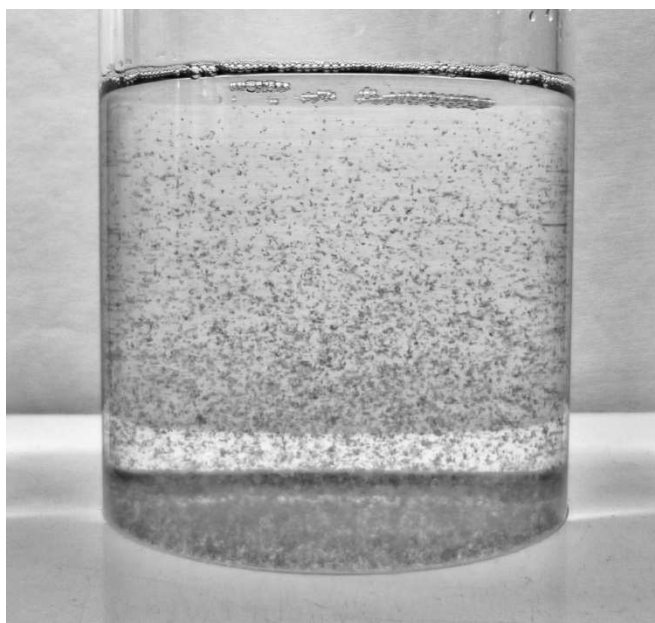
$$N_R = N_H^+(I_1) - N_H^+(I_2) \quad (2)$$

N_R vyjadřuje počet specifických funkčních skupin, $N_H^+(I_1)$ množství přidaných H^+ iontů v bodě ekvivalence 1 (kde začíná disociace dané skupiny), $N_H^+(I_2)$ množství přidaných H^+ iontů v bodě ekvivalence 2 (kde disociace dané skupiny ustává).

3.7 Optimalizační sklenicové zkoušky

Koagulační pokusy (sklenicové zkoušky) byly prováděny na osmimístné míchací koloně (LMK 8-03, Ústav pro hydrodynamiku AV ČR, v.v.i.). Probíhaly čtyři typy sklenicových zkoušek: 1) BSA + $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$; 2) huminové látky (HL) + $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$; 3) BSA + HL + $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$; 4) BSA + HL bez $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$. Pro sklenicové zkoušky byla použita demineralizovaná voda s obsahem organických látek (HL a/nebo BSA) 5-13 $mg \cdot l^{-1}$ DOC. Hodnota $KNK_{4,5}$ byla upravena na 1,5 $mmol \cdot l^{-1}$. Požadovaných hodnot pH (v rozsahu 2,5-8,5) bylo dosaženo pomocí 0,1 M HCl a 0,1 M NaOH. Homogenizační míchání probíhalo při středním gradientu rychlosti $\bar{G} = 150 s^{-1}$ po dobu 1 minuty. Vlastní agregace pak probíhala při $\bar{G} = 30 s^{-1}$ po dobu 14 minut u zkoušek s koagulačním činidlem a při $\bar{G} = 20 s^{-1}$ po dobu 44 minut u zkoušek bez koagulačního činidla. Po míchání následovala fáze sedimentace (60 minut). Ukázka sedimentujících

vloček je uvedena na obr. 1. U každého vzorku byla následně stanovena hodnota pH a KNK_{4,5}. Pro další stanovení – zbytkové koncentrace DOC (případně rozlišení DOC BSA a DOC HL) a u sklenicových zkoušek s použitím koagulačního činidla pro určení zbytkové koncentrace hliníku – byly vzorky navíc odstředěny (20 minut při RCF 1470 g). Sklenicové zkoušky a veškerá následná stanovení byly prováděny třikrát, chyba měření je uváděna v příslušných kapitolách.



Obr. 1: Ukázka sedimentujících vloček po koagulaci organických látek pomocí síranu hlinitého (za optimálních podmínek koagulace)

3.8 Stanovení zbytkových koncentrací hliníku, stanovení pH, stanovení KNK

Zbytkové koncentrace Al byly stanoveny po reakci s pyrokatecholovou violetí spektrofotometricky, a to při vlnové délce 580 nm na přístroji Spekol 11 (Carl Zeitz Jena, SRN). Hodnota pH byla měřena potenciometricky za využití přístroje Accumet AB15 plus (Fisher Scientific, USA) s elektrodou Blue Line 13 pH. KNK (kyselinová neutralizační kapacita) byla stanovena titrací 0,1 M HCl za využití methylooranže jako indikátoru. Podrobnější metodiky stanovení výše uvedených parametrů popisuje Horáková a kol. (2003). Měření byla prováděna třikrát, chyba stanovení byla menší než 5 %.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Koagulace HL a BSA samostatně

Zásadními faktory ovlivňujícími účinnost koagulace organických látek jsou dávka koagulačního činidla a hodnota pH (Gregor a kol., 1997; Volk a kol., 2000; Duan a Gregory, 2003). Pro huminové látky i protein BSA byly provedeny sklenicové zkoušky za účelem objasnění vlivu těchto parametrů na koagulaci jednotlivých látek.

4.1.1 Vliv dávky koagulačního činidla

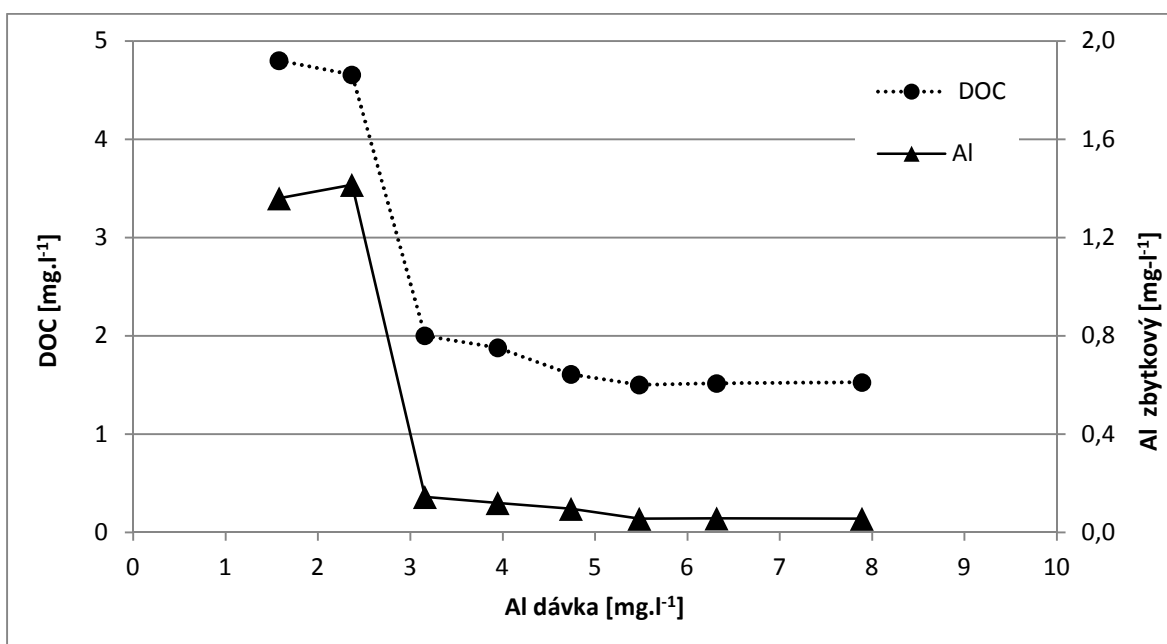
Byly testovány různé dávky koagulačního činidla (odpovídající 0,2-8,0 mg.l⁻¹ Al), a to při pH 6,0 – tato hodnota odpovídá předpokládanému rozmezí účinné koagulace organických látek pomocí síranu hlinitého (Gregor a kol., 1997; Matilainen a kol., 2010). Ukázalo se, že potřebné dávky koagulačního činidla pro účinné odstranění huminových látek a BSA se výrazně liší. Při výchozí koncentraci DOC 5 mg.l⁻¹ a pH 6,0 byla jako optimální stanovena dávka odpovídající 5,5 mg.l⁻¹ Al pro HL (viz obr. 2), zatímco pro BSA jen 1,2 mg.l⁻¹ (viz obr. 3). Při těchto dávkách koagulačního činidla bylo dosaženo nejnižších zbytkových koncentrací DOC (1,5 mg.l⁻¹ pro HL; 0,7 mg.l⁻¹ pro BSA). Se stoupající dávkou činidla nad stanovené optimum nebylo pozorováno efektivnější odstranění HL ani BSA. Ustálení účinnosti odstranění organických látek při dosažení určité dávky činidla je běžné jak pro huminové látky (Liu a kol., 2011; Wang a kol., 2014), tak pro AOM (Pivokonský a kol., 2009, 2012). Také zbytkové koncentrace Al byly při výše uvedených optimálních dávkách koagulačního činidla nejnižší (pod 0,1 mg.l⁻¹ Al pro HL i pro BSA).

Zjištěná optimální dávka činidla pro koagulaci HL se shoduje např. se studií Jung a kol. (2005), kde je uváděno jako optimum (při pH 6,0) 1 mg Fe na 1 mg DOC huminových látek. Např. Huang a Shiu (1996) ale stanovuje optimální dávku výrazně nižší. To může být vysvětleno tím, že HL jsou v dané studii zastoupeny pouze určitou frakcí (HA), přičemž různé frakce HL (huminové kyseliny, fulvokyseliny) mají patrně rozdílné vlastnosti, které jsou pro koagulaci určující - např. nábojovou hustotu (Collins a kol., 1986).

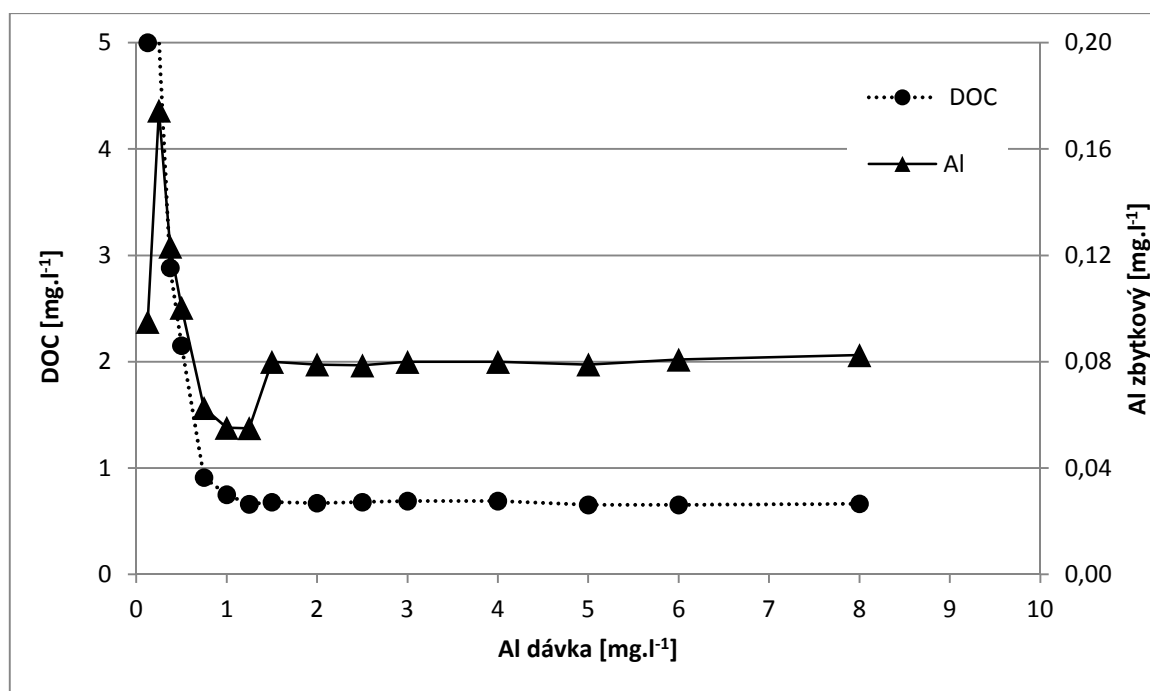
Dávka činidla optimální pro BSA je o něco nižší než dávky stanovené jako vhodné pro koagulaci sinicových proteinů (Pivokonský a kol., 2012). To může být dáno

do souvislosti s molekulovou hmotností – BSA má velkou MH, zatímco sinicové proteiny obsahují i nízkomolekulární frakci (Pivokonský a kol., 2006, 2014).

