

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Ústav pro životní prostředí

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

**Vliv peptidů a proteinů produkovaných sinicí  
*Microcystis aeruginosa* na koagulaci**

*Influence of peptides/proteins produced  
by *Microcystis aeruginosa* on coagulation process*

Magdalena Barešová  
Vedoucí: RNDr. Martin Pivokonský, Ph.D.  
srpen 2012

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

V Praze dne 6. srpna 2012

Magdalena Barešová

Děkuji všem, kteří přispěli ke vzniku této práce. Velmi oceňuji podmínky, které mi byly vytvořeny pro vypracování této práce v Ústavu pro hydrodynamiku AV ČR, v .v. i..

<b>Osnova</b>	
<b>Abstrakt</b>	5
<b>1. Úvod</b>	7
<b>2. Literární přehled</b>	9
<b>2.1. AOM v povrchových vodách</b>	9
<b>2.2. AOM při úpravě vody</b>	12
2.2.1. Vedlejší produkty desinfekce vody s obsahem AOM	13
2.2.2. Cyanotoxiny	14
2.2.3. Metody odstranění AOM při úpravě vody	16
2.2.3.1. Konvenční úprava vody	16
2.2.3.2. Adsorpce na aktivním uhlí	18
2.2.3.3. Membránová filtrace	19
2.2.3.4. Vliv AOM na koagulaci	19
<b>3. Materiál a metodika</b>	25
<b>3.1. Odběr kultury <i>Microcystis aeruginosa</i></b>	25
<b>3.2. Příprava COM</b>	25
<b>3.3. Charakterizace COM proteinových látek</b>	26
3.3.1. Izolace a stanovení podílu peptidové/proteinové složky COM	26
3.3.2. Analýza rozpuštěného organického uhlíku	26
3.3.3. Stanovení molekulových hmotností COM proteinových látek	27
3.3.4. Stanovení izoelektrických bodů COM proteinových látek	27
<b>3.4. Hodnocení tvorby komplexních látek peptidů/proteinů a železa</b>	28
3.4.1. Izolace proteinových látek s afinitou k Fe	28
3.4.2. Stanovení vazebné kapacity Fe-peptidových/proteinových komplexů	28
<b>3.5. Charakteristika vlastností kaolínových částic</b>	30
3.5.1. Příprava kaolínu	30
3.5.2. Stanovení povrchového náboje kaolínové suspenze	30
<b>3.6. Optimalizační sklenicové zkoušky</b>	31
3.6.1. Stanovení železa, zákalu, pH a KNK	32
<b>4. Výsledky a diskuse</b>	33
<b>4.1. Charakterizace COM proteinových látek</b>	33
<b>4.2. Tvorba komplexních látek mezi COM peptidy/proteiny a železitými ionty</b>	34
4.2.1. Komplexy tvořící COM peptidy/proteiny	34
4.2.2. Mechanismy a hodnocení tvorby komplexních látek	35
<b>4.3. Koagulace COM peptidů/proteinů</b>	38
4.3.1. Hodnocení dávky koagulantu	38
4.3.2. Vliv pH na koagulaci COM peptidů/proteinů	40
4.3.3. Mechanismy koagulace COM peptidů/proteinů	43
<b>4.4. Koagulace kaolínové suspenze</b>	47
4.4.1. Měření povrchového náboje kaolínu	47
4.4.2. Vliv pH na koagulaci kaolínové suspenze	48
4.4.3. Mechanismy koagulace kaolínové suspenze	48
<b>4.5. Koagulace COM peptidů/proteinů a kaolínové suspenze</b>	50
4.5.1. Vliv pH na koagulaci COM peptidů/proteinů a kaolínové suspenze	50
4.5.2. Mechanismy koagulace COM peptidů/proteinů a kaolínové suspenze	55
<b>5. Závěr</b>	58
<b>6. Praktický význam výsledků práce</b>	60
<b>7. Seznam použitých zkratk a symbolů</b>	62
<b>8. Literatura</b>	64

## **Abstrakt**

Diplomová práce je zaměřena na objasnění mechanismů podílejících se na koagulaci peptidových a proteinových COM (Cellular Organic Matter) produkovaných sinicí *Microcystis aeruginosa* a na popis jejich vlivu na koagulaci hydrofobní kaolínové suspenze. Na základě výsledků koagulačních pokusů bylo prokázáno, že účinnost koagulace COM peptidů/proteinů i kaolínových částic je silně závislá na hodnotě pH, která určuje nábojové charakteristiky peptidů/proteinů, kaolínu a produktů hydrolýzy koagulačního činidla a tedy i převládající mechanismy interakcí mezi nimi. Účinné koagulace a nejvyššího odstranění COM peptidů a proteinů bylo dosaženo v rozmezí pH 4-6 v důsledku nábojové neutralizace záporně nabitého povrchu peptidů/proteinů kladně nabitými produkty hydrolýzy železitého koagulačního činidla. Peptidy a proteiny za těchto reakčních podmínek také pozitivně ovlivnily koagulaci kaolínových částic. Jako dominantní mechanismy koagulace byly za těchto podmínek určeny nábojová neutralizace a adsorpce. Bylo prokázáno, že při nízkém koncentračním poměru COM peptidů/proteinů a koagulačního činidla ( $COM/Fe < 0,33$ ) dochází ke koagulaci peptidů/proteinů v rozsahu pH 6-8 mechanismem adsorpce peptidů/proteinů na částicích hydratovaných oxidů železa, který popisuje elektrostatický patch model. Naopak při vysokém poměru koncentrací COM a Fe ( $COM/Fe > 0,33$ ) dochází ke snížení účinnosti koagulace mechanismem stérické stabilizace. Dále bylo prokázáno, že ve slabě kyselé oblasti pH dochází k narušení koagulačního procesu v důsledku tvorby rozpustných Fe-peptidových/proteinových komplexních látek. Maximální schopnost peptidů/proteinů tvořit rozpustné komplexní látky s Fe byla pozorována okolo pH 6, kdy vazebná kapacita peptidů/proteinů dosáhla 1,38 mmol Fe na 1 g DOC. Prostřednictvím afinitní chromatografie byly izolovány komplexotvorné peptidy a proteiny s afinitou k Fe o MW 1; 2,8; 6; 8; 8,5; 10 a 52 kDa.

## **Klíčová slova**

AOM – organické látky produkované fytoplanktonem; COM – celulární organické látky; Fe-peptidové/proteinové komplexy; koagulace; *Microcystis aeruginosa*; peptidy/proteiny; vazebná kapacita.

## **Abstract**

The aim of the diploma thesis is to analyze the mechanisms involved in the coagulation of peptides and proteins contained in cellular organic matter produced by *Microcystis aeruginosa*, and to describe their influence on the coagulation of hydrophobic kaolin suspension. According to the results of jar tests, the coagulation effectiveness and removability of COM peptides/proteins and kaolin particles are heavily dependent on pH value which determines charge characteristics of peptides/proteins, kaolin and hydrolysis products of coagulant and therefore the prevailing mechanisms of interactions between them. Efficient coagulation and the highest removal of COM peptides and proteins were achieved in the pH range of 4-6 due to charge neutralization of peptide/protein negative surface by positively charged hydrolysis products of ferric coagulant. Peptides and proteins contributed to the coagulation of kaolin particles under the reaction conditions mentioned above, too. Charge neutralization and adsorption were found to be the dominant coagulation mechanisms under these conditions. At a low COM/Fe concentration ratio ( $\text{COM/Fe} < 0.33$ ), adsorption of peptides/proteins onto ferric oxide-hydroxide particles, described as the electrostatic patch model, enabled the coagulation in the pH range of 6-8. On the contrary, at a high concentration ratio of COM/Fe ( $\text{COM/Fe} > 0.33$ ), steric stabilization reduced the effectiveness of coagulation at pH 6-8. At pH around 6.2, the coagulation process was disrupted due to the Fe-peptides/proteins complexes formation. The maximum ability of peptides and proteins to form soluble complex compounds with Fe was observed around pH 6, when the binding capacity of peptides/proteins reached 1.38 mmol Fe per 1 g of peptide/protein DOC. Through affinity chromatography, complex forming peptides and proteins with affinity to Fe of relative molecular weights 1, 2.8, 6, 8, 8.5, 10 and 52 kDa were isolated.

## **Keywords**

AOM – Algal Organic Matter; Binding capacity; Coagulation; COM – Cellular Organic Matter; Fe-peptide/protein complexes; *Microcystis aeruginosa*; Peptides/proteins.

## 1. Úvod

Významnou součástí většiny povrchových vod jsou přírodní organické látky (NOM – Natural Organic Matter). V případě využití povrchových zdrojů vody pro pitné účely se tyto látky projevují řadou negativních vlastností. Jsou zdrojem pachů a pachutí, ovlivňují barvu vody, některé z nich jsou toxické (sinicové toxiny) (Sivonen a Jones, 1999; Ma a kol., 2012b). Při desinfekci vody mohou být zdrojem řady karcinogenních látek, inhibují proces účinného odstranění zákalotvorných látek (jílovité částice) či tvoří rozpustné komplexní sloučeniny s vícemocnými kationty, čímž zvyšují spotřebu železitých a hlinitých činidel používaných k úpravě vody (Bernhardt a kol., 1985; Takaara a kol., 2005; Pivokonský a kol., 2006, 2012; Richardson a kol., 2007). Z chemického hlediska představují NOM složitou směs aromatických a alifatických uhlovodíkových struktur s mnoha typy funkčních skupin, např. amidové, karboxylové, hydroxylové, ketonické a další funkční skupiny (Leenheer a Croue, 2003). NOM jsou tvořeny převážně huminovými látkami (huminové kyseliny a fulvokyseliny) a látkami nehuminového charakteru (především proteiny a polysacharidy) (Leenheer a Croue, 2003; Pivokonský a kol., 2011). V povrchových vodách je zpravidla obsah huminových látek ve srovnání s látkami nehuminového charakteru vyšší. Nehuminové látky se v našich podmínkách ve zvýšených koncentracích vyskytují převážně ve vegetačním období při masovém rozvoji sinic a řas – jedná se o tzv. AOM (Algal Organic Matter) (Bernhardt a kol., 1987; Leenheer a Croue, 2003). Právě AOM mají značný dopad na proces úpravy vody a mohou způsobovat řadu poruch při výrobě pitné vody. Charakter organických látek produkovaných vodním květem způsobuje nejen to, že míra jejich odstranění je obvykle velmi nízká, ale vede také k poruchám v odstranění ostatních ve vodě se vyskytujících znečišťujících příměsí (Pivokonský a kol., 2006, 2009a; Takaara a kol., 2007). Jsou známy i případy, kdy masivní rozvoj vodního květu vedl až k totálnímu kolapsu technologické linky úpravy vody.

Vedle skutečnosti, že některé produkty sinicového vodního květu (cyanotoxiny) jsou toxické, mohou především polysacharidové a peptidové (proteinové) složky AOM způsobovat značné zatížení technologií používaných pro úpravu vody. Důvodem k jejich účinné eliminaci není pouze vlastní zatížení upravené vody zvýšeným obsahem organických látek a z toho vyplývající technologické problémy, ale také skutečnost, že tyto látky mohou tvořit vedlejší produkty desinfekce vody. Při desinfekci vody chlorem a jeho sloučeninami dochází k tvorbě halogenovaných organických sloučenin, především trihalogenmetanů – THMs (např. chloroform, dibromchlormetan,

bromdichlormetan) a halogenderivátů kyseliny octové – HAAs (např. kyselina dichloroctová, trichloroctová, fluoroctová) (Nguyen a kol., 2005; Chen a kol., 2008; Hong a kol., 2008, 2009). Do současné doby bylo detekováno přes 700 takových sloučenin vyskytujících se v pitné vodě zpravidla v koncentracích v řádech  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , z nichž některé jsou toxické nebo karcinogenní (Richardson a kol., 2007; Chen a kol., 2008). Vzniku těchto sekundárních kontaminantů lze účinně předcházet právě maximálně možným odstraněním organických látek koagulací. Protože vliv AOM na procesy probíhající při úpravě vody nebyl doposud uspokojivě objasněn, je v současné době předmětem intenzivního výzkumu po celém světě. Výzkum se zaměřuje především na objasnění mechanismů interakcí AOM s produkty hydrolýzy koagulačních činidel a se zákalotvornými (jílovitými) částicemi. Snahou je popsat tyto mechanismy tak, aby za účelem dosažení minimálních zbytkových koncentrací AOM v upravené vodě bylo možné proces koagulace optimalizovat a tím předcházet nežádoucím vedlejším efektům popsaným výše.

Cílem předkládané diplomové práce je popsat mechanismy koagulace proteinové složky COM produkované sinicí *Microcystis aeruginosa* a objasnit její vliv na koagulaci hydrofobní kaolínové suspenze.

Mezi dílčí cíle práce patří:

- (1) charakterizace vlastností COM peptidů/proteinů významných z hlediska koagulačních procesů,
- (2) objasnění inhibičního vlivu COM peptidů/proteinů na koagulaci,
- (3) popis mechanismů interakcí COM peptidů/proteinů, hydrofobních kaolínových částic a produktů hydrolýzy koagulačního činidla,
- (4) kvantifikace inhibičního potenciálu proteinových COM tvorbou rozpustných povrchových ligandových komplexů s  $\text{Fe}^{3+}$  ionty.



## 2. Literární přehled

### 2.1. AOM v povrchových vodách

Fytoplankton v povrchových vodách je zdrojem řady organických látek, tzv. AOM (Algal Organic Matter). AOM jsou produkovány dvěma základními mechanismy. Metabolickými pochody sinic a řas se AOM do povrchových vod dostávají jako tzv. extracelulární organické látky (EOM – Extracellular Organic Matter), při odumírání a rozkladu vlastních buněk fytoplanktonu jsou pak uvolňovány tzv. intracelulární organické látky (IOM – Intracellular Organic Matter) a organické látky vázané na povrchu buněk (SOM – Surface-bonded/Surface-retained Organic Matter) (Takaara a kol., 2005, 2010; Henderson a kol., 2008b; Ma a kol., 2012a). Společně můžeme označit IOM a SOM jako tzv. celulární organické látky (COM – Cellular Organic Matter) (Takaara a kol., 2007). COM jsou do vody uvolňovány rovněž v důsledku mechanického nebo chemického poškození buněk sinic a řas při úpravě vody (Chow a kol., 1998; Pietsch a kol., 2002; Schmidt a kol., 2002; Takaara a kol., 2007; Ma a kol., 2012a).

Množství a diverzita AOM narůstá během růstové křivky fytoplanktonu (Takaara a kol., 2005; Pivokonský a kol., 2006). V průběhu exponenciální fáze růstu je odumírání buněk sinic a řas relativně nízké a AOM jsou uvolňovány především metabolickou činností organismů ve formě EOM. Ve stacionární fázi růstu již dochází k úhynu organismů a nárůst koncentrací organických látek je částečně způsoben i autolytickými procesy (Pivokonský a kol., 2006). Se stářím sinicové kultury se tak postupně zvyšuje podíl COM na celkové koncentraci AOM (Pivokonský a kol., 2006; Takaara a kol., 2007).

Chemické složení AOM je velmi různorodé, závisí především na druhu a růstové fázi organismu, případně na podmínkách jeho kultivace (Hoyer a kol., 1985; Brown a kol., 1997; Maksimova a kol., 2004; Henderson a kol., 2008b). Skladba, množství a rychlost uvolňování AOM jsou dále ovlivněny fyziologickými podmínkami a fotosyntetickou aktivitou vlastních buněk mikroorganismů (Fogg, 1983; Hoyer a kol., 1985; Maksimova a kol., 2004). Významný vliv mají především hodnota pH, iontová síla, teplota, intenzita a doba slunečního záření, obsah živin a organických látek a koncentrace O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> ve vodě (Hellebust, 1974; Fogg, 1983; Leenheer a Croue, 2003). AOM obsahují především následující skupiny látek:

(1) *Sacharidy*, resp. *polysacharidy* a *heteropolysacharidy*, jejichž nejběžnějšími stavebními jednotkami jsou glukosa, galaktosa, mannososa, rhamnososa, fukosa, arabinosa,

xylosa a uronové kyseliny, se vyskytují jako součást EOM i COM (Fogg, 1971; Hellebust, 1974; Hoyer a kol., 1985; Maksimova a kol., 2004). Jednoduché sacharidy a vícesytné alkoholy, jako např. glycerol a mannitol, se u převážné většiny druhů vyskytují jako součást EOM pouze v malých množstvích (Hellebust, 1974).

(2) *Dusíkaté látky* se vyskytují především ve formě *aminokyselin, oligopeptidů* a *proteinů*. Aminokyseliny a peptidy jsou velmi běžnou součástí EOM zelených řas, ve většině případů ale představují pouze jejich malou část. Sinice naopak uvolňují do vody relativně velká množství asimilovaných dusíkatých látek, především ve formě polypeptidů, jejichž hlavními stavebními jednotkami jsou glycin, kyselina glutamová a asparagová, alanin a serin (Hellebust, 1974). Dále lze do této skupiny EOM zařadit glykoproteiny, glukosamin, nukleové kyseliny a další bílkovinné látky se specifickými vlastnostmi jako např. enzymy, vitamíny (kyselina nikotinová, thiamin, biotin), inhibitory a stimulatory růstu (Fogg, 1971; Hellebust, 1974). Polypeptidy a proteiny se však do vodního prostředí uvolňují především při odumírání planktonních sinic i řas jako součást COM. Například COM produkované sinicí *Anabaena flos-aquae* obsahují proteiny s molekulovými hmotnostmi (MW – Molecular Weight) 18, 73, 190, 360 a nad 900 kDa. Jako součást COM sinice *Microcystis aeruginosa* byly identifikovány proteiny s relativními molekulovými hmotnostmi 21, 85, 234, 395, 470 a nad 900 kDa, u COM zelené řasy *Scenedesmus quadricauda* byly zjištěny proteiny o MW 16, 73, 223 a nad 900 kDa (Pivokonský a kol., 2006).

(3) *Organické kyseliny*, především *kyselinu glykolovou*. K uvolňování glykolátu (sůl kyseliny glykolové) dochází zejména při nízkých koncentracích CO<sub>2</sub> (omezení fotosyntézy), nízkém poměru oxidu uhličitého a kyslíku, vysoké intenzitě světla a nedostatku živin (Fogg, 1971, 1983; Hellebust, 1974), množství jeho produkce výrazně závisí na druhu organismu (Hellebust, 1974). Anaerobně žijící řasy uvolňují velké množství produktů fermentace, mezi které patří kyselina mléčná, octová a mravenčí (Fogg, 1971; Hellebust, 1974). Některé druhy také mohou produkovat kyselinu pyrohroznovou, α-ketojantarovou, α-ketoglutarovou, α-ketomáselnou, α-ketoisovalerovou a acetocetovou. Organické kyseliny se vyskytují jako součást EOM i COM (Fogg, 1971).

(4) *Tuky a mastné kyseliny* jsou součástí spíše COM, jako EOM se vyskytují pouze u některých druhů. Organismy rodů *Chlamydomonas* a *Chlorella* produkují nenasycené mastné kyseliny nebo jejich peroxidy (Hellebust, 1974).

(5) *Fenolové sloučeniny* uvolňují pouze některé mořské druhy hnědých řas, jsou spíše součástí COM (Hellebust, 1974).

(6) *Látky obsahující fosfor (organické fosfáty)* jsou do vody uvolňovány ve značných množstvích poškozenými nebo odumírajícími buňkami, lze je řadit k COM (Fogg, 1971; Hellebust, 1974).

(7) *Těkavé látky*, především *aldehydy* a *ketony*, jsou produkovány některými běžnými druhy řas, které způsobují zápach (např. *Chlamydomonas globosa*, *Synura petersenii*, *Cryptomonas ovata*). Bývají součástí EOM i COM (Fogg, 1971; Hellebust, 1974).

(8) *Toxiny* jsou charakteristické především pro sinice – *cyanotoxiny*. Jedná se o biologicky aktivní a toxické látky. Jsou to většinou produkty sekundárního metabolismu sinic, nebývají vylučovány aktivně a z buňky se vyplavují většinou až po její lýzi, lze je tedy zařadit spíše mezi COM (Fogg, 1971). Dělení cyanotoxinů vyplývá z jejich chemické struktury (cyklické a lineární peptidy, alkaloidy a lipopolysacharidy), dále se mohou dělit dle místa cílového působení toxinu (hepatotoxiny, neurotoxiny, imunotoxiny, genotoxiny, mutageny, dále embryotoxiny, dermatotoxiny a cytotoxiny) (Sivonen a Jones, 1999).

Dominantní složkou AOM jsou peptidy/proteiny a polysacharidy (Pivokonský a kol., 2006). Uvádí se, že u sinic představují peptidy/proteiny 40-70 %, u zelených řas a rozsivek pak cca 12-50 % (Whyte, 1987; Brown, 1991; Chronakis, 2001; Pivokonský a kol., 2006).

Složení AOM se značně liší v závislosti na růstové fázi fytoplanktonu (Takaara a kol., 2005). V exponenciální a stacionární růstové fázi převládají polysacharidové EOM nad proteinovými (Pivokonský a kol., 2006; Takaara a kol., 2007). Bylo ale prokázáno, že během stárnutí kultury fytoplanktonu dochází k postupnému nárůstu koncentrace proteinů (Pivokonský a kol., 2006; Huang a kol., 2009). Tento koncentrační nárůst není doprovázen změnou v zastoupení proteinových EOM (Pivokonský a kol., 2006). Například u sinice *M. aeruginosa* byl prokázán nárůst podílu proteinů v EOM z 10 % na počátku kultivace až na cca 40 % ve stacionární fázi růstu (Pivokonský a kol., 2006). Takaara a kol. (2005) detekovali během kultivace *M. aeruginosa* EOM o molekulových hmotnostech mezi 10-20 kDa, okolo 40 kDa a více než 600 kDa. Vysoké molekulární hmotnosti (MW > 600 kDa) byly zřejmě tvořeny kombinovanými látkami jako jsou např. peptidoglykany. Pivokonský a kol. (2006) ve složení EOM *Microcystis aeruginosa* během kultivace identifikovali proteiny

o molekulové hmotnosti 21 kDa a více než 900 kDa. EOM sinice *Anabaena flos-aquae* obsahovaly proteiny s MW okolo 18 kDa a více než 900 kDa, u EOM zelené řasy *Scenedesmus quadricauda* byly detekovány proteiny o MW okolo 16 kDa.

Skladbě COM u sinic dominují proteinové látky, které dosahují výrazně vyššího podílu než v EOM. Pivokonský a kol. (2006) hodnotili poměr proteinů v COM sinic a řas jako podíl proteinového DOC (Dissolved Organic Carbon) a celkového DOC COM. Proteiny tvořily u sinice *M. aeruginosa* až 66,4% podíl z celkových COM. U *A. flos-aquae* byl podíl proteinů 50,7%. Podíl proteinů v COM zelené řasy *S. quadricauda* byl stanoven pouze na 29,1%. Henderson a kol. (2008b) zjistili u AOM *M. aeruginosa* 64% podíl DOC proteinů, u zelené řasy *Chlorella vulgaris* byl pak tento podíl 40%. Jako složky COM *M. aeruginosa* byly identifikovány proteiny o relativních molekulových hmotnostech přibližně 21, 85, 234, 359, 470 a více než 900 kDa, COM *A. flos-aquae* obsahovaly proteiny s relativní molekulovou hmotností 18, 73, 190, 360 a nad 900 kDa, u COM *S. quadricauda* byly zjištěny proteiny o relativních molekulových hmotnostech 16, 73, 223 a 900 kDa (Pivokonský a kol., 2006).

## 2.2. AOM při úpravě vody

Látky produkované řasami a sinicemi (AOM) nepříznivě ovlivňují procesy úpravy vody a v důsledku toho i výslednou kvalitu upravené vody (Bernhardt a kol., 1985; Henderson a kol., 2008b, 2010). Již při velmi nízkých koncentracích (řádově  $\text{ng.l}^{-1}$ ) jsou zdrojem nepříjemného zápachu a negativně ovlivňují i chuťové vlastnosti vody, jedná se o tzv. T&O (Taste and Odor) sloučeniny (Dixon a kol., 2010; Ma a kol., 2012b). Například 2-metylisoborneol (MIB) a trans-1,10-dimetyl-trans-9-decalol (geosmin, GSM), dva z nejvýznamnějších netoxických metabolitů, jsou příčinou zatuchlé zemité pachuti a zápachu vody (Westerhoff a kol., 2005; Dixon a kol., 2010). Dále, jak již bylo zmíněno, AOM tvoří karcinogenní vedlejší produkty desinfekce vody (Siddiqui a kol., 1997; Nguyen a kol., 2005; Chen a kol., 2008; Hong a kol., 2008, 2009; Fang a kol., 2010). Zatížení upravované vody zvýšeným obsahem AOM je také nežádoucí z důvodu výskytu obtížně odstranitelných cyanotoxinů (Chow a kol., 1999; Hitzfeld a kol., 2000). Další velice nepříjemnou vlastností EOM je také jejich inhibiční vliv na koagulaci ostatních ve vodě přítomných znečišťujících příměsí (zákalotvorné hlinitokřemičitany) (Takaara a kol., 2007). Tato skutečnost vede při výskytu AOM k poruchám koagulace doprovázené zvýšeným obsahem organických látek, Fe/Al atd. ve filtrátu (Pivokonský a kol., 2011).

