

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Účinnost odbourávání lineárních alkylbenzensulfonanů ve
vegetačním poli umělého mokřadu studovaná pomocí HPLC**

Bakalářská práce

Marek Pazderník

Školitel: RNDr. Jan Šíma, Ph.D.

České Budějovice 2012

Bakalářská diplomová práce

Pazderník, M., 2012: Účinnost odbourávání lineárních alkybenzensulfonanů ve vegetačním poli umělého mokřadu studovaná pomocí HPLC. [The efficiency of the linear alkylbenzene sulfonates degradation in a constructed wetland vegetation bed studied by HPLC. Bc. Thesis, in Czech.] – 20 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

This bachelor thesis is focused on the determination of removal efficiency of linear alkylbenzene sulfonates in a constructed wetland for wastewater treatment with a horizontal subsurface flow studied by high performance liquid chromatography. Data from the seasonal monitoring from march – october 2011 are used to evaluate the efficiency.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 16.04.2012.

Marek Pazderník

Obsah

1. Úvod.....	1
Cíle práce.....	2
2. Rešeršní část.....	3
2.1 Lineární Alkylbenzensulfonany (LAS).....	3
2.1.1 Vymezení pojmu tenzid, detergent, povrchové napětí.....	3
2.1.2 Struktura, charakteristika a mechanismus čistících účinků LAS.....	3
2.1.3 Mechanismus negativních účinků LAS na životní prostředí.....	4
2.1.4 Biodegradovatelnost lineárních alkylbenzensulfonanů.....	4
2.2. Kořenové čistírny odpadních vod (KČOV).....	5
2.2.1 Základní schéma KČOV s podpovrchovým horizontálním tokem.....	5
2.2.2 Princip čištění vody v KČOV.....	6
2.3 HPLC/UV pro určení koncentrace LAS ve vzorcích vod.....	6
3. Metodika.....	7
3.1 Základní charakteristika použitých analytických metod.....	7
3.1.1 Iontově párová vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	7
3.1.2 UV spektrometrická detekce.....	7
3.1.3. Extrakce tuhou fází (SPE)	7
3.2 Vlastní stanovení LAS.....	8
3.2.1 Postup stanovení koncentrace LAS ve vzorku vody z KČOV.....	8
3.2.2 Instrumentace a použité látky.....	8
3.2.3 Validované parametry metody.....	9
3.3. KČOV Slavošovice.....	10
3.3.1 Popis objektu KČOV Slavošovice.....	10
3.3.2 Odběr vzorků.....	11
4. Výsledková část	12
4.1. Validace metody.....	12
4.1.1 Kalibrace.....	12
4.1.2 Zjištěné charakteristiky použité metody.....	13
4.2 Naměřená data.....	13

5.Diskuze výsledků.....	15
5.1 Stupeň odbourávání jednotlivých homologů.....	16
5.2 Vliv redoxního potenciálu, teploty vody a množství přitékající vody do KČOV na odbourávání LAS.....	16
5.3 Lineární alkylbenzensulfonany ve vztahu k anionickým tenzidům.....	17
6.Závěr.....	18
7.Reference.....	19

Poděkování

Chtěl bych touto cestou poděkovat svému školiteli panu RNDr. Janu Šímovi, Ph.D. za špičkové vedení, cenné rady a připomínky k mé práci.

Tato studie byla financována v rámci výzkumného záměru MŠMT MSM 6007665801.

1. Úvod

Z historického hlediska byly mokřady považované za nevyužitelné plochy bránící v rozvoji regionu. V druhé polovině dvacátého století bylo získáno velké množství informací o procesech probíhajících v mokřadech, tím došlo ke změně pohledu na důležitost těchto ekosystémů, byla rozpoznána jejich role jako přirozených protipovodňových systémů či stabilizátorů mikroklimatu. Taktéž byl objeven potenciál uměle konstruovaných mokřadů pro čištění odpadních vod, dnes nazývaných kořenové čistírny odpadních vod (KČOV). První experimenty užití mokřadních rostlin na úpravu odpadní vody byly provedeny v Německu v padesátých letech dvacátého století. První kořenové čistírny odpadních vod byly zkonstruovány v letech šedesátých⁽¹⁾.