Je patrné, že optimální dávku koagulačního činidla nelze stanovit pouze na základě výchozí koncentrace NOM - významný vliv má charakter organických látek, který je třeba zohlednit. Dávky, při kterých je BSA účinně odstraňováno, jsou pro koagulaci huminových látek zcela nedostatečné. Vysoké zbytkové koncentrace DOC při nízkých dávkách koagulačního činidla zároveň korespondují se zvýšenými zbytkovými koncentracemi Al (viz obr. 2 a 3). Totéž pozoruje např. i Chov a kol. (1999) při koagulaci AOM produkovaných sinicí *Microcystis aeruginosa* pomocí síranu hlinitého – při dávce činidla poloviční oproti optimu byly stanoveny vyšší zbytkové koncentrace Al než při optimální dávce činidla. To je zřejmě způsobeno tím, že dané množství Al nepostačuje pro vznik sedimentujících (odstranitelných) částic (Gregor a kol., 1997).



Obr. 2: HL - Zbytkové koncentrace DOC a Al v závislosti na dávce koagulačního činidla (vyjádřeno jako Al) při pH 6; výchozí DOC HL 5 mg.l⁻¹



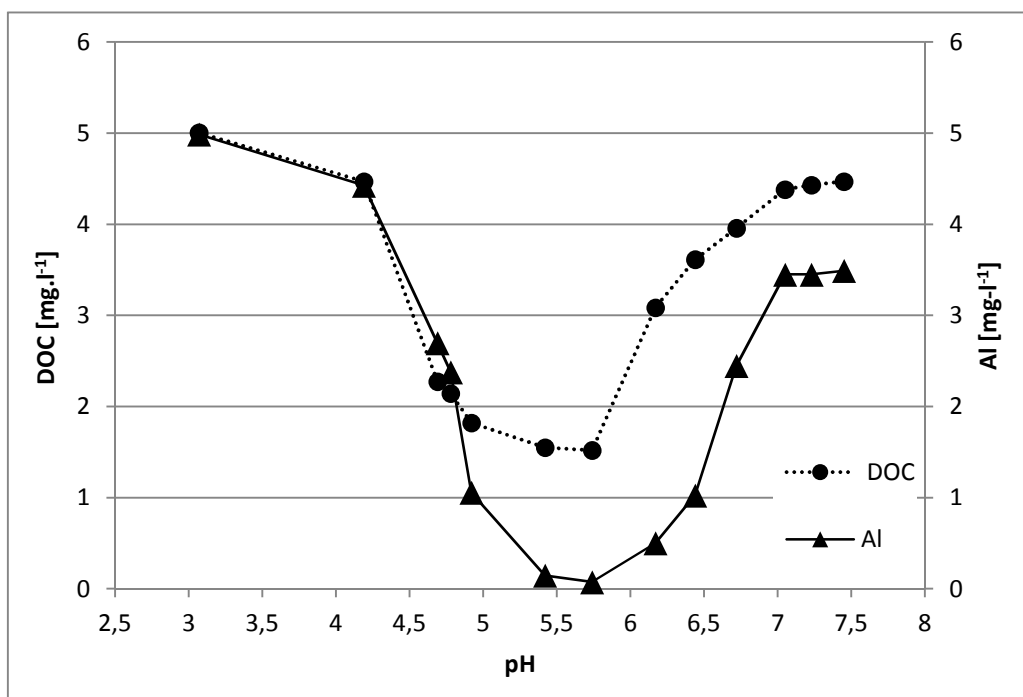
Obr. 3: BSA - Zbytkové koncentrace DOC a Al v závislosti na dávce koagulačního činidla (vyjádřeno jako Al) při pH 6; výchozí DOC BSA 5 mg.l⁻¹

4.1.2 Vliv hodnoty pH

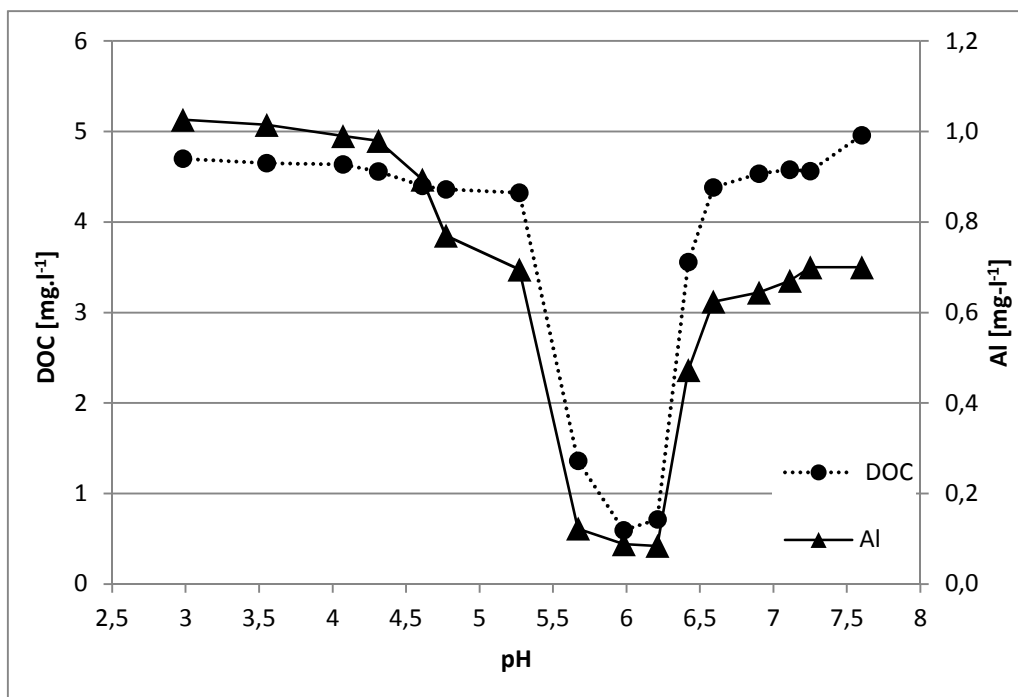
Sklenicové zkoušky při různých hodnotách pH (3,0-7,5) byly provedeny vždy s optimální dávkou činidla pro danou látku (HL nebo BSA). Je patrné, že pH má zásadní vliv na koagulaci obou studovaných látek.

Huminové látky byly s nejvyšší účinností (cca 70 % DOC) odstraněny při hodnotách pH 4,9-5,7. Nejnižší zbytková koncentrace DOC byla stanovena na 1,5 mg.l⁻¹ DOC, a to při pH 5,7. V rámci uvedeného rozmezí pH bylo dosaženo i nejnižších zbytkových koncentrací hliníku (0,1 mg.l⁻¹ Al). Mimo optimální pH rostou zbytkové koncentrace DOC i Al. Nad pH 6,5 už k odstranění HL takřka vůbec nedochází, podobně je tomu pod pH 4,5. Průběh koagulace HL v závislosti na pH je zobrazen na obr. 4. Stanovené optimum pH se shoduje se studiemi Lu a kol. (1999) a Cheng a kol. (2004), kde jsou pro koagulaci HL rovněž použita činidla na bázi hliníku. Srovnatelné výsledky byly dosaženy i při koagulaci HL pomocí předpolymerizovaného činidla (PACl): optimum v rozmezí 4,0-5,5; nad pH 6,0 prudký vzestup zbytkového DOC (Lin a kol., 2014).

Nejlepšího odstranění BSA (cca 80 % DOC) bylo dosaženo v rozmezí pH 5,7-6,2. Minimální zbytková koncentrace DOC činí $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$ DOC a byla dosažena při pH 6,0. V uvedeném rozmezí pH byly stanoveny i nejnižší zbytkové koncentrace hliníku (minimum $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ Al při pH 6,0-6,2). Mimo optimální pH prudce stoupají zbytkové koncentrace DOC i Al. Při hodnotách pod 5,5 a nad 6,5 je odstraněno už jen méně než 20 % BSA. Účinnost koagulace v závislosti na pH je znázorněna na obr. 5. Optimální pH pro koagulaci BSA je užší než optima pro sinicové proteiny (Pivokonský a kol., 2012; Šafaříková a kol., 2014), ale hodnoty se překrývají. To je patrně způsobeno tím, že sinicové proteiny jsou směsí látek o různých vlastnostech (rozdílné molekulové hmotnosti, nábojové charakteristiky (Pivokonský a kol., 2006, 2009, 2012) – rozsah optima pro jednotlivé složky se může lišit), zatímco BSA je pouze jeden protein bez příměsí a zmiňované vlastnosti jsou jasně dané. Obdobně lze odůvodnit i to, že u BSA je oproti huminovým látkám (které obsahují rozdílné frakce) patrný prudší vzrůst zbytkových koncentrací DOC i Al mimo optimální pH.



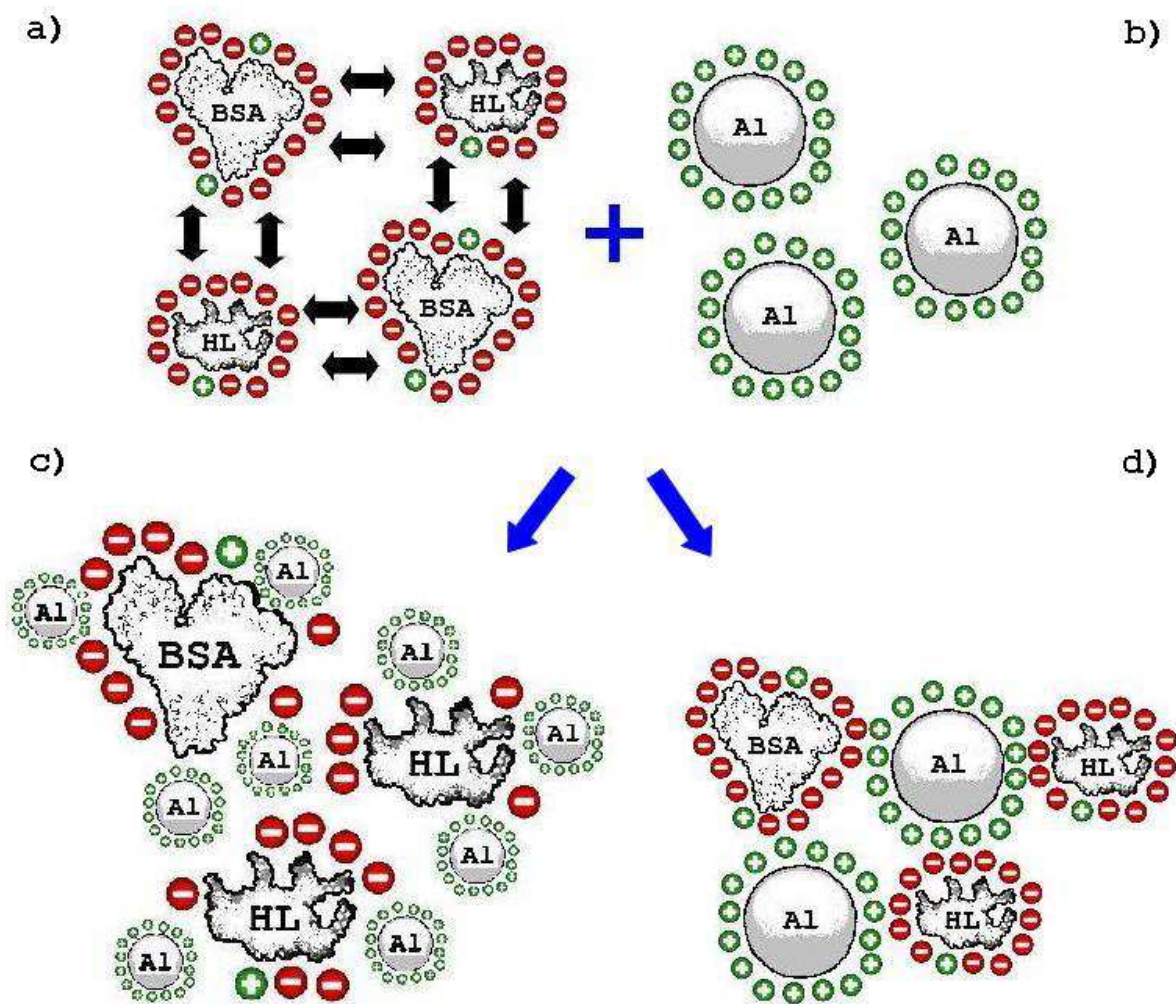
Obr. 4: HL - Zbytkové koncentrace DOC a Al po koagulaci HL v závislosti na pH (výchozí DOC 5 mg.l^{-1}); dávka koagulačního činidla odpovídá $5,5 \text{ mg.l}^{-1}$ Al



