

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí



**CHARAKTERISTIKA ORGANICKÝCH LÁTEK
PRODUKOVANÝCH FYTOPLANKTONEM A JEJICH
INHIBIČNÍ VLIV NA PROCES ÚPRAVY VODY**

Diplomová práce

Jitka Bäumeltová

Duben 2007

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří přispěli ke vzniku této práce. Děkuji především mému školiteli RNDr. Martinu Pivokonskému, Ph.D., interní konzultantce Ing. Libuši Benešové a mé rodině.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a souhlasím s dalším využitím všech v ní obsažených informací pod podmínkou, že budou řádně citovány.

V Praze dne 23.4.2007


Jitka Bäumeltová

OBSAH

Abstrakt/Abstract	4
1. Úvod	6
2. Literární rešerše	7
2.1 Příměsi ve vodách	7
2.1.1 Koloidní disperse	8
2.2 Charakteristika organických látek přírodního původu	11
2.2.1 Huminové látky	11
2.2.2 Organické látky produkované sinicemi a řasami	13
2.3 Odstraňování organických látek z vody	21
2.3.1 Konvenční úprava vody	21
2.3.2 Použití moderních technologií	24
3. Metodika	25
3.1 Kultivace a kultivační média sinic a řas	25
3.2 Příprava extracelulárních a intracelulárních organických látek	27
3.3 Stanovení podílu proteinů	27
3.4 Stanovení relativní molekulové hmotnosti	28
3.5 Afinitní chromatografie	29
3.6 Analytická stanovení	29
3.7 Použité druhy fytoplanktonu	32
4. Výsledky měření	34
4.1 Vliv koncentrace vzorků na stanovení relativní molekulové hmotnosti	34
4.2 Vlastní výsledky měření	37
4.2.1 Množství organických látek vylučovaných během kultivace	37
4.2.2 Podíl proteinů a neproteinových látek	40
4.2.3 Charakteristika extracelulárních a intracelulárních látek	41
4.2.4 Výsledky afinitní chromatografie	43
4.2.5 Ověření DOC frakcionace	44
4.2.6 Porovnání výsledků dvou metod stanovení organických látek	45
5. Diskuse	47
6. Závěr	50
8. Seznam literatury	52
9. Seznam zkratk a symbolů	56

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce je charakterizovat organické látky, které produkují sinice *Anabaena flos-aquae* a *Microcystis aeruginosa* a zelená řasa *Scenedesmus quadricauda* a popsat jejich případné komplexační vlastnosti ovlivňující destabilizační procesy při úpravě vody. Organické látky sinic a řas (Algogenic Organic Matter - AOM) můžeme rozdělit na tzv. extracelulární organické látky (Extracellular Organic Matter - EOM), které jsou produkovány metabolickou činností během života mikroorganismů, a na tzv. intracelulární organické látky (Intracellular Organic Matter - IOM), které se dostávají do prostředí až po odumření nebo poškození buněk. Dalším cílem diplomové práce je popsat případné rozdíly ve složení EOM a IOM a zjistit, jak se odlišují AOM produkované jednotlivými druhy organismů.

Koncentrace AOM se zvyšují se stářím kultury u všech sledovaných druhů fytoplanktonu. Nejvyšší hodnoty byly zjištěny u sinice *M. aeruginosa*, nejnižší naopak u zelené řasy *S. quadricauda*, kde byl pozorován také nejnižší podíl proteinů. Vyšší podíl proteinů byl zjištěn u sinic. Jako součásti EOM byly u *A. flos-aquae* identifikovány proteiny o relativní molekulové hmotnosti (Mr) kolem 18 tis. a více než 900 tis., u *M. aeruginosa* proteiny o Mr kolem 21 tis. a více než 900 tis. a u EOM *S. quadricauda* proteiny o Mr kolem 16 tis. IOM *A. flos-aquae* obsahují proteiny o Mr kolem 18, 73, 190, 360 tis. a více než 900 tis., IOM *M. aeruginosa* proteiny o Mr kolem 21, 85, 234, 359, 470 tis. a více než 900 tis. a IOM *S. quadricauda* proteiny o Mr kolem 16, 73, 223 tis. a více než 900 tis. Výsledky dokazují, že se EOM a IOM svým složením od sebe liší.

Pomocí afinitní chromatografie byly izolovány proteiny, které jsou schopny tvořit komplexy s vícemocnými kationty (Al^{3+} , Fe^{3+}). U sinic *A. flos-aquae* a *M. aeruginosa* se jedná o proteiny s Mr kolem 60 tis. Tyto proteiny mohou při úpravě vody způsobovat značné problémy, protože tvoří komplexy s vícemocnými kationty (Al^{3+} , Fe^{3+}), které jsou součástí používaných destabilizačních činidel. Vlivem tvorby těchto komplexních sloučenin dochází k poklesu účinnosti destabilizace a agregace a k nárůstu množství spotřebovaného destabilizačního činidla.

ABSTRACT

The aim of the diploma thesis is a characterisation of organic matter produced by the cyanobacteria *Anabaena flos-aquae* and *Microcystis aeruginosa* and the green algae *Scenedesmus quadricauda* and a description of their eventual complex formation which have effect on process of destabilization during water treatment. The algogenic organic matter (AOM) can be divided into the so-called extracellular organic matter (EOM), which is produced by metabolism into the water, and into the so-called intracellular organic matter (IOM), which gets into the aqueous media after cell's damage or death. The other aim of the diploma thesis is to find eventual differences in the structures of EOM and IOM and find out how AOM differ among individual species of cyanobacteria and algae.

The concentrations of AOM increased during their cultivation for all monitored microorganisms. The highest values of concentrations were detected in the culture of cyanobacteria *M. aeruginosa*, conversely, the lowest values were found for the green algae *S. quadricauda* where the lowest portions of proteins were also observed. The higher portions of proteins were found for cyanobacteria. EOM of *A. flos-aquae* included proteins of relative molecular weight (MW) around 18 thousand and more than 900 thousand. For EOM of *M. aeruginosa* proteins of relative MW around 21 thousand and more than 900 thousand were isolated. For EOM of *S. quadricauda* proteins of relative MW around 16 thousand were detected. IOM of *A. flos-aquae* contained proteins of relative MW around 18, 73, 190, 360 thousand and more than 900 thousand. IOM of *M. aeruginosa* included proteins of relative MW around 21, 85, 234, 359, 470 thousand and more than 900 thousand and for IOM of *S. quadricauda* proteins of relative MW around 16, 73, 223 thousand and more than 900 thousand were detected. These results prove that the compositions of EOM and IOM differ.

Using affinity chromatography the proteins able to form complexes with multivalent cations (Al^{3+} , Fe^{3+}) were isolated. For cyanobacteria *A. flos-aquae* and *M. aeruginosa* proteins of relative MW around 60 thousand was detected. These proteins could cause serious problems during water treatment because of forming the complexes with multivalent cations, which are part of used destabilization reagents. The formation of these complexes causes decrease of efficiency of the process of destabilization and aggregation and increase of consumed destabilization reagents.

1. ÚVOD

Ožehavým tématem v České republice je v posledních letech výskyt vodního květu v povrchových vodách v letních měsících, kdy při dostatečném množství živin a teplém počasí dochází k rozvoji některých druhů sinic a řas. Sinice a řasy během tohoto období vylučují velké množství různorodých látek, které mohou způsobovat zdravotní problémy lidí využívající tuto vodu k pití nebo koupání. Nejčastěji se mluví o problematice vodního květu v souvislosti s koupáním lidí a jejich zdravotními problémy. Problémy s rozvojem fytoplanktonu se ale objevují i v povrchových zdrojích pitné vody. Většina úpraven využívající tuto vodu se v letních měsících potýká s řadou technologických problémů. Některé organické látky sinic a řas inhibují proces destabilizace a agregace používaný při úpravě vody, a způsobují tím nárůst spotřeby destabilizačního činidla. Látky, které nebyly při úpravě vody odstraněny mohou tvořit s dezinfekčním činidlem vedlejší produkty dezinfekce vody (některé z nich mohou být karcinogenní). Vzhledem k tomu, že podíl pitné vody získané z povrchových zdrojů roste, je třeba zajistit dostatečnou a vhodnou úpravu této vody.

Vlivem organických látek, které produkují sinice a řasy, na proces úpravy vody se zabývalo jen málo studií. Studií, které by tyto organické látky rozdělávaly na metabolity a látky, které jsou uvolňovány po poškození nebo odumření buněk a zabývaly se charakterem a vlastnostmi těchto látek, je ještě méně. Přitom právě látky, které se dostávají do vodního prostředí během odumírání vodního květu působí úpravnám vody největší potíže. Zjištění struktury a vlastností těchto látek a optimálních podmínek při jejich odstraňování může vést ke zlepšení tradičních procesů používaných při úpravě vody nebo k vyvinutí nové technologie, a zajistit tak kvalitní pitnou vodu z povrchových zdrojů i v období rozvoje fytoplanktonu.

Cílem této diplomové práce je charakterizovat organické látky produkované sinicemi *Anabaena flos-aquae* a *Microcystis aeruginosa* a zelenou řasou *Scenedesmus quadricauda* a popsat rozdíly ve složení organických látek sinic a řas a také rozdíly mezi EOM a IOM jednotlivých druhů. Cílem je také potvrdit předpokládanou afinitu některých organických látek sinic a řas k hlinitým a železitým iontům, které jsou součástí běžně používaných destabilizačních činidel.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Příměsi ve vodách

Voda se v přírodě nevyskytuje chemicky čistá. Obsahuje rozpuštěné a nerozpuštěné látky anorganického a organického původu. Organické látky se ve vodách objevují v různých koncentracích, od stopových množství v přírodních a užitkových vodách až po jednotky, popř. i desítky g/l v odpadních vodách. Jedná se o látky přírodního, ale i antropogenního původu. Mezi přírodní organické znečišťující příměsi patří výluhy z půd a sedimentů (půdní a rašelinný humus, výluhy z listů a tlejícího dřeva) a produkty životních pochodů organismů. Organické látky antropogenního původu pocházejí především ze splaškových a průmyslových odpadních vod, z odpadů ze zemědělství, ze skládek a mohou vznikat i při úpravě vody chlorací. Hlavním cílem úpravy surové vody na vodu pitnou je co nejúčinnější odstranění těchto příměsí [1].

Příměsi ve vodách lze obecně rozdělit na [1]:

- minerální příměsi - hlinitokřemičitany a sraženiny anorganických látek
- organické příměsi - huminové látky a polysacharidy
- biologický materiál - řasy, bakterie a viry

Dále můžeme obsažené příměsi ve vodě dělit podle jejich specifických fyzikálních a chemických vlastností, jako je [2]:

- stupeň disperzity (hrubé, koloidní a analytické disperze)
- charakter povrchu částic (od částic pevného charakteru s přesně definovaným povrchem až po makromolekulární částice s řetězovitou strukturou)
- chemické složení (od jednoduchých anorganických látek až po složité organické molekuly)
- původ náboje (deformace strukturní mřížky u anorganických sloučenin, přítomnost funkčních skupin na skeletu organických sloučenin atd.)

Protože přírodní voda je disperzní soustava, je stupeň disperzity znečišťujících příměsí její významnou charakteristikou, která definuje kinetickou stabilitu systému (odolnost vůči působení silového pole). Disperzní soustavy dělíme na [3]:

- Hrubě disperzní soustavy (suspenze, emulze a pěny), které mají průměr částic větší než 10^{-6} m, podléhají působení silového pole a jsou kineticky nestálé. Při úpravě vody lze tyto částice odstranit usazováním.

- Koloidně disperzní soustavy (koloidy), které mají průměr částic v rozmezí od 10^{-6} až do 10^{-8} m. Tyto částice nepodléhají vlivům silového pole, jsou kineticky stálé a nesedimentují. Nelze je proto při úpravě vody odstranit usazováním.
- Analytické disperzní soustavy (pravé roztoky), které jsou také kineticky stálé, mají průměr částic menší než 10^{-8} m. V systému jsou částice analytických soustav obsaženy ve formě iontů nebo molekul, které nejsou schopny adheze. Běžnými úpravárenskými postupy jsou obtížně odstranitelné.

Koloidní a analytické disperze se navíc vyznačují odolností vůči vzájemnému spojování ve větší, kineticky stabilní agregáty a odolností vůči adhezi na jiných površích, tzv. agregátní stabilitou. Agregátní stabilita je úzce vázána na strukturu částic [1-3].

2.1.1 Koloidní disperze

Stabilita koloidních disperzí má fyzikální charakter a je dána nábojem částic a s ním spojeným působením elektrostatických sil. Stabilita systému může být tedy ovlivněna změnami podmínek působících na dané prostředí. Částice koloidních disperzí se vyznačují mikroheterogenitou, která významně ovlivňuje optické vlastnosti vody, způsobuje opalescenci vody a tzv. Tyndallův jev. Opalescencí vody se rozumí slabý zákal vody vyvolaný paprskem světla procházejícím tlustší vrstvou koloidní disperze, pozorovatelný kolmo na směr dopadajícího světla. Příčinou zákalu je lom a odraz světla na jednotlivých koloidních částicích. Tyndallův jev je způsoben rozptylem světla na koloidních částicích a projevuje se jako světelný kužel, jehož vrchol je v místě vstupu paprsku do prostředí [1].

Koloidní částice podléhají neustálému Brownovu pohybu, který je způsoben nahodilými srážkami koloidních částic s molekulami rozpouštědla v důsledku jejich tepelného pohybu. Dalším typickým znakem koloidních částic je elektrický náboj na jejich povrchu, který je příčinou jejich migrace v elektrickém poli, tzv. elektroforéza [2].

Koloidní disperze se podle afinity k vodě dělí na [2-5]:

- hydrofilní koloidy
- hydrofobní koloidy

Hydrofobní koloidy (hydrosoly) jsou heterogenní koloidní soustavy, které vznikají disperzací nebo srážením. Tyto koloidní soustavy nejsou v termodynamické rovnováze, a proto jsou agregátně nestálé. Každá částice má vlastní fázové rozhraní, které ji odděluje od disperzního prostředí. Hydrosoly jsou agregátně nestálé a jejich spojování do větších celků se nazývá koagulace. Koagulace probíhá ve vodách buď přirozeně nebo vnějším zásahem (např. přidáním destabilizačního činidla). Ve vodách se vyskytují tyto hydrosoly – amorfní oxid křemičitý, hydratované oxidy kovů, aluminosilikáty (jílové minerály), či emulze olejů a tuků [2].

Hydrofilní koloidy (koloidní roztoky) jsou homogenní disperzní soustavy tvořené makromolekulami (vysokomolekulárními koloidy) nebo micelárními koloidy (tzv. micelami). Mezi makromolekulární koloidy patří bílkoviny, huminové látky, polysacharidy, třísloviny, polyfosforečnany aj. Micelární koloidy tvoří přechod mezi vysokomolekulárními a pravými roztoky. Micelární koloidy jsou tvořeny shluky malých molekul, které by při nízkých koncentracích tvořily pravé roztoky. Překročením tzv. kritické micelární koncentrace (KMK) dochází k tvorbě micel. Tvorba micel je podmíněna specifickou strukturou molekul, tzv. amfipatické molekuly (obsahují jak skupiny s velkou afinitou k vodě zaručující dostatečnou rozpustnost, tak i skupiny ve vodě nerozpustné). Ve vodách se z micelárních koloidů vyskytují např. tenzidy, saponiny a některá barviva [1-2].

Náboj hydrofilních koloidů vzniká disociací charakteristických skupin v organické molekule, jejich rozložením podél řetězce molekuly, typem vazeb atd. Hydrofilní koloidy nesou na svém povrchu řadu polárních skupin, např. karboxyl-, hydroxyl-, fosfo-, sulfo- nebo amino- skupiny. Přítomnost těchto skupin na površích organických látek způsobuje prostorovou orientaci dipólů molekul vody, a tím vytváří kolem organické makromolekuly prostorově orientovaný hydratační obal. Díky tomuto obalu se makromolekuly navzájem odpuzují a samovolně se neslučují do větších celků [2].

Další příčinou stability hydrofilních koloidů může být tzv. sférická stabilizace. Ke sférické stabilizaci hydrofilních koloidů dochází při adsorpci hydrofilních koloidů na fázovém rozhraní mezi pevnou částicí a vodou. Adsorbované segmenty vytvářejí na pevném povrchu "smyčky" a řetězce, které mohou mít jak stabilizující tak i destabilizující účinek. Jejich účinek závisí na poměru množství polymeru a pevných částic, afinitě polymeru k vodě a pevné částici a na typu a koncentraci elektrolytu [6].