### 2.2.1. Vedlejší produkty desinfekce vody s obsahem AOM

Zbytkové koncentrace AOM ve vodě se stávají prekurzory vedlejších produktů desinfekce vody, tzv. DBPs (DBPs – Disinfection By-Products), vznikajících při hygienickém zabezpečení vody (Nguyen a kol., 2005; Richardson a kol., 2007; Chen a kol., 2008; Hong a kol., 2008, 2009; Huang a kol., 2009; Fang a kol., 2010). Dosud bylo detekováno více než 700 různých DBPs sloučenin, z nichž některé jsou toxické nebo karcinogenní (Richardson a kol., 2007; Chen a kol., 2008). DBPs se v pitné vodě zpravidla vyskytují v koncentracích v řádech  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (Richardson a kol., 2007). Koncentrace DBPs se mění sezónně, jejich tvorba je závislá na druhu a růstové fázi fytoplanktonu, klíčová je volba desinfekčního činidla a reakční podmínky desinfekce (pH, teplota, kontaktní čas) (Nguyen a kol., 2005; Richardson a kol., 2007; Chen a kol., 2008; Hong a kol., 2008; Huang a kol., 2009).

Při desinfekci vody chlorem dochází k tvorbě halogenovaných organických sloučenin, především trihalogenmetanů (THMs – Trihalogenmethanes) (např. karcinogenní chloroform  $\text{CHCl}_3$  nebo karcinogenní a genotoxický bromoform  $\text{CHBr}_3$  a dibromchlormetan  $\text{CHClBr}_2$ ) a halogenderivátů kyseliny octové (HAAs – Haloacetic Acids) (např. genotoxická kyselina chloroactová  $\text{CH}_2\text{ClCOOH}$  (MCAA), karcinogenní a genotoxická kyselina dichloroactová  $\text{CHCl}_2\text{COOH}$  (DCAA) a karcinogenní kyselina trichloroactová  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (TCAA)) (Richardson a kol., 2007; Hong a kol., 2009; Huang a kol., 2009; Lui a kol., 2011). Aplikace alternativních desinfekčních činidel, ozonu, oxidu chloričitého a chloraminů, obvykle vede k nižší produkci THMs a HAAs (Siddiqui a kol., 1997).

Většina AOM má obecně vyšší potenciál tvorby HAAs než THMs (Chen a kol., 2008; Hong a kol., 2009; Huang a kol., 2009). Prokázanými prekurzory DBPs při chloraci vody jsou AOM proteiny, lipidy a sacharidy. Nejvýraznější potenciál k tvorbě DBPs mají proteiny a lipidy (Hong a kol., 2008). Uvádí se, že většina AOM proteinů a aminokyselin umožňuje tvorbu především HAAs, nicméně u aromatických aminokyselin (tryptophan a tyrosin) byla prokázána především tvorba THMs (Hong a kol., 2009; Huang a kol., 2009). Nguyen a kol. (2005) pozorovali při reakci chloru s EOM a buněčnou biomasou zelené řasy *Scenedesmus quadricauda*, sinice *Oscillatoria prolifera* a rozsivky *Chaetoceros muelleri* především tvorbu THMs, z nichž 99 % představoval chloroform, dále byly produkovány DCAA, TCAA i MCAA. Obdobné výsledky prokázaly i další studie (Hong a kol., 2009; Lui a kol., 2011).

Mezi DBPs vznikající při desinfekci vody s obsahem AOM patří také halogenované aldehydy (např. karcinogenní a genotoxický formaldehyd HCHO a rovněž karcinogenní i genotoxický acetaldehyd CH<sub>3</sub>CHO) vznikající při ozonizaci. Dalšími DBPs vznikajícími při desinfekci vody jsou halogenované acetonitrily (např. genotoxický dichloracetonitril (DCAN)), nitrosaminy (např. karcinogenní a genotoxický nitrosodimethylamin (NDMA)), halonitrometany (např. genotoxický bromdichlormetan), haloamidy (např. genotoxický chloracetamid), halofuranony (např. karcinogenní a genotoxický MX (3-chlor-4-(dichlormetyl)-5-hydroxy-2(5*H*)-furanon)) a halopyrroly (genotoxický 2,3,5-tribrompyrrol) (Richardson a kol., 2007; Fang a kol., 2010; Lui a kol., 2011).

Vzniku DBPs lze účinně předcházet maximálně možným odstraněním organických látek koagulací nebo primárním odstraněním neporušených buněk fytoplanktonu (Huang a kol., 2009). V případě nedostatečně efektivní koagulace je nutné zbylé koncentrace AOM odstranit pomocí adsorpce na aktivním uhlí či membránovými procesy (Kim a Yu, 2005; Hnatůková a kol., 2011).

### 2.2.2. Cyanotoxiny

Sinice svým sekundárním metabolismem produkují biologicky aktivní, akutně i chronicky toxické látky, ve vodě rozpustné cyanotoxiny (Sivonen a Jones, 1999; Bláha a kol., 2009). Cyanotoxiny jsou produkovány ve všech fázích růstu sinic. Aktivně metabolickými pochody jsou vylučovány extracelulární cyanotoxiny. K uvolnění výrazného množství intracelulárních v buňkách vázaných cyanotoxinů dochází v důsledku přirozené či mechanickým a/nebo chemickým stresem způsobené lýze buněk (Sivonen a Jones, 1999; Pietsch a kol., 2002; Schmidt a kol., 2002; Jurczak a kol., 2005). Uvolnění cyanotoxinů z buňky do vody se odehrává nejen v přírodních podmínkách, ale také vlivem technologických postupů při úpravě vody (Pietsch a kol., 2002; Schmidt a kol., 2002).

Nejméně 1/3 z 50 známých rodů sinic má schopnost produkovat toxiny (Newcombe a kol., 2003), přičemž cca 25 až 75 % sinicových květů je toxických (Maršálek a kol., 2001; Bláhová a kol., 2008). Mezi nejvýznamnější producenty cyanotoxinů patří sinice rodů *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Lyngbya* aj. (Sivonen a Jones, 1999; Hitzfeld a kol., 2000; Schmidt a kol., 2002). Některé druhy sinic mohou produkovat současně i několik různých toxinů, naopak jiné populace těchto druhů mohou být zcela netoxické

(Sivonen a Jones, 1999). Spektrum produkovaných cyanotoxinů a jejich obsah v biomase sinic se také může výrazně měnit i během vegetačního růstu sinic (Sivonen a Jones, 1999).

Cyanotoxiny se dělí podle chemické struktury na cyklické a lineární peptidy, heterocyklické sloučeniny (alkaloidy) a lipopolysacharidy (Sivonen a Jones, 1999; Hitzfeld a kol., 2000). Dle funkce a místa cílového působení toxinu jsou cyanotoxiny členěny na hepatotoxiny (microcystiny, nodulariny – peptidy), neurotoxiny (anatoxiny a saxitoxiny – alkaloidy) a cytotoxiny (hepatotoxický cylindrospermopsin – alkaloid), dermatotoxiny (lyngbyatoxiny a aplysiatoxiny), endotoxiny, imunotoxiny, genotoxiny, mutageny, embryotoxiny a dráždivé lipopolysacharidy (Sivonen a Jones, 1999; Hitzfeld a kol., 2000; Wiegand a Pflugmacher, 2005). Díky toxickým účinkům jsou rovněž jako cyanotoxiny klasifikovány některé sinicové lipopolysacharidy, které jsou nedílnou součástí buněčné stěny sinic (Sivonen a Jones, 1999).

Ve sladkých vodách jsou nejčastěji detekovanou skupinou cyanotoxinů microcystiny, které byly izolovány ze zástupců sinic rodu *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Woronichinia*, *Phormidium*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon* aj. (Dawson, 1998; Sivonen a Jones, 1999; Bláhová a kol., 2007). Jedná se o skupinu hepatotoxických monocyklických heptapeptidů (Dawson, 1998; Sivonen a Jones, 1999). Dosud bylo identifikováno více než 70 strukturních variant microcystinů lišících se především párem variabilních L-aminokyselin a změnami na postranních řetězcích, například mezi vodíkem nebo metyl skupinou (Dawson, 1998; Sivonen a Jones, 1999; Bláha a kol., 2009). Základní struktura microcystinů je tvořena sedmi cyklicky spojenými aminokyselinami zahrnujícími D-alanin, pár variabilních L-aminokyselin označovaných jako X a Z, kyselinu D-glutamovou a tři neobvyklé aminokyseliny (kyselinu D-erythro- $\beta$ -metylasparagovou (MeAsp), hydrofobní C<sub>20</sub>  $\beta$ -aminokyselinu (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimetyl-10-phenyldeca-4(E),6(E)-dienovou (Adda) a N-metyldehydroalanin (Mdha) (Dawson, 1998; Sivonen a Jones, 1999; Harada a kol., 2004). Nejčastěji se vyskytující, nejvíce studovaná a jedna z nejtoxičtějších variant je microcystin-LR (MC-LR) obsahující leucin (L) v pozici X a arginin (R) v poloze Z (Dawson, 1998). Microcystiny tvoří až 1 % sušiny biomasy sinic (Bláha a kol., 2009). Molekulové hmotnosti jednotlivých variant microcystinů se pohybují v rozpětí 985 až 1024 Da (Campinas a Rosa, 2010). Bláha a kol. (2009) uvádějí rozsah MW 909 až 1115 Da.

Přítomnost cyanobakteriálních toxinů ve zdrojích pitné vody představuje závažný problém pro úpravny vody, protože ne všechny technologické postupy jsou schopny tyto látky efektivně odstranit (Hitzfeld a kol., 2000). Protože většina cyanotoxinů je součástí COM, lze jejich značný podíl eliminovat v rámci procesu odstranění celých buněk sinic koagulací (Sivonen a Jones, 1999; Pietsch a kol., 2002; Jurczak a kol., 2005). Účinnost odstranění již ve vodě obsažených cyanotoxinů pak závisí na aplikované technologii úpravy vody a může se do určité míry lišit pro různé zdroje surové vody a různé druhy sinic (Bláha a Maršálek, 2003; Jurczak a kol., 2005). Nejčastěji se používají adsorpce na aktivním uhlí (práškovém i granulovaném), nanofiltrace, ozonizace a chlorace (Lambert a kol., 1996; Bláha a Maršálek, 2003; Campinas a Rosa, 2006; Dixon a kol., 2010; Ho a kol., 2011). Konvenční úprava vody koagulací je schopná odstranit pod detekovatelnou mez počáteční koncentrace microcystinů  $< 2-3 \mu\text{g.l}^{-1}$ . U vyšších koncentrací je výhodné použít ozonizaci a následnou adsorpci na aktivním uhlí (Bláha a Maršálek, 2003). Konvenční úprava vody koagulací a následnou separací vzniklých agregátů dosahuje účinnosti odstranění cca do 60 % u microcystinu-LR, v kombinaci s adsorpcí na aktivním uhlí pak cca 80 % (Lambert a kol., 1996). Nicméně konvenční postup úpravy vody není schopen dosáhnout ani při zařazení adsorpce na aktivním uhlí kompletního odstranění microcystinů. Zbytkové koncentrace MC-LR se obvykle pohybují do  $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$  (Lambert a kol., 1996).

### **2.2.3. Metody odstranění AOM při úpravě vody**

#### **2.2.3.1. Konvenční úprava vody**

Dosavadní výzkum v oblasti koagulace AOM prokázal jejich relativně nízkou míru odstranitelnosti při konvenční úpravě vody (Widrig a kol., 1996; Cheng a Chi, 2003; Pivokonský a kol., 2009a, b). Účinnost jejich koagulace je ovlivněna především druhem a růstovou fází organismu, typem a dávkou koagulantu a reakčním pH (Widrig a kol., 1996; Gregor a kol., 1997; Pivokonský a kol., 2009a, b). V závislosti na koncentraci AOM jsou k jejich odstranění potřebné relativně vysoké dávky koagulačního činidla (Pivokonský a kol., 2009a, 2011). Účinným nástrojem redukce koncentrací nežádoucích organických látek přítomných ve vodě včetně microcystinů a nejlepší možností úpravy vody je separace nepoškozených buněk fytoplanktonu i s jejich intracelulárními složkami včetně v buňkách vázaných cyanotoxinů (Chow a kol., 1998, 1999; Briley a Knappe, 2002; Pietsch a kol., 2002).



Účinnost koagulace AOM lze zvýšit předoxidací (Sukenik a kol., 1987; Jurczak a kol., 2005; Teixeira a Rosa, 2007; Pivokonský a kol., 2011; Ma a kol., 2012b). Účinky oxidace výrazně závisí na typu a optimální dávce oxidačního činidla, stejně jako na vlastnostech vody, druhu a růstové fázi fytoplanktonu (Sukenik a kol., 1987; Siddiqui a kol., 1997; Plummer a Edzwald, 2002; Pivokonský a kol., 2011). Běžně se jako oxidační činidla používají ozon, chlor, oxid chloričitý, chloraminy a manganistan draselný (Sukenik a kol., 1987; Widrig a kol., 1996; Siddiqui a kol., 1997; Plummer a Edzwald, 2002; Henderson a kol., 2008a; Ma a kol., 2012a, b). Značným handicapem předoxidace je však v případě úpravy surové vody obsahující celé buňky fytoplanktonu porušení jejich buněčné membrány, lýze buněk a následné uvolnění COM proteinů a dalších metabolitů, které mohou dále komplikovat koagulační proces (Hitzfeld a kol., 2000; Takaara a kol., 2005, 2007; Ma a kol., 2012a, b).

V praxi je nejčastěji používaným předoxidačním činidlem ozón. Jeho vliv na účinnost koagulace sinic, řas i AOM se liší v závislosti na druhu organismu, složení AOM a reakčních podmínkách (dávka, kontaktní čas, pH atd.) (Widrig a kol., 1996; Pietsch a kol., 2002). Widrig a kol. (1996) uvádějí cca 15% zvýšení účinnosti koagulace AOM při použití předozonizace. Samotné odstranění buněk koagulací mikroorganismů *Scenedesmus quadricauda* a *Dictyosphaerium pulchellum* se pak již při dávce 0,8 mg O<sub>3</sub>.mg<sup>-1</sup>C zvýšilo o 10-15 %. Montiel a Welte (1998) dosáhli při koagulaci po předchozí ozonizaci nízkou dávkou ozonu 1 mg.l<sup>-1</sup> dokonce zvýšení odstranění řas ze 75 % až na 93 %. Ozonizace nemá vliv pouze na samotné zvýšení účinnosti koagulace AOM, ale obvykle se projevuje také značným snížením dávek koagulačních činidel, které může dosahovat i 50 % v porovnání s dávkou bez aplikace ozonu (Sukenik a kol., 1987). Předozonizace je však také spojena s určitými riziky. Při nevhodně zvolené dávce a nepříznivých reakčních podmínkách může docházet k oxidativní fragmentaci vysokomolekulárních látek na nízkomolekulární, které jsou hůře koagulovatelné (Widrig a kol., 1996). Tato skutečnost vede k sekundárnímu zatížení upravované vody nárůstem koncentrací DOC a následně i ke zvýšené produkci DBPs. Za těchto podmínek je proto nutné aplikovat další technologické kroky úpravy, například adsorpci na aktivním uhlí či membránovou filtraci (Teixeira a Rosa, 2005, 2006a; Hnat'uková a kol., 2011).

Vedle koagulace je při konvenčním schématu dvoustupňové separace suspenze značně problematický stupeň sedimentace, který obvykle není dostatečně účinný na separaci malých vloček s nízkou hustotou tvořených koagulací buněk sinic a řas.

Z tohoto důvodu je sedimentace v poslední době často nahrazována flotací rozpuštěným vzduchem (DAF – Dissolved Air Flotation) (Teixeira a Rosa, 2006a, b, 2007; Henderson a kol., 2008a). Výhodou DAF v porovnání se sedimentací je skutečnost, že je méně závislá na účinnosti agregace a i u nedostatečně zagregované suspenze je schopná efektivně odstranit i menší nedostatečně vyvinuté vločky (Teixeira a Rosa, 2007). Henderson a kol. (2008a) uvádějí, že pomocí DAF je možné dosáhnout o 15-20 % vyšší účinnosti v odstranění různých druhů fytoplanktonu (sinice *M. aeruginosa* a zelené řasy *Chlorella vulgaris*) než při použití sedimentace. Obdobné výsledky byly prokázány i ve studii Teixeira a Rosa (2006b), která se zabývala odstraněním buněk *M. aeruginosa*.

### 2.2.3.2. Adsorpce na aktivním uhlí

Efektivní metodou odstranění zbytkových koncentrací nízkomolekulárních AOM včetně rozpuštěných cyanotoxinů je adsorpce na aktivním uhlí (AC – Activated Carbon). AC se používá jak v granulované (GAC – Granular Activated Carbon), tak i práškové (PAC – Powdered Activated Carbon) podobě (Lambert a kol., 1996; Campinas a Rosa, 2006; Ho a kol., 2011).

Obecně můžeme říci, že s klesající molekulovou hmotností AOM roste účinnost adsorpce na AC (Kim a Yu, 2005; Hnat'uková a kol., 2011). Hlavním faktorem ovlivňujícím adsorpční kapacitu je velikostní distribuce pórů AC vzhledem k molekulární velikosti adsorbovaných látek (Pelekani a Snoeyink, 1999; Ebie a kol., 2001). Pokud jsou mikropóry dostatečně velké pro adsorpci AOM s nízkou MW (např. microcystin-LR) ale příliš malé pro AOM s vyšší MW, dochází k adsorpci vysokomolekulárních látek v mezopórech a následně tak k blokaci mikropórů (Pelekani a Snoeyink, 1999; Ebie a kol., 2001). V případě, že jsou póry AC dostatečně velké pro nízkomolekulární mikropolutanty i vysokomolekulární AOM, je významným mechanismem přímá kompetice nízkomolekulárních a vysokomolekulárních frakcí na adsorpčních místech v pórech adsorbentu (Pelekani a Snoeyink, 1999; Ebie a kol., 2001). Rozsah blokace pórů určuje především dávka AC a relativní poměr počáteční koncentrace nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek (Ebie a kol., 2001). Vliv počáteční koncentrace adsorbátu je důležitý zejména při odstraňování AOM o velkých molekulových hmotnostech a jejich mnohonásobně vyšších koncentracích ( $\text{mg.l}^{-1}$ ), které jsou mnohdy až o šest řádů vyšší než koncentrace stopových organických polutantů ( $\mu\text{g.l}^{-1}$  koncentrace cyanotoxinů) (Bjelopavlic a kol., 1999; Quinlivan a kol.,

2005). Vlastním mechanismem adsorpce AOM, především pak COM peptidů, jsou elektrostatické interakce a tvorba vodíkových vazeb. Tyto mechanismy jsou detailně popsány v literatuře (Newcombe a Drikas, 1997; Moreno-Castilla, 2004; Hnaťuková a kol., 2011). Tento negativní vliv organických látek na adsorpci mikropolutantů a efekt blokace pórů lze snížit volbou AC s širší velikostní distribucí pórů (Pelekani a Snoeyink, 1999; Ebie a kol., 2001; Quinlivan a kol., 2005; Hnaťuková a kol., 2011).

### **2.2.3.3. Membránová filtrace**

Další metodou používanou k odstranění AOM včetně cyanotoxinů jsou membránové filtrace. Membránové filtrace se v závislosti na kvalitě surové vody používají buď samostatně nebo v kombinaci s konvenční úpravou vody (Gijsbertsen-Abrahamse a kol., 2006; Teixeira a Rosa, 2006a; Campinas a Rosa, 2010; Dixon a kol., 2010). Nevýhodou jejich samostatného použití je, že především při ultra- i nanofiltraci dochází ke značnému zanášení membrán proteinovými i polysacharidovými AOM (Her a kol., 2004; Campinas a Rosa, 2010). Mechanismus zanášení membrán je závislý na velikosti pórů membránového filtru a povaze znečišťujících látek. Bylo prokázáno, že zanášení membrány závisí více na jejich vlastnostech, provozních podmínkách filtrace a charakteru organických látek než na jejich celkové počáteční koncentraci v surové vodě (Her a kol., 2004; Campinas a Rosa, 2010).

Mechanismus separace AOM na membránách v závislosti na velikosti pórů membrány, velikosti a tvaru molekul AOM a nábojových poměrech na membráně a povrchu molekul AOM probíhá především dočasnou povrchovou či permanentní vnitřní filtrací látek s velkou a střední MW, naopak u látek s nízkou MW se uplatňuje především adsorpce uvnitř pórů membrány (Teixeira a Rosa, 2005; Campinas a Rosa, 2010). Adsorpce je pak ve své podstatě řízena stejnými mechanismy (chemisorpce, fyzikální adsorpce) jako u AC. V případě cyanotoxinů je, vzhledem k jejich malé MW, předpokládána separace pomocí adsorpce na či uvnitř membrány (Gijsbertsen-Abrahamse a kol., 2006; Campinas a Rosa, 2010).

### **2.2.3.4. Vliv AOM na koagulaci**

Vliv AOM na proces koagulace je značný. Nejen že jsou tyto látky samy o sobě obtížně odstranitelné, ale ovlivňují také odstranitelnost ostatních ve vodě přítomných znečišťujících příměsí (Pivokonský a kol., 2006, 2009a). Vliv AOM byl prokázán jak

na koagulaci hydrofobních (kaolínové suspenze) (Takaara a kol., 2007), tak i hydrofilních (např. huminových) koloidních látek (Dolejš, 1993).

Vlastním odstraněním AOM při úpravě vody se zabývali především Pivokonský a kol. (2009a), kteří studovali jejich celulární složku (COM). Sklenicové optimalizační zkoušky se síranem železitým byly provedeny v rozsahu pH 3 až 8 s koncentracemi COM 3 a 7 mg.l<sup>-1</sup> DOC (Dissolved Organic Carbon) a dále s neproteinovými a proteinovými frakcemi COM. Aplikováno bylo nejprve rychlé homogenizační míchání ( $\bar{G} = 300 \text{ s}^{-1}$ ) po dobu 1 min, následně rychlé agregační ( $\bar{G} = 80 \text{ s}^{-1}$ ) po dobu 15 min a 60 min sedimentace. Nejnižších zbytkových koncentrací COM bylo dosaženo při počáteční koncentraci 3 mg.l<sup>-1</sup> DOC v rozmezí pH 4,5 až 6,5 při dávce 6 mg.l<sup>-1</sup> Fe. Při počáteční koncentraci 7 mg.l<sup>-1</sup> DOC dosáhly nejnižší zbytkové DOC koncentrace 3,35 mg.l<sup>-1</sup> při dávce Fe 26 mg.l<sup>-1</sup> a pH 6. Nejnižší koncentrace zbytkového železa (0,014 mg.l<sup>-1</sup>) byla pozorována při dávce Fe 5 mg.l<sup>-1</sup> a pH 7,3. Optimální pH pro odstranění COM je tedy okolo 5, zatímco pH potřebné k dostatečnému snížení koncentrace zbytkového koagulačního činidla je v rozmezí pH 6 až 7.

Dále bylo zjištěno, že s vyšší účinností jsou koagulovány proteinové než neproteinové látky (např. polysacharidy) (Pivokonský a kol., 2009a, b; Ma a kol., 2012a). Účinnost odstranění COM proteinů (DOC<sub>P</sub> surové vody 4,12 mg.l<sup>-1</sup>) se ve studii Pivokonský a kol. (2009b) pohybovala v rozsahu 50 % u hlinitého (pH 6,2-6,8) a až 74 % u železitého koagulantu (pH 5,8-6,0). Maximální účinnost odstranění COM neproteinových látek pro nižší koncentrace (DOC<sub>NP</sub> surové vody 2,86 mg.l<sup>-1</sup>) tak byla pouze cca 11 % pro železitý a až 22 % pro hlinitý koagulant. Nejvyššího odstranění DOC<sub>P</sub> bylo dosaženo při dávce vyšší než 9 mg.l<sup>-1</sup> Fe a pH 6,7 při nízké počáteční koncentraci COM (3 mg.l<sup>-1</sup>) a při 18 mg.l<sup>-1</sup> Fe a pH < 5,8 při vysoké počáteční koncentraci COM (7 mg.l<sup>-1</sup>). Nejnižší zbytkové koncentrace DOC<sub>NP</sub> byly detekovány při dávce 9 mg.l<sup>-1</sup> a pH 6,7 pro nízké koncentrace a při 2 mg.l<sup>-1</sup> při pH 7,6 při vysoké koncentraci COM (Pivokonský a kol., 2009a).

Z předchozího textu je patrné, že vyšší účinnosti koagulace především u nabitých proteinových složek COM je dosahováno při použití železitých činidel. Důvodem je skutečnost, že hydroxid železitý vznikající hydrolyzou železitých koagulačních činidel je mnohem méně rozpustný a hydrolyzuje ve výrazně širším rozsahu pH než hydroxid hlinitý. Hliník až do pH cca 4,5 převažuje v rozpuštěné formě [Al(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup>, zatímco železo hydrolyzuje již při hodnotě pH 2. Zároveň v zásadité oblasti se zhruba až do pH 10 železo částečně stále vyskytuje ve formě

hydroxoželezitanových kationtů, zatímco hliník je již cca od pH 8 záporně nabitý (Duan a Gregory, 2003).