Obr. 5: BSA - Zbytkové koncentrace DOC a Al po koagulaci BSA v závislosti na pH (výchozí DOC 5 mg.l⁻¹); dávka koagulačního činidla odpovídá 1,2 mg.l⁻¹ Al

4.1.3 Mechanismy koagulace

Optimální koagulace obou studovaných látek (HL a BSA) bylo dosaženo v oblasti mírně kyselého pH. Vzhledem k zásadnímu vlivu hodnoty pH na účinnost koagulace je patrné, že velký význam mají nábojové charakteristiky interagujících složek systému, které jsou určovány právě hodnotou pH. Jako hlavní mechanismus koagulace HL v mírně kyselém pH je obvykle uváděna nábojová neutralizace (Cheng a kol., 2004; Jung a kol., 2005; Wang a kol., 2014). Huminové látky obsahují velké množství ionizovatelných skupin, jejichž disociací získávají HL při určitých hodnotách pH záporný náboj (Jones a Bryan, 1998; Siéličchi a kol., 2008). Hodnoty disociačních konstant pK daných skupin se mohou lišit v závislosti na jejich lokaci v rámci molekuly v důsledku působení fyzikálních a chemických faktorů (Masini, 1993). Záporný náboj huminových látek obecně ale převažuje nad hodnotou pH 4,0 (Duan a Gregory, 2003). Při stanoveném optimálním pH (4,9-5,7) jsou tedy HL záporně nabitě a v důsledku elektrostatických repulzí koloidně stabilní. U produktů hydrolyzy Al při tomto pH převažuje kladný náboj (Stumm a Morgan, 1996), který umožňuje neutralizaci, destabilizaci a následnou agregaci organických látek (Duan a kol., 2014). Elektrostatické repulze i interakce jsou znázorněny na obr. 6.



Obr. 6: Znázornění procesu koagulace HL a BSA s využitím činidla na bázi Al: a) repulze mezi organickými látkami v důsledku převažujícího záporného náboje; b) přidavek koagulačního činidla; c) nábojová neutralizace (destabilizace) OL působením činidla; d) adsorpce OL na povrchu hydroxidů hliníku

Pozn.: různé formy hydrolytických produktů Al jsou zjednodušeně prezentovány jako „Al“

Vedle nábojové neutralizace se na koagulaci zejména při vyšších hodnotách optimálního pH může podílet i adsorpce na povrchu hydroxidů hliníku (Duan a Gregory, 2003). Lu a kol. (1999) pro koagulaci huminových látek pomocí síranu hlinitého zdůrazňuje význam adsorpce nad pH 5,0, což koresponduje i s pH stanoveným za optimální v této práci. K adsorpci dochází díky rozdílným nábojům na povrchu

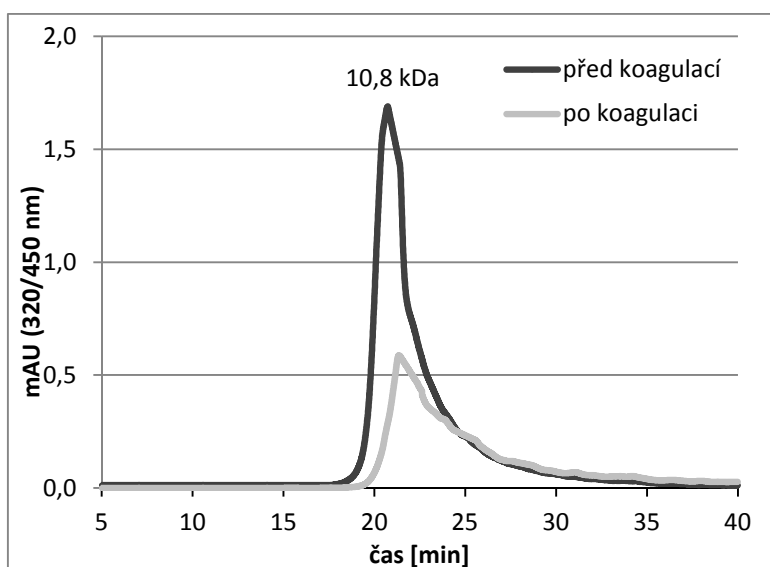
interagujících látek (Duan a Gregory, 2003; Matilainen a kol., 2010), uplatňovat se ale může i tvorba vodíkových můstků (Bernhardt a kol., 1985). Adsorpci znázorňuje obr. 6d.

Nábojová neutralizace je patrně hlavním mechanismem koagulace i pro BSA. Při pH optimálním pro koagulaci tohoto proteinu (5,7-6,2) převažuje u molekul BSA záporný povrchový náboj - hodnota izoelektrického bodu BSA je 4,7 (Norde a Favier, 1992; Ang a Elimelech, 2007), což umožňuje elektrostatické interakce s produkty hydrolýzy Al (obdobný mechanismus jako pro HL). Tento princip koagulace je jako dominantní uváděn i pro sinicové proteiny (Pivokonský a kol., 2012) i AOM celkově (Gonzalez-Torres a kol., 2014). Obdobně jako u huminových látek se na koagulaci BSA může rovněž podílet i adsorpce na povrchu hydroxidů hliníku.

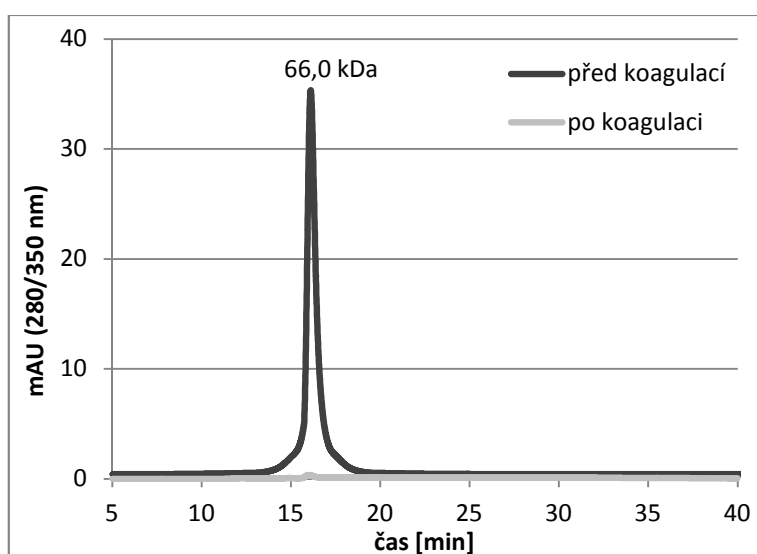
Protein BSA je koagulací odstraňován s velmi velkou účinností (téměř 90 %), přičemž postačující dávka činidla je poměrně nízká ($1,2 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Al}$). Maximální odstranění huminových látek je o něco méně účinné (nepřesahuje 70 %) a potřebná dávka koagulačního činidla je vyšší ($5,5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Al}$). Jedním z důvodů může být to, že BSA má velkou molekulovou hmotnost (66 kDa) - je známo, že látky s velkou molekulovou hmotností obvykle dobře koagulují (Bolto a kol., 2002; Cheng a Chi, 2003; Sharp a kol., 2006). Analýzu molekulových hmotností studovaných látek před a po koagulaci znázorňují obr. 7 a 8. Molekulová hmotnost BSA byla dle předpokladu stanovena na 66 kDa. Molekulová hmotnost huminových látek je celkově podstatně menší, dominuje složka kolem 10 kDa a méně. Z MH zbytkových organických látek po koagulaci (v optimu) je patrné, že složky s vyššími molekulovými hmotnostmi jsou odstraňovány takřka úplně a na zbytkových koncentracích OL se tedy podílí zejména nízkomolekulární frakce (pod 10 kDa). To souvisí také s nábojovou hustotou, která je vyšší pro látky s menší molekulovou hmotností. Takovéto částice pak hůře podléhají destabilizaci (Collins a kol., 1986). Z titračních křivek HL a BSA zobrazených na obr. 9 a 10 vyplývá, že HL nesou oproti BSA podstatně více skupin schopných přijmout/odštěpit proton, a tedy nést náboj v závislosti na pH. Přibližně do pH 8,0 lze předpokládat, že náboj studovaných organických látek je zapříčiněn zejména disociací kyselých karboxylových skupin, nad touto hodnotou pak začínají mít vliv bazické skupiny (Collins a kol., 1986). Konkrétní hodnoty disociačních konstant (pK) specifických skupin se liší v závislosti na jejich umístění v rámci molekuly (Masini, 1993). U HL i BSA bylo stanoveno více disociačních konstant odpovídajících hodnotám pro karboxylové skupiny. Zatímco ale huminové látky obsahují průměrně 9 COOH skupin na 1 g DOC, u BSA je to průměrně jen 1,5 COOH

skupin na 1 g DOC (vypočteno z titračních křivek viz obr. 9 a 10 podle rovnice (2) uvedené v kap. 3.6).

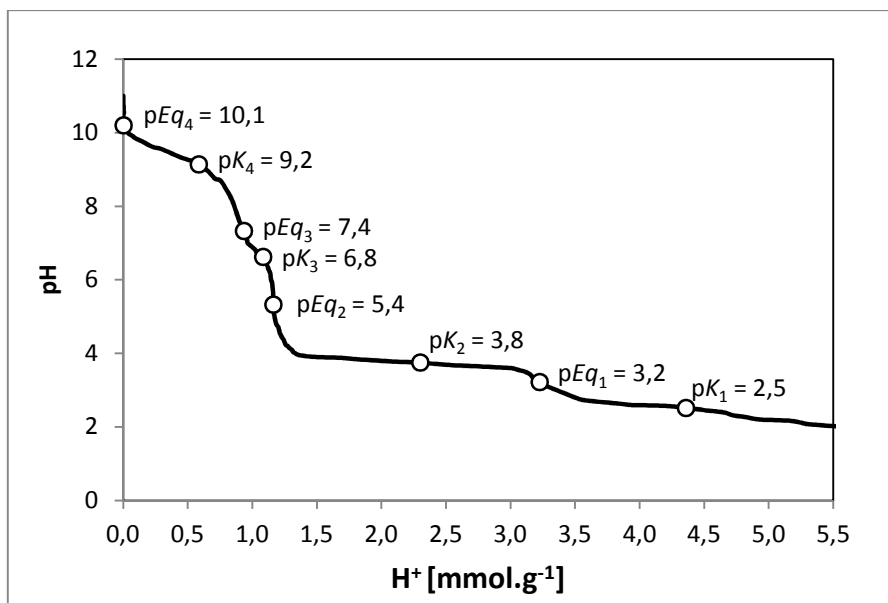
V rámci huminových látek jsou koagulací lépe odstraňovány HA než FA, které jsou menší a mají vyšší nábojovou hustotu (Gregor a kol., 1997). To souhlasí i se zjištěním, že např. Huang a Shiu (1996), kteří pracují pouze s HA, stanovují jako optimální nižší dávky činidla oproti této práci, která využívá přírodní výluh HL obsahující huminové kyseliny i fulvokyseliny.