Koloidní částice nesou na svém povrchu elektrický náboj, který může mít různý původ. Elektrický náboj na povrchu hydrofobních koloidů vzniká nejčastěji deformací

strukturní mřížky, adsorpcí specifických iontů a povrchovou disociací částic tvořených částečně rozpustnou sloučeninou. Na povrchu hydrofobních koloidů vzniká tzv. elektrická dvojvrstva, kterou charakterizuje ζ (zeta) potenciál [3]. Zeta potenciál vyjadřuje míru stability koloidních částic ve vodě. Je známa řada teorií o struktuře elektrické dvojvrstvy. V současné době se za obecně platnou považuje Sternova teorie, která je založena na elektroneutralitě celého systému. Koloidní částice je tvořena tuhou fází, jejíž povrch nese obvykle kladný náboj. Tato vnější vrstva pevné fáze koloidní částice tvoří vnitřní část elektrické dvojvrstvy. K této vrstvě jsou přitahovány opačně nabití ionty, které tvoří vnější tzv. sekundární část elektrické dvojvrstvy. Vnější část elektrické dvojvrstvy je pak tvořena dvěma částmi. Vnější část vrstvy u tuhé fáze při pohybu částice zůstává a nepohybuje se, zatímco druhá část je difúzní. Vnitřní vrstva sekundární části elektrické dvojvrstvy tzv. Sternova vrstva je nepohyblivou plošnou vrstvou, která je založena na neutralitě celého systému. Ionty Sternovy vrstvy jsou vázány k vnitřní vrstvě adsorpčními silami. Hustota náboje Sternovy vrstvy je menší než u vnitřní vrstvy. Náboj vnitřní vrstvy je tak Sternovou vrstvou kompenzován jen zčásti. Zbývající náboj vnitřní vrstvy působí na ionty roztoku elektrostatickými silami a tvoří difúzní část vnější vrstvy. Vnitřní vrstva a Sternova část vnější vrstvy se pohybují jen zčásti – vzniká pohybové rozhraní mezi Sternovou vrstvou a ostatní kapalinou. Toto rozhraní vykazuje elektrostatický ζ potenciál. Koloidní částice jsou chráněny před koagulací nábojem jenž nesou na svém povrchu. Hodnota ζ potenciálu se obvykle pohybuje v rozmezí 50 až 100 mV. Zvyšováním koncentrace elektrolytu klesá stabilita koloidu, protože hustota ζ potenciálu klesá a může dosáhnout až záporných hodnot. Převažující vliv na destabilizaci koloidních částic mají ionty opačně nabitě než vnitřní část dvojvrstvy. Pokud dojde ke snížení ζ potenciálu na hodnotu cca 30 mV (kritický potenciál), dochází v důsledku zeslabení elektrostatických sil k destabilizaci a agregaci [2-5].

Koagulaci hydrofobních koloidů popisuje DLVO (Derjagin, Landau, Verwey, Oerbeek) teorie, která je založena na principu rovnováhy mezi působením přitažlivých van der Waalsových sil a odpudivých sil vyvolaných elektrickým nábojem koloidních částic [3].

Hydrofilní i hydrofobní koloidy mají v přirozených vodách stejné znaménko hydratačního obalu, proto není možné jejich vzájemné shlukování do větších celků [2].

2.2 Charakteristika organických látek přírodního původu

Organické látky přírodního původu (Natural Organic Matter - NOM) jsou běžnou součástí povrchových i podzemních zdrojů surové vody [7-8]. Mezi NOM patří huminové látky a organické látky vznikající životními pochody mikroorganismů, především sinic a řas (Algogenic Organic Matter - AOM). NOM ovlivňují nejenom zápach, barvu a chuť vody, ale také tvoří komplexy s kovy a pesticidy. Složení, struktura a fyzikální vlastnosti NOM mají zásadní vliv na optimalizaci procesů úpravy vody [9-12].

Na účinnost odstranění NOM destabilizací a agregací působí zejména tyto faktory [12]:

- podstata a vlastnosti částic NOM
- typ a dávka koagulačního činidla
- pH
- iontová síla
- teplota

2.2.1 Huminové látky

Huminové látky jsou běžnou součástí přírodních vod a zahrnují cca 50-75 % celkového organického uhlíku ve vodě [13]. V povrchových vodách způsobují jejich charakteristické žlutohnědé zbarvení.

Huminové látky se do povrchových vod dostávají především dvěma způsoby [14]:

- výluhem z rašelinišť a půd obsahujících větší množství humusu
- biochemickým odbouráváním některých organických látek především ligninu a další syntézou štěpných produktů

Huminové látky jsou vysokomolekulární alifatické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí několika stovek až desítek tisíců. Mezi charakteristické funkční skupiny huminových látek patří karboxylová a hydroxylová, dále se může vyskytovat ketonová, esterová a etherová funkční skupina [13]. Huminové látky obsahují v molekule především uhlík, vodík, kyslík a dusík, jak je uvedeno v tab.1 [1].

Tab.1. Elementární složení huminových látek přítomných v přírodních vodách [1]

	C [%]	O [%]	H [%]	N [%]
Fulvinové kyseliny	46	48,6	4,0	1,2
Huminové kyseliny	57	37,1	4,4	2,0

Vlastnosti huminových látek, jako je rozpustnost ve vodě, schopnost agregace, disociace a oxidace, nábojové poměry či schopnost vytvářet komplexy s kovovými ionty, úzce souvisí s jejich složením, které je ovlivněno procesy jejich vzniku (humifikační procesy) [13]. Huminové látky mají slabě kyselý charakter a jsou z biochemického hlediska velmi resistantní, proto prakticky neovlivňují kyslíkový režim vod [15]. Z přírodních vod se mohou částečně odstraňovat postupnou agregací molekul nebo tvorbou málo rozpustných sloučenin s některými ionty kovů ve vyšších oxidačních stupních. Chemicky jsou huminové látky dobře oxidovatelné (při CHSK se oxiduje 100 % organických látek) [1]. Barevnost huminových látek je způsobena přítomností karboxylové funkční skupiny a dvojných vazeb v postranních řetězcích, cyklech i přítomností kondenzovaných benzenových jader (především v kyselé oblasti). Z chemického hlediska je pro vody s huminovými látkami charakteristická nízká hodnota pH, větší obsah iontů (NH_4^+ , $\text{Fe}^{2+,3+}$) a již zmiňované žlutohnědé zbarvení. Huminové látky jsou v pitných, užitkových a provozních vodách nežádoucí. Jejich přítomnost ve vodě se projevuje zhoršením sensorických vlastností vody (zejména barvy a chuti) [13-15].

Z fyzikálně-chemického hlediska se huminové látky rozpustné ve vodě chovají jako hydrofilní koloidy s různým stupněm disperzity. Koloidní částice mají v přírodních vodách záporný náboj a izoelektrický bod leží v kyselé oblasti. V silně alkalickém prostředí tvoří především pravé roztoky [1].

Mezi významné vlastnosti huminových látek patří také tvorba nejrůznějších komplexů (především s vícemocnými kationy). Tato vlastnost je ovlivněna přítomností karboxylových a fenolových skupin. Schopnost tvorby komplexů se zvyšuje se vzrůstající hodnotou pH. Rozpustnost komplexů huminových látek s vícemocnými kationy závisí na hmotnostním poměru obou složek. Čím je poměrné zastoupení kationtů větší, tím je rozpustnost komplexů menší. Tato vlastnost je jednou z příčin vyluhovatelnosti kovů z půd huminovými látkami a příčinou zvýšené koncentrace železa a manganu v rašelinových vodách [14,16].

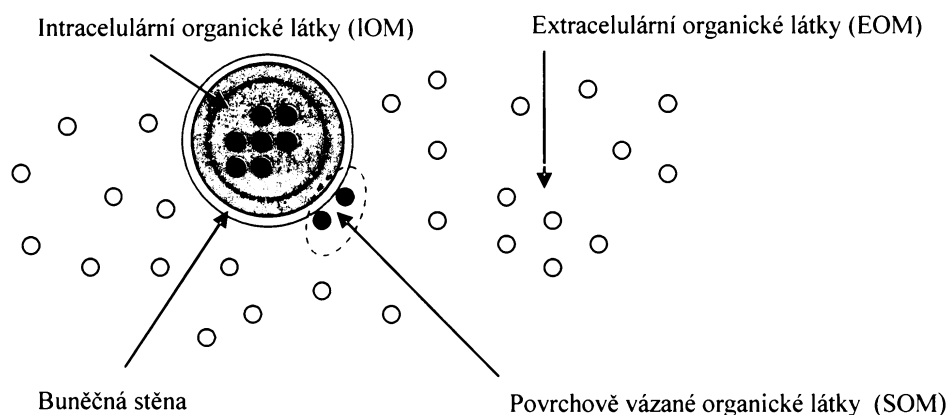
Huminové látky rozpustné ve vodě se dělí podle rozpustnosti v kyselém a alkalickém prostředí na [17]:

- huminové kyseliny – nerozpustné v kyselém a neutrálním prostředí
- fulvinové kyseliny – rozpustné v celém rozsahu pH

Huminové kyseliny jsou slabě disociované vícemocné organické kyseliny, jejichž roztoky mají pH kolem 3,5. Jsou to vysokomolekulární látky, které se chovají jako micelární koloidy [13]. Fulvinové kyseliny mají oproti huminovým kyselinám menší molekulovou hmotnost, kyselejší charakter a vyšší obsah kyslíku v molekule [18]. Jsou žlutě až světle hnědě zbarvené. Aromatický charakter je u nich méně významný než u huminových kyselin. Pro fulvinové kyseliny může být pH roztoku menší než 3. Tyto látky vykazují komplexotvorné vlastnosti a mají značnou výměnnou kapacitu [1]. Hranice mezi těmito dvěma skupinami je značně variabilní a lze je dělit na další frakce podle jejich chemických a fyzikálně-chemických vlastností [13].

2.2.2 Organické látky produkované sinicemi a řasami

V povrchové vodě jsou vedle huminových látek jednou z dominantních frakcí rozpuštěného organického uhlíku (Dissolved Organic Matter - DOC) organické látky produkované sinicemi a řasami, tzv. AOM [19-22]. Sinice a řasy vylučují organické látky do prostředí jak metabolickou činností, tzv. extracelulární organické látky (Extracellular Organic Matter – EOM), tak také při odumírání fytoplanktonu a následných autolytických pochodech, tzv. intracelulární organické látky (Intracellular Organic Matter – IOM) [19]. Někteří autoři [22] uvádějí ještě tzv. povrchově vázané organické látky (Surface Organic Matter - SOM), viz obr.1.



Obr.1. Organické látky produkované sinicemi a řasami (AOM) [22]

Mezi AOM patří široká škála sloučenin, např. monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy, aminokyseliny, peptidy, proteiny a stopová množství řady dalších organických kyselin (např. kyselina glykolová). Tyto látky mají pro řasy důležité funkce jako stavební a zásobní látky, enzymy, vitamíny, hormonální látky, inhibitory a toxiny [19-21]. Množství a typ vylučovaných AOM závisí na růstové fázi, druhu organismu, fyziologických a přírodních podmínkách. V exponenciální fázi růstu je celková mortalita buněk relativně nízká a AOM jsou tvořeny převážně díky sekreci organismů, tzv. EOM. Ve stacionární fázi růstu již nepochybně dochází ke zvýšenému úhynu organismů. Nárůst koncentrace organických látek je částečně způsoben i autolytickými procesy. Postupně dochází ke zvyšování podílu IOM na celkové koncentraci AOM [20]. Sinice (*Cyanophyta*) jsou bohaté na proteiny, které tvoří 40-65 % jejich suché váhy [19] na rozdíl od zelených řas (*Chlorophyta*), které obsahují vyšší procento sacharidů [10].

Nejvíce AOM je do vodních nádrží vylučováno během období masového rozvoje sinic a řas, tzv. vodního květu. Ve vodě se může projevit jako "hustá zelená kaše", která je buď homogenní nebo v ní mohou být patrné drobné vločky či jehličky o velikosti několika milimetrů. Hlavní příčinou výskytu vodního květu je množství živin ve vodě, dalšími důležitými faktory jsou teplota a světlo. Nejčastěji se vodní květ na vodních nádržích objevuje koncem léta (v srpnu nebo v první polovině září). Na některých lokalitách může docházet k masovému rozvoji sinic již v průběhu června [23]. Dominantními druhy sinic, které tvoří vodní květ v našich přírodních podmínkách, jsou především *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa* a *Aphanizomenon flos-aquae* [8]. Sinice produkují v době masového rozvoje cyanotoxiny, které mohou způsobovat úhyn dobytka pijící tuto vodu i celou řadu zdravotních problémů u lidí [8,23-24].

Nárůst množství AOM způsobuje také technologické problémy při úpravě vody [22,25-26]. Ke snížení aktivity řas lze použít proces předchlorace nebo předozonizace, který ale způsobuje zničení buněk a nárůst množství organických látek [25]. Tyto látky mohou při dezinfekci chlorem a jeho některými sloučeninami tvořit trihalogenmetany (Trihalogenmethans – THM), halogenderiváty kyseliny octové (Haloacetic acids – HAA), haloacetonitrily, chlorketony, chloraldehydy a další vedlejší produkty dezinfekce (Disinfection By-Products – DBP). Uvedené sloučeniny se z vod odstraňují obtížně [8,25-30]. THM se tvoří reakcí organických látek (AOM) s chlorem a zbylými kationy hliníku nebo železa v upravené vodě [31]. U THM a HAA bylo potvrzeno, že jsou pro člověka karcinogenní, proto je důležité odstranit ze surové vody prekurzory těchto látek [9]. Vliv AOM na úpravu vody je v podstatě dvojitý. První spočívá ve vlivu AOM na

destabilizaci a agregaci ostatních ve vodě se vyskytujících příměsí (humínové látky, anorganické suspenze atd.). Druhý problém pak představuje vlastní účinné odstranění EOM a IOM a to především v případech, kdy tyto látky tvoří podstatnou část znečišťujících příměsí [32].

Významnou vlastností některých látek obsažených v AOM je tvorba povrchových komplexních sloučenin s vícemocnými kationty nebo tvorba povrchových komplexních sloučenin reakcí s hydrokomplexy a hydratovanými ionty. Bylo prokázáno, že především proteiny (např. metallothionein) uvolňované při odumírání fytoplanktonu mají vysokou afinitu k produktům hydrolýzy hlinitých a železitých solí a vytváří s těmito látkami komplexy [32]. Tím se výrazně zvyšují dávky destabilizačních činidel a dochází ke snižování účinnosti procesu destabilizace a agregace. AOM schopné tvořit komplexy s vícemocnými kationty se dají úspěšně izolovat a analyzovat pomocí afinitní chromatografie [22].

Extracelulární organické látky

Extracelulární organické látky (EOM) hrají důležitou roli při růstu a fyziologii sinic a řas a jsou uvolňovány do vodního prostředí metabolickou činností těchto mikroorganismů [20]. Mezi EOM patří velké množství látek, např.: monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy, aminokyseliny, peptidy, proteiny, jiné organické kyseliny, lipidy, fenolické látky a organické fosfáty, které mají pro sinice a řasy důležité funkce, např. jako enzymy, růstové inhibitory a stimulanty a toxiny (specifické pro sinice – cyanotoxiny) [21]. Sinice se od zelených řas liší vylučováním a skladbou EOM [20].

Vylučování jednoduchých látek jako jsou sacharidy, aminokyseliny a organické kyseliny zdravými buňkami sinic a řas probíhá především difúzí přes buněčnou stěnu. Množství vylučovaných látek závisí na koncentračním gradientu a permeabilitické konstantě. Větší molekuly (polysacharidy, proteiny a polyfenolické látky) jsou pravděpodobně vylučovány složitějšími procesy (např. fúzí) [21].

Množství EOM vylučovaných jednotlivými druhy sinic a řas se dá srovnávat podle celkového organického uhlíku (TOC), partikulovaného organického uhlíku (POC) a rozpuštěného organického uhlíku (DOC). Vlastnosti EOM souvisí jak s relativní molekulovou hmotností jednotlivých látek, tak také s rozdílným složením frakcí (sacharidů, proteinů, močových kyselin a poměru N/C) [20]. Jednotlivé složky EOM se dají oddělit podle jejich relativní molekulové hmotnosti pomocí gelové permeační chromatografie (GPC – Gel Permeation Chromatography) [22,32]. Studovat

extracelulární organické látky v přírodě je obtížné vzhledem k působení různých přírodních faktorů na metabolismus sinic a řas, proto se k určení mechanismu akumulace EOM v médiu a odhadu jejich ekologického významu využívá laboratorních podmínek [10].

Při exponenciálním růstu buněk vylučují řasy do prostředí od méně než 1 % do více než 50 % fotoasimilovaného uhlíku. Toto procento závisí na druhu řasy a okolních podmínkách. Vysoká intenzita světla často podněcuje řasy k vylučování velkého množství fotosyntetických látek, které mohou vést k poničení membrán. V noci kdy neprobíhá fotosyntetická asimilace je uvolňováno do prostředí relativně malé množství uhlíku [20].

Intracelulární organické látky

Intracelulární organické látky (IOM) se dostávají do přírodních vod po odumření nebo poškození buněk sinic a řas. Mezi IOM patří látky, které mají pro sinice a řasy především stavební, zásobní, energetickou a enzymatickou funkci. Jejich podíl ve vodě se zvyšuje při masivním odumírání fytoplanktonu. Z hlediska vlivu na proces úpravy vody představují tyto látky oblast zcela neprozkoumanou [32].

Buněčná stěna sinic je vícevrstevná. Vnější buněčný obal tvoří slizová vrstva složená z lipopolysacharidů. Další složkou je dvojice lipoproteinových membrán. Pevná složka buněčné stěny je uložena mezi oběma membránami a je tvořena peptydoglykanem. Tato vrstva je poměrně tenká. U většiny sinic je hlavní zásobní látkou škrob (α -1,4 glukán). Mezi další zásobní látky patří cyanofycinová zrnka a polyfosfátové granule (volutin). Fotosyntetickými pigmenty sinic jsou chlorofyl a, α i β -karoten, xantofyly a specifická barviva zvaná fykobiliny (modrý allofykocyanin a fykocyanin a červený fykoerytrin). Četné planktonní sinice, zejména ty, které tvoří vodní květ, obsahují v plazmě plynové měchýřky agregované do aerotopů, které snižují specifickou hmotnost buněk a umožňují jim vznášet se ve vodě. Stěna měchýřků je poměrně pevná a tvořená proteiny. Některé sinice mají schopnost vázat plynný dusík pomocí tzv. heterocytů [23,33].