Limitována je především schopnost koagulace nízkomolekulárních látek (MW < 2 kDa), které jsou obtížněji odstranitelné koagulací než vysokomolekulární frakce (Bernhardt a kol., 1987; Volk a kol., 2000; Cheng a Chi, 2003; Ma a kol., 2012a). COM proteiny o vyšších molekulárních hmotnostech byly odstraněny koagulací efektivněji než COM proteiny o nízkých MW i v práci Pivokonský a kol. (2009a). Dle této studie představují obtížně koagulovatelnou frakci COM peptidy s nižší MW než 10 kDa. Ve studii Pivokonský a kol. (2009b) byly proteiny *M. aeruginosa* o MW 85, 470 a větší než 900 kDa zcela odstraněny při koagulaci železitým činidlem. Koagulace s hlinitým koagulantem poskytla rovněž odstranění proteinových látek o MW 470 a více než 900 kDa a na rozdíl od Fe byla úspěšnější v odstranění 21 kDa (Al koagulovalo tuto frakci s 56% účinností, Fe pouze s 34% účinností). U koagulace MW 234 a 359 kDa byl již opět účinnější železitý koagulant. Při vyšší dávce koagulantu již ve zbytkovém DOC nebyla identifikována nejvyšší MW frakce 900 kDa, odstranění vysokých MW COM tedy roste s dávkou činidla. Při koagulaci se 4 mg.l<sup>-1</sup> Fe bylo zbytkové DOC<sub>p</sub> 1,16 mg.l<sup>-1</sup>, při dávce 11 mg.l<sup>-1</sup> bylo zbytkové DOC<sub>p</sub> 0,91 mg.l<sup>-1</sup> (Pivokonský a kol., 2009a). Podle Amy a kol. (1992) mohou být koagulací účinně odstraněny pouze rozpuštěné organické látky o molekulových hmotnostech větších než 5 kDa. Nízkomolekulární organické látky je tak nutné odstranit jinými mechanismy, např. adsorpcí na aktivním uhlí (Kim a Yu, 2005; Hnaťuková a kol., 2011).

AOM ovlivňují koagulační procesy pomocí řady mechanismů (Pivokonský a kol., 2009a, 2012). V závislosti na koncentraci, složení a vlastnostech, jako je například distribuce molekulových hmotností (MW), velikost povrchového náboje, hodnota izoelektrického bodu atd., mohou AOM vykazovat pozitivní i negativní účinky na koagulaci (Ma a kol., 2012a). Při nízkých koncentracích mohou AOM účinnost koagulace zvyšovat, naopak jejich vysoké koncentrace koagulaci významným způsobem narušují (Bernhardt a kol., 1985, 1987; Pivokonský a kol., 2012). Vliv polysacharidových převážně nenabitých AOM na koagulaci částic může být při jejich nízkých koncentracích (1-2 mg.l<sup>-1</sup> DOC) podobný efektu neiontových polymerních flokulačních činidel, kdy adhezí na povrchu znečišťujících částic umožňují tvorbu tzv. mezičásticových polymerních můstků (Bernhardt a kol., 1985; Dolejš, 1993; Pivokonský a kol., 2006, 2009a, 2012). Naopak při vysokých koncentracích především nabitých proteinových složek AOM může v závislosti na hodnotě pH docházet vlivem

odpudivých elektrostatických interakcí k inhibici koagulačních procesů (Bernhardt a kol., 1985; Dolejš, 1993; Pivokonský a kol., 2006, 2009a, 2012; Sano a kol., 2011).

Dalším popsaným mechanismem vlivu AOM na koagulaci je tvorba polynukleárních směsných ligandových povrchových komplexních sloučenin s vícemocnými kationty kovů a produkty hydrolyzy koagulačních činidel (Bernhardt a kol., 1985; Takaara a kol., 2005; Pivokonský a kol., 2006, 2012). Vznik povrchových Fe/Al-organických komplexů brání hydrolyze koagulačního činidla a tvorbě kladně nabitých železitých a hlinitých polyhydroxokomplexů nutných k destabilizaci znečišťujících příměsí (Bernhardt a kol., 1985, 1987). Polyhydroxokomplexy iontů kovů destabilizačního činidla jsou prostřednictvím těchto interakcí vázány v organických molekulách v rozpuštěné či koloidní formě a nemohou se dále účastnit koagulačního procesu (Bernhardt a kol., 1985; Takaara a kol., 2005; Pivokonský a kol., 2006, 2012). Tvorba těchto komplexních sloučenin tak vede k poklesu účinnosti koagulace, neúměrnému nárůstu spotřeby koagulačního činidla, vzrůstu hodnot zákalu, organických látek a koncentrací zbytkového koagulantu (železa či hliníku) v upravované vodě (Bernhardt a kol., 1985, 1987; Pivokonský a kol., 2006, 2009a, 2012; Takaara a kol., 2007). Při vysokých dávkách koagulačního činidla v oblasti  $\text{pH} > 6$  je možné AOM a jejich komplexy s ionty Al a Fe odstranit zachycením ve sraženině hydratovaných oxidů Al/Fe pomocí mechanismu tzv. enmeshmentu (Gregor a kol., 1997; Duan a Gregory, 2003; Bache a Gregory, 2007). Vysoké dávky koagulačního činidla při enmeshmentu mají však za následek vznik nadměrného množství odpadního kalu a vyšší ekonomickou náročnost procesu (Takaara a kol., 2007, 2010; Ma a kol., 2012a; Sano a kol., 2011).

Takaara a kol. (2007) studovali vliv různé koncentrace EOM a COM *M. aeruginosa* na koagulaci kaolínu s použitím PACl (polyaluminiumchlorid) jako koagulačního činidla. Koagulační zkoušky byly prováděny s koncentrací kaolínu  $20 \text{ mg.l}^{-1}$  a různým množstvím přidaných AOM. Všechny pokusy probíhaly s dávkou PACl  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  a v neutrální oblasti pH (pH 7). Proces koagulace se skládal z 20 min rychlého míchání při  $80 \text{ ot.min}^{-1}$ , 15 min při  $60 \text{ ot.min}^{-1}$  a 20 min sedimentace. Koagulace samotného kaolínu dosáhla 97,7% účinnosti. V přítomnosti EOM  $112,5 \text{ mg C.l}^{-1}$  a  $214,9 \text{ mg C.l}^{-1}$  byla účinnost koagulace kaolínu 91,5% a 81,5%, při koagulaci s COM o koncentraci  $7,7 \text{ mg C.l}^{-1}$  a  $20,6 \text{ mg C.l}^{-1}$  pak byla účinnost koagulace 79,8% a 0%. COM i při 1/10 koncentracích způsobily mnohem výraznější

inhibici koagulace kaolínové suspenze než EOM, obsahují tedy zřejmě více inhibičních látek (Takaara a kol., 2007).

V dalších pokusech se Takaara a kol. (2010) zaměřili na koagulaci kaolínových částic v přítomnosti SOM (Surface-bonded/Surface-retained Organic Matter) produkovaných sinicí *M. aeruginosa*. Sklenicové zkoušky byly opět prováděny s koagulačním činidlem PACl (dávka 20 mg.l<sup>-1</sup>) při konstantní hodnotě pH 7. Při koagulaci samotného kaolínu bylo dosaženo jeho 91,6% odstranění. V přítomnosti sinicových hydrofilních SOM došlo k rapidní redukci účinnosti koagulace kaolínové suspenze až na cca 13 %. V případě koncentrace SOM 100 mg.l<sup>-1</sup> byla zaznamenána dokonce absolutní inhibice koagulace kaolínových částic. Autoři prokázali, že na inhibici koagulačních procesů mají vliv především lipopolysacharidy a řetězce RNA (ribonukleové kyseliny) obsažené v SOM.

Stabilizace kaolínových částic způsobená jejich interakcí s AOM může být při koagulaci částečně eliminována změnou reakčního pH (Bernhardt a kol., 1987). Účinnost koagulace AOM je možné také zvýšit přidávkem vápenatých iontů. AOM pak vytváří povrchové komplexní sloučeniny s Ca<sup>2+</sup> ionty a nedochází tak k nárůstu spotřeby hlinitých či železitých koagulačních činidel (Bernhardt a kol., 1986).

Některým autorům (Takaara a kol., 2005; Pivokonský a kol., 2006) se částečně podařilo izolovat a detekovat proteiny podílející se na tvorbě těchto komplexních sloučenin. Takaara a kol. (2005) izolovali proteiny schopné tvorby povrchových komplexů o molekulových hmotnostech mezi 43 a 67 kDa v EOM i AOM. Z výsledků jejich práce také vyplývá, že množství komplexotvorných látek obsažených v AOM narůstá během růstové křivky fytoplanktonu. Pivokonský a kol. (2006) izolovali při použití afinitní chromatografie komplexotvorné proteiny o molekulové hmotnosti kolem 60 kDa z EOM i COM frakce *A. flos-aqua* i *M. aeruginosa*. Mimo to Pivokonský a kol. (2006) detekovali zhruba dvojnásobné množství komplexních látek s hliníkem než se železem, proteiny *M. aeruginosa* mají tedy zřejmě větší afinitu k Al. I z tohoto důvodu je pro úpravu vod bohatých na AOM vhodnějším koagulantem železitá sůl.

Dolejš (1993) studoval vliv EOM na koagulaci huminových látek. Koagulační zkoušky prováděl bez kontroly pH s Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.18H<sub>2</sub>O a částečně neutralizovaným síranem hlinitým (PNAS) v 15 mmol.l<sup>-1</sup> roztoku. Buňky *Scenedesmus quadricauda* byly po určitou dobu ponechány v surové vodě s obsahem huminových látek. Koncentrace 8000 buněk.ml<sup>-1</sup> a 15 hodin dlouhý kontaktní čas měl již na koagulaci huminových látek pozitivní efekt. S delším kontaktním časem (3 dny) došlo v přítomnosti vyšší

koncentrace EOM k výraznému zlepšení koagulace huminových látek za nižší dávky koagulačního činidla. Nicméně důvody této zajímavé skutečnosti autor dále nijak nekomentuje.

Principy koagulace AOM ani vliv AOM na procesy probíhající při úpravě vody nebyly dosud uspokojivě objasněny a to i navzdory skutečnosti, že v době rozvoje fytoplanktonu ve vodárenských nádržích mohou tyto látky významně komplikovat technologii úpravy vody. Cílem této práce je proto objasnění mechanismů interakcí proteinové složky COM produkované sinicí *Microcystis aeruginosa* a hydrofobní kaolínové suspenze s produkty hydrolýzy koagulačních činidel.



### 3. Materiál a metodika

#### 3.1. Odběr kultury *Microcystis aeruginosa*

Sinice *Microcystis aeruginosa* byla získána odběrem z hladiny údolní nádrže Švihov (obr. 1). Odběr byl prováděn pomocí planktonní sítě o velikosti ok 0,01 mm. Takto získané buňky byly dále odděleny od případných hrubých nečistot promytím v destilované vodě (pH stabilizováno na hodnotě 7 pomocí 0,125 M NaHCO<sub>3</sub>) a následným cezením přes nerezové síto o velikosti ok 0,1 mm. Dále byly buňky separovány z vody filtrací přes membránový filtr s velikostí pórů 0,22 μm. Pro ověření zastoupení sinice *Microcystis aeruginosa* byl u takto separované kultury proveden kvantitativní mikroskopický rozbor. Zastoupení sinice *M. aeruginosa* dosahovalo cca 99 %. Zbýlý podíl byl tvořen druhem *Microcystis wesenbergii*.



Obr. 1 Sinicový vodní květ (*Microcystis aeruginosa*) na hladině údolní nádrže Švihov, srpen 2010

#### 3.2. Příprava COM

Separované buňky *M. aeruginosa* byly smíchány s demineralizovanou vodou a následně destruovány ultrazvukem v ledové lázni po dobu 5 minut při frekvenci 20 kHz a výkonu 240 W (UP400S, Hielscher Ultrasonics, SRN). COM byly dále odděleny od zbytků buněčné hmoty pomocí membránového filtru 0,22 μm (Millipore, USA). V dalším kroku bylo provedeno zahuštění COM při 20 °C na rotační vakuové

odparce (Laborota 4000 HB/G1, SRN). Takto získané vzorky COM byly následně uchovány zamražením při teplotě -18 °C.

### **3.3. Charakterizace COM proteinových látek**

#### **3.3.1. Izolace a stanovení podílu peptidové/proteinové složky COM**

Peptidy a proteiny byly ze vzorků COM izolovány dvoustupňovým srážením pomocí  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  při 0 °C. Metodiku srážení peptidů a proteinů podrobně popisuje Dawson a kol. (1986). Sraženina peptidů a proteinů byla od rozpuštěných neproteinových organických látek oddělena filtrací přes 0,22  $\mu\text{m}$  membránový filtr (Millipore, USA). Následně byla rozpuštěna v 200 ml demineralizované vody.

Podíl COM peptidů/proteinů vyjádřený jako rozpuštěný organický uhlík proteinových látek ( $\text{DOC}_P$ ) byl stanoven z rozdílu celkového rozpuštěného organického uhlíku ( $\text{DOC}_T$ ) a rozpuštěného organického uhlíku neproteinových látek ( $\text{DOC}_{NP}$ ) oddělených filtrací přes 0,22  $\mu\text{m}$  membránový filtr (Millipore, USA) od proteinové sraženiny, viz rovnice (1)

$$\text{DOC}_P = \text{DOC}_T - \text{DOC}_{NP}. \quad (1)$$

Ze vzorků rozpuštěných COM peptidů a proteinů byly následně odstraněny zbytkové koncentrace znečišťujících nízkomolekulárních látek (zbytkové koncentrace srážedla) pomocí ultrafiltrační membrány PLAC 1000 Da (Millipore, USA) pomocí filtrační aparatury s míchanou filtrační celou – Solvent Resistant Stirred Cell (Millipore, USA). Filtrační cela byla promíchávána 60  $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$  a tlak dusíkové atmosféry nad filtrovaným vzorkem byl udržován na hodnotě 1 baru.

Proces izolace peptidové a proteinové složky COM byl v průběhu práce prováděn opakovaně. Finální koncentrace  $\text{DOC}_P$  byly okolo 500  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$  s chybou stanovení vždy do 5 %.

#### **3.3.2. Analýza rozpuštěného organického uhlíku**

Rozpuštěný organický uhlík (DOC – Dissolved Organic Carbon) byl stanoven pomocí analyzátoru Shimadzu TOC- $V_{CPH}$  (Shimadzu Corporation, Japonsko). Jako kalibrační standardy byly použity hydrogenftalát draselný (TC standard), hydrogenuhličitan sodný (TC standard) a bezvodý uhličitan sodný (IC standard). Jako slepý vzorek byla použita demineralizovaná voda. Vzorky byly filtrovány přes 0,22  $\mu\text{m}$  membránový filtr (Millipore, USA). DOC byl spočítán jako rozdíl celkového (TC –

Total Carbon) a anorganického uhlíku (IC – Inorganic Carbon). Všechna měření byla prováděna třikrát. Chyby měření byly vždy menší než 2 %.

### 3.3.3. Stanovení molekulových hmotností COM proteinových látek

Relativní molekulové hmotnosti (MW – Molecular Weight) proteinových látek byly stanoveny pomocí HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography). Použity byly kolony Agilent Bio SEC-5 100 Å, 300 Å a 500 Å (7,8 × 300 mm, 5 µm) spojené do série (separační rozsah 100-1 250 000 Da). HPLC systém (Agilent 1100 series, Agilent Technologies, USA) byl propojen s detektorem s diodovým polem (DAD – Diode Array Detector). K detekci peptidů a proteinů byla použita vlnová délka 280 nm, která pro dané vzorky poskytuje největší odezvu (Pivokonský a kol., 2006; Hnaťuková a kol., 2011). Jako mobilní fáze byl pro frakcionaci MW použit 0,15 M fosfátový pufr o hodnotě pH 7,0. Průtok kolonou byl 1 ml.min<sup>-1</sup> při teplotě 23 °C. Objem nástřiku vzorku byl 60 µl. Hodnota DOC<sub>p</sub> všech peptidových/proteinových vzorků byla za účelem eliminace případného koncentračního efektu na HPSEC upravena na 100 mg.l<sup>-1</sup>. Analýza dat byla provedena pomocí Agilent Technologies Chemstation software (Agilent Technologies, USA). Molekulové hmotnosti detekovaných peptidů a proteinů byly odvozeny z kalibrační křivky SEC standardů o známých MW (Sigma-Aldrich, USA): D-Biotin (224 Da), cyanocobalamin (1,35 kDa), aprotinin (6,5 kDa), cytochrom c (12,4 kDa), karboanhydráza (29 kDa), albumin (66 kDa), alkohol dehydrogenáza (150 kDa), apoferritin (443 kDa), thyroglobulin (670 kDa) a imunoglobulin (900 kDa). K výpočtu MW byla použita semi-logaritmická kalibrační křivka ( $r = 0,99$ ). Jako kontrolní vzorky byly použity ovalbumin (44 kDa) a  $\gamma$ -globulin (158 kDa) (BioRad Laboratories, USA). Standardní chyba byla  $\pm 0,95$  kDa pro  $\gamma$ -globulin a  $\pm 0,64$  kDa pro ovalbumin. Reprodukovatelnost MW frakcí proteinových vzorků AOM byla velmi dobrá. Odchytky MW byly při opakovaných měřeních menší než 3 %.

### 3.3.4. Stanovení izoelektrických bodů COM proteinových látek

Hodnoty izoelektrických bodů (pI) peptidových/proteinových COM byly stanoveny pomocí izoelektrické fokusace (IEF – Isoelectric Focusing) Multiphor II electrophoresis system (Pharmacia, Švédsko). IEF gel (7%) byl připraven pomocí amfoterních elektrolytů o pI 2,5-5,0 a 3,5-10,0 (BioRad Laboratories, USA). K určení izoelektrických bodů byla použita standardní kalibrační křivka proteinové kalibrační

sady v rozsahu pI 2,5-10,0 (BioRad Laboratories, USA). Jako barvicí roztok byl použit 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-258 (BioRad Laboratories, USA) v 15% kyselině octové a 45% metanolu. Jako odbarvovací roztok sloužil 40% metanol a 10% kyselina octová. Izoelektrická fokusace byla provedena na Fakultě potravinářské a biochemické technologie VŠCHT Praha.

### **3.4. Hodnocení tvorby komplexních látek peptidů/proteinů a železa**

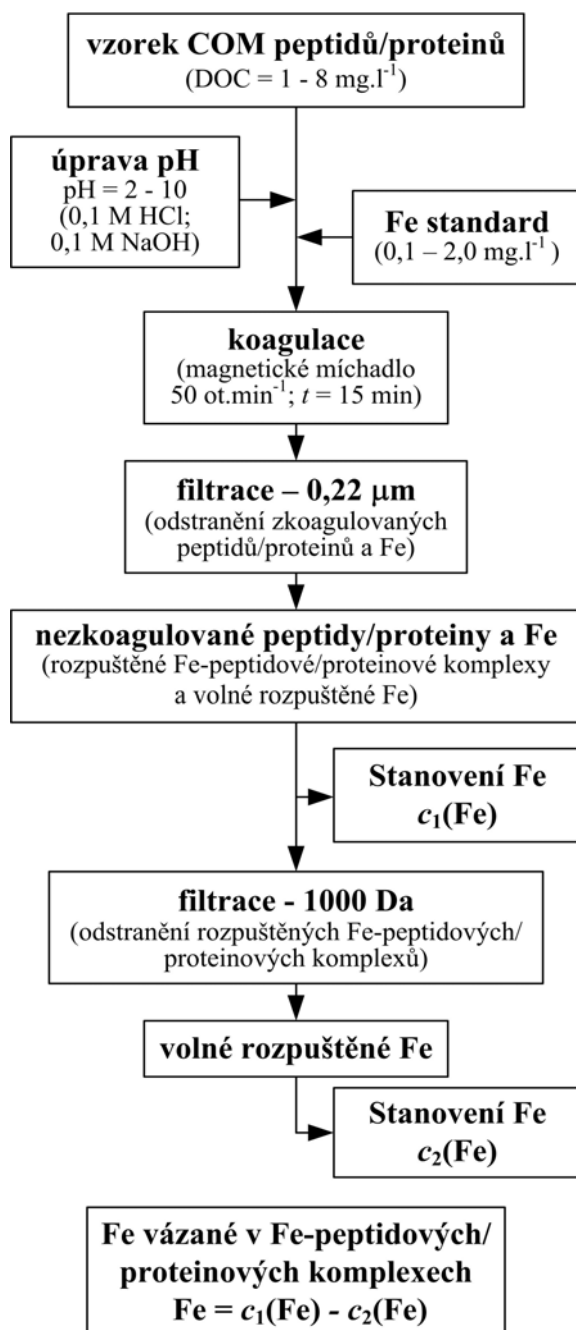
#### **3.4.1. Izolace proteinových látek s afinitou k Fe**

Proteiny schopné tvorby rozpuštěných povrchových komplexních látek s vícemocnými kationty kovů koagulačního činidla byly detekovány pomocí afinitní chromatografie (Affinity Chromatography). V afinitní koloně (1 ml, HiTrap<sup>TM</sup>, Amersham Bioscience Corp., Japonsko) byly imobilizovány Fe<sup>3+</sup> ionty. Jako vazebný pufr byl použit 0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> obsahující 0,5 M NaCl o hodnotě pH 7,2. Jako eluční pufr byl použit stejný pufr o hodnotě pH 9,0. Průtok pufrů byl 1,00 ml.min<sup>-1</sup> a objem eluované frakce 15 ml. Frakce proteinových látek vázaných v elučním pufru byly následně odsoleny membránovou ultrafiltrací (Plac 1000 Da, Millipore, USA) pomocí filtrační aparatury s míchanou filtrační celou – Solvent Resistant Stirred Cell (Millipore, USA) a následně desetkrát zakoncentrovány při 20 °C na rotační vakuové odparce (Laborota 4000 HB/G1, SRN). MW izolovaných komplexotvorných proteinových látek byly stanoveny pomocí HPSEC. Všechny analýzy byly provedeny ve třech opakováních.

#### **3.4.2. Stanovení vazebné kapacity Fe-peptidových/proteinových komplexů**

Množství Fe, které se společně s COM peptidy a proteiny podílí na tvorbě povrchových ligandových komplexů, bylo kvantifikováno jako poměr Fe integrovaného do rozpuštěné organické hmoty a celkového obsahu přidaného Fe. Schopnost proteinových látek tvořit rozpustné povrchové komplexní látky se železem byla hodnocena pomocí koagulace s odstupňovanou koncentrací proteinových látek (1 až 8 mg.l<sup>-1</sup>) a Fe standardu koagulantu (0,1; 0,5; 1; 1,5 a 2 mg.l<sup>-1</sup> Fe) (Sigma-Aldrich, USA). Koagulační zkoušky byly provedeny v rozsahu pH 2-10. Hodnota pH byla upravena pomocí 0,1 M HCl a 0,1 M NaOH. Koagulovaný podíl proteinů a Fe byl odstraněn filtrací přes 0,22 μm membránový filtr (Millipore, USA). Z nekoagulované frakce byly rozpuštěné Fe-peptidové/proteinové komplexy odděleny od samotného nekoagulovaného Fe membránovou ultrafiltrací (Plac 1000 Da, Millipore, USA) pomocí

filtrační aparatury s míchanou filtrační celou – Solvent Resistant Stirred Cell (Millipore, USA). Množství Fe vázaného v organické hmotě bylo vyjádřeno jako rozdíl Fe po filtraci 0,22  $\mu\text{m}$  membránovým filtrem a po ultrafiltraci přes ultrafiltrační membránu Plac 1000 Da. Postup stanovení množství železa vázaného v povrchových ligandových Fe-peptidových a proteinových komplexech je patrný z obr. 2.



Obr. 2 Stanovení peptidové/proteinové vazebné kapacity Fe

### 3.5. Charakteristika vlastností kaolínových částic

#### 3.5.1. Příprava kaolínu

Vzorky kaolínu (lom Sedlec, Sedlecký kaolín, a.s., ČR) byly před použitím v koagulačních testech upraveny. Suspenze o koncentraci  $100 \text{ g.l}^{-1}$  kaolínu v demineralizované vodě byla po dobu 12 hodin míchána na magnetickém míchadle a následně homogenizována pomocí ultrazvuku po dobu 30 minut při frekvenci 20 kHz a výkonu 400 W (UP400S, Hielscher Ultrasonics, SRN). Z takto upravené kaolínové suspenze byla následně sedimentací separována frakce o velikosti částic  $< 4 \mu\text{m}$ . K výpočtu sedimentačních rychlostí byl použit modifikovaný Stokesův vztah pro laminární režim proudění ( $Re < 0,25$ ) (Merkus, 2009). Takto separovaná frakce kaolínových částic byla zakoncentrována v odstředivce ( $12000 \times g$ , 30 min) a vysušena do konstantní hmotnosti při  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 12 hodin.

#### 3.5.2. Stanovení povrchového náboje kaolínové suspenze

Povrchový náboj kaolínové suspenze (částice o velikosti  $< 4 \mu\text{m}$ ) byl stanoven potenciometrickou titrací kyselinou chlorovodíkovou podle metody publikované v práci Bjelopavlic a kol. (1999). Titrace byla provedena pomocí digitální byrety (Burette Automatic III, Brand, SRN) v dusíkové atmosféře. Před samotnou titrací byly nejprve k navážce 40 g kaolínových částic do titrační baňky přidány 4 ml 0,1 M NaOH. Následně byl vzorek doplněn roztokem elektrolytu o objemu 400 ml a ponechán takto 30 min k ustálení. Pro potenciometrické titrace byly postupně použity elektrolyty o koncentracích 0,01; 0,1; a 1 M NaCl. Následně byl vzorek kaolínu postupně titrován pomocí 0,1 M HCl až do pH 2. Mezi jednotlivými přídávky HCl (0,05 ml) bylo vždy ponecháno 10 min pro ustálení rovnováhy. Relativní povrchový náboj kaolínové suspenze byl stanoven po odečtu titračních křivek kaolínové suspenze a slepého vzorku (titrace samotných elektrolytů 0,01; 0,1 a 1 M NaCl) pomocí rovnice (2)

$$|\sigma_o| = \frac{n}{m}, \quad (2)$$

kde  $|\sigma_o|$  je relativní povrchový náboj ( $\text{mmol.g}^{-1}$ ),  $n$  představuje rozdíl křivky slepé titrace a titrace kaolínové suspenze (mmol) a  $m$  je navážka kaolínu (g). Grafickým vynesáním relativního povrchového náboje v závislosti na pH při různých koncentracích elektrolytu (0,01; 0,1 a 1 M NaCl) byly získány křivky povrchového náboje kaolínových částic. Průsečík těchto křivek odpovídá bodu, ve kterém je celkový povrchový náboj kaolínu nezávislý na koncentraci elektrolytu a má tedy hodnotu

0 mmol.g<sup>-1</sup>. Hodnota pH v tomto bodě je označována jako pH nulového bodu náboje (pH<sub>NBN</sub>).