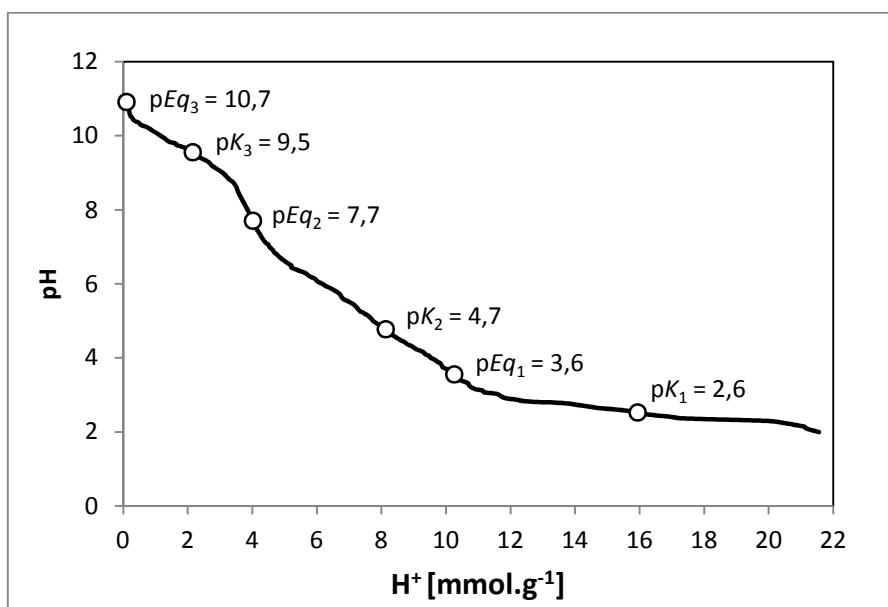
Obr. 7: HL – analýza molekulových hmotností před koagulací a po koagulaci v optimu



Obr. 8: BSA – analýza molekulových hmotností před koagulací a po koagulaci v optimu



Obr. 9: HL – titrační křivka s body ekvivalence (pEq) a disociačními konstantami (pK)



Obr. 10: BSA – titrační křivka s body ekvivalence (pEq) a disociačními konstantami (pK)

Vliv na koagulaci může mít také přítomnost SO_4^{2-} iontů pocházejících z koagulačního činidla. Síranový aniont ovlivňuje elektrický potenciál hydrolytických produktů Al – snižuje u nich množství kladného náboje (Duan a Gregory, 2003; Duan a kol., 2014). Důsledkem je rozšíření rozmezí pH, ve kterém dochází ke tvorbě separovatelných vloček, a to do kyselé oblasti (Duan a Gregory, 2003). Obsah SO_4^{2-} iontů v roztoku může také ovlivňovat jeho iontovou sílu a napomáhat tak kompresi stabilizující

elektrické dvojvrstvy, která při určitých hodnotách pH obklopuje organické znečišťující částice. Vedle vlivu síranového aniontu na elektrostatické interakce lze očekávat také tvorbu chemických vazeb mezi SO_4^{2-} a organickými látkami. Ovlivněn je i charakter vznikajících vloček – např. při koagulaci huminových látek pomocí síranu hlinitého byla pozorována tvorba větších vloček oproti koagulaci pomocí dusičnanu hlinitého (Duan a kol., 2014).

Při nízkých hodnotách pH (pod hranicí optima) koagulace ustává. Hydrolytické produkty hliníku nesou v dané oblasti pH kladný náboj (Duan a Gregory, 2003), který začíná převažovat i u organických látek. Takové nábojové poměry nejsou příznivé pro působení mechanismů, které jsou pro koagulaci studovaných látek patrně zásadní.

Při vyšších hodnotách pH (u HL i BSA shodně nad pH 6,5) ke koagulaci takřka nedochází. U organických látek stále převažuje (sílí) záporný náboj. Karboxylové skupiny jsou v alkalickém prostředí více deprotonovány (Collins a kol., 1986), zvyšuje se nábojová hustota OL (Bernhardt a kol., 1985). Např. Lin a kol. (2014) pozoruje nad pH 6,0 velmi prudký pokles zeta potenciálu OL (nabývá silně záporných hodnot). U hydrolytických produktů Al ale začínají ve vyšších hodnotách pH převládat neutrální, případně pak záporně nabitě formy (Duan a Gregory, 2003; Lu a kol., 1999) a dochází tak k inhibici elektrostatických interakcí mezi složkami systému. Hodnota izoelektrického bodu hydroxohlinitanů může záviset na řadě faktorů, za využití síranu hlinitého se ale dá předpokládat kolem pH 8,0 (Duan a Gregory, 2003). Ačkoli koagulace OL nad pH 6,5 už neprobíhá, zbytkové koncentrace Al (v rozmezí pH 6,5-7,5) jsou nižší než koncentrace výchozí. To může být způsobeno částečným vysrážením amorfního hydroxidu hlinitého, jehož výskyt je v neutrální oblasti pH dominantní. Ten je schopen precipitace, ale je celkově elektricky neutrální (Duan a Gregory, 2003), což nepodporuje vznik elektrostatických interakcí s OL. K odstranění organických látek mechanismem „sweep flocculation“ (popsáno v kapitole 2.2.2.1.) v oblasti neutrálního pH při daných dávkách koagulačního činidla patrně nedochází.

4.2 Koagulace HL a BSA současně – s koagulačním činidlem

V povrchových vodních zdrojích se zcela běžně vyskytují různé typy NOM současně (Marhaba a Van, 2000; Sharp a kol., 2006). Je tedy žádoucí posuzovat i jejich vzájemné působení, které může během koagulace nastat a ovlivnit tak její účinnost.

4.2.1 Vliv dávky koagulačního činidla

Potřebná dávka koagulačního činidla pro odstranění HL a BSA současně (pro DOC 10 mg.l⁻¹; z toho 5 mg.l⁻¹ HL a 5 mg.l⁻¹ BSA) odpovídá 1,6 mg.l⁻¹ Al. To je podstatně méně než pro koagulaci HL o výchozím DOC 5 mg.l⁻¹ samostatně (5,5 mg.l⁻¹ Al) a naopak více než pro koagulaci BSA o výchozím DOC 5 mg.l⁻¹ samostatně (1,2 mg.l⁻¹ Al). Je tedy patrné, že přítomnost BSA pozitivně ovlivňuje koagulaci HL a naopak.

Podobný jev pozoroval např. Wang a kol. (2014) pro kombinaci HL a přírodních organických koloidních látek nehumínového charakteru (organic colloids – OC) při koagulaci za pomoci síranu hlinitého (Al₂(SO₄)₃.14H₂O). Za přítomnosti OC a jinak stejných podmínek docházelo k lepšímu odstranění HL, naopak přidavek HL k OC způsoboval jejich horší odstranění, případně zvýšení potřebné dávky koagulačního činidla. Horší koagulace OC byla pozorována už při koncentraci HL 1 mg.l⁻¹ DOC. Charakter použitých OC není jasně definován, ale negativní vliv HL na koagulaci nehumínových látek je patrný. Tyto výsledky se shodují i se studií pro kombinaci AOM produkovaných rozsivkou *Asterionella formosa* a huminových látek, ve které byla navíc testována různá koagulační činidla, a to jak na bázi hliníku, tak železa (síran hlinitý, síran železitý, PACl, PFS). Přítomnost HL ve všech případech snižovala účinnost koagulace, případně vyžadovala vyšší dávky činidla (Jiang a kol., 1993). Naopak pozitivní vliv proteinů na koagulaci byl při určitých hodnotách pH pozorován i např. pro kombinaci proteinů a anorganických nečistot – Šafaříková a kol. (2013) toto potvrzuje pro proteinovou složku sinice *Microcystis aeruginosa* a kaolinové částice.

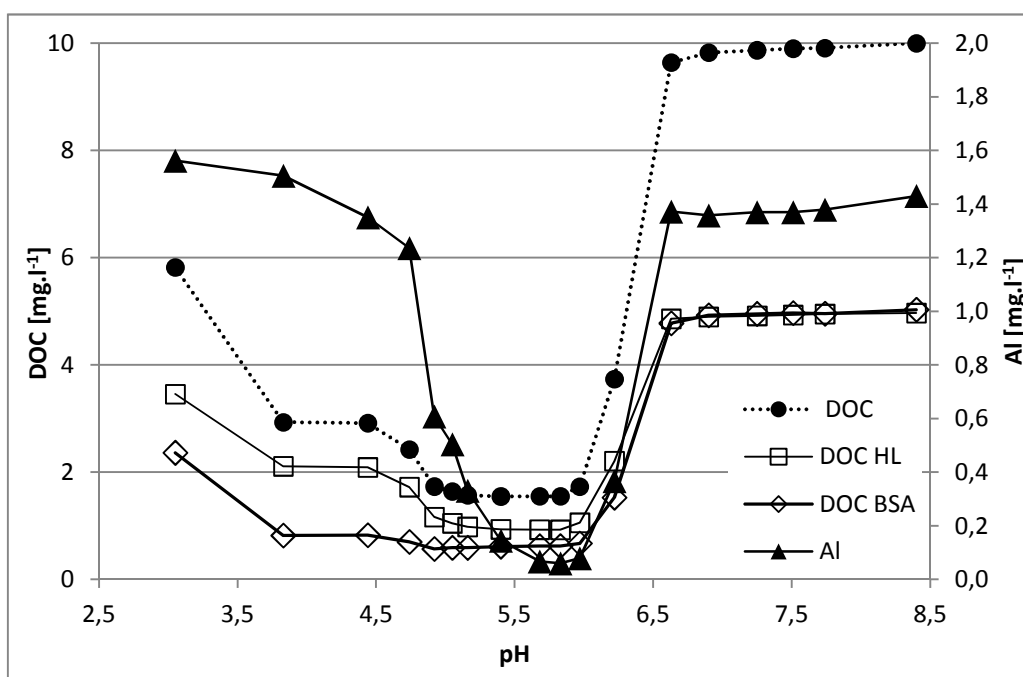
4.2.2 Vliv hodnoty pH

Při koagulaci HL a BSA současně bylo dosaženo nejlepšího odstranění organických látek (nad 80 % DOC) v rozmezí pH 4,9-6,0; nejnižších zbytkových koncentrací Al (přibližně 0,1 mg.l⁻¹) v rozmezí pH 5,4-6,0. Nejnižší zbytková koncentrace DOC činí 1,6 mg.l⁻¹, a to v rozmezí pH 5,2-5,8. Průběh koagulace HL + BSA v závislosti na pH je znázorněn na obr. 11. Vhodné hodnoty pH pro koagulaci HL + BSA korespondují s výsledky pro jednotlivé látky.

Zajímavé je, že cca mezi pH 3,8-4,5 už dochází ke koagulaci (odstranění přibližně 70 % DOC), zatímco zbytkové koncentrace Al jsou velmi vysoké (takřka odpovídají výchozí koncentraci Al). Při pH 3,1 je pak patrný prudký nárůst zbytkové koncentrace DOC oproti pH 3,8. Ke koagulaci tedy zřejmě může v určitém rozmezí pH v omezené

míře docházet i na základě interakcí mezi BSA a HL bez zásadního vlivu koagulačního činidla (hliník se při tomto pH vyskytuje převážně v rozpuštěné podobě (Stumm a Morgan, 1996). Možnost interakcí mezi BSA a HL nezávisle na přítomnosti dalších látek navrhuje např. i Salehi a Madaeni (2010), Tian a kol. (2013), Myat a kol. (2014), Wang a kol. (2015). Vzájemné interakce znečišťujících příměsí pozitivně ovlivňující koagulaci jsou v jiných studiích pozorovány rovněž v oblasti kyselého pH. Např. Šafaříková a kol. (2013) pozoruje za přítomnosti sinicových proteinů koagulaci kaolinových částic v rozmezí pH, kde bez vlivu proteinů koagulace kaolinu neprobíhá (pH 4,0-6,0 při použití $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, pH 5,0-6,5 při použití $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$).

Nad horní hranicí optima (pH 6,0) je patrný prudký pokles účinnosti koagulace. Už při pH 6,5 prakticky nedochází k odstranění organických látek a i zbytkové koncentrace Al jsou vysoké (zbytkové koncentrace DOC i Al dosahují téměř výchozích hodnot). Tento stav následně setrvává až do nejvyšších testovaných hodnot pH (8,5). V této oblasti pH tedy nedochází ani k interakcím mezi NOM a činidlem, ani k interakcím mezi jednotlivými složkami NOM.