Buněčná stěna řas je polysacharidová (celulózní), někdy chybí nebo je nahrazena glykoproteinovou vrstvou. Mezi zásobní látky zelených řas patří škrob, monosacharidy, disacharidy a volutin. Fotosyntetickými pigmenty těchto organismů jsou především chlorofyl a+b a β -karoten a několik xantofylů. Barva chloroplasty je jasně zelená. Při dusíkovém hladovění vznikají sekundární karotenoidy, které vyvolávají červenohnědé zbarvení chloroplastu nebo celého protoplastu. Mají různé typy stélek (od

mikroskopických jednobuněčných až po makroskopické) [33].

Sinice a řasy vylučují velké množství různorodých látek jako jsou:

Sacharidy

Mezi nejběžnější látky vylučované sinicemi a řasami patří především monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Sinice a řasy uvolňují sacharidové složky v různých stádiích růstu. Při aktivním růstu a fotoasimilaci bylo uvolňování sacharidů prokázáno např. u následujících druhů sinic a řas. *Chlamydomonas*, *Porphyridium cruentum*, *Anabaena flos-aquae*, *Katodinium*. Jiné druhy mikroorganismů produkují extracelulární polysacharidy při stacionární růstové fázi, např. *Isochrysis galbana*, *Prymnesium parvum*, *Dunaliella tertiolecta*, *Rhodomonas sp.*, *Pyramimonas sp.* [21]. Akumulace sacharidů ve vodním prostředí závisí na fotosyntetické aktivitě organismů, ale ve srovnání s celkovým obsahem AOM jen málo závisí na jejich mortalitě [10].

Mezi běžné složky extracelulárních sacharidů a polysacharidů patří glukóza, galaktóza, manóza, xylóza a močové kyseliny. Ve velmi malém množství se vyskytují cukerné alkoholy (např. ribitol, sorbitol a manitol) [21]. Pro každý druh řasy existují typické sacharidové složky, které se mění podle stáří kultury [20]. Nejvíce jsou zastoupeny polysacharidy, které zahrnují rozpustné a fyziologicky aktivní složky. Funkční skupiny polysacharidů mohou reagovat s některými těžkými kovy (měď, olovo, kadmium) a změnit jejich mobilitu a toxicitu ve vodním prostředí. Extracelulární sacharidy mohou dosahovat až 40 % celkových organických látek v závislosti na druhu řasy a přírodních podmínkách [10]. Nejvíce sacharidů bylo vylučováno během exponenciální fáze [20,32].

Aminokyseliny, peptidy a proteiny

Aminokyseliny, peptidy a proteiny jsou běžnou součástí řas, ale ve většině případů se vyskytují jen v malých množstvích, na rozdíl od sinic, které uvolňují do prostředí velké množství asimilovaných dusíkatých látek [19].

Velké množství těchto látek se vyskytuje ve formě proteinů, pouze malé množství jako volné aminokyseliny. Extracelulární peptidy se skládají z dvanácti aminokyselin (např. glycin, glutaminová kyselina, alanin, serin). Pro některé řasy (*Euglena*, *Monochrysis*, *Ochromonas*, *Skeletonema*) je typické vylučování vitamínu B₁₂.



Mezi látky tvořené proteiny patří také toxiny, růstové inhibitory a stimulatory a enzymy [21].

Jiné organické kyseliny

Sinice a řasy z organických kyselin nejčastěji vylučují kyselinu glykolovou [17]. Mezi sinice, které produkují kyselinu glykolovou patří: *Coccochloris sp.*, *Anacystis sp.*, *Oscillatoria sp.*, mezi zelené řasy pak *Chlorella sp.*, *Dunaliella sp.*, *Chlamydomonas sp.* V anaerobních podmínkách vylučují některé druhy sinic a řas laktát, acetát a formiát [21].

Lipidy

Vylučování lipidů sinicemi a řasami je velmi málo známé. Nenasycené mastné kyseliny vylučují ve starších kulturách např. řasy *Chlamydomonas sp.* a *Chlorella sp.* Mořská rozsivka *Asterionella japonica* vylučuje mastné kyseliny, které inhibují bakteriální růst [21].

Těkavé látky

Speciální pach v době masového rozvoje sinic a řas často souvisí s uvolňováním těkavých sloučenin [34]. Některé chaluhy (*Phaeophyceae*) vylučují velké množství polyfenolů (především flavanoly a taniny). Mezi další těkavé organické látky patří: formaldehyd, acetaldehyd, methylethylketon, dimethylsulfid, furfural, aceton, ethylacetát, ethylalkohol a kyselina ethanová. Tyto látky vylučují např. *Chlamydomonas globosa*, *Synura petersenii*, *Cryptomonas ovata* [21].

Organické fosfáty

Na konci masového rozvoje sinic a řas vylučují mrtvé a nezdravé buňky větší množství organických fosfátů [21].

AOM mají pro mikroorganismy některé důležité funkce, např. jako:

Enzymy

Řasy mohou produkovat enzymy, které jim zajišťují řadu důležitých funkcí, např. zlativka *Ochromonas variabilis* uvolňuje enzymy, které hydrolyzují sacharózu, škrob a proteiny, rozsivka *Nitzschia putrida* vylučuje protolytické enzymy, penátní rozsivky *Nitzschia filiformis* a *N. frusutulum* produkují extracelulární enzymy

depolymerizující agar a některé druhy zelených řas produkují enzymy rozkládající škrob [21].

Vitaminy

Několik druhů mořských planktonních řas produkuje extracelulární vitaminy, např. thiamin (*Skeletoema cosatum*, *Dunaliella*, *Phaeodactylum*) a biotin (*S. costatum*, *Cyclotella nana*). Vysoká koncentrace rozpuštěných vitamínů (B₁₂, thiamin a biotin) souvisí s rozvojem biomasy fytoplanktonu, proto se produkce vitamínů odehrává především během exponenciální a stacionární fáze. V některých přírodních vodách byly zjištěny také vitaminy B₆, E, askorbát a riboflamin [21].

Růstové inhibitory a stimulatory

Mnoho druhů řas vylučuje látky, které inhibují nebo stimulují vlastní růst, růst jiných organismů nebo obojí [33].

Cyanotoxiny

Cyanotoxiny jsou biologicky aktivní látky sekundárního metabolismu, které jsou produkovány sinicemi vyskytujícími se ve sladkých, brakických i slaných vodách. Jsou toxicitější než toxiny vyšších rostlin a hub, zároveň jsou ale méně toxické než bakteriální toxiny (např. botulin) [35].

Problémy s otravou cyanotoxiny vznikají požitím vody obsahující sinice nebo kontaktem při koupání. Některé epidemiologické studie prokázaly nejen jejich teratogenní vliv, ale také hepatotoxické, embryotoxické, imunotoxické, neurotoxické, dermatotoxické a další efekty na zdraví obyvatel. Nejčastějším následkem kontaktu s vodním květem jsou kožní alergie, záněty spojivek a bronchitidy [23,36].

Podle chemické struktury můžeme cyanotoxiny dělit na [36]:

- alkaloidy
- cyklické a lineární peptidy
- lipopolysacharidy

Další uznávané členění dělí cyanotoxiny podle metod biodetekce, konkrétně podle mechanismů účinku toxinů [23]:

- neurotoxiny (vliv na nervový systém)
- hepatotoxiny (vliv na metabolickou aktivitu jater)
- imunotoxiny a imunomodulanty

- genotoxiny a mutageny (Tumor Promoting Factors)
- embryotoxiny
- cytotoxiny
- dermatotoxiny

Jednotlivé toxiny mají často smíšenou biologickou aktivitu. Populace jednoho druhu může také souběžně produkovat několik druhů toxinů. Mezi nejstudovanější a také nejdůležitější patří neurotoxiny a hepatotoxiny [33].

Neurotoxiny

Mezi neurotoxiny patří anatoxin a, anatoxin a(s), anatoxin b, homoanatoxin, saxitoxin, neosaxitoxin, aphanotoxin 1-5 a jsou produkovány především rody *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Planktothrix* a *Nostoc*.

Neurotoxiny jsou ve vodním ekosystému poměrně nestabilní. Sladkovodní sinice produkují zejména anatoxin a aphanotoxin. Oba neurotoxiny jsou alkaloidní povahy a blokují sodíkové kanály membrán, aniž by ovlivnily jejich propustnost pro draslík [36]. Tím způsobují u zvířat i lidí vrávorání, dýchavičnost, strnutí svalstva, nadměrné slinění (anatoxin-a) a mohou způsobit až smrt díky inhibici acetylcholinesterázy. Mezi neurotoxiny se také řadí saxitoxin, který je produkován obrněnkami (*Dinophlagelata*) a je známý především v souvislosti s rudým přílivem na mořském pobřeží (tzv. red tide). Tento neurotoxin se akumuluje v těle měkkýšů a jejich konzumací může dojít k otravě. Do dnešního dne je popsáno asi 20 variant saxitoxinů a mohou být produkovány i sladkovodními sinicemi [35-37].

Hepatotoxiny

Z hepatotoxinů jsou nejznámější microcystiny, nodularin a microviridin a produkované je především rody *Trichodesmium*, *Umezakia*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaenopsis* a *Nodularia*.

Hepatotoxiny způsobují poškození struktury a funkce jater. Jejich strukturu tvoří cyklické peptidy. Sladkovodními sinicemi jsou produkovány zejména microcystiny a microviridiny. Jedná se o termostabilní látky, jejichž aktivita není omezena ani po několika hodinách varu. Hepatotoxiny můžeme podle struktury rozdělit na alkaloidní hepatotoxiny a peptidické hepatotoxiny [36]. Vnějšími znaky působení hepatotoxinů

jsou především slabost, bledost, problémy s dýcháním a střevní potíže. Na molekulární úrovni způsobuje microcystin a nodularin inhibici fosfatázy (enzym hydrolýzy organických esterů), což má velmi rozsáhlé následky, protože tento enzym má mnoho rolí při regulaci genetických, vývojových, metabolických a fyziologických pochodů. Hepatotoxiny mohou podporovat i vznik nádorů [35-38].

2.3 Odstraňování organických látek z vody

Pro odstranění organických látek z vody se s úspěchem používají nejen procesy konvenční úpravy vody, ale také některé moderní technologie [12].

2.3.1 Konvenční úprava vody

Konvenční procesy úpravy vody zahrnující destabilizaci, agregaci a následnou separaci vzniklých agregátů jsou běžnou metodou používanou při úpravě vody s obsahem NOM. Na účinnost odstranění NOM během destabilizace a agregace působí řada faktorů, především typ a dávka koagulačního činidla, pH, iontová síla a teplota [12].

Tvorba separovatelných agregátů probíhá ve dvou fázích [4]:

1. fáze – destabilizace kineticky stálých částic příměsí (vliv chemických faktorů)
2. fáze – dochází k agregaci destabilizovaných částic v kineticky nestálé agregáty (vliv fyzikálních faktorů)

Destabilizace

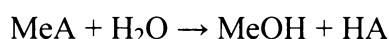
Hlavním problémem při odstraňování hydrofobních a hydrofilních koloidů z přirozených vod je stejné znaménko jejich hydratačních obalů, což neumožňuje jejich vzájemné spojování do větších celků. K dosažení vzájemného spojování znečišťujících příměsí je důležité potlačit nebo alespoň omezit jejich stabilizující mechanismy [4].

Destabilizace hydrofilních koloidů se dosahuje především pomocí koordinačních reakcí mezi funkčními skupinami, které nesou částice a kovové ionty hydroxopolymerů. Hydrofobní koloidy naopak destabilizujeme potlačením jejich elektrické dvojvrstvy, čehož dosáhneme neutralizací náboje, např. pomocí adsorpce částic na povrchu již vytvořených agregátů, přirozených elektrolytů či specifickou adsorpcí na produktech destabilizačního činidla [2-4].

Jako destabilizační činidla se používají především železité a hlinité soli, např. síran železitý ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), síran hlinitý ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$), chlorid železitý

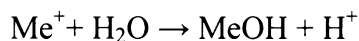
(FeCl₃·6H₂O), chlorsíran železitý (FeClSO₄) a hlinitan sodný (NaAlO₂). Směsná destabilizační činidla, která obsahují Al³⁺ i Fe³⁺ ionty, se používají pro speciální účely, např. pro úpravu mineralizovaných vod. Optimální dávka destabilizačního činidla se zjišťuje zpravidla sklenicovou optimalizační zkouškou. Postup a princip sklenicové optimalizační zkoušky je podrobně popsán v literatuře [4].

Hlinité a železité soli ve vodě disociují a hydratují za tvorby hydroxokomplexů, které jsou schopny polymerace [2-4]. Hydrolyzu, která proběhne po nadávkování hlinité nebo železité soli do vody lze popsat následující rovnicí [4]:



(Me - kation přidané železité nebo hlinité soli, A - anion přidané hlinité nebo železité soli).

V iontovém tvaru má rovnice podobu:



Hydrolyza probíhá mechanismem vratných reakcí a je značně závislá na iontové síle, teplotě a pH vody a na koncentraci použitého destabilizačního činidla [34].

Agregace

Pojmem agregace jsou označovány procesy, při kterých dochází k vzájemnému spojování částic ve větší separovatelné celky. Agregace probíhá za předpokladu adhezních schopností částic [2]. Výrazný vliv na průběh agregace má pohyb částic. Částice o malém průměru se pohybují perikinetickým pohybem v důsledku tepelného pohybu molekul vody. Perikinetický pohyb je hlavním mechanismem v počátku agregace a je ovlivňován teplotou. S růstem teploty jeho intenzita roste a současně roste i kinetická energie částic. Částice o větším průměru tepelnému pohybu nepodléhají, ale pohybují se tzv. ortokinetickým pohybem, který je vyvolán pohybem kapaliny nebo působením gravitačního pole. Při pohybu kapaliny dochází ke vzniku tečných sil, jejichž velikost je charakterizována velikostí gradientu rychlosti G. Gradient rychlosti je definován jako rychlostní spád tvořící se mezi dvěma sousedními elementárními vrstvami pohybující se kapaliny ve směru kolmém na směr pohybu. Částice unášené proudící kapalinou jsou tečnými silami ovlivňovány. S růstem velikosti tečných sil roste

i intenzita pohybu částic a v důsledku toho i četnost setkání částic. Z hlediska průběhu procesu agregace je významným faktorem i doba, po kterou jsou částice pod vlivem tečných sil. Působením tečných sil není ovlivňována pouze rychlost a účinnost agregace, ale i charakter tvořené suspenze. Při agregaci působí tečné síly v opačném smyslu než síly adhezní. [2-4].

Pohyb částic vede ke vzájemným kolizím, které vyúsťují ve spojení částic. Vznikají tak dvoj-, troj- a vícenásobné agregáty. Postupná agregace vede k postupnému poklesu počtu částic v systému a k růstu velikosti zbývajících částic [4].

V systému při agregaci je možno odlišit čtyři typy částic [4]:

- nedestabilizované neagregované částice příměsí (NEA) – vyskytují se v počáteční fázi
- primární částice (PRI) – vznikají agregací nestabilizovaných a neagregovaných částic
- mikročástice (MI) – vznikají agregací primárních částic
- makročástice (MA) – vznikají vzájemnou agregací mikročástic nebo spojováním primárních částic a mikročástic

Oddělení suspenze je možno dosáhnout řadou způsobů, v běžné praxi se nejčastěji používají tyto [4]:

- usazování agregátů v gravitačním poli (k separaci látek dochází působením gravitační síly na částice)
- zachycování v pevné filtrační vrstvě zrnitého materiálu (při filtraci dochází při průtoku suspenze přes filtrační materiál k adhezi částic suspenze na částicích pórovité filtrační vrstvy) nebo zachycování ve vznášené filtrační vrstvě vytvořené suspenze (při filtraci vznášenou vrstvou vločkovité suspenze dochází k postupnému zachycování suspenze a k narůstání koncentrace suspenze ve vrstvě)
- separace ve vznášené vrstvě zrnitého materiálu (na povrchu expandovaného materiálu se zachycují pouze destabilizované neagregované částice a vytváří kompaktní obalovou vrstvu, mechanismus zachycování částic lze označit za krystalizaci při vysokých energiích)

2.3.2 Použití moderních technologií

Pro větší účinnost odstraňování organických látek se vyvíjejí nové metody, mezi které patří membránové procesy a filtrace přes aktivní uhlí [12].

Membránové procesy

Množství membrán, které jsou dnes k dispozici můžeme dělit podle typu separace, v které mohou být použity, podle materiálu a podle struktury.

Typy membrán, které se používají pro úpravu pitné vody, se dají rozdělit do 3 hlavních kategorií [39]:

- mikro/ultrafiltrace (MF/UF)
- nanofiltrace (NF)
- reverzní osmóza (RO)

V posledních letech se používá technologie membránové filtrace. Značnou nevýhodou této metody je především její technologická náročnost a s tím související velmi vysoké ekonomické náklady [9]. Mikrofiltrace a ultrafiltrace jsou účinné pro odstraňování částic, zákalu, bakterií a cyst z přírodních vod. Tyto procesy ale nejsou dostatečně účinné při odstraňování barvy a jsou náchylné k nánosům [12].