### 3.6. Optimalizační sklenicové zkoušky

Schopnost koagulace peptidových a proteinových látek obsažených v COM *Microcystis aeruginosa* byla studována pomocí standardních sklenicových zkoušek (jar tests) (Bratby, 2006). Sklenicové zkoušky byly provedeny ve dvoulitrových nádobách na osmimístné pádlové míchací koloně (LMK 8-03, Ústav pro hydrodynamiku AV ČR, v. v. i.). Ke sklenicovým zkouškám byla použita demineralizovaná voda s upravenou hodnotou pH pomocí 0,125 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,1 M HCl a 0,1 M NaOH tak, aby se hodnota pH koagulující suspenze pohybovala v rozmezí 3,0 až 9,0. Do takto připravených sklenic byla v závislosti na typu zkoušky dávkována kaolínová suspenze a/nebo peptidové a proteinové COM. Postupně byly provedeny následující koagulační pokusy: 1) demineralizovaná voda s KNK upravenou na hodnotu 1,5 mmol.l<sup>-1</sup> + kaolínové částice (frakce < 4 μm); 2) demineralizovaná voda s KNK upravenou na hodnotu 1,5 mmol.l<sup>-1</sup> + COM peptidy a proteiny o počáteční koncentraci 1, 3, 5 a 8 mg.l<sup>-1</sup> a 3) demineralizovaná voda s KNK upravenou na hodnotu 1,5 mmol.l<sup>-1</sup> + kaolínové částice (frakce < 4 μm) + COM peptidy a proteiny o počáteční koncentraci 1, 3, 5 a 8 mg.l<sup>-1</sup>. Jako koagulační činidlo byl vždy použit Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O, který byl aplikován v rozsahu koncentrací 1,4-14,0 mg.l<sup>-1</sup> (0,025-0,25 mmol.l<sup>-1</sup>). Důvodem použití železitého koagulačního činidla byla vyšší stabilita jeho hydroxidů a hydratovaných oxidů v rozsahu experimentálních hodnot pH.

Vlastní proces sklenicové zkoušky zahrnoval 1 min homogenizačního míchání o vysokém středním gradientu rychlosti ( $\bar{G} = 300 \text{ s}^{-1}$ ), 15 min agregačního míchání o nízkém gradientu rychlosti ( $\bar{G} = 80 \text{ s}^{-1}$ ) a 60 min sedimentace. Po 60 min sedimentace suspenze byly stanoveny hodnoty zákalu, pH a celková kyselinová neutralizační kapacita (KNK<sub>4,5</sub>). Pro stanovení zbytkové koncentrace Fe, DOC (viz kap. 3.3.2.) a molekulových hmotností zbytkových COM proteinů (viz kap. 3.3.3.) byly vzorky dále odstředovány po dobu 20 min při 3000 ot.min<sup>-1</sup> (Pivokonský a kol., 2011). Všechny uvedené pokusy byly provedeny nejméně třikrát. Chyby stanovení jednotlivých hodnot zbytkových koncentrací jednotlivých ukazatelů jsou uvedeny v příslušných kapitolách.

### **3.6.1. Stanovení železa, zákalu, pH a KNK**

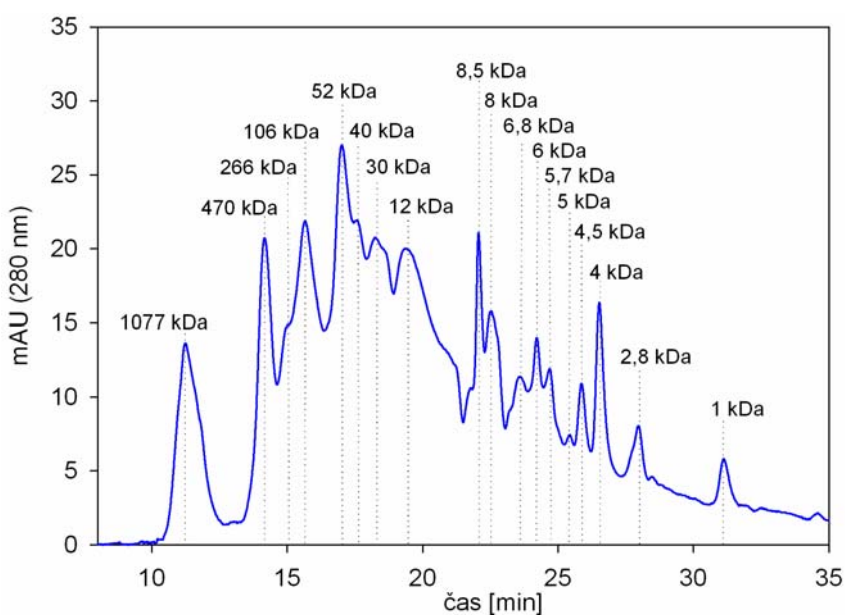
Zbytkové koncentrace Fe po sklenicové zkoušce byly stanoveny spektrofotometricky po reakci s rhodanidem při 480 nm (Spekol 11, Carl Zeitz Jena, SRN). Zákal byl analyzován spektrofotometricky při 560 nm (Spekol 11, Carl Zeitz Jena, SRN). Hodnota pH byla měřena potenciometricky (pH metr SevenCompact™ pH/Ion, Mettler Toledo, Švýcarsko; elektroda InLabR Expert Pro, Metler Toledo, Švýcarsko). Celková kyselinová neutralizační kapacita (KNK<sub>4,5</sub>) byla stanovena titrací 0,1 M HCl pomocí indikátoru methyloranž. Všechny chemikálie byly připraveny s demineralizovanou vodou. Měření byla prováděna opakovaně, nejméně však třikrát, a chyba stanovení se vždy pohybovala do 5 %. Podrobné metodiky stanovení jednotlivých ukazatelů lze nalézt v literatuře (Horáková a kol., 2003).



## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1. Charakterizace COM proteinových látek

Celulární organické látky produkované sinicí *Microcystis aeruginosa* jsou z velké části tvořeny proteinovými organickými látkami (Pivokonský a kol., 2006, 2012). Podíl proteinů, vyjádřený jako  $DOC_P$ , představoval v našem případě cca 62,9 % celkového  $DOC_T$ . Neproteinová složka COM pak tvořila přibližně 37,1 %. Tyto hodnoty korespondují s údaji uváděnými v práci Henderson a kol. (2008b), kteří zjistili 64% podíl proteinů na celkovém  $DOC_T$  během stacionární fáze růstu *M. aeruginosa*. COM proteiny, které byly následně použity v koagulačních testech, byly charakterizovány z hlediska distribuce relativních molekulových hmotností (MW) pomocí HPSEC. Na obr. 3 je zobrazen HPSEC chromatogram molekulových hmotností izolovaných COM peptidů a proteinů. Jako součást frakce COM byly identifikovány peptidy a proteiny o MW přibližně 1; 2,8; 4; 4,5; 5; 5,7; 6; 6,8; 8; 8,5; 12; 30; 40; 52; 106; 266; 470 a 1077 kDa. Protože HPSEC je ale metodou velikostní nikoli hmotnostní frakcionace, je třeba hodnoty těchto stanovených MW považovat za relativní. Pomocí izoelektrické fokusace (IEF) byly stanoveny následující hodnoty izoelektrických bodů ( $pI$ ) COM peptidů a proteinů: 4,79; 4,88; 4,91; 5,02; 5,12; 5,25; 5,45; 5,62; 5,80; 6,10; 6,33; 6,47; 6,63; 7,05; 7,39; 7,82; 7,93 a 8,05. Počet hodnot zjištěných izoelektrických bodů se shoduje s množstvím proteinů identifikovaných pomocí HPSEC. Nicméně je třeba konstatovat, že použité metody neumožňují jednoznačně identifikovaným MW přiřadit hodnoty  $pI$ .

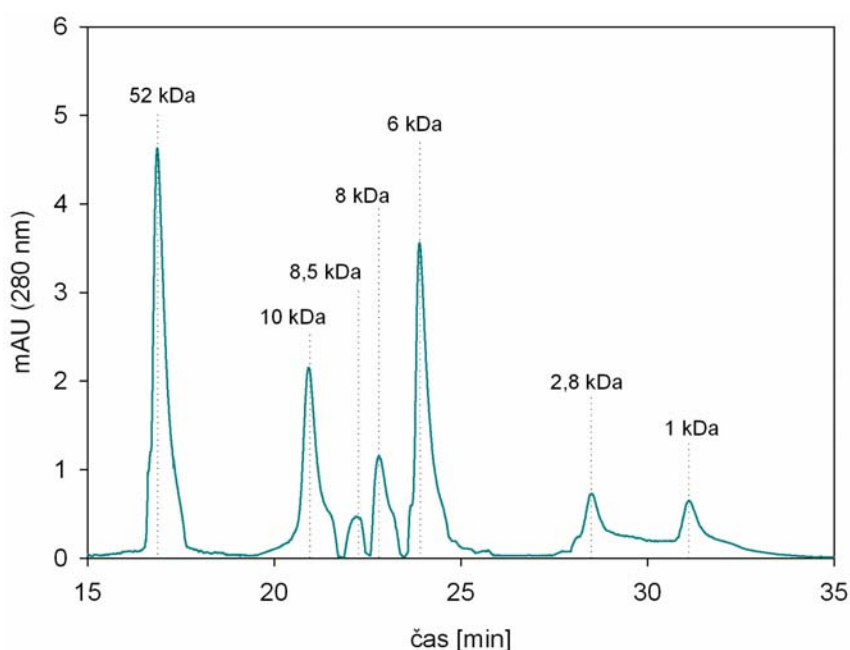


Obr. 3 Relativní molekulové hmotnosti COM peptidů/proteinů sinice *Microcystis aeruginosa*

## 4.2. Tvorba komplexních látek mezi COM peptidy/proteiny a železitými ionty

### 4.2.1. Komplexy tvořící COM peptidy/proteiny

Peptidy a proteiny schopné tvorby komplexních látek se železem, používaným jako koagulační činidlo, byly izolovány pomocí afinitní chromatografie a následně detekovány použitím HPSEC. Obr. 4 zobrazuje jednotlivé MW (1; 2,8; 6; 8; 8,5; 10 a 52 kDa) komplexotvorných peptidů a proteinů. Jednoznačná identifikace těchto peptidů a proteinů nebyla možná, nicméně z literatury lze usuzovat o jaké látky se může jednat. Birch a Bachofen (1990) uvádějí, že dominantní podíl komplexotvorných látek produkovaných mikroorganismy tvoří nízkomolekulární frakce s MW < 10 kDa. Identifikované nízkomolekulární peptidy mohou představovat lineární a cyklické oligopeptidy schopné vazby železa, jedná se např. o cyanopeptolin (MW přibližně 950 Da), aeruginopeptin (MW 1022 až 1072 Da), micropeptin (MW 885 až 1110 Da), ale i microcystiny (MW 985 až 1024 Da) a cyanochlorofyl (MW přibližně 900 Da) (Martin a kol., 1993; Ishida a kol., 1998; Harada a kol., 2001; Harada, 2004; Campinas a Rosa, 2010).



Obr. 4 Relativní molekulové hmotnosti komplexotvorných peptidů/proteinů

Nízkomolekulární peptidy mohou být také tvořeny tzv. sinicovými siderofory s MW v rozmezí od 500 do 1500 Da, které vykazují vysokou afinitu k železu. Jedná se o látky umožňující přenos železa přes buněčné membrány (Wilhelm, 1995). Siderofory s navázaným železem se dále váží k periplasmickým vazebným proteinům

(MW 8 až 100 kDa), které napomáhají jejich transportu cytoplazmatickou membránou do cytoplazmy sinic (Krewulak a Vogel, 2008). Skupinu těchto transporterů Fe mohou představovat Fe-proteinové komplexy s MW v rozsahu 8 až 52 kDa. Dále mohou Fe-proteinové komplexy *M. aeruginosa* obsahovat sinicové metaloenzymy (hydrogenázy), které mají rovněž vysokou afinitu k Fe (Tamagnini a kol., 2002). Asada a kol. (1987) izolovali z buněk *M. aeruginosa* železo vázající hydrogenázy s MW okolo 50-56 kDa. Tamagnini a kol. (2007) uvádějí, že HoxH hydrogenázová podjednotka s MW 49 kDa obsahuje aktivní centrum pro vazbu niklu a železa. Hydrogenázy dalších druhů sinic mají podobné MW okolo 35 a 60 kDa (Vignais a kol., 2001). Proteiny s MW okolo 60 kDa s vysokou afinitou k železu byly izolovány z COM sinice *M. aeruginosa* také ve studii Pivokonský a kol. (2006). Tyto výsledky dále korespondují se studií Takaara a kol. (2005), kde byly identifikovány jako chelátové komplexotvorné látky COM proteiny *M. aeruginosa* s MW okolo 43-67 kDa.

#### 4.2.2. Mechanismy a hodnocení tvorby komplexních látek

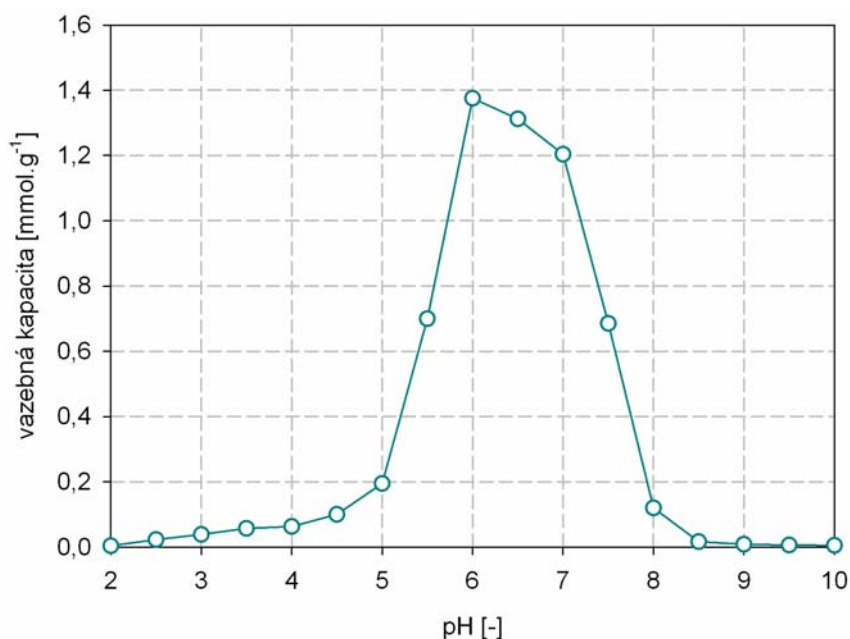
Afinita železa k peptidovým a proteinovým COM se obvykle vysvětluje pomocí modelu povrchových komplexů (Stumm a Morgan, 1996). Tento model vysvětluje tvorbu Fe-peptidových/proteinových povrchových komplexů vznikem koordinační vazby mezi disociovanými karboxylovými skupinami na povrchu řetězců peptidů a proteinů a pozitivně nabitými povrchovými skupinami železitých hydroxopolymerů a hydratovaných oxidů koagulačního činidla (Bernhardt a kol., 1985; Pivokonský a kol., 2006, 2012). Tyto reakce lze schematicky znázornit např. následujícím způsobem.



Převažující forma nabitých železitých hydroxopolymerů přímo závisí na hodnotě pH. Při  $\text{pH} < 2$  se ve vodném prostředí  $\text{Fe}^{3+}$  ionty koagulačního činidla vyskytují z 99 % ve formě hexaaquaželezitého komplexu  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ . Při  $\text{pH} \sim 2$  dochází k hydrolyze tohoto komplexu a uvolněním protonů z iontu vznikají dimery železitých hydroxokomplexů  $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2]^{4+}$ . S dalším růstem hodnoty pH ( $\text{pH} > 2$ ) dochází k polymerizaci a vzniku kladně nabitých polynukleárních železitých hydroxopolymerů (tj.  $[\text{Fe}_2(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_7]^{3+}$ ,  $[\text{Fe}_3(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_5]^{5+}$  a  $[\text{Fe}_4(\text{OH})_6(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{6+}$ ).

a železitých hydratovaných oxidů ( $\alpha$ -FeO(OH) nebo  $\gamma$ -FeO(OH)) (Stumm a Morgan, 1996). Kladně nabitě železité hydroxopolymery a hydratované oxidy interagují koordinačními elektrostatickými vazbami s disociovanými karboxylovými funkčními skupinami ( $-\text{COO}^-$ ) na povrchu peptidů a proteinů (Sigg a Stumm, 1981; Furrer a Stumm, 1983). Železo potřebné pro koagulaci je tak vázáno ve formě stabilních rozpuštěných či mikrokoloidních Fe-peptidových/proteinových komplexů, což následně vede k inhibici koagulace a k nárůstu účinné dávky koagulantu (Bernhardt a kol., 1985; Pivokonský a kol., 2006, 2009a; Ma a kol., 2012b).

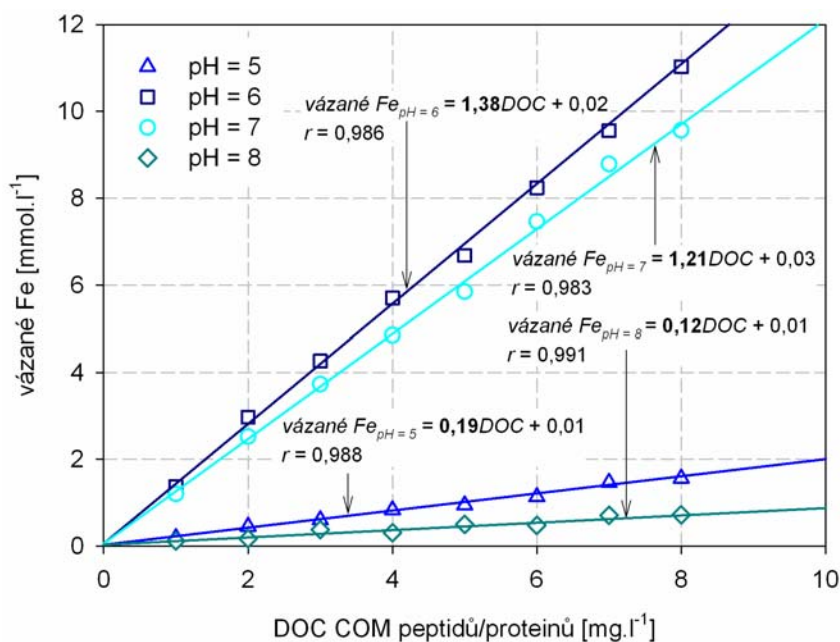
Vliv pH na množství železa vázaného formou Fe-peptidových/proteinových povrchových komplexů je zobrazen na obr. 5. Z hodnot  $pI$  komplexotvorných peptidů a proteinů ( $pI = 4,79; 5,12; 5,25; 5,45; 5,62; 5,80$  a  $6,10$ ), které byly stanoveny pomocí IEF vyplývá, že při  $\text{pH} < 5,5$ , které odpovídá průměrné hodnotě  $pI$ , převládá kladný náboj komplexotvorných peptidů (skupiny  $-\text{NH}^{3+}$  převažují nad  $-\text{COO}^-$  funkčními skupinami). Pozitivně nabitě peptidy, proteiny a kladně nabitě hydroxopolymery železa se vzájemně elektrostaticky odpuzují a vznik rozpustných železitých peptidových a proteinových komplexů je proto za těchto reakčních podmínek zanedbatelný (BC v rozmezí od  $0,19 \text{ mmol.g}^{-1}$  při  $\text{pH} 5$  až nulové hodnoty při  $\text{pH} 2$ ). Při  $\text{pH}$  v rozmezí  $5,5$  a  $7,5$  se vznik Fe-peptidových/proteinových povrchových komplexů výrazně zvyšuje díky přitažlivým elektrostatickým interakcím mezi záporně nabitými deprotonovanými kyselými funkčními skupinami peptidů a proteinů a pozitivně nabitými železitémi hydroxopolymery. Při  $\text{pH} > 8$  je tvorba železitých peptidových a proteinových komplexů opět výrazně snížena. Železo se již do značné míry vyskytuje v aniontové formě hydroxokomplexů, např.  $[\text{Fe}(\text{OH})_4]^-$  (Stumm a Morgan, 1996), a peptidy a proteiny jsou rovněž záporně nabitě. Dochází tak opět k elektrostatickému odpuzování sloučenin železa a proteinových látek. BC se pohybuje v rozmezí od  $0,12 \text{ mmol.g}^{-1}$  při  $\text{pH} 8$  až  $0,01 \text{ mmol.g}^{-1}$  při  $\text{pH} 10$ . Podobný mechanismus repulze byl při vysokých hodnotách  $\text{pH}$  popsán v případě interakcí mezi deprotonovanými karboxylovými skupinami COM peptidů a povrchovými kyselými kyslíkatými skupinami aktivního uhlí (Hnaťuková a kol., 2011). Navíc je v alkalické oblasti  $\text{pH}$  tvorba Fe-peptidových/proteinových komplexů rušena přítomností  $\text{OH}^-$  iontů jakožto kompetitivních ligandů (Stumm a Morgan, 1996).



Obr. 5 Vazebná kapacita COM peptidů/proteinů pro Fe v závislosti na pH

Rozpuštěné nebo mikrokoloidní Fe-peptidové/proteinové komplexy mohou vznikat pouze v případě, kdy jsou karboxylové skupiny peptidových postranních řetězců deprotonizované, tj. přibližně při  $\text{pH} > 4,8$  ( $\text{RCOOH } pK_a = 4,756$ ) (Dawson a kol., 1986). Ostatní kyselé funkční skupiny na povrchu peptidů/proteinů, např.  $-\text{SH}$  a  $-\text{OH}$ , mají hodnoty  $pK_a$  konstant ve značně alkalické oblasti ( $\text{RSH } pK_a = 8,33$  a  $\text{ROH } pK_a = 10,07$ ) (Dawson a kol., 1986), kdy Fe-hydroxokomplexy jsou již převážně záporně nabitě ( $[\text{Fe}(\text{OH})_4]^-$ ). Z tohoto důvodu se  $-\text{SH}$  a  $-\text{OH}$  skupiny prakticky nemohou (nebo jen malou měrou) účastnit tvorby povrchových Fe-peptidových/proteinových komplexů. Z předchozího je zřejmé, že vazebná kapacita Fe (BC – Binding Capacity) je přímo závislá na hodnotě pH. Pro ověření BC byly vytvořeny korelační koeficienty mezi množstvím vázaného rozpustěného Fe a DOC COM peptidů a proteinů při pH 5, 6, 7 a 8. Při všech hodnotách pH byla pozorována dobrá korelace. Korelační koeficienty  $r$  byly 0,988 při pH 5, 0,986 při pH 6, 0,983 při pH 7 a 0,991 při pH 8. Obr. 6 zobrazuje křivky vazebné kapacity Fe pro koncentraci DOC COM peptidů a proteinů v rozmezí od 1 do 8  $\text{mg.l}^{-1}$  při pH 5, 6, 7 a 8. Vazebnou kapacitu Fe v  $\text{mmol Fe.g}^{-1}$  DOC při dané hodnotě pH vyjadřuje sklon regresních přímk, tj. 0,19; 1,38; 1,21 a 0,12. Maximální komplexotvorná kapacita byla pozorována při pH okolo 6, kdy kapacita peptidů a proteinů vázat kladně nabitě železité hydroxopolymery koordinačními elektrostatickými interakcemi dosáhla  $1,38 \text{ mmol.g}^{-1}$  (obr. 6). S poklesem či vzrůstem hodnoty pH pak komplexotvorná kapacita klesá. Tyto

výsledky korespondují s prací Gregor a kol. (1996), kteří určili maximální vazebnou kapacitu Al  $1,6 \text{ mmol.g}^{-1}$  pro EOM při hodnotě pH 6. Frimmel a kol. (1983) stanovili vazebnou kapacitu Fe  $1,2 \text{ mmol.g}^{-1}$  pro fulvokyseliny. COM peptidy a proteiny tedy vykazují prakticky stejnou BC železa jako fulvokyseliny, které ze skupiny NOM bývají uváděny jako látky s největší vazebnou kapacitou pro vícemocné kationty.