Obr. 11: Zbytkové koncentrace DOC a Al po koagulaci HL+BSA v závislosti na pH (výchozí DOC 10 mg.l⁻¹: 5 mg.l⁻¹ HL + 5 mg.l⁻¹ BSA); dávka koagulačního činidla odpovídá 1,6 mg.l⁻¹ Al

4.2.3 Mechanismy koagulace

Výsledky společné koagulace HL a BSA ukazují, že BSA pozitivně ovlivňuje koagulaci HL a naopak. Již Bernhardt a kol. (1985) poukazuje na skutečnost, že zejména vysokomolekulární frakce AOM může za určitých podmínek napomáhat tvorbě mezičásticových vazeb. Ty jsou umožněny především interakcemi AOM proteinů s ostatními koagulujícími složkami (Henderson a kol., 2010; Šafaříková a kol., 2013). Mezi jednotlivými typy NOM ale může také docházet ke kompetici o produkty hydrolýzy koagulačních činidel, přičemž vznikající komplexy mají různé vlastnosti determinující jejich následnou odstranitelnost. Např. HL zřejmě tvoří vločky, které hůře sedimentují (Wang a kol., 2014). Docházet může patrně i ke vzájemným interakcím mezi HL a BSA bez účasti koagulačního činidla (Myat a kol., 2014). Možné interakce jsou podrobněji popsány v kapitole 4.3.2.

Optimální pH pro koagulaci HL + BSA souhlasí s hodnotami pro jednotlivé látky uvedenými v kapitole 4.1.2. Lze tedy usuzovat, že interakce s koagulačním činidlem jsou založeny na stejných principech, které jsou podrobněji popsány v kapitole 4.1.3: dominantní je zřejmě opět nábojová neutralizace, případně adsorpce.

4.3 Koagulace HL a BSA současně – bez koagulačního činidla

Byly provedeny sklenicové zkoušky pro kombinaci HL a BSA bez koagulačního činidla, a to pro různé poměry BSA vůči HL (DOC HL vždy 5 mg.l^{-1} , DOC BSA 3, 5 nebo 8 mg.l^{-1}). Testován byl vliv hodnoty pH na průběh koagulace.

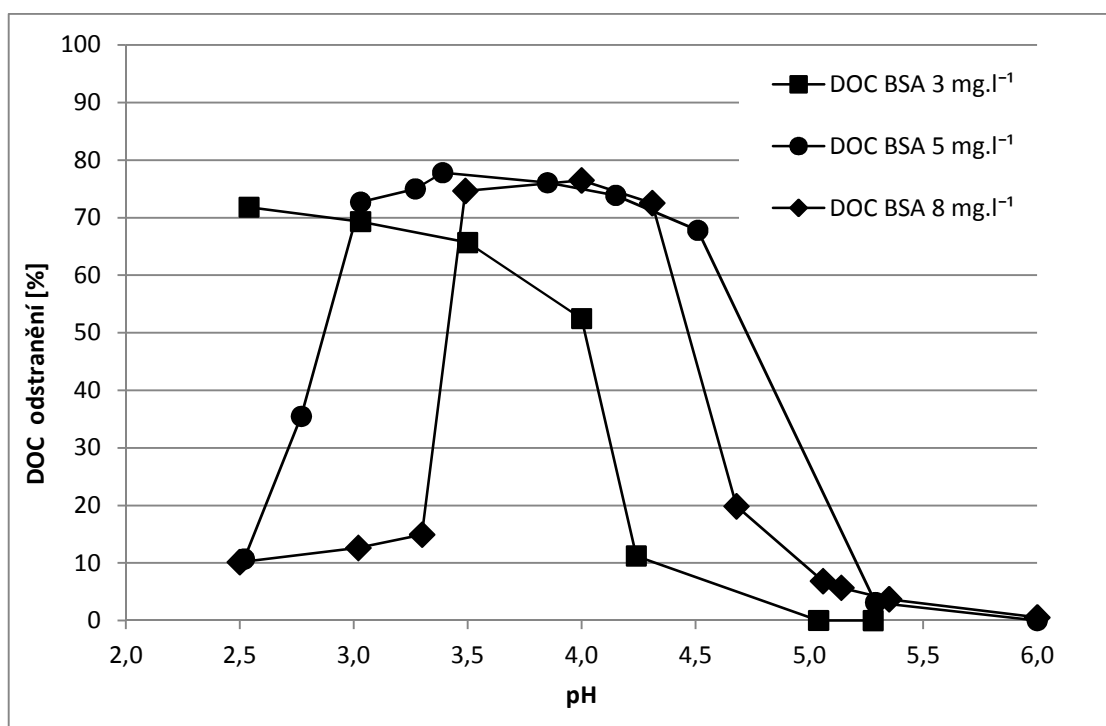
4.3.1 Vliv hodnoty pH a poměru BSA / HL

Ukázalo se, že ke koagulaci kombinace BSA a HL dochází i bez použití koagulačního činidla, přičemž vliv na účinnost má jak poměr jednotlivých složek, tak hodnota pH. Optimální pH se pro různé koncentrace BSA mírně liší, obecně se ale pohybuje v nižších hodnotách než pro koagulaci HL+BSA s využitím koagulačního činidla. Závislost účinnosti koagulace na pH pro různé poměry BSA vůči HL ukazuje obr. 12.

Nejlepšího odstranění organických látek (téměř z 80 %) bylo dosaženo při vyšších koncentracích BSA (DOC 5 a 8 mg.l^{-1}). Při koncentraci BSA 5 mg.l^{-1} bylo účinného odstranění (nad 70 % DOC) dosaženo v širším rozmezí pH (3,0-4,2) než při koncentraci BSA 8 mg.l^{-1} (pH 3,5-4,3), ale optimální pH se z velké části překrývá (3,5-4,2).

Maximálního odstranění DOC (78 %) pro 5 mg.l⁻¹ DOC BSA bylo dosaženo při pH 3,4; pro 8 mg.l⁻¹ DOC BSA při pH 4,0 (odstraněno 76 % DOC). Mimo uvedená optimální rozmezí pH nastává prudký pokles účinnosti koagulace, a to jak směrem k nízkému pH (testováno do pH 2,5), tak k vysokému pH (testováno do pH 6,0).

Při nižší koncentraci BSA (DOC BSA 3 mg.l⁻¹) byla pozorována obecně horší účinnost koagulace, ale i tak bylo při určitém pH (2,5) dosaženo odstranění až 72 % organických látek.

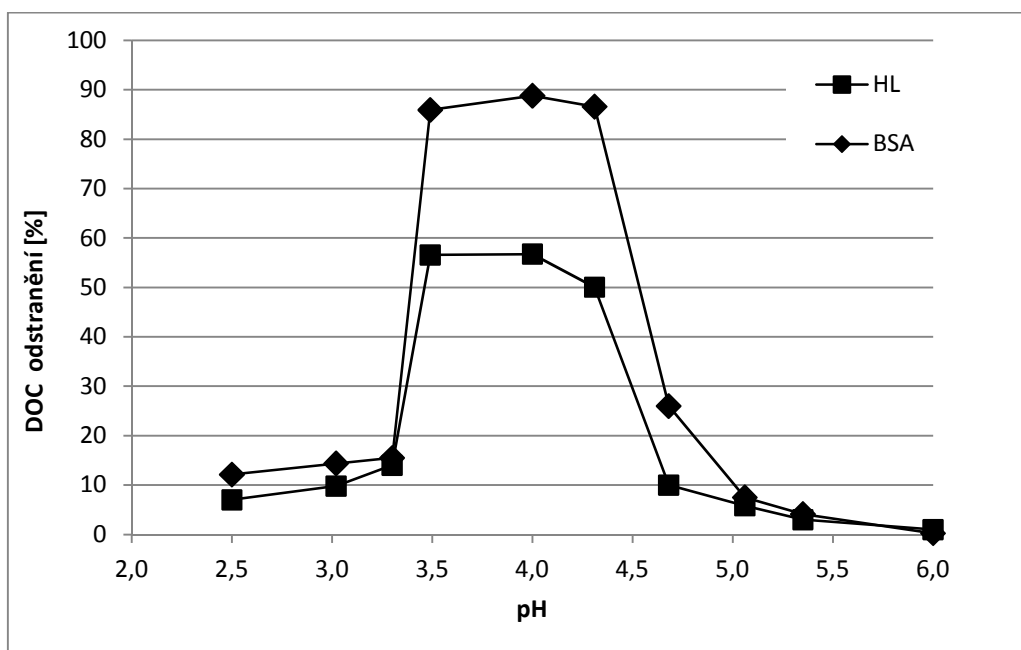


Obr. 12: Účinnost odstranění DOC po koagulaci HL+BSA v závislosti na pH (výchozí DOC 8-13 mg.l⁻¹: 5 mg.l⁻¹ HL + 3-8 mg.l⁻¹ BSA); bez koagulačního činidla

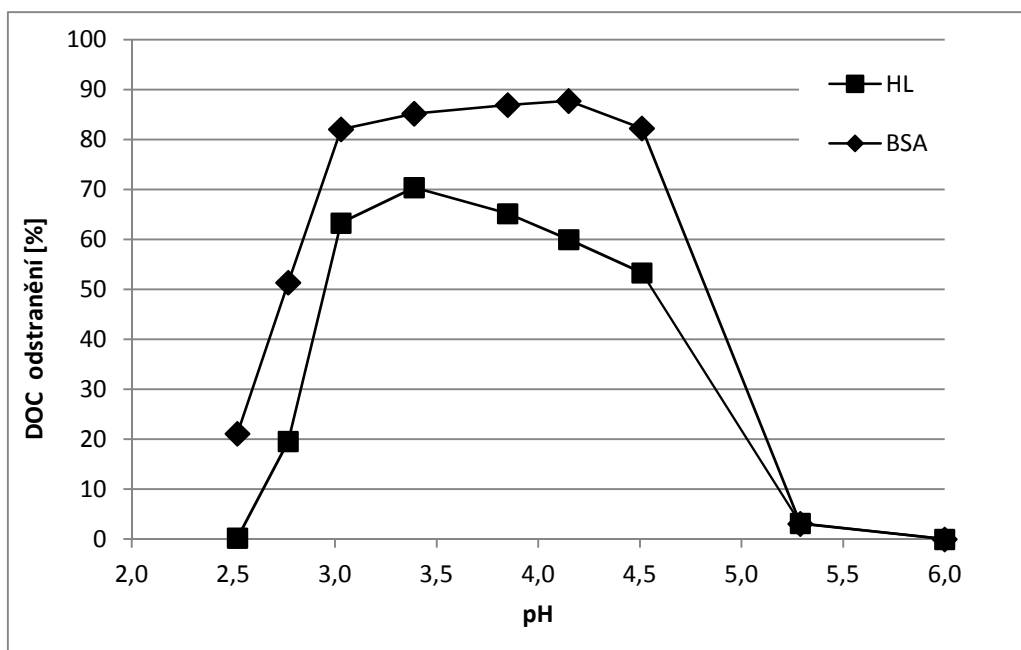
Při všech testovaných poměrech BSA vůči HL je BSA odstraňováno s vyšší účinností než huminové látky (stejně jako při použití činidla). Srovnání průběhu koagulace studovaných látek v závislosti na pH pro jednotlivé poměry BSA vůči HL znázorňují obr. 13-15.

Huminové látky jsou odstraňovány nejvýše ze 70 %, a to při pH 3,4 a koncentraci DOC BSA 5 mg.l⁻¹ (viz obr. 14). Pro DOC BSA 3 a 8 mg.l⁻¹ se maximální účinnost pohybuje mezi 50 a 60 %. Protein BSA je odstraňován až z více než 90 % (při DOC BSA 3 mg.l⁻¹ a pH 2,5-3,5; viz obr. 15), při ostatních koncentracích je pak účinnost mezi

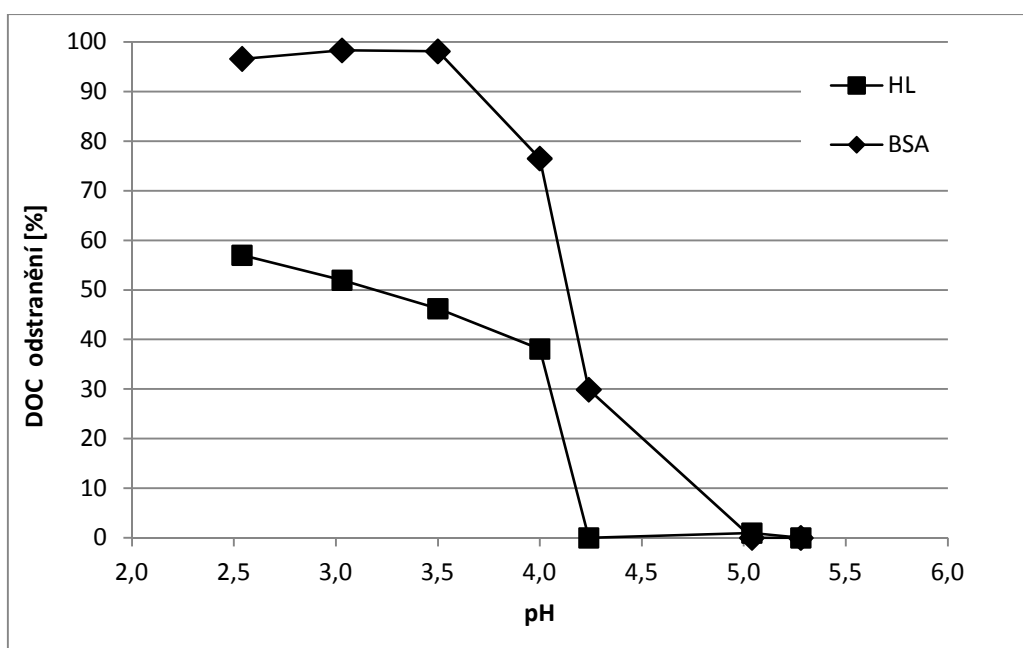
80 a 90 %. Vývoj účinnosti koagulace v závislosti na pH je pro HL, BSA i OL celkově vždy pro daný poměr látek podobný.