Filtrace přes aktivní uhlí

Filtrace přes aktivní uhlí (AC) je stále častěji užíváno pro zkvalitnění úpravy pitných vod ve vodárenství [30]. Aktivní uhlí můžeme podle tvaru a velikosti dělit na práškovou, granulovanou, extrudovanou a tkaninovou. Pro kontinuální úpravu pitných vod se používá především granulované aktivní uhlí (GAC), pro nárazové odstraňování organických polutantů pak práškové aktivní uhlí (PAC) [39].

3. METODIKA

3.1 Kultivace a kultivační média sinic a řas

K výzkumu byly použity kultury sinic *Anabaena flos-aquae* a *Microcystis aeruginosa* a zelené řasy *Scenedesmus quadricauda*. Inokula těchto druhů sinic a řas pocházejí ze sbírky autotrofních mikroorganismů Botanického ústavu AV ČR. Kultury sinic *A. flos-aquae* a *M. aeruginosa* byly pěstovány ve dvaceti litrech Z média a kultura zelené řasy *S. quadricauda* ve dvaceti litrech BB média. Složení těchto médií je popsáno v následujících odstavcích. Mikroorganismy byly pěstovány při teplotě 24 °C a světelné periodě 16 h světlo a 8 h tma. Intenzita použitého osvětlení byla 6000 lx. Celý objem kultivačního média byl míchán intenzitou 40 ot./min. Před každým použitím se všechny materiály a média sterilizovaly autoklávem. Růstové křivky mikroorganismů byly stanoveny měřením chlorofylu-a. Množství organických látek vylučovaných fytoplanktonem v průběhu jejich kultivace bylo měřeno jako DOC_C a CHSK_{Mn}. Všechny parametry byly měřeny každý druhý den od počátku kultivace. Vzorke pro stanovení koncentrací chlorofylu-a a AOM byly u sinice *M. aeruginosa* odebírány 4., 8., 12., 16. a 18. den kultivace. S ohledem na částečně odlišný průběh růstu zbývajících dvou kultivovaných mikroorganismů byly vzorky pro stanovení AOM odebírány ještě 20. den u *A. flos-aquae* a 20. a 22. den u *S. quadricauda*.

Z médium

Médium podle Zehndera modifikované Staubem (1961) se používá pro většinu sinic. Do cca 750 ml destilované vody přidáme 10 ml jednotlivých makroelementů ze zásobních roztoků, 10 ml Fe-EDTA, 0,08 ml Gaffronových mikroelementů a doplníme do 1000 ml destilovanou vodou. Přesná množství použitých roztoků jsou uvedena v tab.2-3. Na přípravu 500 ml Fe-EDTA použijeme 0,138 mg FeCl₃.6H₂O rozpuštěného v 5 ml 0,1 N HCl a 0,186 mg Chelatonu III rozpuštěného v 5 ml 0,1 N HCl.

Tab.2. Složení Z média - makroelementy

<i>Makroelementy</i>	<i>Použité množství [g/l]</i>
NaNO ₃	46,7
Ca(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	5,9
K ₂ HPO ₄	3,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,5
Na ₂ CO ₃	2,1

Tab.3. Složení Z média – Graffronovy mikroelementy

<i>Graffronovy mikroelementy</i>	<i>Použité množství na 100 ml roztoku [mg]</i>
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	19,8
V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ ·16H ₂ O	3,1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	8,8
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	28,7
Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	15,4
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ ·24H ₂ O	47,4
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	3,3
KBr	11,9
H ₃ BO ₃	31,0
MnSO ₄ ·4H ₂ O	223,0
Cr(NO ₃) ₃ ·7H ₂ O	3,7
Co(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	14,6
KI	8,3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	12,5

Tab.4. Složení BB média

<i>Zásobní roztok</i>	<i>Chemikálie</i>	<i>Použité množství</i>
<i>Zásobní roztok "a"</i>	NaNO ₃	2,50 g
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,25 g
	K ₂ HPO ₄	0,75 g
	KH ₂ PO ₄	1,75 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75 g
	NaCl	0,25 g
<i>Zásobní roztok "b"</i>	Chelaton III	5,00 g
	KOH	3,10 g
<i>Zásobní roztok "c"</i>	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,50 g
	H ₂ SO ₄ konc.	0,10 ml
<i>Zásobní roztok "d"</i>	H ₃ BO ₃	1,14 g
<i>Zásobní roztok "e"</i>	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,88 g
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,14 g
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (MoO ₃)	0,24 (0,07) g
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,16 g
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,05 g

BB médium

Médium podle Bristolu modifikované Boldem (1949) se používá pro většinu řas. Smícháme 10 ml zásobního roztoku "a", 1 ml zásobního roztoku "b", 1 ml zásobního roztoku "c", 1 ml zásobního roztoku "d", 1 ml zásobního roztoku "e" a doplníme do

1000 ml destilovanou vodou. Přesná množství použitých roztoků jsou uvedena v tab.4.

3.2 Příprava extracelulárních a intracelulárních organických látek

Příprava EOM

Vzorky kultivačního média (1000 ml) obsahující buňky sinic a řas byly filtrovány přes 0,22 μm membránový filtr (MF, Millipore). Následně byly z filtrátu pomocí iontové výměny (silně kyselý Na^+ katex Noromit 001*7) odstraněny vícemocné kationty (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Tímto krokem se zabránilo případným srážkám dvouvalentních iontů s organickými látkami obsaženými ve filtrátu. Takto upravené vzorky byly v dalším kroku zahuštěny při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$ na desetinu svého původního objemu (100 ml) pomocí vakuové rotační odparky (Laborota 4000 HB/G1). Vzorky EOM byly skladovány při teplotě -18 $^{\circ}\text{C}$.

Příprava IOM

Vzorky IOM byly připraveny destrukcí mikroorganismů 16. den kultivace. Mikroorganismy byly odděleny od kultivačního média pomocí 0,22 μm membránového filtru (MF, Millipore). Destrukce organismů byla prováděna ultrazvukovým homogenizátorem (HD 3200, 20 kHz, 60 W), který byl ponořen do kádinky se separovanými buňkami mikroorganismů. Účinnost destrukce byla sledována optickým mikroskopem (Optech B4T). Zbylé pevné částice byly odstraněny filtrací přes 0,22 μm membránový filtr. Takto získané vzorky IOM byly následně koncentrovány na desetinu původního objemu (100 ml) pomocí vakuové rotační odparky (Laborota 4000 HB/G1) při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$. Vzorky IOM byly skladovány při teplotě -18 $^{\circ}\text{C}$.

3.3 Stanovení podílu proteinů

Vzhledem k obecnému poznatku, že AOM jsou tvořeny především sacharidy, polysacharidy a proteiny, byly během výzkumu stanovovány podíly proteinů (DOC_P) a neproteinových látek (DOC_{NP}), především sacharidů a polysacharidů, z celkového množství organických látek (DOC_C). Proteiny byly vysráženy ze vzorků EOM a IOM pomocí kyseliny wolframové (H_2WO_4). EOM a IOM vzorky byly naředěny vodou, aby měl výsledný roztok koncentraci $\text{DOC}_C = 100 \text{ mg/l}$. 0,6 ml roztoku A (10% $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 0,6 ml roztoku B (0,335 M H_2SO_4) bylo smícháno a přidáno k 10 ml vzorku EOM a IOM. Kyselina wolframová (H_2WO_4), která se připravila smícháním 0,8 ml roztoku A a 0,8 ml roztoku B, byla přidávána po kapkách za stálého míchání vzorků. Takto vysrážené proteiny byly v dalším kroku filtrací přes 0,22 μm membránový filtr

(MF, Millipore) odděleny od zbylých organických látek. Podíl proteinů (DOC_P) na celkové koncentraci organických látek (DOC_C) udává vzorec:

$$DOC_P = DOC_C - DOC_{NP} \quad (1)$$

kde DOC_P udává množství organických látek proteinového charakteru,

DOC_C je celkové množství organických látek pro EOM nebo IOM a

DOC_{NP} udává množství organických látek neproteinového charakteru, které bylo měřeno ve filtrátu po membránové filtraci.

Srážení proteinů bylo prováděno třikrát a chyba stanovení DOC_P byla menší než 5 %.

3.4 Stanovení relativní molekulové hmotnosti

Ze vzorků EOM a IOM byly pomocí dialýzy (dialyzační membrána Amersham Bioscience Corp., Mr: 10 tis.) odstraněny nízkomolekulární frakce organických látek. Dialýza probíhala v 0,05 M fosfátovém pufru (pH = 7,0). U takto upravených vzorků byla pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) provedena frakcionace obsažených látek podle relativních molekulových hmotností (Mr). Použitím stejné koncentrace ($DOC_C = 100$ mg/l) pro všechny vzorky EOM a IOM se předešlo vlivům různé koncentrace vzorků na GPC. Frakcionace obsažených látek podle Mr byla prováděna na instrumentálním zařízení HPLC (Agilent 1100 series, Agilent Technologies, USA) s detektorem s diodovým polem (DAD). Byly použity 2 kolony Agilent Zorbax GF-250 (9,4 mm x 250 mm, 4 μ m) a GF-450 (9,4 mm x 250 mm, 6 μ m) zapojené do série. Separací rozsah Mr série kolon byl 4 – 900 tis. Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr (0,2 M Na_2HPO_4) o pH 7,0. Průtok systémem byl nastaven na 2,00 ml/min a teplota na 23 °C. Objem vzorku byl 20 μ l. Pro měření Mr EOM a IOM byla použita absorpční vlnová délka 280 nm. Analýza dat byla provedena pomocí softwaru Agilent Technologies Chemstation. Systém byl kalibrován použitím standardů pro gelovou chromatografii (Sigma-Aldrich Co.): cyanokobalamin (1,35 tis.), ribonukleáza-a (13,7 tis.), myoglobin (17 tis.), karbonická anhydráza (29 tis.), albumin (66 tis.), alkoholová dehydrogenáza (150 tis.), β -amyláza (200 tis.), apoferitin (443 tis.), thyroglobulin (669 tis.) a imunoglobulin (900 tis.). Ve všech případech byla pozorována dobrá lineární závislost. Jako zpětné a vnitřní standardy byly použity hovězí gamaglobulin (158 tis.) a kuřecí ovalbumin (44 tis.). Reprodukovatelnost Mr frakcionace EOM a IOM byla velmi dobrá a odchylky Mr byly pro opakovaná měření menší než 3 %.

3.5 Afinitní chromatografie

Pro detekci proteinů, které mají schopnost tvořit komplexy s vícemocnými kationty, byla použita afinitní chromatografie. Vzorky EOM a IOM byly nanášeny na afinitní kolonu (HiTrapTM, Amersham Bioscience Corp.), kde byly proteiny schopné tvořit komplexy s vícemocnými kationty (Fe^{3+} , Al^{3+}) znehybněny v ligandech. Jako startovací pufr byl použit hydrogenfosforečnan sodný (0,02 M Na_2HPO_4) s chloridem sodným (0,5 M NaCl) o pH 7,2. Stejný pufr byl použit také jako eluční, ale jeho pH bylo 3,5. Průtok pufru na kolonu byl 2,00 ml/min a objem separovaných frakcí 5 ml. Vzorky byly po afinitní chromatografii odsoleny pomocí dialyzační membrány (Amersham Bioscience Corp., Mr: 10 tis.) a zahuštěny pomocí vakuové rotační odparky (Laborota 4000 HB/G1) při teplotě 30 °C. Relativní molekulové hmotnosti těchto proteinů byly stanoveny pomocí GPC.

3.6 Analytická stanovení

Stanovení chlorofylu-a

Růst mikroorganismů během jejich kultivace byl sledován pomocí měření chlorofylu-a. 100 ml vzorku bylo zfiltrováno přes GF/F filtr (Whatman). Chlorofyl-a byl z filtru extrahován použitím 14 ml ethanolu (96%). Koncentrace chlorofylu-a v extraktu se stanovila spektrofotometricky. Optická hustota extraktů byla měřena při 664 a 750 nm pomocí UV/VIS 8452A spektrofotometru (Agilent Technologies). Byly použity 40-ti mm kyvety a jako slepý vzorek ethanol (96%). Koncentrace chlorofylu-a (ρ_c) v $\mu\text{g/l}$ se vypočte z rovnice odvozené Arvolou (1981):

$$\rho_c = \frac{(A - A_0) \cdot 29.6 \cdot V_e}{V_s \cdot d} \quad (2)$$

kde A je absorbance extraktu před okyselením ($A = A_{664} - A_{750}$),

A_0 je absorbance extraktu po okyselení ($A_0 = A_{664} - A_{750}$),

V_s je objem filtrovaného vzorku [l],

V_e je objem extraktu [l] a

d je optická dráha kyvety [mm].

Měření chlorofylu-a bylo u všech vzorků prováděno třikrát a chyba měření byla menší než 5 % .

DOC analýza

Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku byla měřena pomocí Shimadzu TOC – V_{CPH} analyzátoru. Přístroj byl kalibrován hydrogenftalátem draselným (standard pro celkový uhlík), hydrogenuhličitanem sodným a uhličitanem sodným (standarty pro anorganický uhlík). Vzorky byly před měřením celkového uhlíku (TC) a anorganického uhlíku (IC) zfiltrvány přes 0,22 µm membránový filtr (MF, Millipore). Standarty pro TC a IC se pohybovaly v rozsahu 0 - 100 mg/l. Rozpuštěný organický uhlík (DOC) byl vypočten z rozdílu změřených hodnot celkového a anorganického uhlíku, tedy podle rovnice:

$$DOC = TC - IC \quad (3)$$

kde DOC je rozpuštěný organický uhlík,

TC je celkový organický uhlík a

IC je anorganický uhlík.

Jako kontrolní vzorky byly použity TC nebo IC standarty o koncentraci 10 mg/l a 50 mg/l. Všechna měření byla prováděna třikrát a chyba měření byla menší než 2 %.

Chemická spotřeba kyslíku manganistanem

Chemická spotřeba kyslíku manganistanem (CHSK_{Mn}) byla měřena jako množství oxidovatelných organických látek obsažených ve vodě po oxidaci manganistanem draselným (KMnO₄) v prostředí okyseleném kyselinou sírovou (H₂SO₄). Oxidace probíhá po dobu 10 minut za varu. Úbytek manganistanu draselného (množství spotřebované na oxidaci organických látek) se stanoví odměrným manganometrickým stanovením. Po ukončení oxidace se do reakčního roztoku přidá známé množství standardního odměrného roztoku šřavelanu sodného, jehož přebytek je ekvivalentní k množství manganistanu spotřebovaného na oxidaci organických látek v roztoku a stanoví se titrací odměrným roztokem manganistanu. Při užití obecně platných stechiometrických vztahů pro titraci a dosazení konkrétních hodnot pro uvedené manganometrické odměrné stanovení je CHSK_{Mn} vzorku vody vyjádřena vzorcem:

$$CHSK_{Mn} = \frac{f_i \cdot c(KMnO_4) \cdot (V_t - V_s) \cdot M(O) \cdot 10^3}{V_v} \quad (4)$$

kde CHSK_{Mn} je chemická spotřeba kyslíku vzorku vody [mg/l],

f_i je titrační přepočítávací faktor,

$c(\text{KMnO}_4)$ je látková koncentrace odměrného roztoku manganistanu draselného [mol/l],
 V_t je objem odměrného roztoku manganistanu draselného spotřebovaného při titraci vzorku [ml],

V_s je objem odměrného roztoku manganistanu draselného spotřebovaného při titraci slepého stanovení [ml],

V_v je objem vzorku vody použitý pro stanovení CHSK_{Mn} [ml],

$M(\text{O})$ je molární hmotnost kyslíku (O) [g/mol], $M(\text{O}) = 16\text{g/mol}$.

pH vody

pH vody se měřilo potenciometrickým stanovením pomocí pH-metru se skleněnou měrnou a kalomelovou referenční elektrodou.

Kyselinová neutralizační kapacita do pH 4.5

$\text{KNK}_{4,5}$ se stanovovalo titrací odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové do hodnoty pH 4.5. Konec titrace je určen barevným přechodem indikátoru (u metyloranže: žlutá → oranžová).

$\text{KNK}_{4,5}$ se vypočte z rovnice:

$$\text{KNK}_{4,5} = \frac{c(\text{HCl}) \cdot V_t \cdot 1000}{V_v} \quad (5)$$

kde $\text{KNK}_{4,5}$ je schopnost vody reagovat s vodíkovými ionty do pH 4.5 [mmol/l],

$c(\text{HCl})$ je látková koncentrace odměrného roztoku HCl [mmol/l],

V_t je objem roztoku HCl, spotřebovaný do konce titrace [ml] a

V_v je objem vzorku použitý při titraci [ml].

3.7 Použité druhy fytoplanktonu

V následujících odstavcích je stručně popsána charakteristika 3 použitých druhů fytoplanktonu. Jedná se o dva druhy sinic (*Cyanobacteria*) a jeden druh zelených řas (*Chlorophyta*). Sinice *Anabaena flos-aquae* a *Microcystis aeruginosa* způsobují ve vodách vznik tzv. vodního květu a vylučují do svého okolí toxiny.