Kořenové čistírny odpadních vod jsou člověkem konstruované ekosystémy, vytvořené za účelem snížení celkového objemu a koncentrace nebezpečných odpadních látek z komunálních či průmyslových vod před jejich vypuštěním do vodních toků. Navrhují se tak, aby využívaly stejných biologických, chemických a fyzikálních procesů, jaké probíhají v mokřadech přirozených. Vegetační pole KČOV, lze charakterizovat podle různých parametrů, tři nejdůležitější jsou způsob průtoku odpadní vody (otevřený povrchový tok nebo podpovrchový tok), typ rostlin zasazených do mokřadu (ponořená, vynořená či plovoucí vegetace) a směr průtoku (horizontální či vertikální). V praxi se ukázalo, že nejefektivnější z hlediska odbourávání nečistot je kombinace různých druhů vegetačních polí v rámci jedné KČOV⁽²⁾.

Hlavní výhody využití kořenové čistírny na úpravu vody jsou nízké provozní náklady, provoz při malých nárocích na speciální vybavení a technologie, nenáročná obsluha, nehlučnost, nenarušení přirozeného vzhledu krajiny. Mezi nevýhody patří zanášení rozvodné zóny a postupně celého systému. Vytěžený materiál z kořenové čistírny je považován za biologicky nebezpečný, což prodražuje jeho odstranění. Dále je problémem eutrofizace nátoků a nestálá účinnost odstraňování dusíku a fosforu⁽³⁾. Za nízkých teplot výrazně klesá účinnost celého systému z důvodu zpomalení biologických procesů, případně může dojít téměř až k úplnému zamrznutí.

Z dnešního hlediska je použití kořenových čistíren odpadních vod nejvhodnější v rozvojových zemích tropického a subtropického pásu, kde jednak nezamrzají a kde by mohl být problém s kvalifikovanou obsluhou tradičních mechanicko-biologických čistíren.

Tato bakalářská práce je součástí studií (monitorování procesů a čistících schopností) prováděných na kořenové čistírně odpadních vod s podpovrchovým horizontálním tokem ve Slavošovicích (15 km východně od Českých Budějovic). V rámci práce byly pravidelně stanovovány lineární alkylbenzenesulfonany ve vzorcích vody odebíraných z KČOV. Vzorky byly odebírány celkem devětkrát (přibližně jednou za 25 dní) v různých zónách umělého mokřadu, v období března až října 2011.

Cíle práce:

1. Literární rešerše

- Vymezit pojmy lineární alkylbenzensulfonan (LAS) a kořenová čistírna odpadních vod (KČOV), nastínit průběh procesů způsobujících odbourávání LAS z odpadní vody v kořenové čistírně odpadních vod.

2. Optimalizovat a validovat metodu využívanou pro stanovení lineárních alkylbenzensulfonanů

- Určit základní charakteristiky metody iontově párové vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí při stanovení LAS.

3. Sezónní monitorování účinnosti odbourávání LAS

- Stanovovat koncentrace LAS v pravidelně odebíraných vzorcích odpadní vody z KČOV Slavošovice.

4. Vyhodnocení, interpretace a diskuze naměřených dat

- Na základě rozdílu koncentrace LAS obsažených v odtékající a přitékající vodě do KČOV zhodnotit účinnost odbourávání LAS.
- Posoudit případné rozdíly v biodegradaci jednotlivých LAS.
- Posoudit vliv teploty vody a redoxního potenciálu vody na účinnost KČOV
- Srovnat naměřené hodnoty s výsledky získanými spektrofotometrickým stanovením souhrnných anionických tenzidů.

2. Rešeršní část

2.1. Lineární alkylbenzensulfonany (LAS)

2.1.1 Vymezení pojmů tenzid, detergent, povrchové napětí

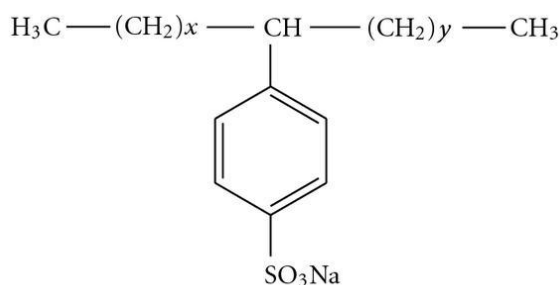
Tenzid je organická látka, která je schopna se hromadit již při nízké koncentraci na fázovém rozhraní a tím snižovat mezifázovou energii soustavy⁽⁴⁾. Povrchové napětí je vlastnost povrchu kapaliny, která jí umožňuje odolat vnější síle. Této vlastnosti například využívá hmyz při pohybu po vodní hladině. V komerční sféře jsou tenzidy pro své vlastnosti součástí velkého množství produktů, mezi nejčastěji používané patří čisticí prostředky (detergenty), aviváže, barvy, lepidla, šampóny a zubní pasty.