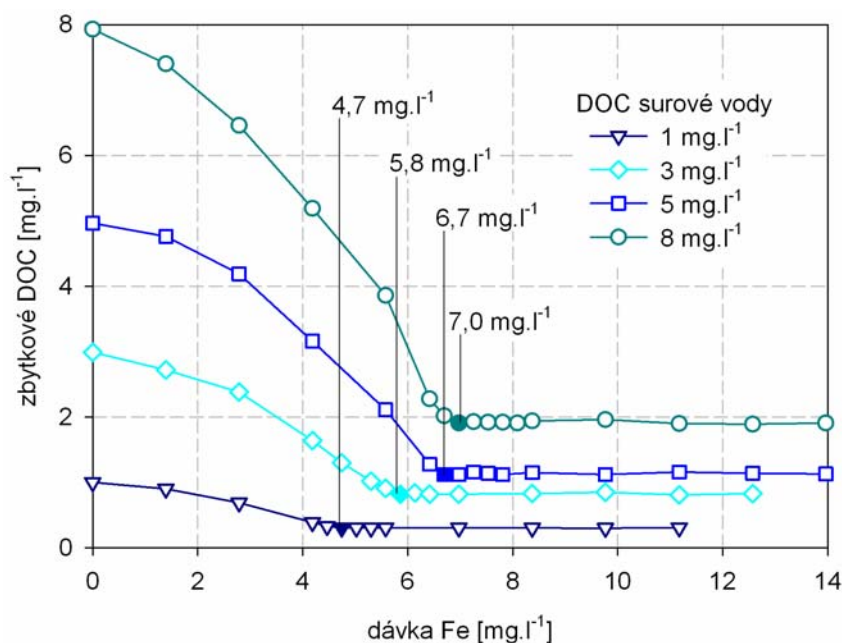
Obr. 6 Vazebná kapacita COM peptidů/proteinů pro Fe (počáteční DOC 1-8  $\text{mg.l}^{-1}$ ) při pH 5, 6, 7 a 8

### 4.3. Koagulace COM peptidů/proteinů

#### 4.3.1. Hodnocení dávky koagulantu

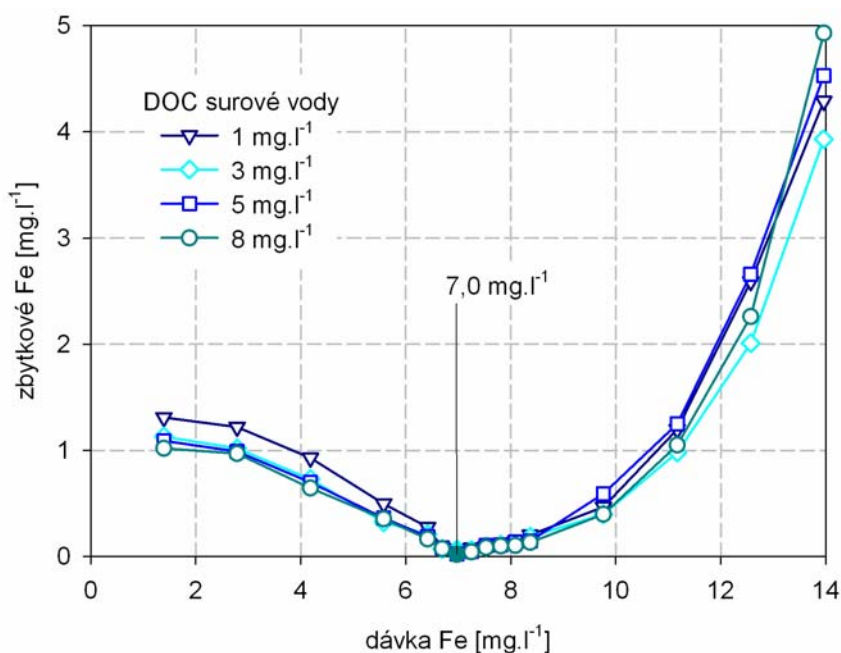
K optimalizaci dávky koagulantu byly provedeny sklenicové zkoušky se surovou vodou (demineralizovaná voda s KNK upravenou na hodnotu  $1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$  + COM peptidy a proteiny o počáteční koncentraci 1, 3, 5 a  $8 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Vzorok surové vody byly alkalizovány pomocí 0,1 M NaOH na hodnotu pH 9 a sklenicové zkoušky byly provedeny bez kontroly pH (hodnota pH se tedy měnila s dávkou koagulantu). Výsledky optimalizace dávek koagulačního činidla jsou zobrazeny na obr. 7 a 8. Je patrné, že s růstem koncentrace peptidů a proteinů roste i dávka koagulačního činidla potřebná pro efektivní odstranění DOC. Maximální odstranění DOC (více než 70% snížení oproti surové vodě) bylo pro různé koncentrace peptidů a proteinů dosaženo při různých dávkách koagulačního činidla. Po dosažení optimální dávky již další přidavek činidla nevyšil odstranění DOC (obr. 7). Naopak nejvyšší odstranění

zbytkového železa bylo dosaženo při dávce koagulačního činidla  $7 \text{ mg.l}^{-1}$  ( $0,125 \text{ mmol.l}^{-1}$ ). Tato dávka byla stejná pro všechny koncentrace peptidů a proteinů v surové vodě (obr. 8). Skutečnost, že zvyšující se koncentrace COM peptidů a proteinů nemá vliv na dávku potřebnou k účinnému odstranění železa, lze vysvětlit tím, že především dlouhé polymerní řetězce vysokomolekulárních proteinů poskytují dostatek nenabitých míst i k jiným typům interakcí než jsou elektrostatické, ty jsou podrobně popsány v kap. 4.3.3.. Jedná se např. o polymer bridging, vodíkové můstky nebo některé specifické stérické interakce, které mohou hrát určitou roli tím, že tyto proteiny umožňují spojení vzájemně se odpuzujících částic  $\text{FeO(OH)}$  (Pivokonský a kol., 2011). Je zřejmé, že s rostoucí koncentrací DOC roste i množství vysokomolekulárních proteinů, které tyto interakce umožňují a pravděpodobně mají na koagulaci podpůrný vliv. Ten se pak projevuje právě na zbytkových koncentracích Fe. Naopak na vlastní odstranění DOC mají tyto interakce vliv malý, protože peptidové a proteinové řetězce se vzájemně primárně odpuzují, a to díky repulzi záporně nabitých karboxylových skupin nebo i díky odpudivým hydratačním interakcím mezi nenabitými hydrofilními částmi jejich řetězců (Pivokonský a kol., 2011). Míru těchto „vedlejších“ interakcí je však těžké (ne-li nemožné) experimentálně ověřit, jejich částečný vliv na interakce mezi produkty hydrolýzy Fe a COM peptidy/proteiny je však pravděpodobný.



Obr. 7 Závislost zbytkové koncentrace DOC na dávce Fe (počáteční DOC COM peptidů/proteinů  $1-8 \text{ mg.l}^{-1}$ )





Obr. 8 Závislost zbytkové koncentrace Fe na jeho dávce (počáteční DOC COM peptidů/proteinů 1-8 mg.l<sup>-1</sup>)

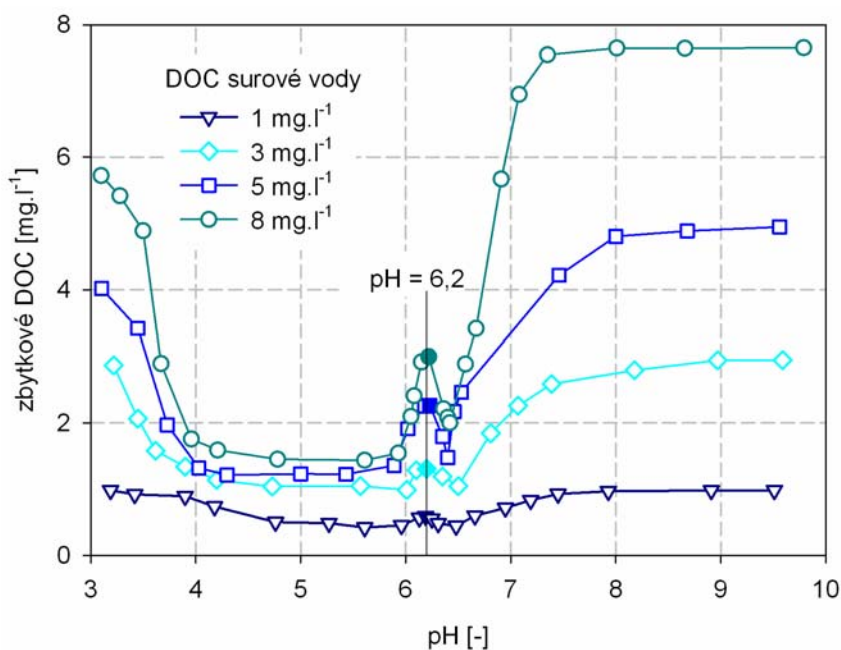
#### 4.3.2. Vliv pH na koagulaci COM peptidů/proteinů

Optimální dávka železitého koagulačního činidla (7 mg.l<sup>-1</sup>) byla použita v následných koagulačních testech zaměřených na popis vlivu hodnoty pH na koagulaci COM peptidů a proteinů. Vzorkům surové vody bylo upraveno pH pomocí předem stanoveného množství 0,1 M HCl a NaOH tak, aby se pH koagulované suspenze po přidavku koagulantu pohybovalo v rozsahu přibližně pH 3 až 10.

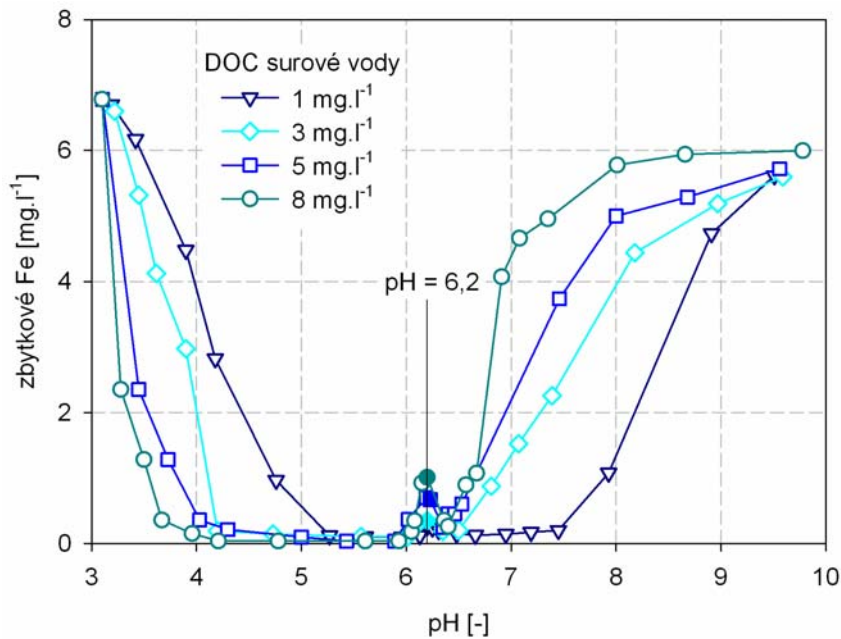
Výsledky koagulačních testů (obr. 9) prokázaly, že nejnižší zbytkové koncentrace DOC peptidů a proteinů byly dosaženy v rozmezí pH 4 až 6 pro všechny počáteční koncentrace DOC peptidů a proteinů. Tyto závěry odpovídají poznatkům studie Pivokonský a kol. (2009a), kde byly nejnižší zbytkové koncentrace COM peptidů a proteinů *M. aeruginosa* zjištěny při hodnotě pH < 6. Rozmezí pH minimální zbytkové koncentrace Fe se mírně zvyšuje s klesající počáteční koncentrací DOC z rozsahu pH 4-6 pro DOC 8 mg.l<sup>-1</sup> na rozmezí pH 5,5-7,5 pro DOC 1 mg.l<sup>-1</sup> (obr. 10). Zvýšení dolní hranice optimálního rozsahu pH pro odstraňování Fe ze 4 (DOC 8 mg.l<sup>-1</sup>) na 5,5 (DOC 1 mg.l<sup>-1</sup>) lze vysvětlit nízkými koncentracemi peptidů a proteinů, které neposkytují dostatečné množství záporně nabitých míst na svých vedlejších řetězcích k reakci s kladně nabitými železitými hydroxopolymerem. Posun horní hranice rozsahu pH pro optimální odstranění Fe ze 6 (DOC 8 mg.l<sup>-1</sup>) na 7,5 (DOC 1 mg.l<sup>-1</sup>) je popsán v kap. 4.3.3.. Nárůst koncentrací DOC i Fe při pH okolo 6 (max. při 6,2)



je způsoben tvorbou povrchových komplexů mezi rozpuštěným či mikrokoloidním Fe a  $-\text{COO}^-$  skupinami na povrchu peptidů a proteinů. Tvorba těchto komplexních sloučenin je popsána v kap. 4.2.2.. Při koagulačních testech bylo dosaženo maximální komplexační kapacity ( $\text{BC} > 1,2 \text{ mmol.g}^{-1}$ ) při hodnotě pH mezi 6 a 7. Tato hodnota odpovídá hodnotám BC zjištěným při stanovení maximální komplexační kapacity COM peptidů a proteinů, viz kap. 4.2.2. Významná komplexační kapacita COM proteinů při pH okolo 6 (obvyklá hodnota pH pro koagulaci většiny povrchových vod s obsahem NOM) způsobuje, že Fe ionty jsou za těchto reakčních podmínek vázány v organické hmotě a neúčastní se procesu koagulace (Bernhardt a kol., 1985; Pivokonský a kol., 2006, 2012; Takaara a kol., 2007). Kromě toho železo vázané v molekulách proteinů blokuje negativně nabitá místa na jejich povrchu, čímž zabraňuje jejich koagulaci mechanismem adsorpce a nábojové neutralizace. Nicméně, je třeba zdůraznit, že při dostatečně vysoké dávce koagulantu a  $\text{pH} > 6$ , lze Fe-peptidové/proteinové komplexy účinně odstranit mechanismem tzv. enmeshmentu. Při enmeshmentu dochází vlivem vysoké dávky Fe k velmi rychlé tvorbě (v řádech sekund) sraženiny hydratovaných oxidů železa, která do své struktury „strhává“ ostatní koloidní příměsi obsažené ve vodě (Duan a Gregory, 2003; Ma a kol., 2012a, b). Z výsledků na obr. 9 a 10 je dále patrné, že při  $\text{pH} > 7$  dochází k prudkému nárůstu zbytkových koncentrací DOC i Fe a koagulace prakticky neprobíhá.

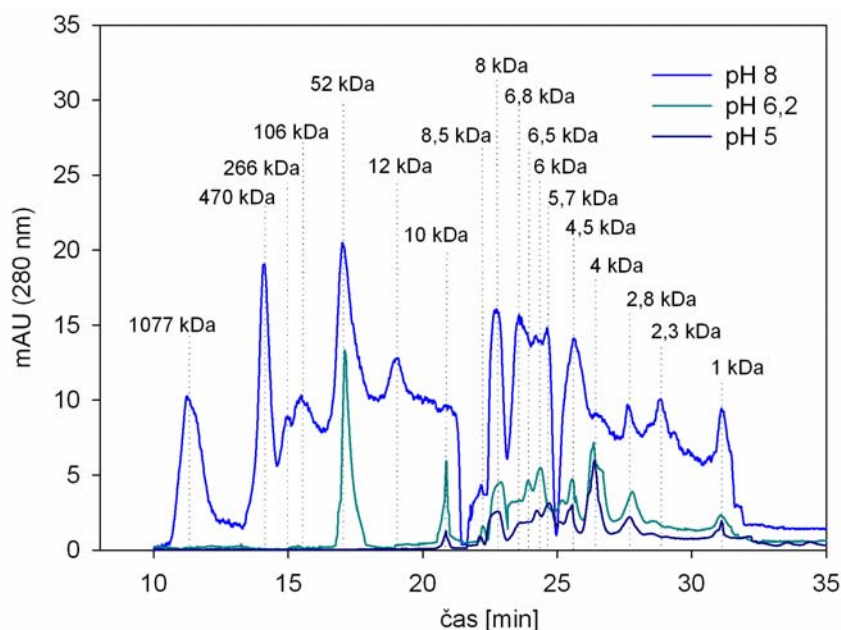


Obr. 9 Závislost zbytkové koncentrace DOC na pH (počáteční DOC COM peptidů/proteinů 1-8 mg.l<sup>-1</sup>)



Obr. 10 Závislost zbytkové koncentrace Fe na pH (počáteční DOC COM peptidů/proteinů 1-8 mg.l<sup>-1</sup>)

Změny ve složení zastoupení MW peptidů a proteinů po koagulaci při pH 5; 6,2 a 8 pro počáteční koncentraci DOC 5 mg.l<sup>-1</sup> jsou patrné z obr. 11. Je zřejmé, že k účinnému odstranění vysokomolekulárních proteinů dochází při hodnotě pH 5. Při pH ~ 5 byly proteiny s MW > 10 kDa odstraněny kompletně a v roztoku byly identifikovány pouze peptidy o MW přibližně 1; 2,8; 4; 4,5; 5,7; 6; 6,5; 6,8; 8; 8,5 a 10 kDa. Naopak během koagulace při pH 8 bylo odstraněno pouze zanedbatelné množství vysokomolekulárních proteinů. Tyto výsledky korespondují se závěry i dalších studií (Pivokonský a kol., 2009a; Ma a kol., 2012a), ve kterých byly rovněž s vyšší účinností odstraňovány vysokomolekulární COM ve srovnání s nízkomolekulárními. Při hodnotě pH, ve které BC dosahuje maxima (pH ~ 6,2), byly v roztoku po koagulaci identifikovány peptidy a proteiny o MW 1; 2,8; 4; 4,5; 6; 6,5; 6,8; 8; 8,5; 10 a 52 kDa. Podobnost mezi tímto spektrem a chromatogramem komplexotvorných peptidů a proteinů izolovaných afinitní chromatografií (obr. 4) značí, že významnou část zbytkové koncentrace DOC stanovené po koagulaci při pH 6,2 představují Fe-peptidové/proteinové komplexní látky.



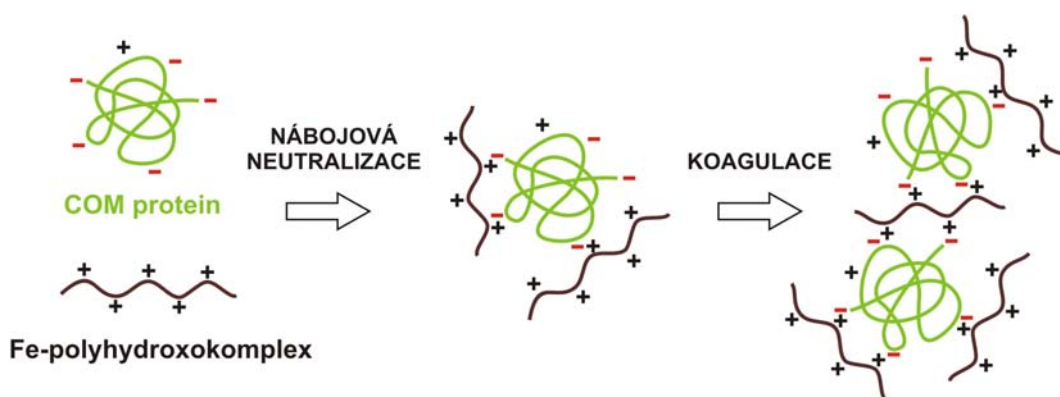
Obr. 11 Relativní molekulové hmotnosti zbytkových peptidů/proteinů po koagulaci při pH 8; 6,2 a 5 (počáteční DOC COM peptidů/proteinů 5 mg.l<sup>-1</sup>)

#### 4.3.3. Mechanismy koagulace COM peptidů/proteinů

Závislost základních mechanismů interakcí mezi peptidy a proteiny a produkty hydrolýzy koagulačního činidla na pH je znázorněna na obr. 12. Peptidy a proteiny obsahují řadu funkčních skupin ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CONH}_2$  atd.) nesoucích za určitých reakčních podmínek (hodnota pH) povrchový náboj. Povrchový náboj peptidů a proteinů je příčinou jejich reaktivity a vede k elektrostatickým interakcím s železitými hydroxopolymerem a hydratovanými oxidy železa (Burns a kol., 1996; Yoon a kol., 1999). Tyto interakce umožňují koagulaci proteinů a peptidů mechanismem nábojové neutralizace a/nebo adsorpce (Bernhardt a kol., 1985; Pivokonský a kol., 2012). Zjištěné hodnoty  $pI$  peptidů a proteinů (viz kap. 4.1.) ukazují, že přibližně při  $\text{pH} < 4$  převládá kladný náboj peptidů a proteinů a počet deprotonizovaných kyselých funkčních skupin na postranních řetězcích peptidů a proteinů je velmi omezený. V důsledku převažujícího kladného náboje je pak účinnost koagulace nízká.

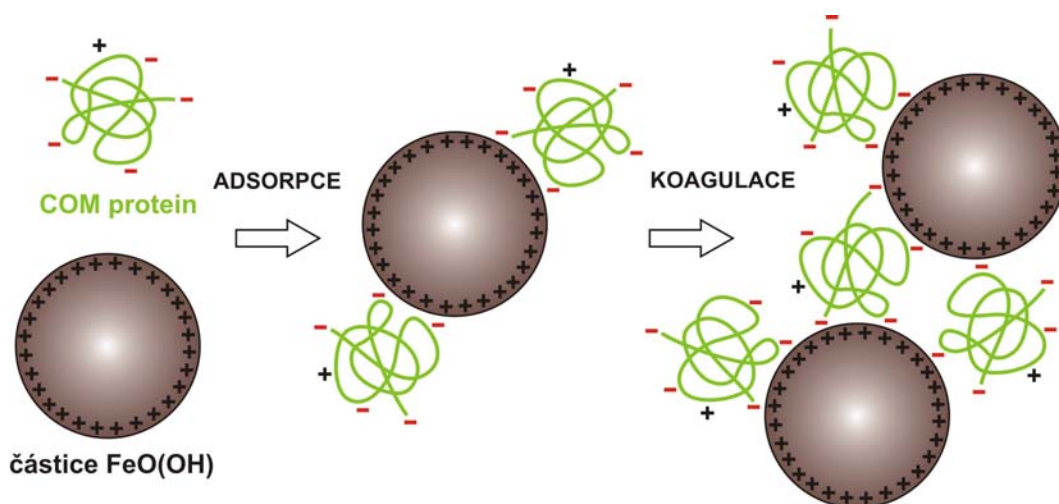


v rozsahu 6 až 8 může být důležitým mechanismem koagulace adsorpce COM peptidů a proteinů na povrchu koloidních hydratovaných oxidů železa. Interakce probíhá především mechanismem elektrostatického patch modelu (Gregory, 1973). Podle této teorie se mohou záporně nabitě peptidy a proteiny poutat ke kladně nabitým koloidním částicím železitých hydratovaných oxidů (pH nulového bodu náboje  $\sim 7,5$ ), což vede ke vzniku záporně nabitých míst na povrchu koloidních částic železa (obr. 14). Při vzájemné srážce takto nabitých částic dochází současně k upevnění opačně nabitých ploch na povrchu těchto částic. Dalším možným vysvětlením mechanismu adsorpce je vznik vodíkových vazeb mezi funkčními skupinami peptidů a proteinů a hydratovaných oxidů železa (Burns a kol., 1996; Yoon a kol., 1999). Význam adsorpce při koagulaci organických látek je obvykle ve srovnání s nábojovou neutralizací elektrostatickými interakcemi výrazně nižší (Pivokonský a kol., 2012). Bernhardt a kol. (1985) prokázali, že adsorpce hraje důležitou roli především v případech, kdy poměr koncentrací COM peptidů/proteinů a železa je nízký. Tato situace je patrná z obr. 10, kdy při počáteční koncentraci DOC  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  a poměru COM a Fe  $\sim 0,14$  mohou být peptidy a proteiny adsorbovány na povrchu koloidních hydratovaných oxidů železa a mohou tak zvyšovat účinnost koagulace tvorbou mezičásticových můstků (obr. 14).



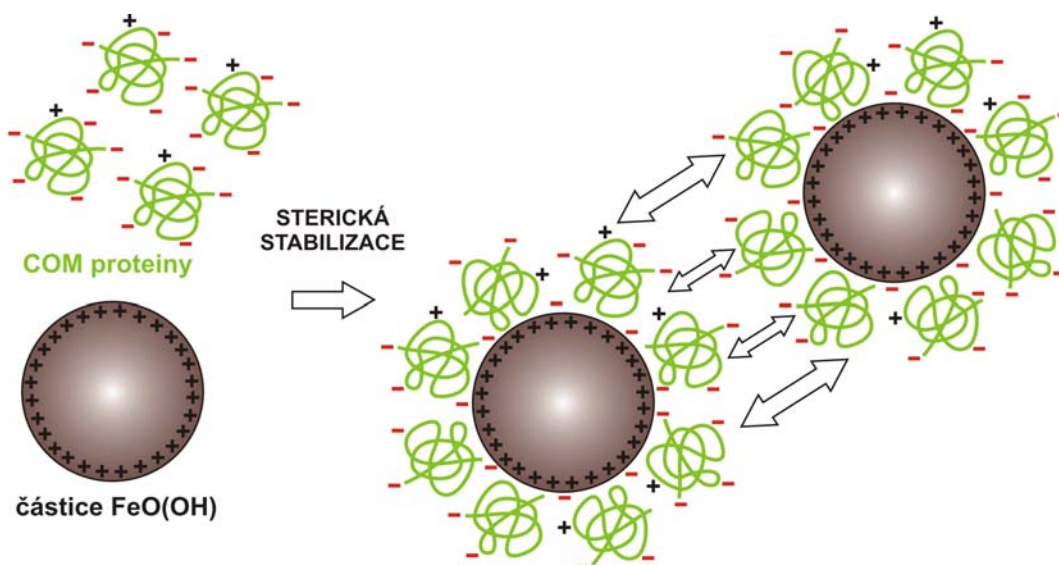
Obr. 13 Tvorba mikroagregátů mechanismem nábojové neutralizace COM peptidů/proteinů Fe-polyhydroxokomplexy





Obr. 14 Koagulace mechanismem elektrostatického patch modelu při nízkém poměru koncentrací DOC peptidů/proteinů a Fe ( $COM/Fe < 0,33$ )

Naopak, při vysokém poměru koncentrací DOC COM a Fe ( $COM/Fe > 0,33$ ) způsobuje stérická stabilizace účinnou inhibici koagulace (Bernhardt a kol., 1985). Této situaci odpovídají v našem případě pokusy s počátečními koncentracemi peptidů a proteinů 3, 5 a 8  $mg.l^{-1}$  DOC, tj. poměr COM a Fe  $\sim 0,43, 0,71$  a 1,14 (viz obr. 10), kde dochází k obsazení prakticky celého povrchu částic hydratovaných oxidů železa COM peptidy a proteiny (obr. 15). Dochází tak ke zvýšení záporného náboje na povrchu částic hydratovaných oxidů železa a následně k elektrostatické repulzi takto stabilizovaných částic (Bernhardt a kol. 1985; Liang a kol., 2007; Li a kol., 2008).