Anabaena flos-aquae

(oddělení: *Cyanobacteria*, řád: *Nostocales*, rod: *Anabaena*)

Rod *Anabaena* tvoří charakteristické řetízky a je známý schopností fixovat plynný dusík pomocí tzv. heterocytů. Heterocyty přeměňují plynný dusík na amoniak, který je vázán jako glutamin a v této formě je transportován do sousedních buněk. *A. flos-aquae* (obr.2) je planktonní druh, který bývá součástí vodního květu. Vznášení ve vodním sloupci je umožněno díky tzv. aerotopům, buňkám vyplněným plynem. *A. flos-aquae* vylučuje neurotoxiny, které mohou způsobovat smrtelné otravy lidí i zvířat.

Microcystis aeruginosa

(oddělení: *Cyanobacteria*, řád: *Chroococcales*, rod: *Microcystis*)

Rod *Microcystis* tvoří nepravidelné kolonie s nápadně viditelnými aerotopy, které obsahují četné kulovité buňky v amorfním slizu. Tento rod je výlučně planktonní a při dostatku živin vytváří hustý vodní květ. V našich přírodních podmínkách je nejčastějším druhem způsobující vodní květ *M. aeruginosa* (obr.3), který má typické prolamované kolonie s úzkým lemlem kolem jejich okraje. Tento a další druhy rodu *Microcystis* produkují nebezpečné toxiny, které poškozují jaterní tkáň (tzv. hepatotoxiny).

Scenedesmus quadricauda

(oddělení: *Chlorophyta*, třída: *Chlorophyceae*, řád: *Scenedesmales*, rod: *Scenedesmus*)

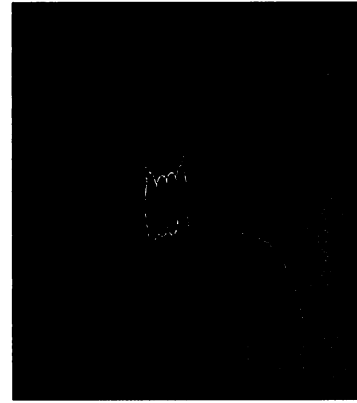
Druhově početný rod *Scenedesmus* bývá součástí sladkovodního planktonu. Válcovité, oválné nebo větvenovité buňky jsou uspořádány v cenobiích. Počet buněk v cenobiu závisí na rychlosti buněčného dělení (2,4,8,16, zřídka až 32), nejčastěji se vyskytují cenobia se čtyřmi buňkami. Buněčná stěna je při pozorování v mikroskopu hladká. Z různých pólů mohou vyčnívat nejrůznější ostny, buňky mají často i žebrovaní. To je spolu s postavením buněk hlavním determinačním znakem do druhu. Buněčná stěna je polysacharidová. Tento rod se využívá v biotechnologii. Běžnou planktonní zelenou řasou je *S. quadricauda* (obr.4) [33].



Obr.2. *Anabaena flos-aquae*
[40]



Obr.3 *Microcystis aeruginosa*
[40]



Obr.4 *Scenedesmus quadricauda*
[41]

4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ

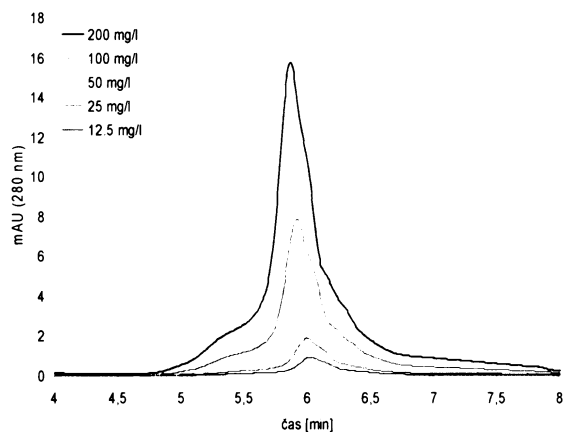
4.1 Vliv koncentrace vzorků na stanovení relativní molekulové hmotnosti

Rychlost průchodu (retenční čas) stanovené látky chromatografickou kolonou je mimo jiné závislá na koncentraci této látky. Za účelem ověření vlivu koncentrace AOM (DOC_C) byla provedena měření při pěti různých koncentracích DOC_C - 12,5 mg/l, 25 mg/l, 50mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l. K měření byly použity vzorky AOM z 12. dne kultivace u všech sledovaných druhů mikroorganismů. Hodnoty retenčního času a relativní molekulové hmotnosti při různých koncentracích DOC_C pro *A. flos-aquae*, *M. aeruginosa*, *S. quadricauda* jsou uvedeny v tab.5. Z těchto hodnot je patrné, že se vzrůstající hodnotou DOC_C klesá retenční čas a roste relativní molekulová hmotnost. Výsledky gelové chromatografie pro různé koncentrace vzorků a vztahy mezi koncentrací DOC_C , retenčním časem a relativní molekulovou hmotností jsou zobrazeny v obr.5-11. Závislost odezvy signálu na čase pro různé koncentrace DOC_C znázorňuje obr.5 pro *A. flos-aquae*, obr.7 pro *M. aeruginosa* a obr.9 pro *S. quadricauda*. Se vzrůstající koncentrací DOC_C se zkracuje retenční čas a zvyšuje se odezva detektoru, viz obr.6, 8 a 10. Závislost retenčního času na koncentraci DOC_C popisují rovnice regresní přímky, pro *A. flos-aquae* je rovnicí regresní přímky $y = - 0,0018 x + 6,0358$ ($R^2 = 0,9571$), pro *M. aeruginosa* $y = - 0,001 x + 6,0108$ ($R^2 = 0,9799$) a pro *S. quadricauda* $y = - 0,001x + 6,1613$ ($R^2 = 0,9657$).

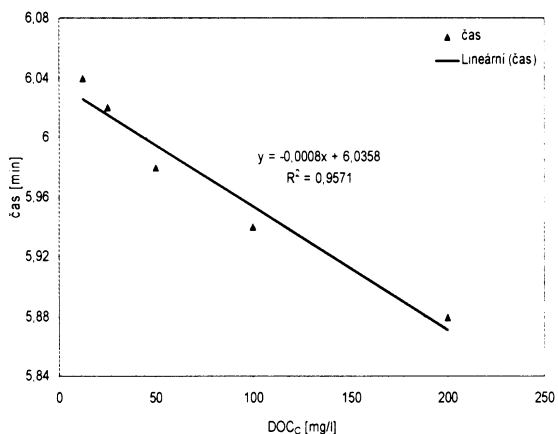
Tab.5. Hodnoty retenčního času a relativní molekulové hmotnosti při různých koncentracích AOM pro *A. flos-aquae*, *M. aeruginosa*, *S. quadricauda*

DOC_C [mg/l]	<i>Anabaena flos-aquae</i>		<i>Microcystis aeruginosa</i>		<i>Scenedesmus quadricauda</i>	
	čas [min]	Mr 10^3 [-]	čas [min]	Mr 10^3 [-]	čas [min]	Mr 10^3 [-]
200	5,88	19,05	5,82	22,8	5,97	18,21
100	5,94	18,04	5,9	21,02	6,05	16,09
50	5,98	17,38	5,95	19,71	6,1	14,77
25	6,02	16,64	5,99	18,93	6,13	13,98
12,5	6,04	15,83	6,01	18,05	6,17	12,92

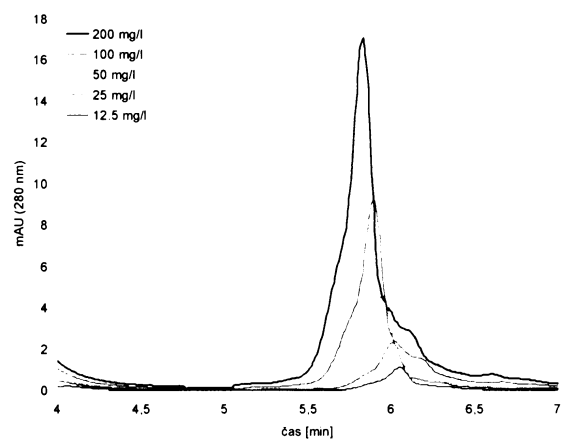
DOC_C – celkový rozpuštěný organický uhlík, Mr – relativní molekulová hmotnost



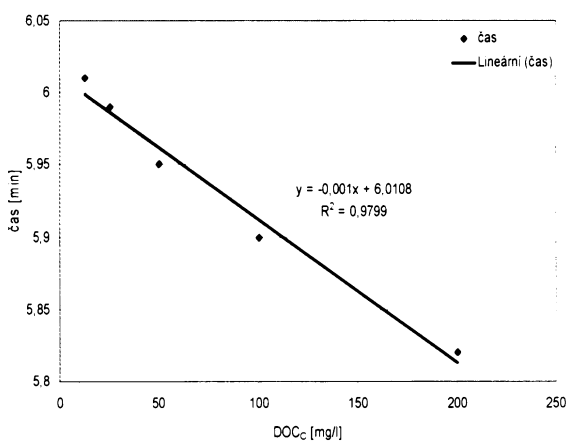
Obr.5. Vliv koncentrace AOM na retenční čas - *A. flos-aquae*



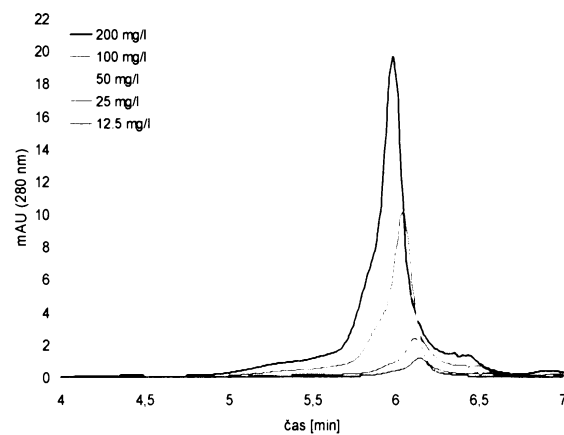
Obr.6. Závislosti retenčního času na koncentraci DOC_C - *A. flos-aquae*



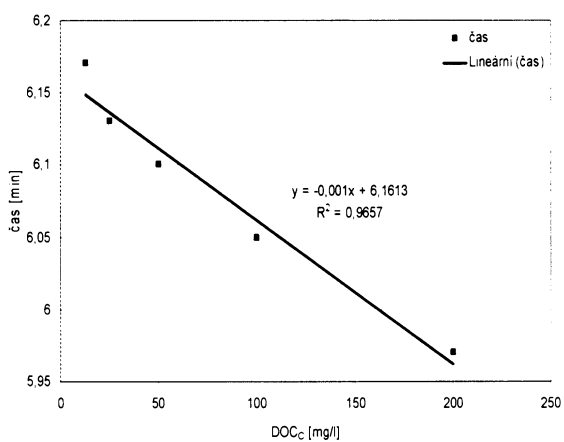
Obr.7. Vliv koncentrace AOM na retenční čas - *M. aeruginosa*



Obr.8. Závislosti retenčního času na koncentraci DOC_C - *M. aeruginosa*

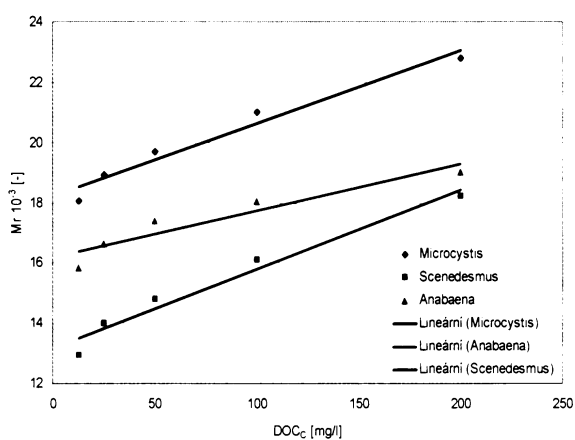


Obr.9. Vliv koncentrace AOM na retenční čas - *S. quadricauda*



Obr.10. Závislost retenčního času na koncentraci DOC_C - *S. quadricauda*

Závislosti relativní molekulové hmotnosti na koncentraci DOC_C pro *A. flos-aquae*, *M. aeruginosa*, *S. quadricauda* jsou zobrazeny na obr.11. Se vzrůstající koncentrací roste M_r u všech druhů (*A. flos-aquae*: $y = 0,0154x + 16,191$, *M. aeruginosa*: $y = 0,024x + 18,246$, *S. quadricauda*: $y = 0,0264x + 13,151$). Nejstrmější závislost byla zjištěna pro zelenou řasu *S. quadricauda* a nejméně strmá pro sinici *A. flos-aquae*. Z těchto výsledků je zřejmý vliv koncentrace vzorků na zjištěné hodnoty relativní molekulové hmotnosti. Aby se předešlo těmto vlivům, byly relativní molekulové hmotnosti všech vzorků EOM a IOM stanovovány při stejné koncentraci DOC_C ($\text{DOC}_C = 100 \text{ mg/l}$).



Obr.11. Závislost relativní molekulové hmotnosti na koncentraci DOC_C

4.2 Vlastní výsledky měření

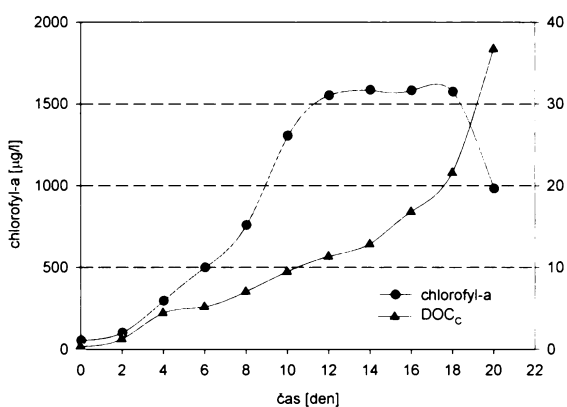
V tab.6 jsou uvedeny hodnoty koncentrace chlorofylu-a, DOC_C , DOC_P , DOC_{NP} během kultivace sinic *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa* a zelené řasy *Scenedesmus quadricauda*. Z naměřených hodnot chlorofylu-a byly sestrojeny růstové křivky, viz obr.12-14. V každé růstové křivce můžeme rozpoznat 4 fáze - lagovou (množství chlorofylu-a neroste ani neklesá), exponenciální (množství chlorofylu-a exponenciálně roste), stacionární (množství chlorofylu-a neroste ani neklesá) a fázi poklesu (množství chlorofylu-a klesá). Množství organických látek, které produkují sinice a řasy bylo měřeno jako celkový rozpuštěný organický uhlík (DOC_C) a metodou $CHSK_{Mn}$. Množství proteinů a neproteinových látek (oligosacharidy, sacharidy a polysacharidy) je uvedeno jako DOC_P a DOC_{NP} .

4.2.1 Množství organických látek vylučovaných během kultivace

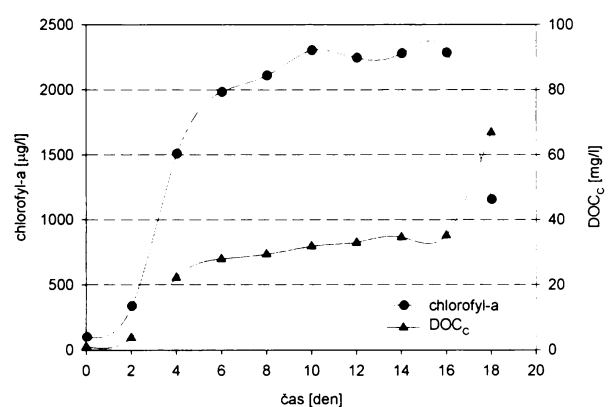
Růstové křivky a křivky koncentrace AOM pro *A. flos-aquae*, *M. aeruginosa* a *S. quadricauda* jsou znázorněny v obr.12-14. Z růstové křivky *A. flos-aquae* (obr.12) je patrné, že dochází k zastavení růstu po cca 10-ti dnech, kdy končí exponenciální fáze a začíná stacionární fáze, která trvá až do cca 18. dne. Poslední fází je fáze poklesu, kdy dochází k poklesu fotosyntetické aktivity buněk, a tím i k poklesu koncentrace chlorofylu-a. Množství AOM měřených jako DOC_C roste u *A. flos-aquae* pozvolna s růstem fotosyntetické aktivity buněk během exponenciální (0,3 - 9,4 mg/l za cca 10 dnů) i stacionární fáze růstu (9,4 - 21,6 mg/l za cca 8 dnů), prudce stoupá až během masivního odumírání buněk (21,6 - 36,7 mg/l za 2 dny). U *M. aeruginosa* (obr.13) dochází k zastavení růstu za cca 8 dní. Do 16. dne trvá stacionární fáze, poté nastává fáze poklesu, kdy je odumírání buněk mnohem větší než jejich tvorba. Množství DOC_C se výrazně zvyšuje do 4. dne (1,0 - 22,2 mg/l), poté jeho množství jen nepatrně roste (22,2 - 35,2 mg/l za cca 14 dní), další výrazný nárůst je patrný až od 16. dne (35,2 - 67,1 mg/l za 2 dny). Růstová křivka *S. quadricauda* (obr.14) má exponenciální fázi cca 8 dní, poté nastává stacionární fáze, která trvá dalších cca 12 dní. 20.den začíná fáze poklesu. Množství AOM se pozvolna zvyšuje během exponenciální (0,3 - 7,8 mg/l za cca 8 dní) i stacionární fáze (7,8 - 14,3 mg/l za cca 12 dní), výrazně roste až od 20. dne (14,3 - 19,7 mg/l za 2 dny).