Obr. 13: Účinnost odstranění DOC jednotlivých složek po koagulaci HL+BSA v závislosti na pH (výchozí DOC 13 mg.l⁻¹: 5 mg.l⁻¹ HL + 8 mg.l⁻¹ BSA); bez koagulačního činidla



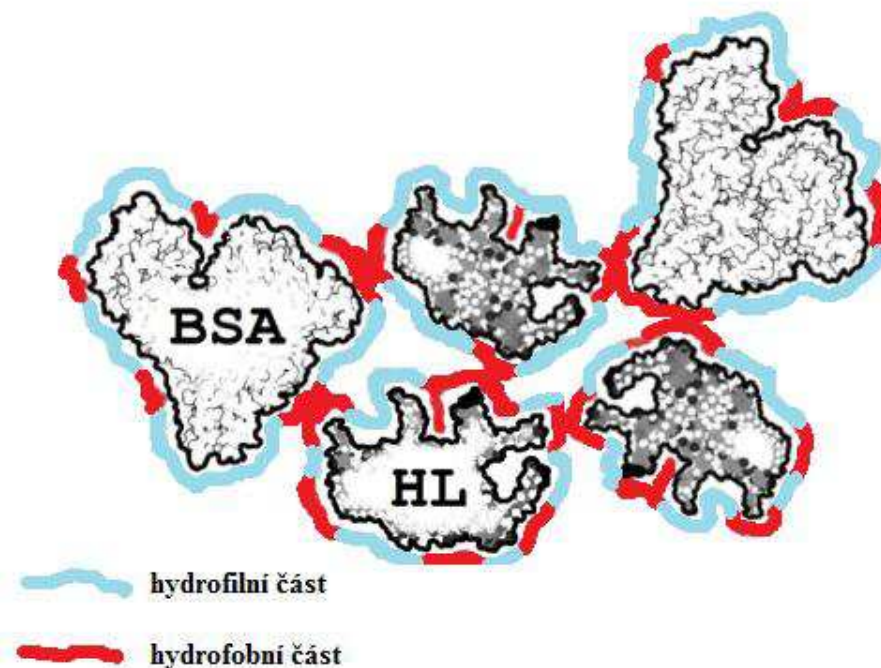
Obr. 14: Účinnost odstranění DOC jednotlivých složek po koagulaci HL+BSA v závislosti na pH (výchozí DOC 10 mg.l⁻¹: 5 mg.l⁻¹ HL + 5 mg.l⁻¹ BSA); bez koagulačního činidla



Obr. 15: Účinnost odstranění DOC jednotlivých složek po koagulaci HL+BSA v závislosti na pH (výchozí DOC 8 mg.l⁻¹: 5 mg.l⁻¹ HL + 3 mg.l⁻¹ BSA); bez koagulačního činidla

4.3.2 Mechanismy koagulace

Na interakcích mezi proteinem BSA a huminovými látkami se může podílet více mechanismů. Důležitým principem kontaktu mezi BSA a HL jsou hydrofobní interakce (Myat a kol., 2014). Vzájemný kontakt hydrofobních částí příslušných molekul je upřednostňován oproti jejich kontaktu s vodou, který je z energetického hlediska nežádoucí (Dill, 1990). BSA obsahuje řadu aminokyselin (AMK), jejichž postranní řetězce mají nepolární (hydrofobní) charakter. Jedná se např. o prolin, leucin, alanin, valin, cystein nebo fenylalanin (Huang a Kim, 2004). Ze strany huminových látek se na hydrofobních interakcích mohou podílet jak aromatické, tak alifatické části jejich molekul (Myat a kol., 2014). Hydrofobní interakce jsou znázorněny na obr. 16.



Obr. 16: Znázornění hydrofobních interakcí mezi organickými látkami ve vodním prostředí

Dalším možným typem interakcí je tvorba vodíkových můstků (Myat a kol., 2014), kdy jsou prostřednictvím vodíkového iontu spojovány dvě polární molekuly (Stumm a Morgan, 1996). BSA obsahuje značné množství AMK s polárními (hydrofilními) postranními řetězci, např. arginin, serin, lysin, threonin, glutamin nebo tyrozin (Huang a Kim, 2004). Huminové látky se na tvorbě vodíkových můstků podílejí zřejmě zejména prostřednictvím karbonylových (akceptor vodíkové vazby), hydroxylových (akceptor nebo donor) a aminových (donor vodíkové vazby) skupin (Myat a kol., 2014).

Na interakcích mezi BSA a HL se může podílet také tvorba tzv. „solných můstků“ („salt bridges“) (Myat a kol., 2014). Ty jsou někdy považovány za zvláštní typ vodíkové vazby (Bosshard a kol., 2004; Myat a kol., 2014), ale souvisí i s nábojem interagujících částic (Dill, 1990). Jedná se o kombinaci dvou nekovalentních vazeb (neutrální vodíkové vazby a elektrostatické interakce mezi kationtem a aniontem). Tato interakce je patrně pevnější než samotná vodíková vazba (Myat a kol., 2014).

Při určité hodnotě pH (4,2-5,3) nastává pro všechny poměry BSA vůči huminovým látkám inhibice vzájemných interakcí. To naznačuje, že ačkoli se uplatňují různé mechanismy, zásadní roli mají nábojové poměry interagujících látek (které jsou vzhledem k charakteru BSA i HL silně závislé na hodnotě pH). Od určitého pH patrně elektrostatické

repulze v důsledku rostoucího záporného náboje BSA i HL zabraňují dalším interakcím, protože molekuly se nemohou dostatečně přiblížit (Bosshard a kol., 2004).

Za přítomnosti koagulačního činidla, které (při určitých hodnotách pH) svým kladným nábojem způsobuje destabilizaci a nábojovou neutralizaci záporně nabitých organických látek, může patrně k interakcím mezi BSA a HL docházet i ve vyšším pH (přibližně do pH 6,0). To lze usuzovat z rozdílů spotřeb koagulačního činidla pro BSA, HL a jejich kombinaci za obdobného pH (diskutováno v kapitole 4.2).

S nábojovými charakteristikami zřejmě souvisí také posun optimálních hodnot pH se změnou poměru BSA vůči huminovým látkám. Podobný jev (rozdíly v optimálním pH pro koagulaci v závislosti na poměru interagujících znečišťujících látek) popisuje Šafaříková a kol. (2013) pro proteiny a kaolin. Jako důvod jsou uváděny právě změny v poměru nábojů interagujících složek systému.

V oblasti silně kyselého pH koagulace při koncentracích DOC BSA 8 a 5 mg.l⁻¹ ustává (při pH 3,3 pro 8 mg.l⁻¹; při pH pod 3,0 pro 5 mg.l⁻¹). Pro 3 mg.l⁻¹ DOC BSA tento jev při nejnižších testovaných hodnotách pH (2,5) pozorován není. Vedle vlivu nábojových poměrů (kyselé karboxylové skupiny začínají být v nízkém pH protonovány (Stumm a Morgan, 1996) nelze vyloučit ani působení změn v konformaci BSA. Pod pH 3,0 byly pozorovány zásadní změny sekundární struktury tohoto proteinu (Cao a kol., 2013) - v silně kyselém pH dochází k denaturaci BSA (Estey a kol., 2006). V rozmezí pH 3,0-9,0 nebyly zásadní změny struktury BSA pozorovány (Cao a kol., 2013).

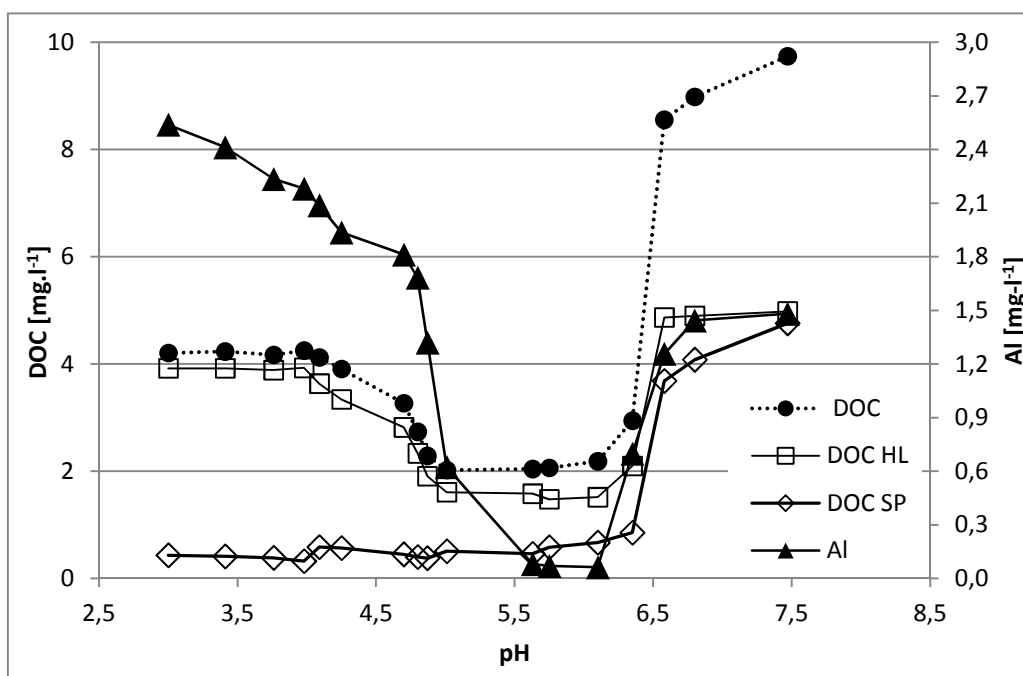
4.4 Srovnání BSA se sinicovými proteiny

Sinicové proteiny zahrnují látky o různých molekulových hmotnostech, mohou se pohybovat v řádu jednotek, desítek i stovek kDa (Pivokonský a kol., 2006, 2009, 2014; Li a kol., 2012). BSA tak se svojí MH spadá do tohoto rozmezí. Rozdílné jsou i hodnoty *pI* jednotlivých proteinů, např. pro proteiny izolované z *Microcystis aeruginosa* byly stanoveny *pI* mezi 4,79 a 8,05 (Pivokonský a kol., 2012), což je velmi blízké hodnotě *pI* BSA, která je 4,70 (Norde a Favier, 1992; Ang a Elimelech, 2007).

Protein BSA byl v řadě studií použit jako látka reprezentující proteinovou složku organických látek přítomných ve vodě (např. Her a kol. 2003; Mo a kol., 2008; Jiao a kol., 2015). Porovnání optimálních parametrů pro koagulaci BSA a AOM je popisováno v kapitole 4.1. Naprosto srovnatelné výsledky pak uvádí ve své diplomové práci Brabenec (2015), který se zabývá interakcemi sinicových proteinů (izolovaných z *Microcystis*

aeruginosa) a huminových látek při koagulaci, a to za využití stejného koagulačního činidla a totožných postupů.