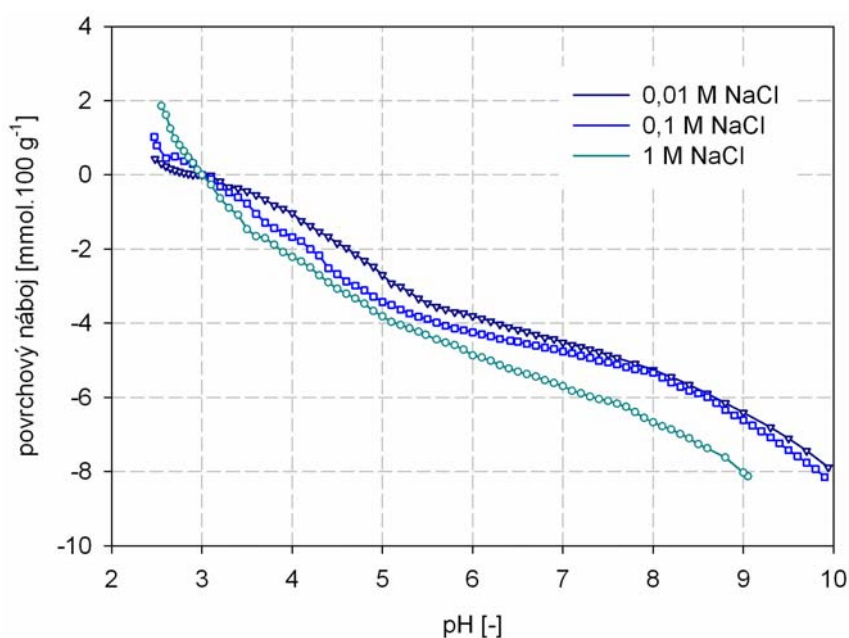
Obr. 15 Inhibice koagulace mechanismem stérické stabilizace při vysokém poměru koncentrací DOC peptidů/proteinů a Fe ( $COM/Fe > 0,33$ )

Při hodnotě  $\text{pH} > 8$  se již železité hydroxopolymery vyskytují také v aniontové formě. Postupně se tak začínají uplatňovat odpuzivé elektrostatické interakce mezi záporně nabitými peptidy a proteiny nesoucími značné množství ionizovaných funkčních skupin a aniontovou formou železitých hydroxopolymerů, tj.  $[\text{Fe}(\text{OH})_4]^-$ . Elektrostatické repulze vedou k postupnému snížení účinnosti a následně úplnému zastavení koagulace.

#### 4.4. Koagulace kaolínové suspenze

##### 4.4.1. Měření povrchového náboje kaolínu

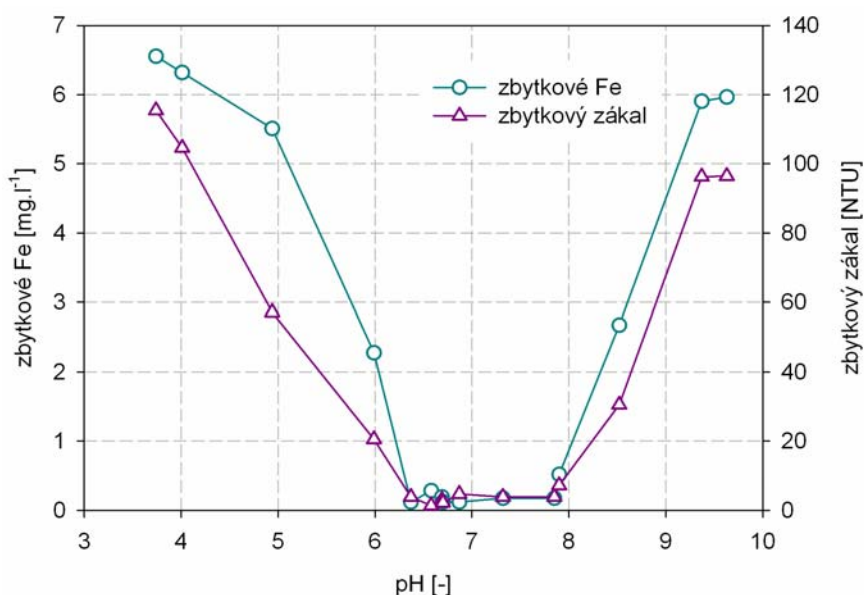
Povrchový náboj kaolínové suspenze (částice o velikosti  $< 4 \mu\text{m}$ ) byl stanoven potenciometrickou titrací HCl. Nulový bod náboje ( $\text{pH}_{\text{NBN}}$ ) kaolínových částic byl určen z průniku titračních křivek při iontových silách roztoku 0,01; 0,1 a 1 M. Hodnota  $\text{pH}_{\text{NBN}}$  byla dosažena při  $\text{pH} 2,99$ , viz obr. 16. Při  $\text{pH}$  vyšším než 2,99 převažují záporně nabitá místa na povrchu kaolínu a celkový náboj kaolínové částice je negativní. V literatuře je obvykle uváděna hodnota  $\text{pH}_{\text{NBN}}$  v rozmezí 2-6 (Coles a Yong, 2002; Dohnalová a kol., 2008; Teh a kol., 2009). Tyto rozdíly jsou přisuzovány rozdílnému chemickému složení jednotlivých vzorků kaolínu (Dohnalová a kol., 2008).



Obr. 16 Povrchový náboj kaolínu v závislosti na pH (iontová síla roztoku 0,01; 0,1 a 1 M)

#### 4.4.2. Vliv pH na koagulaci kaolínové suspenze

Pro srovnatelnost výsledků byla optimální dávka železa pro koagulaci COM peptidů a proteinů, tj.  $7 \text{ mg.l}^{-1}$ , použita i při koagulačních testech zaměřených na popis vlivu hodnoty pH na koagulaci kaolínové suspenze. Vzorkům surové vody (demineralizovaná voda s KNK upravenou na hodnotu  $1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$  + kaolínové částice - frakce  $< 4 \mu\text{m}$ ) byla upravena hodnota pH pomocí předem stanoveného množství  $0,1 \text{ M HCl}$  a  $\text{NaOH}$  tak, aby se pH koagulované suspenze po přidavku koagulantu pohybovalo v rozsahu přibližně pH 3 až 10. Výsledky takto provedených koagulačních testů (obr. 17) prokázaly, že nejnižší zbytkové koncentrace kaolínu (měřené jako zákal) byly dosaženy v rozmezí pH cca 6,5 až 8. Z výsledků je dále patrné, že při  $\text{pH} < 6,5$  a zároveň  $> 8$  zbytkové koncentrace Fe i hodnoty zákalu prudce narůstají a koagulace kaolínu prakticky neprobíhá.



Obr. 17 Závislost hodnot zbytkového zákalu a Fe na hodnotě pH

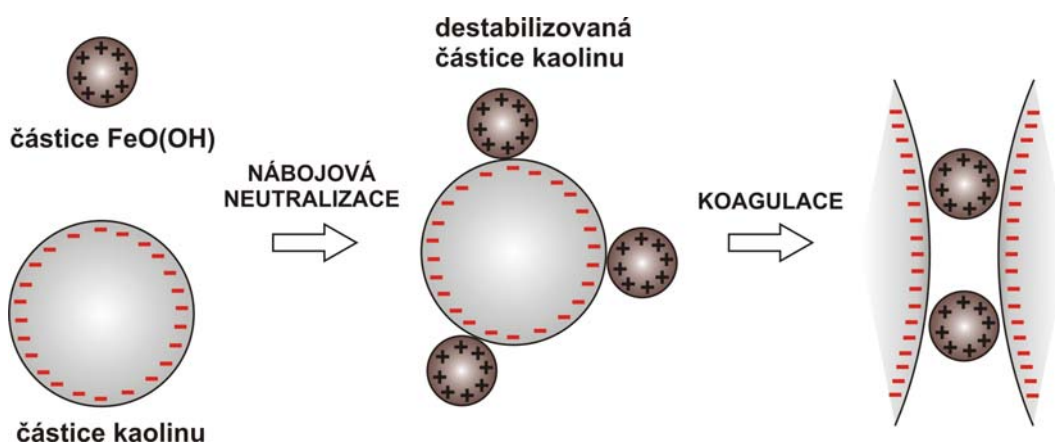
#### 4.4.3. Mechanismy koagulace kaolínové suspenze

Základními mechanismy koagulace kaolínových částic jsou nábojová neutralizace a/nebo adsorpce (Black a kol., 1966; Bache a Gregory, 2007). Jejich účinnost je pak úzce vázána nejen na hodnotu povrchového náboje kaolínových částic, ale také na charakter a hodnotu náboje produktů hydrolýzy použitého koagulačního činidla. Vedle nábojové neutralizace se při použití indiferentního elektrolytu, např.  $\text{NaCl}$ , může uplatňovat koagulace mechanismem potlačení elektrické dvojvrstvy (Black a Chen, 1965, 1967). Tento mechanismus však v případě úpravy vody při použití

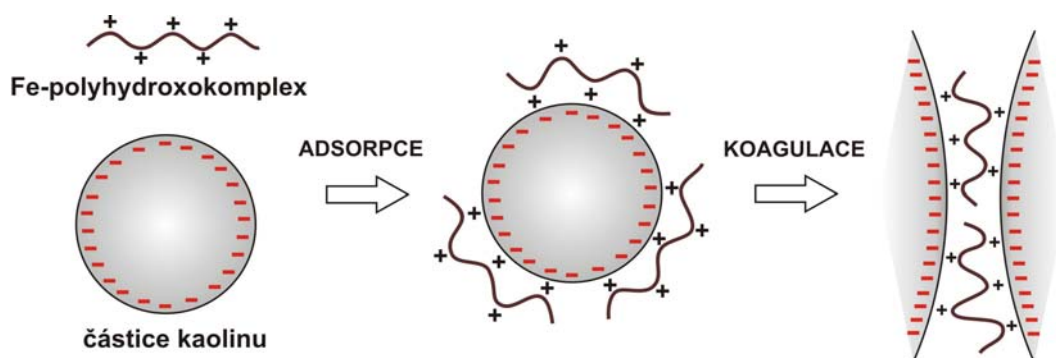


hydrolyzujících koagulačních činidel prakticky nepřichází v úvahu a účinnost koagulace kaolínových částic potlačením elektrické dvojvrstvy tak při běžných hodnotách pH bývá velmi nízká (Pivokonský a kol., 2011).

V našem případě dochází k nejvyšší účinnosti koagulace kaolínové suspenze v rozmezí pH 6,5 až 8 (obr. 17). Při těchto reakčních podmínkách dochází k elektrostatickým interakcím mezi záporně nabitými kaolínovými částicemi a kladně nabitými hydratovanými oxidy železa. Tyto přitažlivé interakce vedou k postupné neutralizaci povrchového náboje kaolínu a následně tak umožňují vznik „nenabitých“ mikroagregátů (obr. 18). Tato postupná neutralizace povrchového náboje je pravděpodobně hlavním mechanismem koagulace kaolínových částic. Nicméně v oblasti pH výskytu polyhydroxokomplexů železa (pH cca do 6,5) může mít pro koagulaci kaolínové suspenze určitý význam také jejich adsorpce na povrchu koloidních kaolínových částic (obr. 19). Adsorpce polymerních Fe-hydroxokomplexů je vysvětlována rovněž přitažlivými elektrostatickými interakcemi a dále např. mechanismem výměnných reakcí, vznikem vodíkových vazeb či tvorbou komplexních látek (Pivokonský a kol., 2011). Přitažlivé elektrostatické interakce mezi hydroxokomplexy a hydratovanými oxidy železa na jedné straně a povrchem kaolínových částic na straně druhé mohou při nadbytku železa vést až k postupné změně celkového povrchového náboje kaolínu (obr. 20). Zvýšení kladného náboje na povrchu kaolínu a následná elektrostatická repulze takto stabilizovaných částic má za následek zpětnou stabilizaci kaolínové suspenze a inhibici koagulace (Black a kol., 1966; Bache a Gregory, 2007).

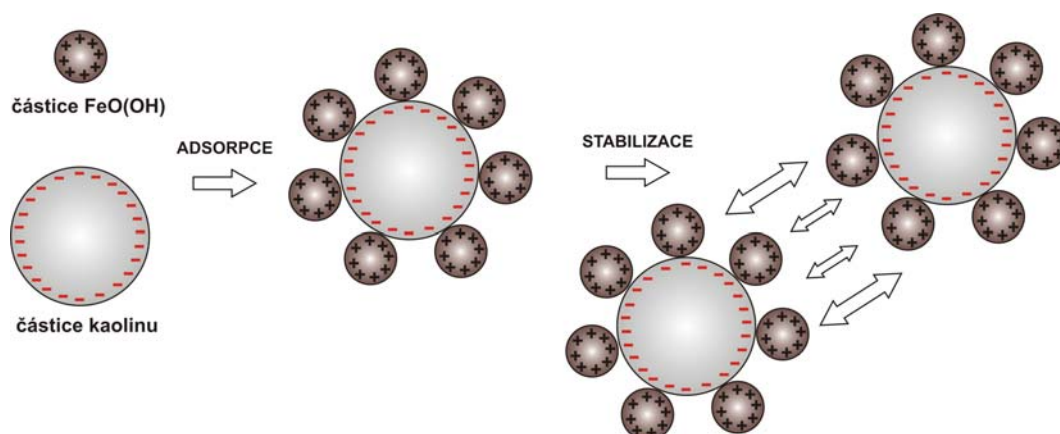


Obr. 18 Tvorba mikroagregátů mechanismem nábojové neutralizace kaolínové částice hydratovanými oxidy železa



Obr. 19 Koagulace mechanismem adsorpce Fe-polyhydroxokomplexů na povrchu kaolínových částic

Při hodnotě  $\text{pH} > 8$  se postupně začínají železité hydroxopolymery vyskytovat v aniontové formě a dochází tak ke vzájemným elektrostatickým repulzím mezi záporně nabitými kaolínovými částicemi a záporně nabitými  $[\text{Fe}(\text{OH})_4]^-$  ionty. Tyto odpudivé interakce následně vedou ke snížení účinnosti a následně úplnému zastavení koagulace.



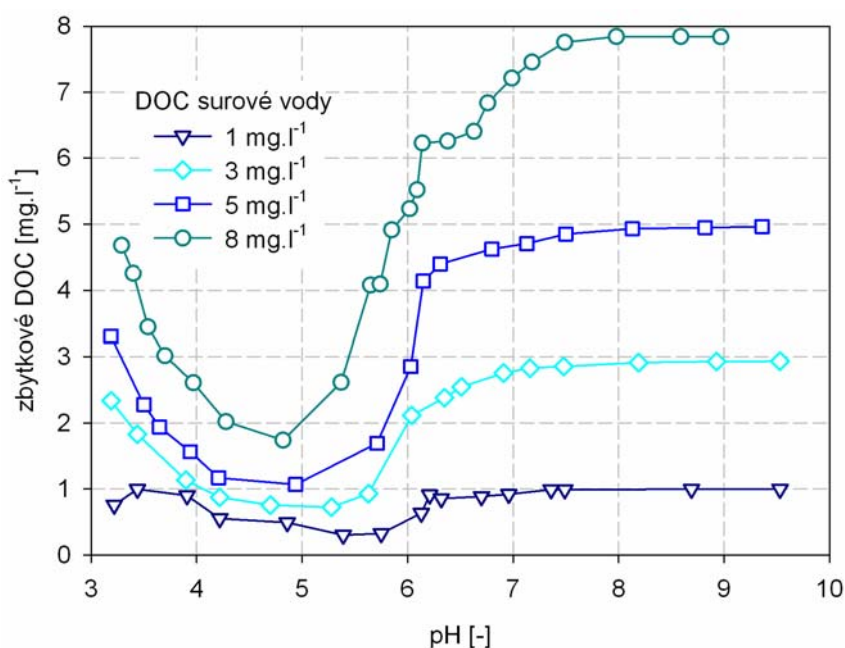
Obr. 20 Inhibice koagulace mechanismem stérické stabilizace kaolínů

#### 4.5. Koagulace COM peptidů/proteinů a kaolínové suspenze

##### 4.5.1. Vliv pH na koagulaci COM peptidů/proteinů a kaolínové suspenze

Pro hodnocení vlivu pH na koagulaci kaolínové suspenze v přítomnosti COM peptidů a proteinů byla obdobně jako při předchozích testech použita dávka železitého koagulačního činidla ( $\text{Fe} = 7 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Vzorkům surové vody (demineralizovaná voda s KNK upravenou na hodnotu  $1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$  + kaolínové částice - frakce  $< 4 \mu\text{m}$  + COM peptidy a proteiny o počáteční koncentraci 1, 3, 5 a  $8 \text{ mg.l}^{-1}$ ) byla upravena hodnota pH pomocí předem stanoveného množství 0,1 M HCl a NaOH tak, aby se pH koagulované suspenze po přidavku koagulantu pohybovalo v rozsahu přibližně pH 3 až 10.

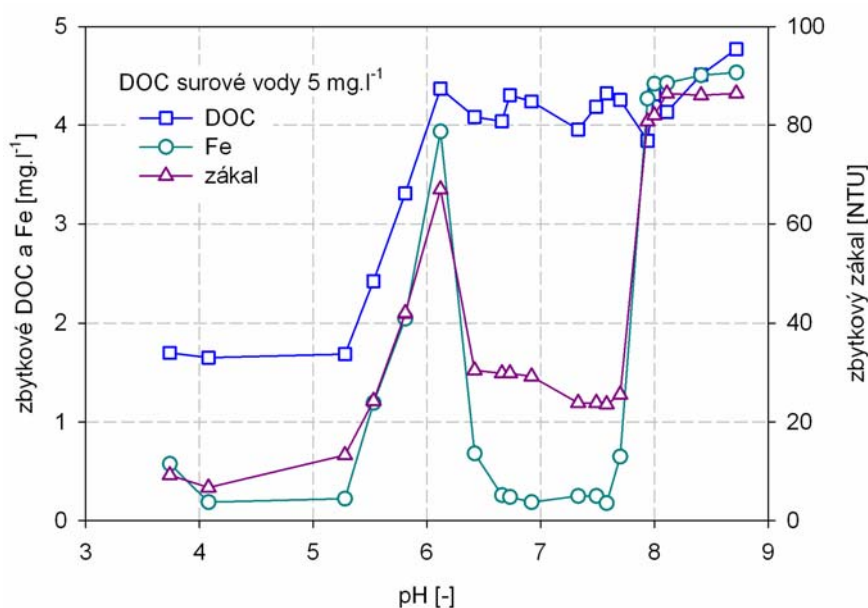
Výsledky provedených koagulačních testů (obr. 21) prokázaly, že nejnižší zbytkové koncentrace DOC byly obdobně jako při pokusech se samotnými peptidy a proteiny dosaženy v rozmezí pH cca 4 až 5,5 pro všechny počáteční koncentrace DOC. S rostoucí hodnotou pH pak dochází k postupnému snížení účinnosti odstranění DOC a při pH > 7 se koagulace COM peptidů a proteinů prakticky zastavuje. Tento průběh odstranění DOC má analogii s koagulačními pokusy prováděnými se samostatnými COM peptidy/proteiny, viz kap. 4.3.2., obr. 9.



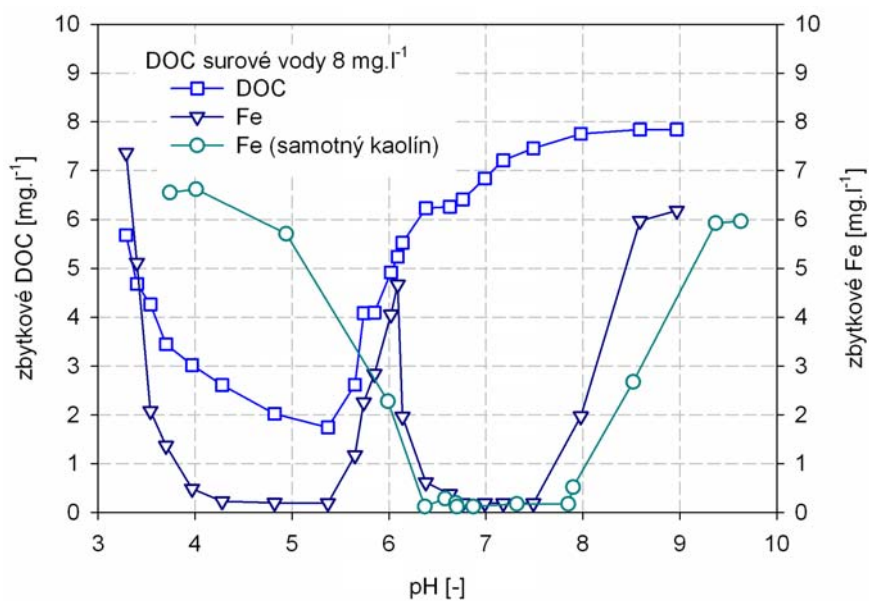
Obr. 21 Závislost zbytkové koncentrace DOC na pH (počáteční DOC COM peptidů/proteinů 1-8 mg.l<sup>-1</sup>)

Z obr. 22 je patrné, že odstranitelnost hydrofobních kaolinových částic je úzce závislá na koagulaci COM peptidů/proteinů. V přítomnosti těchto organických látek dochází k odstranění kaolinových částic (poklesu hodnot zákalu i zbytkových koncentrací Fe) v oblasti pH < 5,5, která se kryje s odstranitelností COM peptidů/proteinů. Při koagulaci samotného kaolínu k jeho odstranění v tomto rozsahu pH nedochází, viz obr. 23. Z výsledků je dále patrné, že cca při pH > 5,5 již naopak dochází k narušení koagulace a k prudkému nárůstu zbytkových koncentrací DOC, hodnot zákalu i Fe. Maximálních hodnot zbytkových koncentrací sledovaných ukazatelů je pak dosahováno při pH okolo 6. Míra narušení koagulace při pH okolo 6 je pak závislá na počáteční koncentraci COM peptidů a proteinů. S růstem počáteční koncentrace DOC v surové vodě dochází ke zvyšování zbytkových hodnot jak zákalu

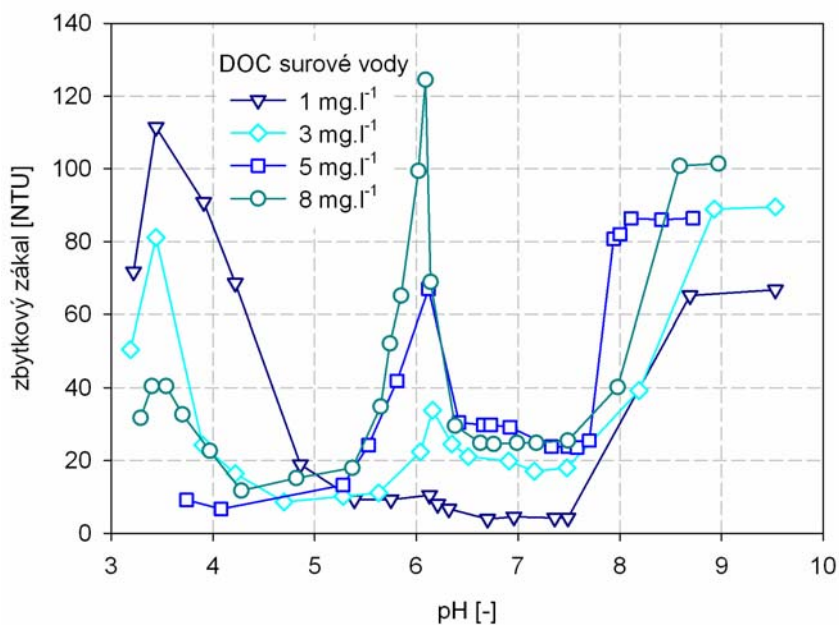
(obr. 24), tak i zbytkových koncentrací Fe (obr. 25). Obdobně jako v případě testů se samotnými COM peptidy/proteiny, viz kap. 4.3.2., je i v tomto případě koagulace narušena tvorbou povrchových Fe-peptidových/proteinových komplexů (mechanismus je popsán v kap. 4.2.2.). Při dalším růstu pH nad hodnoty cca 6,5 je patrný opětovný výrazný pokles zbytkových hodnot zákalu a koncentrací Fe. Naopak zbytkové koncentrace DOC se již v oblasti pH > 6 prakticky nemění a zůstávají přibližně na hodnotách odpovídajících oblasti tvorby Fe-peptidových/proteinových komplexů. Ze srovnání křivek popisujících zbytkové koncentrace Fe, DOC a zbytkové hodnoty zákalu je patrné, že COM peptidy/proteiny se v oblasti pH cca 6,5 až 7,5 koagulace prakticky neúčastní a nemají tak žádný vliv na odstranění kaolínových částic. V této oblasti dochází pouze k odstranění zákalu (COM peptidy/proteiny se neodstraňují vůbec) a to mechanismem popsaným v kapitole 4.4.3.. S pH rostoucím nad hodnotou cca 7,5 opět zbytkové koncentrace Fe i zákal narůstají a koagulace se zastavuje.