Z obr.12-14 je patrné, že u všech sledovaných mikroorganismů roste množství vylučovaných organických látek s časem. Největší množství AOM vylučují mikroorganismy ve fázi poklesu, *A. flos-aquae* vylučuje nejvíce 36,7 mg/l, *M. aeruginosa* 67,1 mg/l a *S. quadricauda* jen 19,7 mg/l. Nejvyšších hodnot

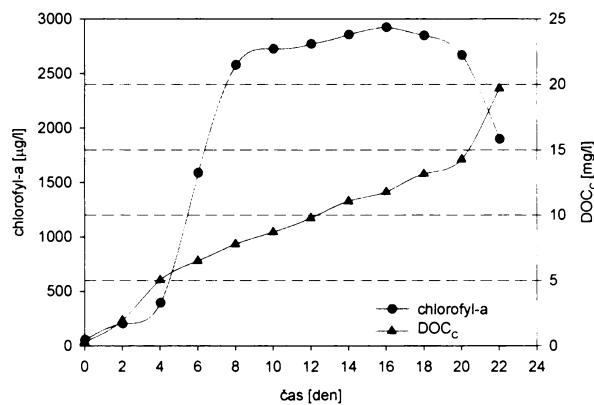
koncentrace AOM bylo dosaženo u sinice *M. aeruginosa*, naopak nejnižší koncentrace AOM byly zjištěny u zelené řasy *S. quadricauda*. Obecně tedy více AOM produkují sinice. Sledované druhy fytoplanktonu se nelišily jen množstvím produkovaných látek, ale také dobou kultivace a charakterem růstové křivky. Nejdelší doba kultivace a to 22. dní byla sledována u zelené řasy *S. quadricauda*. *A. flos-aquae* má dobu kultivace 20. dní a *M. aeruginosa* jen 18. dní. Delší doba kultivace byla pozorována u zelené řasy než u dvou sledovaných druhů sinic. *S. quadricauda* má tedy z těchto tří pozorovaných mikroorganismů nejdelší dobu kultivace a po celou její dobu vylučuje nejmenší množství organických látek.



Obr.12. Růstové křivky a křivky koncentrace AOM - *A. flos-aquae*



Obr.13. Růstové křivky a křivky koncentrace AOM - *M. aeruginosa*.



Obr.14. Růstová křivka a křivka koncentrace AOM - *S. quadricauda*

Tab.6. Koncentrace chlorofylu – a, DOC_C, DOC_P, DOC_{NP} během kultivace *A. flos-aquae*, *M. aeruginosa*, *S. quadricauda*

čas [den]	<i>Anabaena flos-aquae</i>				<i>Microcystis aeruginosa</i>				<i>Scenedesmus quadricauda</i>			
	chlorofyl-a [µg/l]	DOC _C [mg/l]	DOC _P [mg/l]	DOC _{NP} [mg/l]	chlorofyl-a [µg/l]	DOC _C [mg/l]	DOC _P [mg/l]	DOC _{NP} [mg/l]	chlorofyl-a [µg/l]	DOC _C [mg/l]	DOC _P [mg/l]	DOC _{NP} [mg/l]
0	50,0	0,3	xxxxx	xxxxx	97,4	1,0	xxxxx	xxxxx	50,0	0,3	xxxxx	xxxxx
2	98,0	1,2	0,2	1,0	334,5	3,8	0,4	3,4	199,3	1,9	0,2	1,8
4	292,5	4,4	0,7	3,6	1508,2	22,2	3,2	19,0	392,2	5,0	0,6	4,4
6	497,2	5,1	0,9	4,2	1980,5	27,9	4,8	23,1	1587,3	6,5	0,9	5,6
8	756,3	7,0	1,4	5,6	2106,7	29,4	6,2	23,2	2573,4	7,8	1,3	6,5
10	1304,1	9,4	2,3	7,1	2297,4	31,9	7,3	24,6	2719,1	8,7	1,5	7,2
12	1549,9	11,3	2,8	8,5	2240,1	33,0	8,2	24,8	2764,5	9,8	1,7	8,1
14	1583,0	12,8	3,3	9,5	2274,5	34,7	8,9	25,7	2849,3	11,1	1,9	9,2
16	1579,8	16,8	4,6	12,2	2280,1	35,2	10,9	24,3	2916,3	11,8	2,1	9,7
18	1571,6	21,6	6,4	15,2	1158,4	67,1	27,6	39,4	2841,0	13,2	2,5	10,7
20	982,0	36,7	15,1	21,6	xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	2662,8	14,3	2,8	11,5
22	xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	1896,8	19,7	4,4	15,3

DOC_C – celkový rozpuštěný organický uhlík, DOC_P – množství proteinů z DOC_C, DOC_{NP} – množství neproteinových látek z DOC_C

4.2.2 Podíl proteinů a neproteinových látek

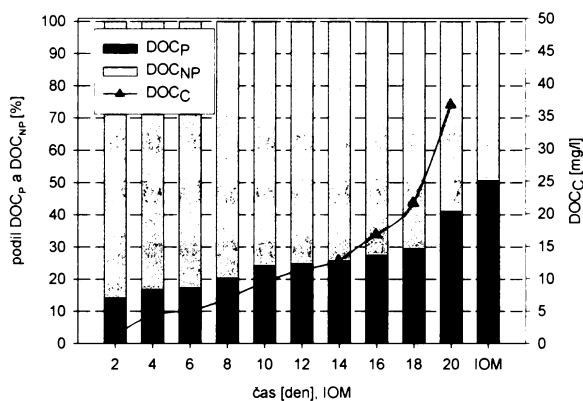
V tab.7 a obr.15-17 jsou zobrazeny podíly proteinových (DOC_P) a neproteinových (DOC_{NP}) organických látek z celkového množství rozpuštěného organického uhlíku (DOC_C). Nárůst podílu DOC_P/DOC_{NP} s časem je patrný u všech sledovaných druhů sinic a řas. Na počátku kultivace (2. den) je hodnota podílu DOC_P/DOC_{NP} pro *A. flos-aquae* 14,2 %, pro *M. aeruginosa* 9,2 % a pro *S. quadricauda* 7,9 %. Ve stacionární fázi dosahuje podíl DOC_P/DOC_{NP} pro *A. flos-aquae* 29,6 %, pro *M. aeruginosa* 31 % a pro *S. quadricauda* jen 19,6 %. Poslední den kultivace (fáze poklesu) je hodnota podílu DOC_P/DOC_{NP} 41,2 % u *A. flos-aquae*, 41,2 % u *M. aeruginosa* a 22,3 % u *S. quadricauda*. Nejvyšší hodnoty tohoto podílu byly naměřeny pro IOM u všech sledovaných druhů mikroorganismů, pro *A. flos-aquae* dosahuje tato hodnota 50,7 %, pro *M. aeruginosa* 66,4 % a pro *S. quadricauda* pouze 29,1 %. Podíl proteinů je pro zelenou řasu *S. quadricauda* po celou dobu její kultivace nejmenší.

Tyto výsledky naznačují, že EOM jsou tvořeny především organickými látkami neproteinového charakteru (jako jsou monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy), naopak u IOM sinic byl podíl proteinů větší než 50 %. Vyšší podíl proteinů (DOC_P) je patrný u sinic, což je pravděpodobně způsobeno větším množstvím proteinů v buňkách, které slouží jako zdroj energie nebo mají zásobní funkci.

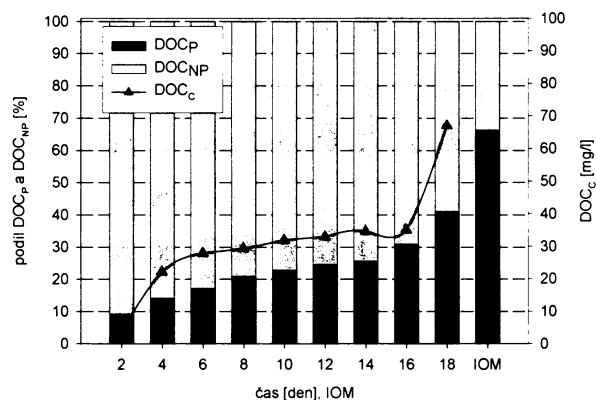
Tab.7. Procentuální podíl proteinů a neproteinových látek pro *A. flos-aquae*, *M. aeruginosa* a *S. quadricauda*

čas [den], IOM	<i>Anabaena flos-aquae</i>			<i>Microcystis aeruginosa</i>			<i>Scenedesmus quadricauda</i>		
	DOC_P [%]	DOC_{NP} [%]	DOC_C [mg/l]	DOC_P [%]	DOC_{NP} [%]	DOC_C [mg/l]	DOC_P [%]	DOC_{NP} [%]	DOC_C [mg/l]
2	14,2	85,8	1,2	9,2	90,8	3,8	7,9	92,1	1,9
4	16,9	84,1	4,4	14,2	85,8	22,2	12,7	87,3	5,0
6	17,4	82,6	5,1	17,3	82,7	27,9	13,8	86,2	6,5
8	20,4	79,6	7,0	21,0	79,0	29,4	16,6	83,4	7,8
10	24,3	75,7	9,4	23,0	77,0	31,9	16,9	83,1	8,7
12	24,9	75,1	11,3	24,7	75,3	33,0	17,8	82,2	9,8
14	25,8	74,2	12,8	25,8	74,2	34,7	17,4	82,6	11,1
16	27,5	72,5	16,8	31,0	69,0	35,2	18,1	81,9	11,8
18	29,6	70,4	21,6	41,2	58,8	67,1	19,1	80,9	13,2
20	41,2	58,8	36,7	xxxxx	xxxxx	xxxxx	19,6	80,4	14,3
22	xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	22,3	77,3	19,7
IOM	50,7	49,3	100*	66,4	33,6	100*	29,1	70,1	100*

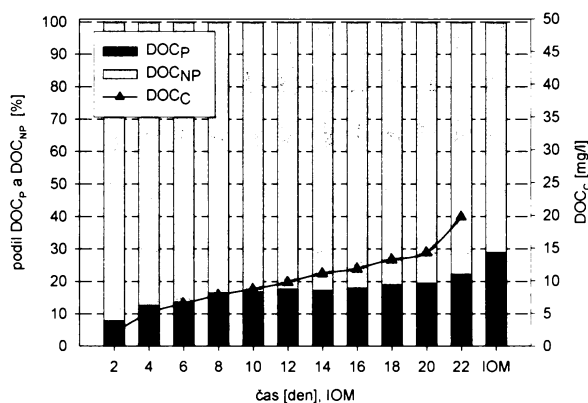
DOC_P – množství proteinů z DOC_C , DOC_{NP} – množství neproteinových látek z DOC_C , DOC_C – celkový rozpuštěný organický uhlík, IOM – intracelulární organické látky, * - koncentrace vznikla ředěním vzorků IOM pro následné zpracování



Obr.15. Podíl proteinů (DOC_p) a neproteinových látek (DOC_{NP}) v % - *A. flos-aquae*



Obr.16. Podíl proteinů (DOC_p) a neproteinových látek (DOC_{NP}) v % - *M. aeruginosa*



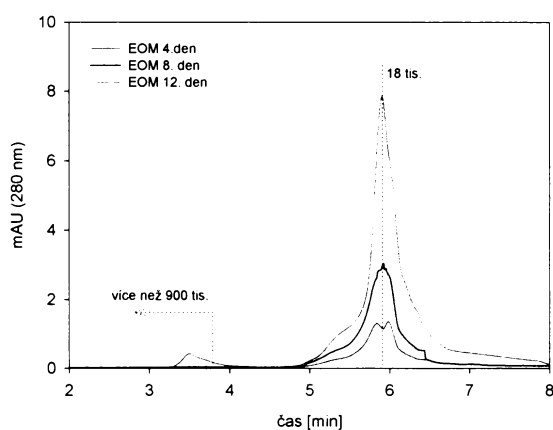
Obr.17. Podíl proteinů (DOC_p) a neproteinových látek (DOC_{NP}) v % - *S. quadricauda*

4.2.3 Charakteristika extracelulárních a intracelulárních látek

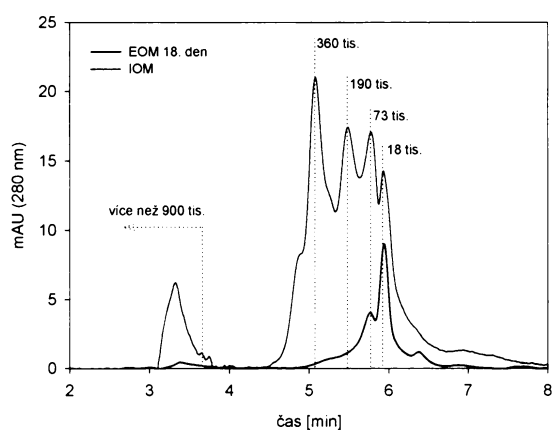
Na obr.18-23 jsou znázorněny výsledky analýzy EOM a IOM pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) v uspořádání vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro *A. flos-aquae*, *M. aeruginosa* a *S. quadricauda*. Na obr.18-19 jsou zobrazeny výsledky pro EOM (4., 8., 12., 18.den kultivace) a IOM sinice *A. flos-aquae*. Pro EOM byly zjištěny proteiny s relativní molekulovou hmotností (Mr) kolem 18 tis. a více než 900 tis. (shodné pro 8., 12. a 18. den kultivace, 4.den kultivace jsou patrné pouze proteiny s Mr 18 tis.). Mr proteinů IOM byla kolem 18, 73, 190, 360 tis. a více než 900 tis. Obr.20-21 ukazuje Mr proteinů obsažených v EOM a IOM u sinice *M. aeruginosa*. U EOM se jedná o proteiny s Mr kolem 21 tis. a s více než 900 tis. (vysokomolekulární složka patrná jen u EOM z 12. a 18. dne kultivace). U IOM *M. aeruginosa* byly zjištěny proteiny s Mr kolem 21, 85, 234, 359, 470 tis. a více než 900

tis. Složení EOM sinic *A. flos-aquae* a *M. aeruginosa* je podobné, ale IOM sinic se liší (viz obr.18-21). *A. flos-aquae* nemá tak výrazný podíl vysokomolekulární složky jako *M. aeruginosa*. Při kultivaci zelené řasy *S. quadricauda* byly identifikovány pouze proteiny o Mr kolem 16 tis., viz obr.22-23. U této řasy nebyly v exponenciální a stacionární fázi zjištěny žádné proteiny o Mr větší než 16 tis. Pro IOM *S. quadricauda* byly zjištěny hodnoty kolem 16, 73, 223 tis. a více než 900 tis.

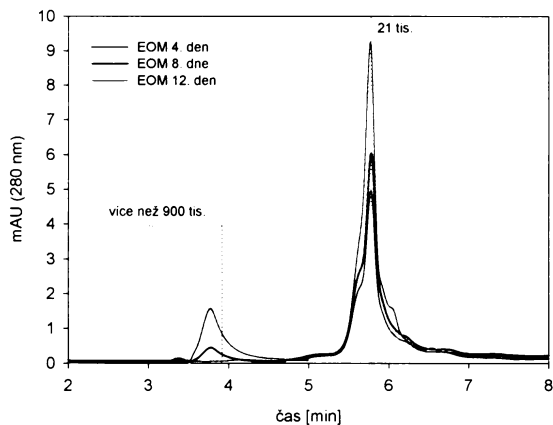
Z analýzy relativních molekulových hmotností pro EOM a IOM je zřejmé, že je skladba EOM a IOM odlišná. Jsou patrné i rozdíly mezi jednotlivými sledovanými druhy sinic a řas. Koncentrace proteinů roste s dobou kultivace a její největší hodnoty byly zjištěny u IOM. Složení EOM se v exponenciální a stacionární fázi co do zastoupení jednotlivých proteinů nemění, změny jsou patrné pouze v jejich koncentraci. Složení proteinů se začíná měnit až během fáze odumírání, kdy jsou ve větší míře vylučovány proteiny IOM. Některé proteiny IOM nebyly zjištěny během kultivace, pro IOM *A. flos-aquae* jsou to proteiny s Mr kolem 190 tis. a 360 tis. (obr.19), u IOM *M. aeruginosa* byly navíc zjištěny proteiny s Mr kolem 359 tis. a 470 tis. (obr.21) a u IOM *S. quadricauda* proteiny s Mr kolem 190 tis. a 360 tis. (obr.23). Tyto proteiny patří pravděpodobně ke stavebním složkám buněk a objevují se v kultuře až po jejich rozpadu.