Detergent je směs tenzidů a dalších látek, která má detergenční vlastnosti. Detergence je schopnost převádět nečistotu z pevného povrchu do objemové fáze roztoku⁽⁴⁾.

Lineární alkylbenzensulfonany jsou anionické tenzidy, které jsou v dnešní době významnou účinnou složkou v komerčních detergentech.

2.1.2 Struktura, charakteristika a mechanismus čisticích účinků LAS

LAS s alkylovým řetězcem o délce 10-13 C jsou ve vyspělých zemích všudypřítomným kontaminantem odpadních vod. Jejich produkce je odhadována na 3-4 milióny tun ročně a tvoří tak 28% z produkce syntetických tenzidů⁽⁵⁾. Dnes již výhradně používané lineární alkylbenzensulfonany se liší od svých předchůdců alkylbenzensulfonanů s rozvětveným alkylem (vyráběných do 80 let minulého století) svým nerozvětveným řetězcem. Lineární alkyl je na rozdíl od rozvětveného alkylu výrazně snadněji biologicky odbouratelný a to jak v oxických^(6,7) tak i v anoxických podmínkách⁽⁸⁾. Základní schéma LAS je zobrazeno na obrázku 1.



Obr. 1. Základní struktura lineárních alkylbenzensulfonanů sodných.

Detergenty se používají na odstranění hydrofobních nečistot, které vodou lze jen těžko odstranit. LAS mají polární natriumsulfonovou skupinu a nepolární alkylový řetězec, ve vodě pak polární část disociuje a tím dále zvýší svoji rozpustnost. Jejich povrchová aktivita se při mytí projevuje tak, že se molekuly LAS adsorbují svou nepolární částí k nepolárním molekulám nečistoty. Polární část molekuly je směřována do polárního rozpouštědla a zároveň je vtahována difúzní silou do prostředí roztoku. Tato přitažlivá síla je vyšší než povrchová síla, již je nečistota přitahována k povrchu, na němž ulpěla, a tak molekuly LAS spolu s navázanou nečistotou přecházejí do prostředí rozpouštědla, kde utvoří micely, které jsou do určité koncentrace ve vodě plně rozpustné.

2.1.3 Mechanismus nežádoucích účinků LAS na životní prostředí

Schopnost LAS odstraňovat z povrchů nečistoty nepolárního charakteru způsobuje po jejich odplavení do životního prostředí narušení hydrofobních ochranných sekretů na povrchu živočichů, čímž ovlivňuje jejich schopnost přežití. Vrstva pěny na hladině způsobená vysokou koncentrací LAS mění přirozenou chemickou rovnováhu na rozhraní vody a atmosféry, dále také absorbuje a odráží sluneční záření. Mikrobiální degradace LAS v aerobních podmínkách probíhá na bázi enzymatické oxidace^(6,7) a snižuje tak koncentraci kyslíku ve vodě, jehož se pak nedostává jiným vodním organismům.

2.1.4 Biodegradovatelnost lineárních alkylbenzensulfonanů

V minulých dvaceti letech proběhly studie odbourávání LAS jak za aerobních^(6,7), tak za anaerobních podmínek^(8,9). Bylo prokázáno, že LAS jsou mikrobiálně výrazně snadněji odbouratelné za aerobních podmínek, zároveň byly navrženy cesty jejich degradace: α , β a ω -oxidace se podílejí na odstranění lineárního alkyly, desulfonace a rozštěpení benzenového kruhu vedou k přeměně LAS na běžné metabolity. Studie faktorů ovlivňujících odbourávání LAS v odpadní vodě v KČOV s podpovrchovým tokem⁽¹⁰⁾ prokázala, že hlavní vliv na účinnost odbourávání LAS má hloubka vegetačního pole (s rostoucí hloubkou klesá účinnost odbourávání), teplota (v létě bylo v rámci pokusu rozloženo umělým mokřadem přes 90% původního množství tenzidů z přiváděné vody, v zimě 40%). Studie ukazuje, že odbourávání LAS probíhá i v redukčním prostředí a prokazuje, že LAS s alkylem C-13 se odbourává rychleji než kratší homology. Na druhou stranu hrubost filtračního materiálu ve vegetačním poli má na účinnost zanedbatelný vliv.