Bylo zjištěno, že jak BSA, tak sinicové proteiny (SP) příznivě ovlivňují koagulaci HL. Přítomnost SP (o koncentraci DOC 5 mg.l⁻¹) podstatně snižuje potřebnou dávku koagulačního činidla (Al₂(SO₄)₃.18H₂O) pro účinné odstranění HL (o koncentraci DOC 5 mg.l⁻¹) z 5,5 mg.l⁻¹ Al na 2,8 mg.l⁻¹ Al (Brabenec, 2015). Průběh koagulace HL + SP v závislosti na hodnotě pH (při optimální dávce činidla) znázorňuje obr. 17. Optimální pH odpovídá hodnotám 5,5-6,1 (Brabenec, 2015), což se téměř úplně překrývá s optimem pro koagulaci HL + BSA (viz kapitola 4.2.2) a i průběh mimo optimum je obdobný. Lze tedy usuzovat, že hlavní mechanismy koagulace (vzhledem k silné závislosti účinnosti právě na hodnotách pH) jsou shodné. Optimální dávky pro koagulaci SP a HL + SP jsou o něco vyšší než pro koagulaci BSA a HL + BSA, což zřejmě může souviset s tím, že SP obsahují i nízkomolekulární peptidy (Pivokonský a kol., 2006, 2014). Částečné odstranění OL pod hranicí optima (za vysokých zbytkových koncentrací hliníku) napovídá, že (stejně jako mezi BSA a HL) dochází za určitých podmínek i k interakcím SP a HL bez přímého vlivu koagulačního činidla. Brabenec (2015) toto potvrzuje i koagulací kombinace SP a HL bez činidla, kdy při určitém pH dochází k odstranění takřka 70 % organických látek.



Obr. 17: Zbytkové koncentrace DOC a Al po koagulaci HL+SP v závislosti na pH (výchozí DOC 10 mg.l⁻¹: 5 mg.l⁻¹ HL + 5 mg.l⁻¹ BSA); dávka koagulačního činidla odpovídá 2,8 mg.l⁻¹ Al (Brabenec, 2015)

5 Závěr

Výsledky potvrzují, že optimalizace parametrů koagulace organických látek nezávisí jen na jejich koncentraci, ale také na jejich charakteru. Pro protein BSA (o koncentraci DOC 5 mg.l⁻¹) byla jako optimální stanovena dávka koagulačního činidla odpovídající 1,2 mg.l⁻¹ Al, zatímco pro huminové látky o stejné koncentraci DOC je potřebná dávka činidla podstatně vyšší (5,5 mg.l⁻¹ Al). Pro kombinaci uvedených organických látek (DOC BSA 5 mg.l⁻¹ + DOC HL 5 mg.l⁻¹) pak byla optimální dávka stanovena na 1,6 mg.l⁻¹ Al, což je více než pro BSA samostatně, ale podstatně méně než pro HL samostatně. Vedle závislosti potřebné dávky činidla na charakteru NOM je tedy patrné i to, že mezi organickými látkami může docházet k interakcím, které ve svém důsledku ovlivňují účinnost koagulace. Optimální pH pro koagulaci jednotlivých typů NOM i pro jejich kombinaci bylo obdobné (4,9-5,7 pro HL; 5,7-6,2 pro BSA; 5,4-6,0 pro jejich kombinaci), což naznačuje, že hlavní mechanismy koagulace jsou pro tyto látky stejné. Při daných hodnotách pH převažuje u obou zkoumaných organických látek záporný náboj, zatímco produkty hydrolyzy koagulačního činidla jsou kladně nabitě. Může tak docházet k elektrostatickým interakcím a žádoucí destabilizaci znečišťujících příměsí. Hlavními principy koagulace jsou nábojová neutralizace a adsorpce. Protein BSA je odstraňován s vyšší účinností než huminové látky, což patrně souvisí s jeho velkou molekulovou hmotností. Je známo, že takové látky obecně dobře koagulují (Bolto a kol., 2002; Cheng a Chi, 2003; Sharp a kol., 2006).

Předpoklad interakcí mezi HL a BSA potvrzuje vedle hodnot optimálních dávek koagulačního činidla i zjištění, že během jejich současné koagulace dochází při určitých hodnotách pH k částečnému odstranění organických látek (cca 60 % DOC při pH 3,8-4,5), zatímco zbytkové koncentrace Al jsou vysoké (takřka výchozí), což poukazuje na minimální účast činidla na koagulaci. Sklenicové zkoušky bez použití koagulačního činidla tento jev potvrzují, přičemž vedle hodnoty pH je důležitý i vzájemný poměr mezi HL a BSA. Nejúčinnější koagulace (odstranění 78 % DOC) bylo bez činidla dosaženo při pH 3,4 a poměru HL:BSA 1:1. HL a BSA mohou zřejmě interagovat zejména díky hydrofobnímu efektu a prostřednictvím vodíkových a solných můstků. Interakce ale při určitém pH (v závislosti na poměru látek mezi hodnotami pH 4,2-5,3) ustávají, patrně v důsledku elektrostatických repulzí, které jsou silnější než přitažlivé síly. Za přítomnosti koagulačního činidla, které částice destabilizuje a repulze tak potlačuje, může k interakcím mezi HL a BSA docházet i při vyšších hodnotách pH.

Ze srovnání BSA a sinicových proteinů (Brabenec, 2015) vyplývá, že jejich chování při koagulaci je obdobné. Přesné dávky činidla vhodné pro koagulaci BSA a SP se mírně liší, v obou případech jsou ale podstatně nižší než pro srovnatelné množství huminových látek. Optimální hodnoty pH pro koagulaci BSA a SP se překrývají, lze tedy předpokládat, že mechanismy koagulace jsou obdobné. Sinicové proteiny příznivě ovlivňují koagulaci huminových látek a mohou s nimi interagovat i bez přítomnosti koagulačního činidla, stejně jako tomu je pro protein BSA. Rozdíly se dají přisuzovat zejména tomu, že SP jsou směsí proteinů, zatímco BSA je jedna látka. Celkově se ale BSA jeví jako vhodná modelová látka zastupující zejména vysokomolekulární frakci sinicových proteinů, které jsou běžnou součástí NOM.

6 Seznam použitých veličin a zkratek

AMK - aminokyselina

AOM (Algal Organic Matter) – organické látky produkované sinicemi a řasami

BSA (Bovine Serum Albumine) – hovězí sérový albumin

DBPs (Disinfection By-products) – vedlejší produkty hygienického zabezpečení

DOC (Dissolved Organic Carbon) – rozpuštěný organický uhlík

EOM (Extracellular Organic Matter) – extracelulární organické látky

FA (Fulvic Acid) – fulvokyseliny

FLD (Fluorescence Detector) – fluorescenční detektor

\bar{G} - střední gradient rychlosti [s^{-1}]

HA (Humic Acid) – huminové kyseliny

HAAs (Haloacetic Acids) – halogenoctové kyseliny

HANs (Haloacetonitriles) – halogenované acetonitrily

HL – huminové látky

HS (Humic Substances) – huminové látky

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) – vysokoúčinná velikostně rozdělující chromatografie

IC (Inorganic Carbon) – anorganický uhlík

IOM (Intracellular Organic Matter) – intracelulární organické látky

KNK_{4,5} – celková kyselinová neutralizační kapacita [$mmol.l^{-1}$]

MCA (Mucochloric Acid) – kyselina mukochlorová ($C_4H_2Cl_2O_3$)

MC-RR – Microcystin-RR

MC-YR – Microcystin-YR

MH – molekulová hmotnost

MX (Mutagen X) - 3-chlor-4-(dichlormetyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanon ($C_5H_3Cl_3O_3$)

NDMAs – N-nitrosodimethylaminy

$N_H^+(I_n)$ – množství přidanych H^+ iontů v bodě ekvivalence n [$mmol.g^{-1}$]

NOM (Natural Organic Matter) – přírodní organické látky

N_R – množství specifických funkčních skupin [$mmol.g^{-1}$]

OL – organické látky

OC (Organic Colloids) – organické koloidy

PACl – polyaluminiumchlorid

PASiC - Polyaluminium Silicate Chlorid

pEq – bod ekvivalence

PFS – polyferric sulfát

pK – disociační konstanta

pI – (Isoelectric Point) – izoelektrický bod

RCF (Relative Centripetal Force) – relativní odstředivé zrychlení [g]

SOM (Surface-retained Organic Matter) – organické látky zachycené na povrchu organismů

SP – sinicové proteiny

SUVA (Specific UV Absorbance) – specifická UV absorbance [$l.m^{-1}.mg^{-1}$]

TC (Total Carbon) – celkový uhlík

THMs (Trihalogenmethans) - trihalogenmethany

7 Seznam použité literatury

- Ang, W. S., Elimelech, M. (2007): Protein (BSA) fouling of reverse osmosis membranes: Implications for wastewater reclamation. *Journal of Membrane Science* 296, 83-92.
- Aráoz, R., Molgó, J., Tandeau de Marsac, N. (2010): Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 56, 813-828.
- Baigorri, R., Fuentes, M., González-Gaitano, G., García-Mina, J. M. (2007): Analysis of molecular aggregation in humic substances in solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 302, 301-306.
- Bernhardt, H., Hoyer, O., Schell, H., Lüsse, B. (1985): Reaction mechanisms involved in the influence of algogenic organic matter on flocculation. *Zeitschrift für Wasser und Abwasserforschung* 18 (1), 18-30.
- Bolto, B., Dixon, D., Eldridge, R., King, S. (2002): Removal of THM precursors by coagulation or ion exchange. *Water Research* 36, 5066-5073.
- Bosshard, H. R., Marti, D. N., Jelesarov, I. (2004): Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *Journal of Molecular Recognition* 17, 1-16.
- Brabenec, T.: Vliv látek produkovaných sinicemi na koagulaci huminových vod. Praha, 2015. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze; Přírodovědecká fakulta; Ústav pro životní prostředí.
- Cao, X.-L., Li, H.-W., Yue, Y., Wu, Y. (2013): pH-Induced conformational changes of BSA in fluorescent AuNCs@BSA and its effects on NCs emission. *Vibrational Spectroscopy* 65, 186-192.
- Carroll, T., King, S., Gray, S. R., Bolto, B. A., Booker, N. A. (2000): The fouling of microfiltration membranes by NOM after coagulation treatment. *Water Research* 34 (11), 2861-2868.
- Chang, R.: Physical Chemistry for the Biosciences, second ed. University Science Books, USA, 2005, 683 s.

- Cheng, W. P. (2002): Comparison of hydrolysis/coagulation behavior of polymeric and monomeric iron coagulants in humic acid solution. *Chemosphere* 47, 963-969.
- Cheng, W. P., Chi, F. H. (2003): Influence of eutrophication on the coagulation efficiency in reservoir water. *Chemosphere* 53, 773-778.
- Cheng, W. P., Chi, F. H., Yu, R. F. (2004): Effect of phosphate on removal of humic substances by aluminium sulfate coagulant. *Journal of Colloid and Interface Science* 272, 153-157.
- Chow, Ch. W. K., Drikas, M., House, J., Burch, M. D., Velzeboer, R. M. A. (1999): The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Water Research* 33 (15), 3253-3262.
- Collins, M. R., Amy, G. L., Steelink, C. (1986): Molecular Weight Distribution, Carboxylic Acidity, and Humic Substances Content of Aquatic Organic Matter: Implications for Removal during Water Treatment. *Environmental Science & Technology* 20, 1028-1032.
- Dill, K. A. (1990): Dominant Forces in Protein Folding. *Biochemistry* 29 (31), 7133-7155.
- Domany, Z., Galambos, I., Vatai, G., Bekassy-Molnar, E. (2002): Humic substances removal from drinking water by membrane filtration. *Desalination* 145, 333-337.
- Duan, J., Gregory, J. (2003): Coagulation by hydrolysing metal salts. *Advances in Colloid and Interface Science* 100-102, 475-502.
- Duan, J., Wang, J., Guo, T., Gregory, J. (2014): Zeta potentials and sizes of aluminum salt precipitates – Effect of anions and organics and implications for coagulation mechanisms. *Journal of Water Process Engineering* 4, 224-232.
- Estey, T., Kang, J., Schwendeman, S. P., Carpenter, J. F. (2006): BSA Degradation under Acidic Conditions: A Model for Protein Instability during Release from PLGA Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95 (7), 1626-1639.
- Gonzalez-Torres, A., Putnam, J., Jefferson, B., Stuetz, R. M., Henderson, R. K. (2014): Examination of the physical properties of *Microcystis aeruginosa* flocs produced on coagulation with metal salts. *Water Research* 60, 197-209.