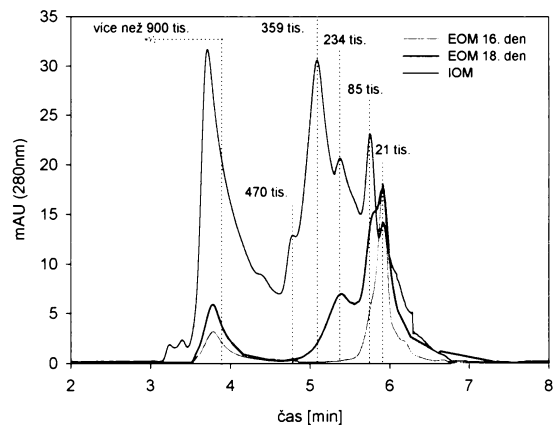
Obr.18. Chromatografický záznam Mr proteinů tvořících EOM *A. flos-aquae* 4., 8. a 12. den



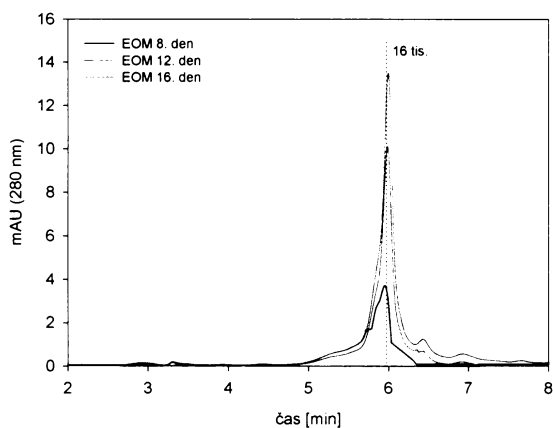
Obr.19. Chromatografický záznam Mr proteinů tvořících EOM *A. flos-aquae* 18. den a IOM



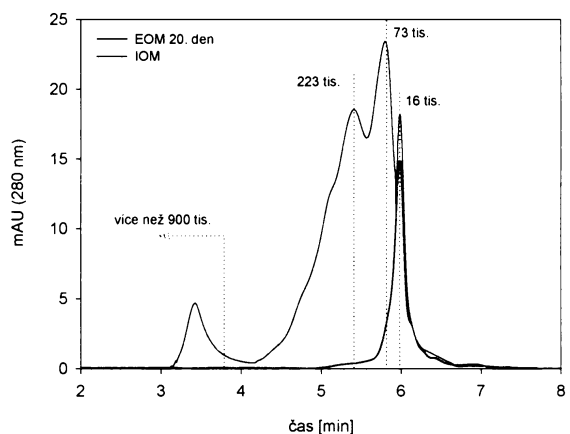
Obr.20. Chromatografický záznam Mr proteinů tvořících EOM *M. aeruginosa* 4., 8. a 12. den



Obr.21. Chromatografický záznam Mr proteinů tvořících EOM *M. aeruginosa* 16., 18. den a IOM



Obr.22. Chromatografický záznam Mr proteinů tvořících EOM *S. quadricauda* 8., 12. a 16. den

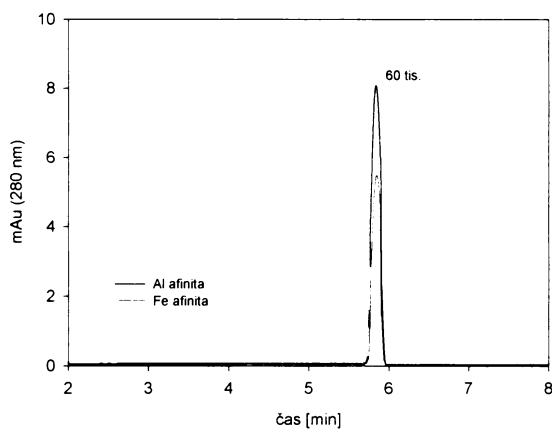


Obr.23. Chromatografický záznam Mr proteinů tvořících EOM *S. quadricauda* 20. den a IOM

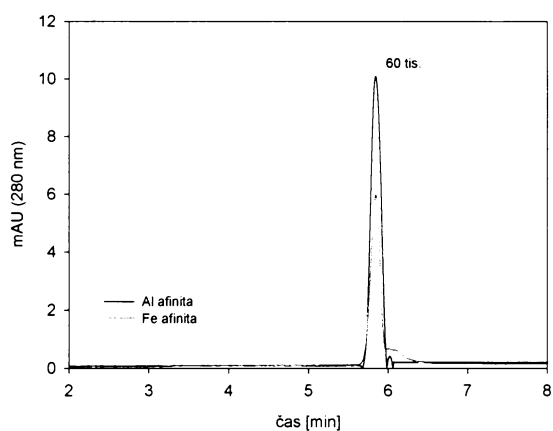
4.2.4 Výsledky afinitní chromatografie

Pro zhodnocení schopnosti proteinů vázat se z hlinitými a železitými ionty byla použita afinitní chromatografie. Výsledky afinitní chromatografie pro sinice *A. flos-aquae* a *M. aeruginosa* ukazuje obr.24-25. Proteiny schopné tvořit komplexy s vícemocnými kationty nebyly izolovány u zelené řasy *S. quadricauda*. U obou druhů sinic byly izolovány proteiny schopné tvořit komplexy s vícevalentními kationty o relativní molekulové hmotnosti kolem 60 tis. Tyto proteiny byly zjištěny jak u IOM, tak i u EOM 12., 16., 18. a 20. den kultivace těchto sinic, ale nebyly zjištěny u EOM v exponenciální fázi. Množství proteinů schopných tvořit komplexy vzrůstá s dobou kultivace, nejvyšší je u IOM.

Výška píku komplexu proteinu s hliníkem je přibližně dvakrát větší než výška píku komplexu proteinu se železem (obr.24-25). Tento rozdíl může být způsoben tím, že afinita EOM a IOM proteinů k tvorbě komplexů se železem je menší než s hliníkem.



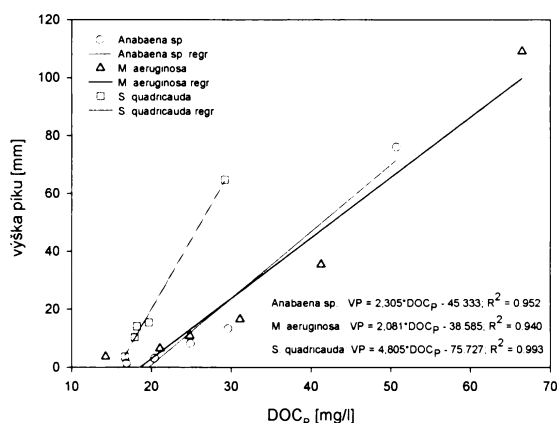
Obr.24. Výsledky afinitní chromatografie
- *A. flos-aquae*



Obr.25. Výsledky afinitní chromatografie
- *M. aeruginosa*

4.2.5 Ověření DOC frakcionace

Pro ověření DOC frakcionace byly stanoveny korelační konstanty mezi výškou píku (VP) GPC a koncentrací proteinů (DOC_P), viz obr.26. Pro všechny kultivované mikroorganismy byla pozorována dobrá lineární závislost mezi PH a DOC_P . S koncentrací proteinů lineárně roste výška píků. Regresní přímka se dá popsat rovnicí $VP = 2,305 \cdot DOC_P - 45,333$ pro *A. flos-aqua*, $VP = 2,081 \cdot DOC_P - 38,585$ pro *M. aeruginosa* a $VP = 4,805 \cdot DOC_P - 75,727$ pro *S. quadricauda*. Korelační konstanta byla pro *A. flos-aquae* 0,976 ($R^2 = 0,952$), pro *M. aeruginosa* 0,970 ($R^2 = 0,940$) a pro *S. quadricauda* 0,997 ($R^2 = 0,993$). U všech druhů fytoplanktonu byly korelační koeficienty i koeficienty determinace velmi vysoké, což potvrzuje silnou lineární závislost.



Obr.26. Vztah mezi výškou píku (VP) při GPC a DOC_p

4.2.6 Porovnání výsledků dvou metod stanovení organických látek

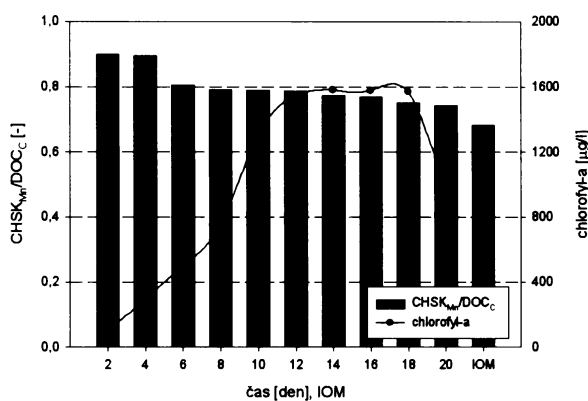
Množství organických látek, které produkují sinice a řasy, bylo měřeno jako DOC_C (celkový rozpuštěný organický uhlík) a metodou CHSK_{Mn}. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tab.8. Výsledky těchto dvou metod jsou srovnány v obr.27-29. Tyto grafy znázorňují podíl CHSK_{Mn}/DOC_C v závislosti na čase pro všechny sledované druhy fytoplanktonu. Podíl CHSK_{Mn}/DOC_C s dobou kultivace klesá u všech druhů, tj. podíl oxidovatelných organických látek měřených jako CHSK_{Mn} klesá a roste podíl organických látek měřených jako DOC_C. Tyto výsledky mohou mít souvislost s nárůstem proteinů v buňkách sinic a řas během kultivace. Nejvyšší hodnoty tohoto podílu byly naměřeny na začátku kultivace (2. den), kdy byly zjištěny nejmenší podíly proteinů. Podíl CHSK_{Mn}/DOC_C je 2.den kultivace pro *A. flos-aquae* 0,90, pro *M. aeruginosa* 0,89 a pro *S. quadricauda* 0,88. Nejmenší podíly CHSK_{Mn}/DOC_C byly pozorovány u IOM, kde byly naopak zjištěny největší podíly proteinů. U IOM *A. flos-aquae* je podíl CHSK_{Mn}/DOC_C 0,68, u IOM *M. aeruginosa* 0,51 a u IOM *S. quadricauda* 0,58.

Z výsledků je patrné, že metoda CHSK_{Mn} poskytuje nižší hodnoty koncentrace organických látek než měření DOC_C. Proto není metoda CHSK_{Mn} vhodná k měření koncentrace organických látek ve vodách, které obsahují AOM sinic a řas. Použití CHSK_{Mn} na úpravách vody v období masového rozvoje fytoplanktonu může mít za následek výrazné podhodnocení celkového množství organických látek obsažených ve vodě.

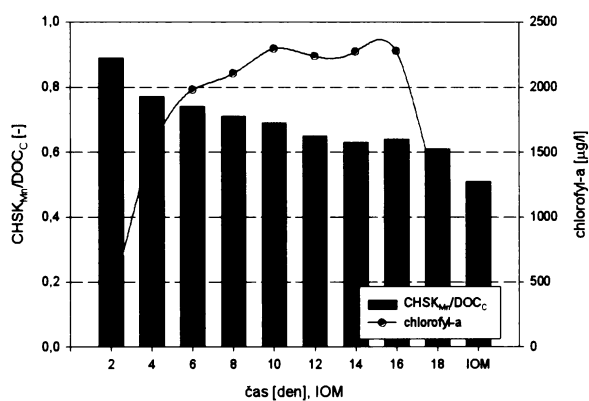
Tab.8. Vývoj kultivace organických látek během kultivace mikroorganismů a podíl $CHSK_{Mn}/DOC_C$

čas [den]	<i>Anabaena flos-aquae</i>			<i>Microcystis aeruginosa</i>			<i>Scenedesmus quadricauda</i>		
	$CHSK_{Mn}$ [mg/l]	DOC_C [mg/l]	$CHSK_{Mn}/DOC_C[-]$	$CHSK_{Mn}$ [mg/l]	DOC_C [mg/l]	$CHSK_{Mn}/DOC_C[-]$	$CHSK_{Mn}$ [mg/l]	DOC_C [mg/l]	$CHSK_{Mn}/DOC_C[-]$
2	1,08	1,20	0,90	3,37	3,79	0,89	1,71	1,94	0,88
4	3,91	4,37	0,89	17,07	22,17	0,77	4,22	5,02	0,84
6	4,12	5,12	0,80	20,66	27,92	0,74	5,27	6,50	0,81
8	5,52	6,98	0,79	20,90	29,43	0,71	6,16	7,80	0,79
10	7,41	9,40	0,79	21,99	31,87	0,69	6,63	8,72	0,76
12	8,87	11,28	0,79	21,43	32,97	0,65	7,06	9,80	0,72
14	9,89	12,79	0,77	21,84	34,66	0,63	7,55	11,10	0,68
16	12,91	16,80	0,77	22,53	35,21	0,64	8,02	11,80	0,68
18	16,23	21,60	0,75	40,92	67,08	0,61	9,11	13,20	0,69
20	27,24	36,70	0,74	xxxxx	xxxxx	xxxxx	9,44	14,30	0,66
22	xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	12,82	19,72	0,65

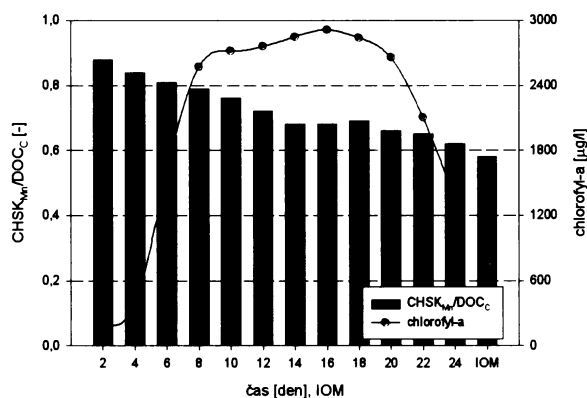
$CHSK_{Mn}$ – chemická spotřeba kyslíku měřená pomocí manganistanu, DOC_C – celkový rozpuštěný organický uhlík



Obr.27. Poměr $CHSK_{Mn}/DOC_C$ - *A. flos aquae*



Obr.27. Poměr $CHSK_{Mn}/DOC_C$ - *M. aeruginosa*



Obr.29. Poměr $CHSK_{Mn}/DOC_C$ - *S. quadricauda*

5. DISKUSE

Výskyt organických látek produkovaných fytoplanktonem v pitné vodě je nežádoucí jak z hlediska zhoršení sensorických vlastností vody (barva, chuť, zákal), tak i tvorbou vedlejších produktů po dezinfekci, např. trihalogenmetanů. V České republice existuje řada úpraven, které využívají vodu z povrchových nádrží, kde se v letních měsících vyskytuje vodní květ. Většina těchto úpraven se potýká s řadou technologických problémů. Zjištění charakteru a vlastností látek produkovaných sinicemi a řasami je pro jejich odstranění při úpravě vody velmi důležité.

Prováděný výzkum byl zaměřen na charakterizaci organických látek, které produkují sinice *A. flos-aquae* a *M. aeruginosa* a zelená řasa *S. quadricauda*. Z výsledků měření organických látek (AOM) je patrné, že u všech sledovaných mikroorganismů roste množství vylučovaných organických látek s časem. Nejvíce látek je produkováno během fáze poklesu. Tyto výsledky publikoval ve své práci již Hoyer a kol. [20]. Největší množství AOM vylučuje sinice *M. aeruginosa*, naopak nejnižší koncentrace AOM byly zjištěny u zelené řasy *S. quadricauda*. Z výsledků měření vyplývá, že více AOM produkují sinice, naopak Hoyer a kol. ve své práci [20] uvedli, že zelené řasy produkují více organických látek než sinice. Tyto rozdílné výsledky mohou být způsobeny výběrem jiných druhů sinic a řas (zelené řasy *Scenedesmus*, *Chlorella* a *Dictyosphaerium* a sinice *Synechocystis* a *Pseudanabena*) nebo odlišnostmi ve zvolené metodice kultivace a stanovování organických látek. Výsledky pro zelenou řasu *S. quadricauda*, množství organických látek měřených jako DOC a podíl neproteinových látek, jsou podobné jako výsledky uvedené v pracích Hoyera [20] a Nguyena [28].

S dobou kultivace roste podíl proteinů u všech sledovaných druhů sinic a řas. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u IOM, pro *A. flos-aquae* dosahuje tato hodnota 50,7 %, pro *M. aeruginosa* 66,4 % a pro *S. quadricauda* pouze 29,1 %. Podíl proteinů byl pro zelenou řasu *S. quadricauda* po celou dobu její kultivace nejmenší. V rostoucí kultuře zelené řasy *Chlorella pyrenoidosa* podle práce Maksimova a kol. dosahuje množství extracelulárních sacharidů 20 - 40 % z celkového obsahu EOM (v médiu byly určeny chromatografickou metodou 3 sacharidy - sacharóza, glukóza a fruktóza) [10]. Nejvíce sacharidů vylučují sinice a řasy během exponenciální fáze [20,32]. Tyto výsledky naznačují, že EOM jsou tvořeny především organickými látkami neproteinového charakteru (jako jsou monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy).

Vyšší podíl proteinů je patrný u sinic, což je pravděpodobně způsobeno větším množstvím proteinů v buňkách, které slouží jako zdroj energie nebo mají zásobní funkci [32].

Z výsledků gelové permeační chromatografie (GPC) je zřejmé, že se množství a rozmanitost proteinů zvyšuje s dobou kultivace (viz obr.18-23). Složení EOM v exponenciální a stacionární fázi se co do zastoupení jednotlivých proteinů nemění, změny jsou patrné pouze v jejich koncentraci. Složení proteinů se začíná měnit až během fáze odumírání, kdy jsou ve větší míře vylučovány proteiny IOM. Tyto proteiny patří pravděpodobně ke stavebním složkám buněk, které se objeví v kultuře až po jejich rozpadu. Podobné výsledky publikovali ve své práci Takaara a kol. [22] pro sinici *Microcystis aeruginosa*, jiné druhy neuvádí. Pomocí gelové chromatografie určily jako součást EOM odebraného na počátku kultivace (4. den) pro *M. aeruginosa* organické látky s Mr kolem 10-20 tis. V pozdější fázi kultivace (17. a 25. den) identifikovali organické látky s Mr kolem 40 tis. a více než 600 tis. Takaara a kol. kromě EOM stanovují také hodnoty Mr pro AOM (skládá se z EOM, IOM a SOM), které se připraví tak, že odebrané vzorky kultivačního média byly rozbity pomocí ultrazvuku. Vzorky AOM jsou odebírány ve stejné dny jako EOM (4., 12., 17. a 25. den). AOM obsahují velké množství složek s vysokou molekulovou hmotností (více než 600 tis.). Tyto látky by mohly být spojovány s látkami jako je peptidoglykan [22].