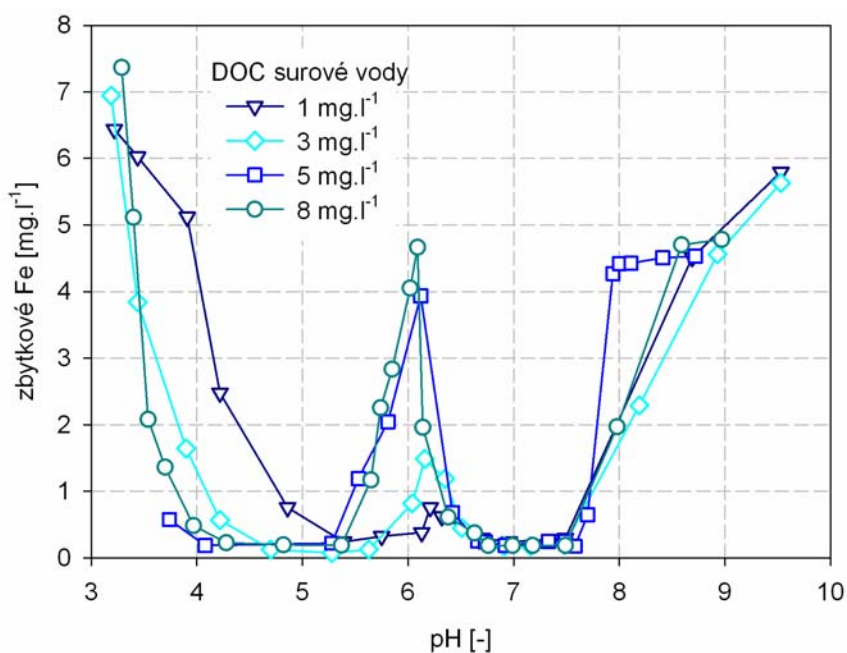
Obr. 22 Závislost zbytkové koncentrace DOC, Fe a kaolínu (hodnota zákalu) na hodnotě pH (počáteční DOC COM peptidů/proteinů 5 mg.l<sup>-1</sup>)



Obr. 23 Závislost zbytkové koncentrace DOC a Fe při koagulaci kaolínu v přítomnosti COM peptidů/proteinů (DOC 8 mg.l<sup>-1</sup>) a závislost zbytkové koncentrace Fe při koagulaci samotného kaolínu na hodnotě pH



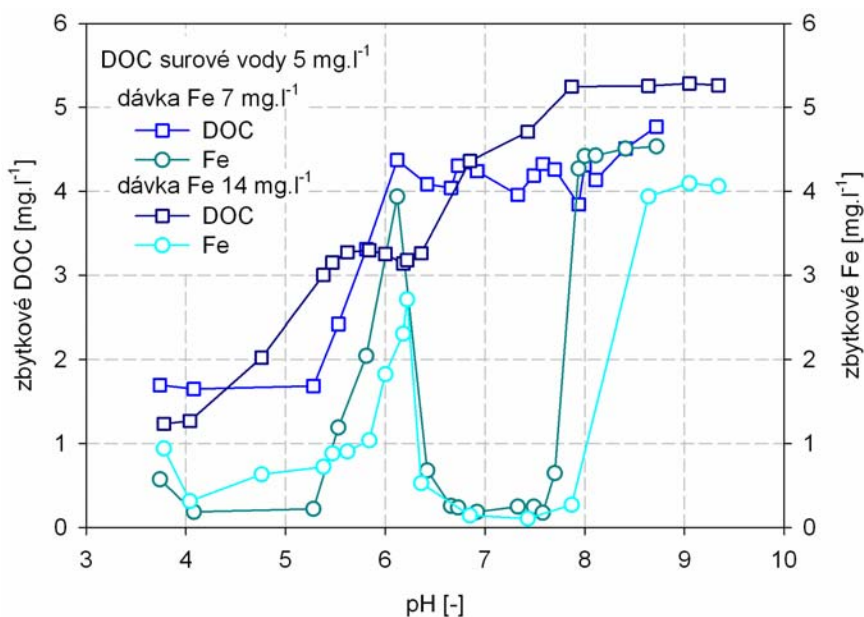
Obr. 24 Závislost hodnot zbytkového zákalu na pH (počáteční DOC COM peptidů/proteinů 1-8 mg.l<sup>-1</sup>)



Obr. 25 Závislost zbytkové koncentrace Fe na pH (počáteční DOC COM peptidů/proteinů 1-8 mg.l<sup>-1</sup>)

Pro ověření vlivu dávky koagulačního činidla byly provedeny i testy s dávkou Fe 14 mg.l<sup>-1</sup>. Surová voda byla tvořena demineralizovanou vodou s KNK upravenou na hodnotu 1,5 mmol.l<sup>-1</sup>, kaolínovými částicemi (frakce < 4 μm) a COM peptidy/proteiny o koncentraci 5 mg.l<sup>-1</sup> DOC. Srovnání vlivu dávek na odstranění COM peptidů/proteinů a zákalu je patrné z obr. 26. Je zřejmé, že zvýšení původní dávky na hodnotu 14 mg.l<sup>-1</sup> nevede k nárůstu účinnosti odstranění peptidů/proteinů. Vyšší dávka koagulantu způsobuje pouze částečné rozšíření optimální oblasti pH pro odstranění zbytkového Fe ze zhruba 6,5-7,5 při dávce koagulantu 7 mg.l<sup>-1</sup> na 6-8. Tento jev je způsoben změnou počáteční koncentrace iontů OH<sup>-</sup> a Fe<sup>3+</sup> (Stumm a Morgan, 1996). Zvýšení dávky koagulačního činidla rovněž vedlo k částečnému snížení narušení koagulace při pH okolo 6. Dávka Fe 14 mg.l<sup>-1</sup> již umožnila částečnou koagulaci vzniklých Fe-peptidových/proteinových komplexů.





Obr. 26 Závislost zbytkové koncentrace DOC a Fe na hodnotě pH a dávce koagulačního činidla

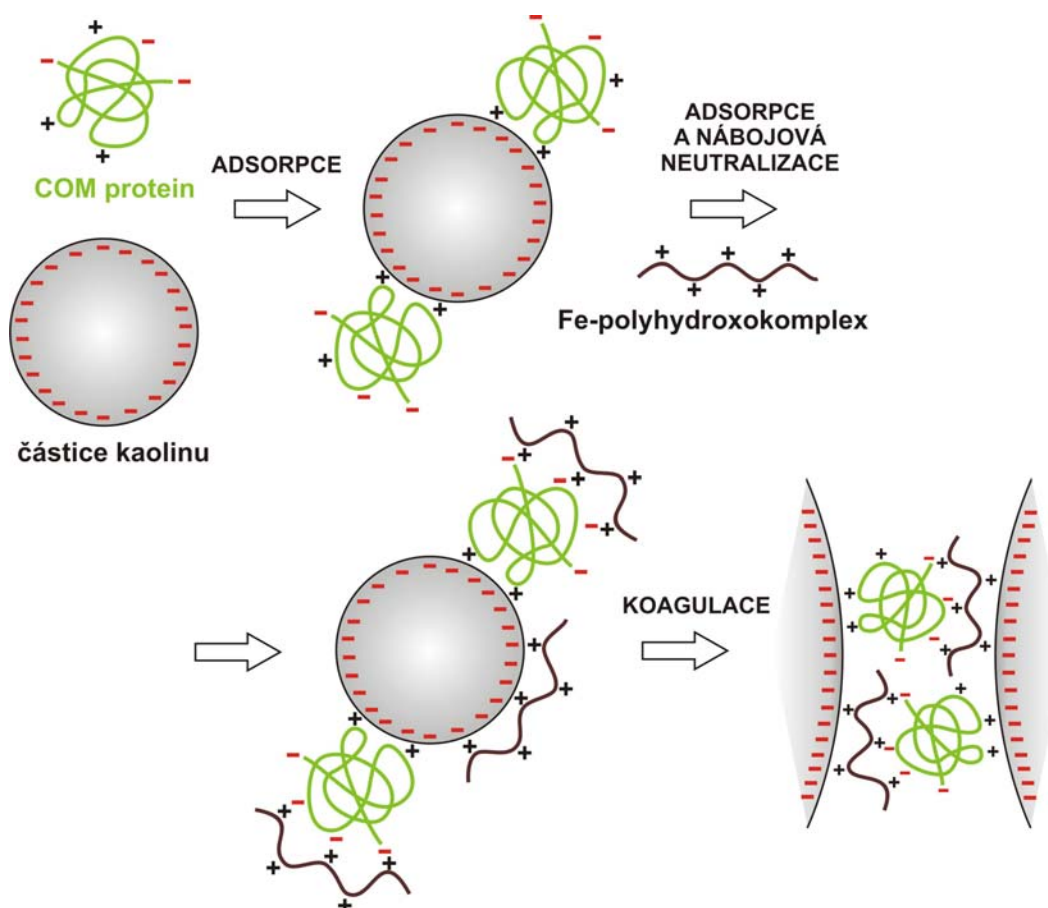
#### 4.5.2. Mechanismy koagulace COM peptidů/proteinů a kaolínové suspenze

Z výsledků popsaných v předchozí kapitole 4.5.1. je patrné, že dominantním mechanismem koagulace je adsorpce a nábojová neutralizace. Tento mechanismus se projevuje především v oblasti účinné koagulace všech složek systému, tj. při  $\text{pH} < 5,5$ . Za těchto reakčních podmínek dochází nejen k elektrostatickým interakcím mezi kladně nabitými železitými hydroxopolymery a záporně nabitými kyselými funkčními skupinami COM peptidů/proteinů, ale také k elektrostatickým interakcím mezi kladně nabitými funkčními skupinami ( $-\text{NH}_3^+$ ) těchto látek a záporně nabitými částicemi kaolínu (Gregory, 2006; Pivokonský a kol., 2011). Vedle těchto elektrostatických interakcí může docházet, a to i v případě interakcí stejně nabitých povrchů, k chemisorpci polymerních COM peptidů a proteinů na povrchu kaolínové částice mechanismem tzv. chemical bringing modelu (LaMer a Healy, 1963; Adamson a Gast, 1997; Birdi, 2003). Význam chemisorpce při interakci kaolínových částic s COM peptidy/proteiny není možné zcela kvantifikovat, je však pravděpodobné, že její vliv nebude nijak zásadní. Důvodem je skutečnost, že v oblasti  $\text{pH} > 6$ , kdy na povrchu peptidů a proteinů převažuje záporný náboj a kaolínové částice jsou také záporně nabitě, k jejich interakcím nedochází (COM peptidy a proteiny se v této oblasti pH nekoagulují), viz níže. V případě shodně nabitých kaolínových částic i COM peptidů/proteinů se tedy s velkou pravděpodobností neuplatňuje ani sdílení

elektronových párů (kovalentní vazba) ani tvorba vodíkových můstků. Hlavním mechanismem tak opět zůstávají přitažlivé elektrostatické interakce, které vedou k postupné neutralizaci povrchového náboje kaolínových částic i peptidových a proteinových řetězců a následně umožňují vznik nenabitých mikroagregátů. Vzájemných interakcí mezi částicemi přítomnými v systému může být celá řada. Částice kaolínu mohou interagovat, pomineme-li jejich vzájemné působení, jak s částicemi železa tak i s polymerními peptidy a proteiny. Obdobně i interakce COM peptidů/proteinů mohou směřovat nejen k Fe-hydroxopolymerům, ale také k částicím kaolínu. Na základě těchto skutečností je vysoce pravděpodobné, že v oblasti  $\text{pH} < 5,5$  bude hrát, obdobně jako při interakcích COM peptidů a proteinů s hydratovanými oxidy železa (kap. 4.3.3.), významnou roli mechanismus patch modelu (Gregory, 2006), kdy se kladně nabitě funkční skupiny na povrchu peptidů a proteinů poutají k záporně nabitým částicím kaolínu. Takto na povrchu kaolínových částic vázané peptidy a proteiny zároveň mohou interagovat svými záporně nabitými funkčními skupinami s kladně nabitými Fe-hydroxopolymerem. Postupně tak vznikají konglomeráty kaolínových částic s peptidy/proteiny a Fe-hydroxopolymerem. Při vzájemné srážce těchto konglomerátů dochází současně k upevnění opačně nabitých ploch na povrchu jiných obdobně formovaných částic (obr. 27). Přestože tento model koagulace plně popisuje koagulaci kaolínových částic i COM peptidů/proteinů pomocí hydrolyzujících koagulačních činidel, je třeba zmínit i některé další mechanismy, které na koagulaci v této oblasti  $\text{pH}$  mohou mít vliv. Jedná se především o polymer bridging způsobený stericými interakcemi (Gregory, 2006; Pivokonský a kol., 2011).

Při  $\text{pH}$  okolo 6 dochází k přednostní tvorbě Fe-peptidových/proteinových komplexů mezi rozpuštěným či mikrokoloidním Fe a  $-\text{COO}^-$  funkčními skupinami na povrchu peptidů a proteinů, viz kap. 4.2.2.. Fe ionty jsou tak vázány v organické hmotě a neúčastní se koagulačních procesů a i interakce mezi peptidy a proteiny na jedné straně a kaolínovými částicemi na straně druhé je vzhledem ke klesajícímu množství kladně nabitých funkčních skupin málo pravděpodobná (Bernhardt a kol., 1985; Pivokonský a kol., 2006, 2012; Takaara a kol., 2007).





Obr. 27 Koagulace adsorpcí COM peptidů/proteinů na povrchu kaolínových částic a nábojovou neutralizací Fe-hydroxopolymerů

Při pH mezi 6 a 8 je kaolín koagulován síranem železitým mechanismem nábojové neutralizace, viz kap. 4.4.3., a proteiny se již koagulace neúčastní. Důvodem absence proteinů v této oblasti koagulace jsou pravděpodobně již známé elektrostatické repulze mezi záporně nabitými kaolínovými částicemi a  $-\text{COO}^-$  skupinami, které v této oblasti pH značně dominují nad skupinami kladně nabitými. S dalším růstem pH nad hodnotu 8 dochází i k repulzním interakcím mezi kaolínovými částicemi a aniontovou formou železitých hydroxopolymerů, tj.  $[\text{Fe}(\text{OH})_4]^-$ , která je v této oblasti pH dominantní formou výskytu Fe, viz kap. 4.4.3..

## 5. Závěr

Bylo prokázáno, že některé peptidy a proteiny produkované sinicí *Microcystis aeruginosa* mají schopnost tvorby rozpustných povrchových komplexů se železem používaným jako koagulační činidlo. Jako komplexotvorné byly izolovány peptidy a proteiny s MW 1; 2,8; 6; 8; 8,5; 10 a 52 kDa. Dále bylo prokázáno, že míra tvorby Fe-peptidových/proteinových komplexů úzce souvisí s hodnotou disociační konstanty karboxylové skupiny vázané na povrchu COM peptidů a proteinů, respektive s hodnotou pH. Hodnota pH ovlivňuje nejen disociaci  $-\text{COOH}$  skupiny, ale má také zásadní vliv na formy výskytu  $\text{Fe}^{3+}$  iontů. Maximální vazebná kapacita peptidů/proteinů ( $\text{BC} > 1,2 \text{ mmol.g}^{-1}$ ) byla zjištěna v oblasti pH 6-7, kdy jsou umožněny elektrostatické interakce vedoucí ke vzniku koordinační vazby mezi disociovanými karboxylovými skupinami na povrchu řetězců peptidů a proteinů a pozitivně nabitými povrchovými skupinami železitých hydroxopolymerů a hydratovaných oxidů železa.

Dále bylo prokázáno, že se změnami nábojových charakteristik COM peptidů/proteinů a Fe-hydroxopolymerů a hydratovaných oxidů se v závislosti na pH mění i vzájemné mechanismy interakcí mezi těmito látkami. Při hodnotě  $\text{pH} < 4$ , kdy peptidy/proteiny i produkty hydrolýzy železa nesou kladný náboj, v důsledku elektrostatických repulzí koagulace prakticky neprobíhá. Naopak nejvyšší účinnosti koagulace je dosahováno při pH v rozmezí 4 až 6, kdy peptidy/proteiny nesou již dostatečné množství disociovaných karboxylových skupin ( $-\text{COO}^-$ ) a Fe-hydroxopolymery mají značný kladný náboj. V oblasti slabě kyselého pH (oblast pH 6-7) je průběh koagulace značně ovlivněn tvorbou Fe-peptidových/proteinových komplexů. Tyto komplexní sloučeniny vznikají již v oblasti pH cca 6-8, kde je dominantním mechanismem koagulace adsorpce. Účinnost koagulace adsorpce je úzce závislá na poměru koncentrací peptidových/proteinových COM/Fe. Při nízkém poměru, kdy je účinnost koagulace vysoká, dochází k tvorbě mezičásticových můstků popisovaných mechanismem elektrostatického patch modelu. Naopak při vysokém poměru COM/Fe může silná adsorpce COM na celém povrchu částic hydratovaných oxidů Fe vést k jejich stérické stabilizaci a inhibici koagulace. Při  $\text{pH} > 8$ , kdy nesou peptidy/proteiny již vysoký záporný náboj a formy železa postupně přechází do aniontové podoby, probíhají mezi těmito částicemi elektrostatické repulze a koagulace se zastavuje.

Obdobně i vzájemné interakce COM peptidů/proteinů, kaolínových částic a produktů hydrolýzy železa jsou, v závislosti na hodnotě pH, ovlivněny především

nábojovými poměry. Bylo zjištěno, že při pH v rozmezí 4-5,5 peptidy/proteiny přispívají ke koagulaci kaolínových částic mechanismem nábojové neutralizace a adsorpce. Při pH 6,5-7,5 se již peptidy/proteiny koagulace neúčastní a kaolín je odstraněn mechanismem adsorpce na hydratovaných oxidech Fe.

Při optimálních reakčních podmínkách (pH 5) jsou koagulací zcela odstraněny pouze vysokomolekulární peptidy a proteiny (MW > 10 kDa). K odstranění nízkomolekulárních peptidů/proteinů nedochází. Při pH v oblasti nízké účinnosti koagulace (pH 8) nebyly odstraněny téměř žádné peptidy a proteiny. Při hodnotě pH nejvyšší vazebné kapacity Fe peptidů/proteinů (pH = 6,2) byly po koagulaci identifikovány téměř stejné peptidy/proteiny jako při izolaci komplexotvorných peptidů/proteinů afinitní chromatografií (MW 1; 2,8; 6; 8; 8,5; 10 a 52 kDa). Tato skutečnost potvrzuje hypotézu, že v této oblasti je dominantním mechanismem inhibice koagulace vznik Fe-peptidových/proteinových komplexů.

## 6. Praktický význam výsledků práce

Z výsledků práce plyne, že odstranitelnost COM peptidů/proteinů je úzce závislá na hodnotě pH. V úpravárenské praxi je koagulace běžně prováděna při hodnotě pH okolo 7 (hodnoty se mohou částečně lišit v závislosti na použitém koagulačním činidle a charakteru surové vody). Neutrální oblast pH (pH 6,5-7,5) je obvykle vhodná pro úpravu zakalených vod (Hall a Packham, 1965), což dokazují i výsledky uvedené v kap. 4.4.2.. Pro odstraňování přírodních organických látek je již obvykle výhodné, opět v závislosti na jejich charakteru a použitém koagulačním činidle, snížit pH do oblasti okolo 6. Z výsledků této práce je patrné, že peptidová/proteinová složka COM má maximální účinnost odstranění dokonce při pH v rozsahu 4-6 (viz kap. 4.3.2.). Toto zjištění odpovídá poznatkům i dalších prací, podle kterých jsou rozpuštěné organické látky nejučinněji odstranitelné při pH v rozsahu 5-6,5 (někdy dokonce i < 5) (Edzwald a kol., 1982; Edwards a Amirtharajah, 1985; Gregor a kol., 1997; Duan a Gregory, 2003; Pivokonská a Pivokonský, 2007; Pivokonská a kol., 2008; Pivokonský a kol., 2008, 2009a, b, 2012). Skutečností je, že v této oblasti pH se obvykle v praxi úprava pitné vody spíše neprovádí. Důvodem jsou především obavy o zvýšení zbytkových koncentrací hliníku ale i železa v upravené vodě, a to především při odstraňování huminových látek mechanismem neutralizace jejich povrchového náboje. V případě výskytu produktů sinic a řas je však výrazné snížení pH do oblasti pod 6 nezbytným předpokladem jejich účinného odstranění. Z tohoto důvodu je výhodné k odstraňování peptidových/proteinových COM použít železitá koagulační činidla, která poskytují dostatek kladného náboje nutného k elektrostatickým interakcím s  $-\text{COO}^-$  skupinami i v oblasti pH okolo 4-5 (Pivokonský a kol., 2009a, b). Při pH 6-8 se začíná uplatňovat mechanismus elektrostatického patch modelu, který je účinný pouze při malém poměru DOC COM peptidů/proteinů a Fe ( $\text{COM/Fe} < 0,33$ ). Při poměru  $\text{COM/Fe} > 0,33$  naopak dochází k inhibici koagulačních procesů mechanismem stérické stabilizace (viz kap. 4.3.3.). Nízká účinnost koagulace v oblasti pH 6-7 je dále zapříčiněna tvorbou Fe-peptidových/proteinových komplexů (viz kap. 4.2.2., 4.5.1. a 4.5.2.), které váží značnou část železa obsaženého v hydrolytických produktech koagulačního činidla. Takto vázané železo se nemůže efektivně zúčastnit koagulace. Naopak v oblasti maximální účinnosti koagulace peptidových/proteinových COM (pH okolo 5) k tvorbě těchto komplexů prakticky nedochází.

Dalším možným problémem úpravy vody s obsahem peptidových/proteinových COM může být skutečnost, že na tyto látky není optimalizována dávka koagulačního

čínidla. Ta je velmi často optimalizována na zákal a nebo na koncentraci organických látek vyskytujících se ve vodě v průběhu celého roku (humínové látky). Sinicové COM jsou ale v našich klimatických podmínkách obvykle sezónní záležitostí a jsou tak velice často při optimalizacích koagulačních procesů opomíjeny, a to i přesto, že v době rozvoje vodního květu mohou tvořit dominantní podíl organických látek obsažených v surové vodě (Pivokonský a kol., 2011). V případě výskytu sinicových COM není hlavním problémem ani tak nárůst koncentrace organických látek (ten ostatně ani vzrůst nemusí, protože právě v letních měsících bývají naopak koncentrace huminových látek na relativně nízké úrovni), ale zásadní je především změna jejich charakteru (molekulová hmotnost, nábojové poměry atd.). Tato změna pak obvykle vede k problémům diskutovaným v úvodních kapitolách této práce. Dochází k nárůstu zbytkových koncentrací DOC, Al/Fe, snížení účinnosti filtrace, nárůstu DBPs atd. Řešení této situace je možné, viz kap. 4.3.2. a 4.5.1., pouze změnou reakčního pH do oblasti 4-6, kde se začne uplatňovat mechanismus nábojové neutralizace COM peptidů/proteinů Fe-polyhydroxokomplexy. V této oblasti pH navíc dochází v přítomnosti peptidových/proteinových COM i k velmi účinnému odstranění zákalu i zbytkového železa, jak bylo prezentováno v kap. 4.5.1., a upravená voda tak dosahuje vysoké kvality.

Závěrem je, bohužel, nutné konstatovat, že v praxi jsou problémy s výskytem sinicových COM velmi často řešeny prostým zvýšením dávky koagulačního činidla, což však samo o sobě je krok naprosto nedostačující a bez zásadní změny reakčních podmínek vyplývající z charakteru sinicových COM (ostatně to platí pro všechny organické látky) nemá opodstatnění.