- Gregor, J. E., Nokes, C. J., Fenton, E. (1997): Optimising Natural Organic Matter Removal from Low Turbidity Waters by Controlled pH Adjustment of Aluminium Coagulation. *Water Research* 31 (12), 2949-2958.
- Harada, K. (2004): Production of Secondary Metabolites by Freshwater Cyanobacteria. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 52 (8), 889-899.
- Hashino, M., Hiram, K., Ishigami, T., Ohmukai, Y., Maruyama, T., Kubota, N., Matsuyama, H. (2011): Effect of kinds of membrane materials on membrane fouling with BSA. *Journal of Membrane Science* 384, 157-165.
- Henderson, R. K., Baker, A., Parsons, S. A., Jefferson, B. (2008a): Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. *Water Research* 42, 3435-3445.
- Henderson, R., Parsons, S. A., Jefferson, B. (2008b): The impact of algal properties and pre-oxidation on solid-liquid separation of algae. *Water Research* 42, 1827-1845.
- Henderson, R. K., Parsons, S. A., Jefferson, B. (2010): The impact of different cell and algogenic organic matter (AOM) characteristics on the coagulation and flotation of algae. *Water Research* 44, 3617-3624.
- Her, N., Amy, G., McKnight, D., Sohn, J., Yoon, Y. (2003): Characterization of DOM as a function of MW by fluorescence EEM and HPLC-SEC using UVA, DOC, and fluorescence detection. *Water Research* 37, 4295-4303.
- Her, N., Amy, G., Park, H.-R., Song, M. (2004): Characterizing algogenic matter (AOM) and evaluating associated NF membrane fouling. *Water Research* 38, 1427-1438.
- Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., Fukuhara, K. (1990): Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173 (2), 639-646.
- Horáková, M. a kolektiv: Analytika vody. VŠCHT, Praha, 2003, 335 s.

- Huang, B. X., Kim, H.-Y. (2004): Probing Three-Dimensional Structure of Bovine Serum Albumin by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 15, 1237-1247.
- Huang, C., Shiu, H. (1996): Interactions between alum and organics in coagulation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 113, 155-163.
- Jiang, J.-Q., Graham, N. J. D., Harward, C. (1993): Comparison of polyferric sulphate with other coagulants for the removal of algae and algae-derived organic matter. *Water Science and Technology* 27 (11), 221-230.
- Jiao, R., Xu, H., Xu, W., Yang, X., Wang, D. (2015): Influence of coagulation mechanisms on the residual aluminium – The roles of coagulant species and MW of organic matter. *Journal of Hazardous Materials* 290, 16-25.
- Jones, M. N., Bryan, N. D. (1998): Colloidal properties of humic substances. *Advances in Colloid and Interface Science* 78, 1-48.
- Jung, A.-V., Chanudet, V., Ghanbaja, J., Lartiges, B. S., Bersillon, J.-L. (2005): Coagulation of humic substances and dissolved organic matter with a ferric salt: An electron energy loss spectroscopy investigation. *Water Research* 39, 3849-3862.
- Jurczak, T., Tarczyska, M., Izydorczyk, K., Mankiewicz, J., Zalewski, M., Meriluoto, J. (2005): Elimination of microcystins by water treatment processes – examples from Sulejow Reservoir, Poland. *Water Research* 39, 2394-2406.
- Kim, H.-C., Dempsey, B. A. (2013): Membrane fouling due to alginate, SMP, EfOM, humic acid, and NOM. *Journal of Membrane Science* 428, 190-197.
- Leloup, M., Nicolau, R., Pallier, V., Yéprémian, C., Feuillade-Cathalifaud, G. (2013): Organic matter produced by algae and cyanobacteria: Quantitative and qualitative characterization. *Journal of Environmental Sciences* 25 (6), 1089-1097.
- Li, L., Gao, N., Deng, Y., Yao, J., Zhang, K. (2012): Characterization of intracellular & extracellular algae organic matters (AOM) of *Microcystic aeruginosa* and formation of AOM-associated disinfection byproducts and odor & taste compounds. *Water Research* 46, 1233-1240.

- Lin, J.-L., Huang, C., Dempsey, B., Hu, J.-Y. (2014): Fate of hydrolyzed Al species in humic acid coagulation. *Water Research* 56, 314-324.
- Liu, T., Chen, Z., Yu, W., Shen, J., Gregory, J. (2011): Effect of two-stage coagulant addition on coagulation-ultrafiltration process for treatment of humic-rich water. *Water Research* 45, 4260-4268.
- Lu, X., Chen, Z., Yang, X. (1999): Spectroscopic study of aluminium speciation in removing humic substances by Al coagulation. *Water Research* 33 (15), 3271-3280.
- Ma, J., Liu, W. (2002): Effectiveness and mechanism of potassium ferrate(VI) preoxidation for algae removal by coagulation. *Water Research* 36, 871-878.
- Marhaba, T., Van, D. (2000): The variation of mass and disinfection by-product formation potential of dissolved organic matter fractions along a conventional surface water treatment plant. *Journal of Hazardous Materials A74*, 133-147.
- Masini, J. C. (1993): Evaluation of neglecting electrostatic interactions on the determination and characterization of the ionizable sites in humic substances. *Analytica Chimica Acta* 283, 803-810.
- Matilainen, A., Vepsäläinen, M., Sillanpää, M. (2010): Natural organic matter removal by coagulation during drinking water treatment: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 159, 189-197.
- McDonald, S., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., Robards, K. (2004): Analytical chemistry of freshwater humic substances. *Analytica Chimica Acta* 527, 105-124.
- Mo, H., Tay, K. G., Ng, H. Y. (2008): Fouling of reverse osmosis membrane by protein (BSA): Effects of pH, calcium, magnesium, ionic strength and temperature. *Journal of Membrane Science* 315, 28-35.
- Myat, D. T., Mergen, M., Zhao, O., Stewart, M. B., Orbell, J. D., Gray, S. (2012): Characterisation of organic matter in IX and PACl treated wastewater in relation to the fouling of a hydrophobic polypropylene membrane. *Water Research* 46, 5151-5164.

- Myat, D. T., Stewart, M. B., Mergen, M., Zhao, O., Orbell, J. D., Gray, S. (2014): Experimental and computational investigations of the interactions between model organic compounds and subsequent membrane fouling. *Water Research* 48, 108-118.
- Norde, W., Favier, J. P. (1992): Structure of adsorbed and desorbed protein. *Colloids and Surfaces* 64, 87-93.
- Pivokonský, M., Klouček, O., Pivokonská, L. (2006): Evaluation of the production, composition and aluminium and iron complexation of algogenic organic matter. *Water Research* 40, 3045-3052.
- Pivokonský, M., Polášek, P., Pivokonská, L., Tomášková, H. (2009): Optimized Reaction Conditions for Removal of Cellular Organic Matter of *Microcystis aeruginosa* During the Destabilization and Aggregation Process Using Ferric Sulfate in Water Purification. *Water Environment Research*, 81 (5), 514-522.
- Pivokonský, M., Šafaříková, J., Bubáková, P., Pivokonská, L. (2012): Coagulation of peptides and proteins produced by *Microcystis aeruginosa*: Interaction mechanisms and the effect of Fe-peptide/protein complexes formation. *Water Research* 46 (17), 5583-5590.
- Pivokonský, M., Šafaříková, J., Barešová, M., Pivokonská, L., Kopecká, I. (2014): A comparison of the character of algal extracellular versus cellular organic matter produced by cyanobacterium, diatom and green alga. *Water Research* 51, 37-46.
- Prakash, S., Lawton, L. A., Edwards, C. (2009): Stability of toxigenic *Microcystis* blooms. *Harmful Algae* 8, 377-384.
- Pu, Y., Kong, L., Huang, X., Ding, G., Gao, N. (2013): Formation of THMs and HANs during bromination of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Environmental Sciences* 25 (9), 1795-1799.
- Richardson, S. D., Plewa, M. J., Wagner, E. D., Schoeny, R., DeMarini, D. M. (2007): Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research* 636, 178-242.

- Rodríguez, F. J., Schlenger, P., García-Valverde, M. (2014): A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: Structural characterization of humic substances. *Science of the Total Environment* 476-477, 718-730.
- Rositano, J., Newcombe, G., Nicholson, B., Sztajn bok. P. (2001): Ozonation of NOM and algal toxins in four treated waters. *Water Research* 35 (1), 23-32.
- Salehi, E., Madaeni, S. S. (2010): Adsorption of humic acid onto ultrafiltration membranes in the presence of protein and metal ions. *Desalination* 263, 139-145.
- Sharp, E. L., Jarvis, P., Parsons, S. A., Jefferson, B. (2006): Impact of fractional character on the coagulation of NOM. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 286, 104-111.
- Siéliéchi, J.-M., Lartiges, B. S., Kayem, G. J., Hupont, S., Frochot, C., Thieme, J., Ghanbaja, J., d'Espinose de la Caillerie, J. B., Barrés, O., Kamga, R., Levitz, P., Michot, L. J. (2008): Changes in humic acid conformation during coagulation with ferric chloride: Implications for drinking water treatment. *Water Research* 42, 2111-2123.
- Stumm, W., Morgan, J. J.: Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1996, 1022 s.
- Šafaříková, J., Barešová, M., Pivokonský, M., Kopecká, I. (2013): Influence of peptides and proteins produced by cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on the coagulation of turbid waters. *Separation and Purification Technology* 118, 46-57.
- Takaara, T., Sano, D., Konno, H., Omura, T. (2007): Cellular proteins of *Microcystis aeruginosa* inhibiting coagulation with polyaluminum chloride. *Water Research* 41, 1653-1658.
- Takaara, T., Sano, D., Masago, Y., Omura, T. (2010): Surface-retained organic matter of *Microcystis aeruginosa* inhibiting coagulation with polyaluminium chloride in drinking water treatment. *Water Research* 44, 3781-3786.

- Tian, J., Ernst, M., Cui, F., Jekel, M. (2013): Effect of different cations on UF membrane fouling by NOM fractions. *Chemical Engineering Journal* 223, 547-555.
- Volk, C., Bell, K., Ibrahim, E., Verges, D., Amy, G., Lechevallier, M. (2000): Impact of enhanced and optimized coagulation on removal of organic matter and its biodegradable fraction in drinking water. *Water Research* 34 (12), 3247-3257.
- Wang, Y., Mao, R., Wang, Q., Yang, Z., Gao, B., Zhao, Y. (2012): Fulvic acid removal performance and control of disinfection by-product formation potential in coagulation-ultrafiltration process. *Desalination* 302, 55-64.
- Wang, Z., Teychene, B., Abbott Chalew, T. E., Ajmani, G. S., Zhou, T., Huang, H., Wu, X. (2014): Aluminum-humic colloid formation during precoagulation for membrane water treatment: Mechanisms and impacts. *Water Research* 61, 171-180.
- Wang, Z., Cao, J., Meng, F. (2015): Interactions between protein-like and humic-like components in dissolved organic matter revealed by fluorescence quenching. *Water Research* 68, 404-413.
- Yang, L., Kim, D., Uzun, H., Karanfil, T., Hur, J. (2015): Assessing trihalomethanes (THMs) and *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) formation potentials in drinking water treatment plants using fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis. *Chemosphere* 121, 84-91.
- Yang, Z., Liu, B., Gao, B., Wang, Y., Yue, Q. (2013): Effect of Al species in polyaluminium silicate chloride (PASiC) on its coagulation performance in humic acid-kaolin synthetic water. *Separation and Purification Technology* 111, 119-124.
- Zamyadi, A., Fan, Y., Daly, R. I., Prévost, M. (2013): Chlorination of *Microcystis aeruginosa*: Toxin release and oxidation, cellular chlorine demand and disinfection by-product formation. *Water Research* 47, 1080-1090.
- Zheng, D., Andrews, R. C., Andrews, S. A., Taylor-Edmonds, L. (2015): Effects of coagulation on the removal of natural organic matter, genotoxicity, and precursors to halogenated furanones. *Water Research* 70, 118-129.