Pro zhodnocení schopnosti proteinů vázat se z hlinitými a železitými ionty byla použita afinitní chromatografie [22,32]. U sinic *M. aeruginosa* a *A. flos-aquae* byly pomocí afinitní chromatografie izolovány proteiny schopné tvořit komplexy s vícevalentními ionty o relativní molekulové hmotnosti kolem 60 tis., podobné výsledky získali také Takaara a kol. Pomocí afinitní chromatografie izoloval pro sinici *M. aeruginosa* proteiny o relativní molekulové hmotnosti 43-67 tis. [22]. Proteiny schopné tvořit komplexy s vícemocnými kationty nebyly izolovány u zelené řasy *S. quadricauda*. U sinic byly proteiny o Mr 60 tis. zjištěny jak u IOM, tak i u EOM 12., 16., 18. a 20. den kultivace těchto sinic, ale nebyly zjištěny u EOM v exponenciální fázi. Množství proteinů schopných tvořit komplexy vzrůstá s dobou kultivace, nejvyšší je u IOM. Izolované proteiny z řas schopné tvořit komplexy s hlinitými kationty mohou zachycovat destabilizační činidlo a inhibovat proces destabilizace a agregace při úpravě vody [22]. Organické dusíkaté látky (pravděpodobně EOM) se špatně odstraňují destabilizací a agregací [25].

Tvorba komplexů mezi kovy a proteiny způsobuje inhibici procesu destabilizace při úpravě pitné vody. K inhibici dochází tak, že se vytvoří komplexy s vícemocnými

kationy (Fe^{3+} , Al^{3+}) a proteiny, které obsahují skupiny OH a COOH. Tyto vytvořené komplexy pak brání tvorbě pozitivně nabitých železitých a hlinitých hydroxokomplexů, které jsou nezbytné pro destabilizaci organických látek ve vodě. Důsledkem je nárůst zbytkové koncentrace železa ve filtrátu. Vytvořené komplexy hlinitých a železitých iontů s proteiny jsou rozpuštěné nebo v koloidní formě a procházejí filtrem při filtraci upravované vody. Tvorba těchto komplexů má za následek obrovský nárůst dávek destabilizačního činidla a pokles účinnosti procesu destabilizace a agregace. Proteiny, které tvoří komplexy, mohou být úspěšně odstraněny pouze po obsazení všech jejich vazebních center (ty jsou důležité pro tvorbu komplexů s vícevalentními kationty) [32,42-44]. Rušivý efekt může být částečně kompenzován přidáním vápenatých iontů [43]. V určitých podmínkách (při dostatečně vysoké dávce destabilizačního činidla, optimální hodnotě pH atd.) mohou být odstraněny komplexy kov-organická látka během poměrně rychlé a vysoké srážlivosti hydroxidů. Tento proces začíná být známý pod pojmem „sweep flocculation“ [45].

Vliv organických látek produkovaných sinicemi a řasami na proces úpravy vody není ještě zcela objasněn. Některé práce se zabývají reakcí přidaného destabilizačního činidla s hydrofobními koloidními znečišťujícími příměsemi během procesu destabilizace a agregace [3]. Jestliže budeme znát charakter organických látek produkovaných sinicemi a řasami, bude možné objasnit jejich inhibiční mechanismus a vyvinout lepší destabilizační činidlo, při jehož použití nebude docházet k inhibici tohoto procesu [22]. Chlorací organických látek se tvoří vedlejší produkty dezinfekce. Důležité je identifikovat zdroje DOC v nádržích a odstranit je na úpravě vody před chlorací [28]. Dávky síranu hlinitého, které se používají v běžné vodárenské praxi a mechanické míchání při úpravě vody nezpůsobují poškození buněk sinice *M. aeruginosa* ani nárůst rozpuštěných microcystinů v upravené vodě [26]. Podstata hlinitých destabilizačních činidel a pH roztoku silně působí na účinnost procesů destabilizace/ultrafiltrace. Nejlepší výsledky byly pozorovány při použití síranu hlinitého jako destabilizačního činidla [12]. Charakterizace organických látek produkovaných fytoplanktonem v období vodního květu podle jejich velikosti, struktury a funkce stejně jako zjištění optimálních podmínek při úpravě vody (dávka destabilizačního činidla, pH apod.) pomůže úpravnám vody, které využívají tradiční procesy úpravy (destabilizace, agregace a následná separace vzniklých agregátů) zajišťovat kvalitní pitnou vodu po celý rok [29].

6. ZÁVĚR

Tato práce se zabývá charakterizací jednotlivých složek EOM a IOM a jejich předpokládanou afinitou k vícemocným kationtům (především Al^{3+} a Fe^{3+}). Tyto kationty tvoří součást solí používaných jako destabilizační činidla při úpravě vody. Výsledky této práce lze shrnout do několika následujících bodů:

- Koncentrace AOM se postupně zvyšují se stářím kultury u všech posuzovaných mikroorganismů, nejvyšší hodnoty byly zjištěny u sinice *M. aeruginosa*.
- S dobou kultivace roste podíl proteinů z DOC_C u všech sledovaných mikroorganismů, výrazně vyšší je u sinic, tento podíl dosahuje u IOM sinice *M. aeruginosa* 66,4 %, u IOM *A. flos-aquae* 50,7 % a u IOM zelené řasy *S. quadricauda* pouze 29,1 %.
- Jako součást EOM *A. flos-aquae* byly identifikovány proteiny o relativní molekulové hmotnosti kolem 18 tis. a více než 900 tis., součástí EOM *M. aeruginosa* byly proteiny o relativní molekulové hmotnosti kolem 21 tis. a více než 900 tis. součástí EOM *S. quadricauda* byly proteiny o relativní molekulové hmotnosti kolem 16 tis.
- Složení EOM se v exponenciální a stacionární fázi co do zastoupení jednotlivých proteinů nemění, změny jsou patrné pouze v jejich koncentraci.
- IOM *A. flos-aquae* obsahují proteiny o relativní molekulové hmotnosti kolem 18, 73, 190, 360 tis. a více než 900 tis., IOM *M. aeruginosa* obsahují proteiny o relativní molekulové hmotnosti kolem 21, 85, 234, 359, 470 tis. a více než 900 tis. a u *S. quadricauda* byly jako součást IOM identifikovány proteiny o relativní molekulové hmotnosti kolem 16, 73 tis. a více než 900 tis. Tyto výsledky dokazují, že se EOM a IOM liší.

- Pomocí afinitní chromatografie byly jako součást AOM u sinic *A. flos-aquae* a *M. aeruginosa* izolovány proteiny o relativní molekulové hmotnosti kolem 60 tis., které mají schopnost tvořit komplexní sloučeniny s vícemocnými kationty (Al^{3+} , Fe^{3+}) tvořící součást solí používaných jako destabilizační činidla při úpravě vody. Vlivem tvorby těchto komplexních sloučenin dochází k poklesu účinnosti destabilizace a agregace a k nárůstu množství spotřebovaného destabilizačního činidla.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Pitter, P. (1999): Hydrochemie. VŠCHT. Praha.
2. Pivokonský, M. (2002): Vliv intenzity a doby míchání na morfologické vlastnosti agregátů tvořených při úpravě vody. Disertační práce ÚŽP PřF UK. Praha.
3. Polasek, P., Mutl, S. (1995): Guidelines to coagulation and flocculation for surface water, Volume I: Design principles for coagulation and flocculation systems. PPA. Johannesburg.
4. Mutl, S. (1984): Sklenicová optimalizační zkouška. Metodická informace č.17. ML VH ČSR. Praha.
5. Tesařík, I. a kol. (1985): Vodárenství. SNTL.
6. Lykleme, J. (1978): Surface chemistry of colloids in connection with stability. Sijhof and Nordhoff Int. Publishers, Alphenaan den Rijn, Netherlands. 3-36.
7. Leenheer, J. A., Croue, J.P. (2003): Characterizing aquatic dissolved organic matter. Environmental Science Technology 37. 18A-26A.
8. Grünwald, A., Šťastný, B., Slavíčková, K., Slavíček, M., Veselý, R. (2004): Charakteristika organických látek přírodního původu ve vodách. Sborník konference Pitná voda. Tábor. 251-256.
9. Aoustin, E., Schäfer, A.I., Fane, A.G., Waite, T.D. (2001): Ultrafiltration of natural organic matter. Separation and Purification Technology 22-23. 63-78.
10. Maksimova, I.V., Bratkovskaya, L.B, Plekhanov, S.E. (2004): Extracellular carbohydrates and polysaccharides of the alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39. Biology Bulletin 31. 175-181.
11. Korth, A., Fiebiger, C., Bornmann, K., Schmidt, W. (2004): NOM increase in drinking water reservoirs – relevance for drinking water production. Water Science and Technology 4. 55-60.
12. Kabsch-Korbutowicz, M. (2005): Effect of Al coagulant type on natural organic matter removal efficiency in coagulation/ultrafiltration process. Desalination 185. 327-333.
13. McDonald, S., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K. (2004): Analytical chemistry of freshwater humic substances (Review). Analytica Chimica Acta 527. 105-124.
14. Žáček, L. (1991): Huminové látky v přirozených vodách a možnosti jejich odstraňování. SZNP. Praha.

15. Peuravuori, J., Pihlaja, K., Välimäki, N. (1997): Isolation and characterization of natural organic matter from lake water: two different adsorption chromatographic methods. *Environment International* 23. 453-464.
16. Leenheer, J. A. (1981): Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. *Environmental Science and Technology* 15. 578-587.
17. Kim, H.C., Yu, M.J. (2005): Characterization of natural organic matter in conventional water treatment process for selection of treatment process focused on DBPs control. *Water Research* 39. 4779-4789.
18. Chalupa, J. (1965): Humínové kyseliny v našich rašelinných vodách, *Vodní hospodářství* 15. 203.
19. Namguk, H., Gary, A., Hyoung-Ryun, P., Myoungsuk, S. (2004): Characterizing algogenic organic matter (AOM) and evaluating associated NF membrane fouling. *Water research* 36. 1427-1438.
20. Hoyer, O., Lüsse, B., Bernhardt, H. (1985): Isolation and characterization of extracellular organic matter (EOM) from algae. *Z. Wasser- Abwasser-Forsch.* 18. 76-90.
21. Hellenbust, J.A. (1974): *Extracellular products*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 838-855.
22. Takaara, T., Sano, D., Konno, H., Omura, T. (2004): Affinity isolation of algal organic matters able to form complex with aluminium coagulant. In: *Proceedings of IWA World Water Congress*. Marrakech. Morocco.
23. Maršálek, B., Keršner, V., Marvan, P. (1996): *Vodní květy sinic. Nodatio flos-aquae*. Brno.
24. Oberholster, P.J., Botha, A-M., Grobbelaar, J.U. (2004): *Microcystis aeruginosa*: source of toxic microcystins in drinking water (Review). *African Journal of Biotechnology* 3. 159-168.
25. Widrig, D.L., Gray, K.A., McAuliffe K.S. (1996): Removal of algal-derived material by preozonation and coagulation: monitoring changes in organic quality by pyrolysis-GC-MS. *Water Research* 30. 2621-2632.
26. Chow, C.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. 3253-3262.

27. Schmidt, W., Jambeck, B., Petzold, H. (1998): Classification of algogenic organic matter concerning its contribution to the bacterial regrowth potential and by-products formation. *Water Science Technology* 37. 91-96.
28. Nguyen, M.L, Westerhoff, P., Baker, L., Hu, Q., Esparza-Soto, M., Sommerfeld, M. (2005): Characteristics and reactivity of algae-produced dissolved organic carbon. *Journal of Environmental Engineering – ASCE* 131. 1574-1582.
29. Lee, S., Cho, J., Shin, H., Son, B., Chae, S. (2003): Investigation of NOM size, structure and functionality (SSF): impact on water treatment process with respect to disinfection by- products formation. *Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA*. 555-564.
30. Matilainen, A., Lindqist, N., Tuhkanen, T. (2005): Comparison of the efficiency of aluminium and ferric sulphate in the removal of natural organic matter during drinking water treatment process. *Environmental Technology* 26. 867-875.
31. Childress, A.E., Vrijenhoek, E.M., Elimelech, M., Tanaka, T.S. (1999): Particulate and THM precursor removal with ferric chloride. *Journal of Environmental Engineering*. 1054-1061.
32. Pivokonský, M., Klouček, O., Pivokonská, L. (2006): Evaluation of the production, composition and aluminum and iron complexation of algogenic organic matter. *Water Research* 40. 3045-3052.
33. Kalina, T., Váňa, J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Nakladatelství Karolinum. Praha.
34. Babel, S., Takizawa, S., Ozaki, H. (2002): Factors affecting seasonal variation of membrane filtration resistance caused by *Chlorella* algae. *Water Research* 36. 1193-1202.
35. Codd, G. A. (2000): Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering* č.16. 51-60
36. Maršálek, B. (2002): Sinice a jejich toxiny. <http://www.sinice.cz/>.
37. Dowell Kearns, K., Hunter, M.D. (2000): Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. *Environmental Microbiology* 2. 291-297.
38. Ho, L., Meyn, T., Keegan, A., Hoefel, D., Brookes, J., Saint, C.P., Newcombe, G. (2006) Bacterial degradation of microcystin toxins within a biologically active sand filter. *Water Research* 40. 768-774.

39. Odegaard H., Eikebrokk B., Storhaug R. (1999): Processes for the removal of humic substances from water – An overview based on Norwegian experiences. *Water Science Technology* 40. 37-46.
40. Internet 1: <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/images2.html>.
41. Internet 2: <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images.html>.
42. Bernhard, H., Hoyer, O., Shell, H., Lüsse, B. (1985): Reaction mechanisms involved in the influence of algogenic organic matter on flocculation. *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.* 18. 18-30
43. Bernhard, H., Lüsse, B., Hoyer, O. (1986): The addition of calcium to reduce the impairment of flocculation by algogenic organic matter. *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.* 19. 219-228.
44. Bernhard, H., Shell, H., Hoyer, O., Lüsse, B. (1991): Influence of algogenic organic substances on flocculation and filtration. *WISA* 1. 41-57.
45. Duan, J., Gregory, J. (2003): Coagulation by hydrolysing metal salts. *Advances in Colloid Interface Science* 100-102. 475-502.

9. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

Seznam zkratk

- AC – aktivní uhlí (Active Carbon)
AOM – organické látky produkované sinicemi a řasami (Allogenic Organic Matter)
DAD – detektor s diodovým polem (Diode-Array Detector)
DBP – vedlejší produkty dezinfekce vody (Disinfection By-Products)
GAC – granulované aktivní uhlí (Granular Active Carbon)
GPC – gelová permeační chromatografie (Gel Permeation Chromatography)
HAA – halogenderiváty kyseliny octové (Haloacetic Acids)
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
EOM – extracelulární organické látky (Extracellular Organic Matter)
IOM – intracelulární organické látky (Intracellular Organic Matter)
MA – makročástice
MF/UF – mikro/ultrafiltrace
MI – mikročástice
NEA – nedestabilizované neagregované částice příměsí
NF – nanofiltrace
NOM – organické látky přírodního původu (Natural Organic Matter)
PAC – práškové aktivní uhlí (Powdered Active Carbon)
PRI – primární částice
RO – reverzní osmóza
SOM – povrchově vázané organické látky (Surface Organic Matter)
THM – trihalogenmetany (Trihalogenmethans)

Seznam symbolů

- A – absorbance extraktu před okyselením [-]
 A_0 – absorbance extraktu po okyselení [-]
c – látková koncentrace [mmol/l]
d – optická dráha kyvety [mm]
DOC – rozpuštěný organický uhlík [mg/l]
 DOC_C – celkový rozpuštěný organický uhlík [mg/l]
 DOC_P – množství organických látek proteinového charakteru [mg/l]
 DOC_{NP} – množství organických látek neproteinového charakteru [mg/l]

f_t – filtrační přepočítávací faktor [-]
 G – gradient rychlosti [s^{-1}]
 $CHSK_{Mn}$ – chemická spotřeba kyslíku manganistanem [mg/l]
 IC – anorganický uhlík [mg/l]
 KMK – kritická micelární koncentrace [mmol/l]
 $KNK_{4,5}$ – kyselinová neutralizační kapacita do pH 4,5 [mmol/l]
 $M(O)$ – molární hmotnost kyslíku [g/mol]
 Mr – relativní molekulová hmotnost [-]
 pH – reakce vody [-]
 POC – partikulovaný organický uhlík [mg/l]
 TOC – celkový organický uhlík [mg/l]
 V_e – objem extraktu [dm^3]
 VP – výška píku [mm]
 V_s – objem filtrovaného vzorku [dm^3]
 V_t – objem roztoku spotřebovaného při titraci [dm^3]
 V_v – objem vzorku použitý při titraci [dm^3]
 ρ_C – koncentrace chlorofylu-a [$\mu g/l$]
 ζ – elektrokinetický (zeta) potenciál [mV]