## 7. Seznam použitých zkratek a symbolů

$\sigma_0$  – relativní povrchový náboj ( $\text{mmol.g}^{-1}$ )

AC (Activated Carbon) – aktivní uhlí

AOM (Algal Organic Matter) – organické látky produkované fytoplanktonem

BC (Binding Capacity) – vazebná kapacita

$c_1$  – množství Fe po filtraci 0,22  $\mu\text{m}$  membránovým filtrem ( $\text{mmol.l}^{-1}$ )

$c_2$  – množství Fe po ultrafiltraci ultrafiltrační membránou Plac 1000 Da ( $\text{mmol.l}^{-1}$ )

COM (Cellular Organic Matter) – celulární organické látky

DAD (Diode Array Detector) – detektor s diodovým polem

DAF (Dissolved Air Flotation) – flotace rozpuštěným vzduchem

DBPs (Disinfection By-Products) – vedlejší produkty desinfekce vody

DCAA (Dichloroacetic Acid) – kyselina dichloroctová ( $\text{CHCl}_2\text{COOH}$ )

DCAN (Dichloroacetonitrile) – dichloroacetonitril

DOC (Dissolved Organic Carbon) – rozpuštěný organický uhlík

$\text{DOC}_{\text{NP}}$  – rozpuštěný organický uhlík neproteinových látek

$\text{DOC}_{\text{P}}$  – rozpuštěný organický uhlík proteinových látek

$\text{DOC}_{\text{T}}$  – celkový rozpuštěný organický uhlík

EOM (Extracellular Organic Matter) – extracelulární organické látky

$\bar{G}$  – střední gradient rychlosti ( $\text{s}^{-1}$ )

GAC (Granular Activated Carbon) – granulované aktivní uhlí

GSM – geosmin (trans-1,10-dimetyl-trans-9-decalol)

HAAs (Haloacetic Acids) – halogenderiváty kyseliny octové

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

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

IC (Inorganic Carbon) – anorganický uhlík

IEF (Isoelectric Focusing) – izoelektrická fokusace

IOM (Intracellular Organic Matter) – intracelulární organické látky

KNK – kyselinová neutralizační kapacita

$\text{KNK}_{4,5}$  – celková kyselinová neutralizační kapacita

$m$  – navážka kaolínu (g)

MCAA (Monochloroacetic Acid) – kyselina chloroctová ( $\text{CH}_2\text{ClCOOH}$ )

MC-LR – microcystin-LR (L – leucin, R – arginin)

MIB – 2-metylisoborneol

MW (Molecular Weight) – molekulová hmotnost

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

$n$  – rozdíl křivky slepé titrace a titrace kaolínové suspenze (mmol)

NDMA (Nitrosodimethylamin) – nitrosodimethylamin

NOM (Natural Organic Matter) – přírodní organické látky

PAC (Powdered Activated Carbon) – práškové aktivní uhlí

PACl – polyaluminiumchlorid

$pH_{NBN}$  – pH nulového bodu náboje

$pI$  (Isoelectric Points) – izoelektrické body

$pK_a$  – kyselinová disociační konstanta

$Re$  – Reynoldsovo číslo

RNA (Ribonucleic Acid) – ribonukleová kyselina

SOM (Surface-bonded/Surface-retained Organic Matter) – organické látky vázané na povrchu buněk

T&O (Taste and Odor Compounds) – sloučeniny způsobující nepříjemný zápach a negativně ovlivňující chuťové vlastnosti vody

$t$  – čas (min)

TC (Total Carbon) – celkový uhlík

TCAA (Trichloroacetic Acid) – kyselina trichloroctová ( $CCl_3COOH$ )

THMs (Trihalogenmethanes) – trihalogenmetany

## 8. Literatura

- Adamson, A.W., Gast, A.P.:** Physical chemistry of surfaces. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997, 784 s.
- Amy, G.L., Sierka, J., Bedessem, D.P., Tan, L. (1992):** Molecular size distribution of dissolved organic matter. *Journal of American Water Works Association* 84 (6), 67-75.
- Asada, Y., Kawamura, S., Ho, K. (1987):** Hydrogenase from the unicellular cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Phytochemistry* 26 (3), 637-640.
- Bache, D.H., Gregory, R.:** Flocks in water treatment. IWA Publishing, London, 2007, 297 s.
- Bernhardt, H., Hoyer, O., Schell, H., Lüsse, B. (1985):** Reaction mechanisms involved in the influence of algogenic organic matter on flocculation. *Zeitschrift für Wasser und Abwasserforschung* 18 (1), 18-30.
- Bernhardt, H., Lüsse, B., Hoyer, O. (1986):** The addition of calcium to reduce the impairment of flocculation by algogenic organic matter. *Zeitschrift für Wasser und Abwasserforschung* 19 (6), 219-228.
- Bernhardt, H., Hoyer, O., Lüsse, B., Schell, H.:** Investigations on the influence of algal-derived organic substances on flocculation and filtration. In: Treatment of drinking water for organic contaminants. proceedings of the second national conference on drinking water (Huck, P.H., Toft, P., Eds.), Pergamon Press, New York, 1987, 383 s.
- Birch, L., Bachofen, R. (1990):** Complexing agents from microorganisms. *Experientia* 46 (8), 827-834.
- Birdi, K.S.:** Handbook of surface and colloid chemistry. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2003, 765 s.
- Bjelopavlic, M., Newcombe, G., Hayes, R. (1999):** Adsorption of NOM onto activated carbon: effect of surface charge, ionic strength, and pore volume distribution. *Journal of Colloid and Interface Science* 210 (2), 271-280.
- Black, A.P., Birkner, F.B., Morgan, J.J. (1966):** The effect of polymer adsorption on the electrokinetic stability of dilute clay suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science* 21 (6), 626-648.
- Black, A.P., Chen, C.J. (1965):** Electrophoretic studies of coagulation and flocculation of river sediment suspensions with aluminium sulfate. *Journal of American Water Works Association* 57 (3), 354-362.
- Black, A.P., Chen, C.J. (1967):** Electrokinetic behavior of aluminium species in dilute dispersed kaolinite systems. *Journal of American Water Works Association* 59 (9), 1173-1183.
- Bláha, L., Maršálek, B. (2003):** Contamination of drinking water in the Czech Republic by microcystins. *Archiv für Hydrobiologie* 158 (3), 421-429.
- Bláha, L., Babica, P., Maršálek, B. (2009):** Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks. *Interdisciplinary Toxicology* 2 (2), 36-41.
- Bláhová, L., Babica, P., Maršalková, E., Maršálek, B., Bláha, L. (2007):** Concentrations and seasonal trends of extracellular microcystins in freshwaters of the Czech Republic – results of the national monitoring program. *Clean – Soil, Air, Water* 35 (4), 348-354.
- Bláhová, L., Babica, P., Adamovský, O., Kohoutek, J., Maršálek, B., Bláha, L. (2008):** Analyses of cyanobacterial toxins (microcystins, cylindrospermopsin) in the reservoirs of the Czech Republic and evaluation of health risks. *Environmental Chemistry Letters* 6 (4), 223-227.
- Bratby, J.:** Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment. IWA Publishing, London, 2006, 407 s.
- Briley, D.S., Knappe, D.R.U. (2002):** Optimizing ferric sulfate coagulation of algae with streaming current measurements. *Journal of American Water Works Association* 94 (2), 80-90.
- Brown, M.R. (1991):** The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 145 (1), 79-99.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A. (1997):** Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151 (1-4), 315-331.



- Burns, N.L., Holmberg, K., Brink, C. (1996):** Influence of surface charge on protein adsorption at an amphoteric surface: Effects of varying acid to base ratio. *Journal of Colloid and Interface Science* 178 (1), 116-122.
- Campinas, M., Rosa, M.J. (2006):** The ionic strength effect on microcystin and natural organic matter surrogate adsorption onto PAC. *Journal of Colloid and Interface Science* 299 (2), 520-529.
- Campinas, M., Rosa, M.J. (2010):** Evaluation of cyanobacterial cells removal and lysis by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* 70 (3), 345-353.
- Chen, C., Zhang, X., Zhu, L., Liu, J., He, W., Han, H. (2008):** Disinfection by-products and their precursors in a water treatment plant in North China: Seasonal changes and fraction analysis. *Science of the Total Environment* 397 (1-3), 140-147.
- Cheng, W.P., Chi, F.H. (2003):** Influence of eutrophication on the coagulation efficiency in reservoir water. *Chemosphere* 53 (7), 773-778.
- Chow, C.W.K., House, J., Velzeboer, R.M.A., Drikas, M., Burch, M.D., Steffensen, D.A. (1998):** The effect of ferric chloride flocculation on cyanobacterial cells. *Water Research* 32 (3), 808-814.
- 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 (15), 3253-3262.
- Chronakis, I.S. (2001):** Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* Strain Pacifica): thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2), 888-898.
- Coles, C.A., Yong, R.N. (2002):** Aspects of kaolinite characterization and retention of Pb and Cd. *Applied Clay Science* 22 (1-2), 39-45.
- Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., Jones, K.M.:** Data for biochemical research. Oxford University Press, New York, 1986, 580 s.
- Dawson, R.M. (1998):** The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36 (7), 953-962.
- Dixon, M.B., Falconet, C., Ho, L., Chow, C.W.K., O'Neill, B.K., Newcombe, G. (2010):** Nanofiltration for the removal of algal metabolites and the effects of fouling. *Water Science and Technology* 61 (5), 1189-1199.
- Dohnalová, Ž., Svoboda, L., Šulcová, P. (2008):** Characterization of kaolin dispersion using acoustic and electroacoustic spectroscopy. *Journal of Mining and Metallurgy* 44 B (1), 63-72.
- Dolejš, P. (1993):** Influence of algae and their exudates on removal of humic substances and optimal dose of coagulant. *Water Science and Technology* 27 (11), 123-132.
- Duan, J., Gregory, J. (2003):** Coagulation by hydrolysing metal salts. *Advances in Colloid and Interface Science* 100-102, 475-502.
- Ebie, K., Li, F., Azuma, Y., Yuasa, A., Hagishita, T. (2001):** Pore distribution effect of activated carbon in adsorbing organic micropollutants from natural water. *Water Research* 35 (1), 167-179.
- Edwards, G.A., Amirtharajah, A. (1985):** Removing colour caused by humic acids. *Journal of American Water Works Association* 77 (3), 50-57.
- Edzwald, J.K., Becker, W.C., Tambini, S.J. (1982):** Aspect of direct filtration in treatment of low turbidity humic acids waters. *Journal of the Environmental Engineering Division – ASCE* 103, 989-1000.
- Fang, J., Yang, X., Ma, J., Shang, C., Zhao, Q. (2010):** Characterization of algal organic matter and formation of DBPs from chlor(am)ination. *Water Research* 44 (20), 5897-5906.
- Fogg, G.E. (1971):** Extracellular products of algae in fresh water. *Archiv für Hydrobiologie – Beiheft Ergebnisse der Limnologie* 5, 1-25.
- Fogg, G.E. (1983):** The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Botanica Marina* 26 (1), 3-14.
- Frimmel, F.H., Immerz, A., Niedermann, H. (1983):** Heavy metal interaction with aquatic humus. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 14 (2), 105-115.
- Furrer, G., Stumm, W. (1983):** The role of surface coordination in the dissolution of  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in dilute acids. *Chimia* 37, 338-341.

- Gijsbertsen-Abrahamse, A.J., Schmidt, W., Chorus, I., Heijman, S.G.J. (2006):** Removal of cyanotoxins by ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science* 276 (1-2), 252-259.
- Gregor, J.E., Fenton, E., Brokenshire, G., Van Den Brink, P., O'Sullivan, B. (1996):** Interactions of calcium and aluminium ions with alginate. *Water Research* 30 (6), 1319-1324.
- Gregor, J.E., Nokes, C.J., Fenton, E. (1997):** Optimising natural organic matter removal from low turbidity waters by controlled pH adjustment of aluminium coagulation. *Water Research* 31 (12), 2949-2958.
- Gregory, J. (1973):** Rates of flocculation of latex particles by cationic polymers. *Journal of Colloid and Interface Science* 42 (2), 448-456.
- Gregory, J.:** Particles in water: Properties and Processes. CRC Press, Boca Raton, London, New York, 2006, 180 s.
- Hall, E.S., Packham, R.F. (1965):** Coagulation of organic color with hydrolysing coagulant. *Journal of American Water Works Association* 57 (9), 1149-1166.
- Harada, K.-I., Mayumi, T., Shimada, T., Fujii, K., Kondo, F., Park, H.-D., Watanabe, M.F. (2001):** Co-production of microcystins and aeruginopeptins by natural cyanobacterial bloom. *Environmental Toxicology* 16 (4), 298-305.
- Harada, K.-I. (2004):** Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 52 (8), 889-899.
- Harada, K.-I., Nakano, T., Fujii, K., Shirai, M. (2004):** Comprehensive analysis system using liquid chromatography-mass spectrometry for the biosynthetic study of peptides produced by cyanobacteria. *Journal of Chromatography A* 1033 (1), 107-113.
- Hellebust, J.A.:** Extracellular products. In: Algal physiology and biochemistry (Stewart, W.D.P., Ed.), University of California Press, Berkeley, 1974, 989 s.
- Henderson, R.K., Parsons, S.A., Jefferson, B. (2008a):** The impact of algal properties and pre-oxidation on solid-liquid separation of algae. *Water Research* 42 (8-9), 1827-1845.
- Henderson, R.K., Baker, A., Parsons, S.A., Jefferson, B. (2008b):** Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. *Water Research* 42 (13), 3435-3445.
- Henderson, R.K., Parsons, S.A., Jefferson, B. (2010):** The impact of differing cell and algogenic organic matter (AOM) characteristics on the coagulation and flotation of algae. *Water Research* 44 (12), 3617-3624.
- Her, N., Amy, G., Park, H.-R., Song, M. (2004):** Characterizing algogenic organic matter (AOM) and evaluating associated NF membrane fouling. *Water Research* 38 (6), 1427-1438.
- Hitzfeld, B.C., Höger, S.J., Dietrich, D.R. (2000):** Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 108 (1), 113-122.
- Hnat'uková, P., Kopecká, I., Pivokonský, M. (2011):** Adsorption of cellular peptides of *Microcystis aeruginosa* and two herbicides onto activated carbon: Effect of surface charge and interactions. *Water Research* 45 (11), 3359-3368.
- Ho, L., Lambling, P., Bustamante, H., Duker, P., Newcombe, G. (2011):** Application of powdered activated carbon for the adsorption of cylindrospermopsin and microcystin toxins from drinking water supplies. *Water Research* 45 (9), 2954-2964.
- Hong, H.C., Mazumder, A., Wong, M.H., Liang, Y. (2008):** Yield of trihalomethanes and haloacetic acids upon chlorinating algal cells, and its prediction via algal cellular biochemical composition. *Water Research* 42 (20), 4941-4948.
- Hong, H.C., Wong, M.H., Liang, Y. (2009):** Amino acids as precursors of trihalomethane and haloacetic acid formation during chlorination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56 (4), 638-645.
- Horáková, M. a kolektiv:** Analytika vody. VŠCHT, Praha, 2003, 335 s.
- Hoyer, O., Lüsse, B., Bernhardt, H. (1985):** Isolation and characterization of extracellular organic matter (EOM) from algae. *Zeitschrift für Wasser und Abwasserforschung* 18 (2), 76-90.

- Huang, J., Graham, N., Templeton, M.R., Zhang, Y., Collins, C., Nieuwenhuijsen, M. (2009):** A comparison of the role of two blue-green algae in THM and HAA formation. *Water Research* 43 (12), 3009-3018.
- Ishida, K., Matsuda, H., Murakami, M. (1998):** Micropeptides 88-A to 88-F, chymotrypsin inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (NIES-88). *Tetrahedron* 54 (21), 5545-5556.
- Jurczak, T., Tarczynska, M., Izydorczyk, K., Mankiewicz, J., Zalewski, M., Meriluoto, J. (2005):** Elimination of microcystins by water treatment processes – examples from Sulejow Reservoir, Poland. *Water Research* 39 (11), 2394-2406.
- Kim, H.C., Yu, M.J. (2005):** Characterization of natural organic matter in conventional water treatment processes for selection of treatment processes focused on DBPs control. *Water Research* 39 (19), 4779-4789.
- Krewulak, K.D., Vogel, H.J. (2008):** Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778 (9), 1781-1804.
- Lambert, T.W., Holmes, C.F.B., Hrudehy, S.E. (1996):** Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Research* 30 (6), 1411-1422.
- LaMer, V.K., Healy, T.W. (1963):** Adsorption-flocculation reactions of macromolecules at the solid-liquid interface. *Reviews of Pure Applied Chemistry* 13, 112-113.
- Leenheer, J.A., Croue, J.P. (2003):** Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology* 37 (1), 18A-26A.
- Li, Q., Jonas, U., Zhao, X.S., Kappl, M. (2008):** The forces at work in colloidal self-assembly: a review on fundamental interactions between colloidal particles. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 3 (3), 255-268.
- Liang, Y., Hilal, N., Langston, P., Starov, V. (2007):** Interaction forces between colloidal particles in liquid: Theory and experiment. *Advances in Colloid and Interface Science* 134-35, 151-166.
- Lui, Y.S., Qiu, J.W., Zhang, Y.L., Wong, M.H., Liang, Y. (2011):** Algal-derived organic matter as precursors of disinfection by-products and mutagens upon chlorination. *Water Research* 45 (3), 1454-1462.
- Ma, M., Liu, R., Liu, H., Qu, J., Jefferson, W. (2012a):** Effects and mechanisms of pre-chlorination on *Microcystis aeruginosa* removal by alum coagulation: Significance of the released intracellular organic matter. *Separation and Purification Technology* 86 (15), 19-25.
- Ma, M., Liu, R., Liu, H., Qu, J. (2012b):** Effect of moderate pre-oxidation on the removal of *Microcystis aeruginosa* by KMnO<sub>4</sub>-Fe(II) process: Significance of the *in-situ* formed Fe(III). *Water Research* 46 (1), 73-81.
- Maksimova, I.V., Bratkovskaya, L.B., Plekhanov, S.E. (2004):** Extracellular carbohydrates and polysaccharides of the algae *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39. *Biology Bulletin* 31 (2), 175-181.
- Maršálek, B., Bláha, L., Turánek, J., Neča, J.: Microcystin-LR and total microcystins in cyanobacterial blooms in the Czech Republic 1993-2000. In: Cyanotoxins-occurrence, causes, consequences (Chorus, I., Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 2001, 357 s.**
- Martin, C., Oberer, L., Ino, T., König, W.A., Busch, M., Weckesser, J. (1993):** Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp. PCC 7806. *The Journal of Antibiotics* 46 (10), 1550-1556.
- Merkus, H.G.:** Particle size measurements: fundamentals, practice, quality. Springer, London, 2009, 533 s.
- Montiel, A., Welte, B. (1998):** Preozonation coupled with flotation filtration: Successful removal of algae. *Water Science and Technology* 37 (2), 65-73.
- Moreno-Castilla, C. (2004):** Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. *Carbon* 42 (1), 83-94.
- Newcombe, G., Drikas, M. (1997):** Adsorption of NOM onto activated carbon: electrostatic and non-electrostatic effects. *Carbon* 35 (9), 1239-1250.
- Newcombe, G., Cook, D., Brooke, S., Ho, L., Slyman, N. (2003):** Treatment options for microcystin toxins: Similarities and differences between variants. *Environmental Technology* 24 (3), 299-308.

- 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 (11), 1574-1582.
- Pelekani, C., Snoeyink, V.L. (1999):** Competitive adsorption in natural water: role of activated carbon pore size. *Water Research* 33 (5), 1209-1219.
- Pietsch, J., Bornmann, K., Schmidt, W. (2002):** Relevance of intra- and extracellular cyanotoxins for drinking water treatment. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 30 (1), 7-15.
- Pivokonská, L., Pivokonský, M. (2007):** On the fractionation of natural organic matter during water treatment. *Journal of Hydrology and Hydromechanics* 55 (4), 253-261.
- Pivokonská, L., Pivokonský, M., Tomášková H. (2008):** Optimization of NOM removal during water treatment. *Separation Science and Technology* 43 (7), 1687-1700.
- Pivokonský, M., Klouček, O., Pivokonská, L. (2006):** Evaluation of the production, composition and aluminum and iron complexation of algogenic organic matter. *Water Research* 40 (16), 3045-3052.
- Pivokonský, M., Pivokonská, L., Tomášková, H. (2008):** Aggregation capability of a fluidised layer of granular material during treatment of water with high DOC and low alkalinity. *Water Science and Technology: Water Supply* 8 (1), 9-17.
- Pivokonský, M., Poláček, P., Pivokonská, L., Tomášková, H. (2009a):** Optimized reaction conditions for removal of cellular organic matter of *Microcystis aeruginosa* during the destabilization and aggregation process using ferric sulphate in water purification. *Water Environment Research* 81 (5), 514-522.
- Pivokonský, M., Pivokonská, L., Bäumeltová, J., Bubáková, P. (2009b):** The effect of cellular organic matter produced by cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* on water purification. *Journal of Hydrology and Hydromechanics* 57 (2), 121-129.
- Pivokonský, M., Bubáková, P., Pivokonská, L., Knesl, B.:** Tvorba suspenze při úpravě vody. Teorie a praxe. SOVAK ČR, Líbeznice, 2011, 218 s.
- Pivokonský, M., Šafaříková, J., Bubáková, P., Pivokonská, L. (2012):** Coagulation of peptides and proteins produced by *Microcystis aeruginosa*: Interaction mechanisms and the effect of Fe-peptide/protein complexes formation. *Water Research*.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.040>.
- Plummer, J.D., Edzwald, J.K. (2002):** Effects of chlorine and ozone on algal cell properties and removal of algae by coagulation. *Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA* 51 (6), 307-318.
- Quinlivan, P.A., Li, L., Knappe, D.R.U. (2005):** Effects of activated carbon characteristics on the simultaneous adsorption of aqueous organic micropollutants and natural organic matter. *Water Research* 39 (8), 1663-1673.
- Richardson, S.D., Plewa, M.J., Wagner, E.D., Schoeny, R., DeMarini, D.M. (2007):** Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research* 636 (1-3), 178-242.
- Sano, D., Ishifuji, S., Sato, Y., Imae, Y., Takaara, T., Masago, Y., Omura, T. (2011):** Identification and characterization of coagulation inhibitor proteins derived from cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Chemosphere* 82 (8), 1096-1102.
- Schmidt, W., Willmitzer, H., Bornmann, K., Pietsch, J. (2002):** Production of drinking water from raw water containing cyanobacteria – Pilot plant studies for assessing the risk of microcystin breakthrough. *Environmental Toxicology* 17 (4), 375-385.
- Siddiqui, M.S., Amy, G.L., Murphy, B.D. (1997):** Ozone enhanced removal of natural organic matter from drinking water sources. *Water Research* 31 (12), 3098-3106.
- Sigg, L., Stumm, W. (1981):** The interactions of anions and weak acids on hydrous Goethite ( $\alpha$ -FeOOH) surface. *Colloids and Surfaces* 2 (2), 101-117.
- Sivonen, K., Jones, G.:** Cyanobacterial toxins. In: Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management (Chorus, I., Bartram, J., Eds.), E & FN Spon Press, London, 1999, 416 s.
- Stumm, W.; Morgan, J.J.:** Aquatic chemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1996, 1022 s.

- Sukenik, A., Teltch, B., Wachs, A.W., Shelef, G., Nir, I., Levanon, D. (1987):** Effect of oxidants on microalgal flocculation. *Water Research* 21 (5), 533-539.
- Takaara, T., Sano, D., Konno, H., Omura, T. (2005):** Affinity isolation of algal organic matters able to form complex with aluminium coagulant. *Water Science and Technology: Water Supply* 4 (5-6), 95-102.
- Takaara, T., Sano, D., Konno, H., Omura, T. (2007):** Cellular proteins of *Microcystis aeruginosa* inhibiting coagulation with polyaluminium chloride. *Water Research* 41 (8), 1653-1658.
- Takaara, T., Sano, D., Masago, Y., Omura, T. (2010):** Surface-retained organic matter of *Microcystis aeruginosa* inhibiting coagulation with polyaluminium chloride in drinking water treatment. *Water Research* 44 (13), 3781-3786.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R., Lindblad, P. (2002):** Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (1), 1-20.
- Tamagnini, P., Leitão, E., Oliveira, P., Ferreira, D., Pinto, F., Harris, D.J., Heidorn, T., Lindblad, P. (2007):** Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiology Reviews* 31 (6), 692-720.
- Teh, E.J., Leong, Y.K., Liu, Y., Fourie, A.B., Fahey, M. (2009):** Differences in the rheology and surface chemistry of kaolin clay slurries: The source of the variations. *Chemical Engineering Science* 64 (17), 3817-3825.
- Teixeira, M.R., Rosa, M.J. (2005):** Microcystins removal by nanofiltration. *Separation and Purification Technology* 46 (3), 192-201.
- Teixeira, M.R., Rosa, M.J. (2006a):** Integration of dissolved gas flotation and nanofiltration for *M. aeruginosa* and associated microcystins removal. *Water Research* 40 (19), 3612-3620.
- Teixeira, M.R., Rosa, M.J. (2006b):** Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa* Part I: The key operating conditions. *Separation and Purification Technology* 52 (1), 84-94.
- Teixeira, M.R., Rosa, M.J. (2007):** Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa* Part II. The effect of water background organics. *Separation and Purification Technology* 53 (1), 126-134.
- Vignais, P.M., Billoud, B., Meyer, J. (2001):** Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews* 25 (4), 455-501.
- Volk, C., Bell, K., Ibrahim, E., Verges, D., Amy, G., Lechevallier, M. (2000):** Impact of enhanced and optimized coagulation on removal of organic matter and its biodegradable fraction in drinking water. *Water Research* 34 (12), 3247-3257.
- Westerhoff, P., Rodriguez-Hernandez, M., Baker, L., Sommerfeld, M. (2005):** Seasonal occurrence and degradation of 2-methylisoborneol in water supply reservoirs. *Water Research* 39 (20), 4899-4912.
- Whyte, J.N.C. (1987):** Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60 (3-4), 231-241.
- Widrig, D.L., Gray, K.A., McAuliffe, K.S. (1996):** Removal of algal-derived organic material by preozonation and coagulation: monitoring changes in organic quality by pyrolysis-GC-MS. *Water Research* 30 (11), 2621-2632.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S. (2005):** Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203 (3), 201-218.
- Wilhelm, S.W. (1995):** Ecology of iron-limited cyanobacteria: a review of physiological responses and implications for aquatic systems. *Aquatic Microbial Ecology* 9 (3), 295-303.
- Yoon, J.-Y., Kim, J.-H., Kim, W.-S. (1999):** The relationship of interaction forces in the protein adsorption onto polymeric microspheres. *Colloids and Surfaces A* 153 (1-3), 413-419.