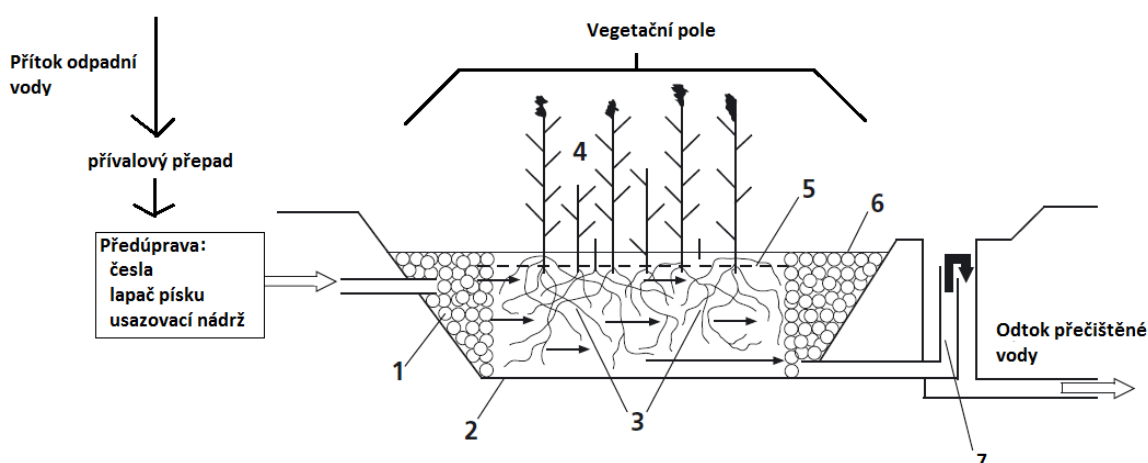
Odbourávání LAS v KČOV bylo také studováno v rámci výzkumu prováděného Fountoulakisem a kol. ⁽¹¹⁾, proběhlo srovnání odbourávání LAS v KČOV s podpovrchovým a povrchovým tokem. Podpovrchový systém s efektivitou degradace LAS 55% se ukázal jako vhodnější oproti povrchovému, kde účinnost byla 30%.

Na KČOV studované v této práci proběhl v letech 2007-08 výzkum ⁽¹²⁾ účinnosti odbourávání celkových anionických tenzidů s průměrným výsledkem 82% odbouraných anionických tenzidů v období jaro až podzim 2007 a 2008.

2.2 Kořenové čistírny odpadních vod (KČOV)

2.2.1 Základní schéma KČOV s podpovrchovým horizontálním tokem

Základem KČOV s podpovrchovým tokem je jedno či více vegetačních polí (obrázek 2.) osazených mokřadní vegetací. S ohledem na poměrně velké nároky na plochu (přibližně 5 m² na jednoho ekvivalentního obyvatele) jsou vhodné zejména pro obce s menším počtem obyvatel. K vegetačnímu poli je připojená nátoková sekce pro přívod odpadní vody, jejíž součástí je předčištění tzn. zbavení vody nejhrubších pevných částic (součástí předúpravy bývají česla, šterbinový lapač písku a usazovací nádrž) a odtoková sekce pro odtok přečištěné vody. Doba zdržení vody v umělém mokřadu je řádově dny až týdny. Je ovlivněna parametry, mezi něž lze zařadit množství vody na přítoku, srážky, porozitu vegetačního pole, teplotu, evapotranspiraci zapojeného porostu mokřadní vegetace ⁽¹³⁾.



Obr. 2. Základní schéma KČOV, 1 – nátoková zóna (kamenivo, 50-200 mm), 2 – nepropustná bariéra (PE či PVC fólie, popř. přirozená vrstva jílu), 3 – filtrační materiál (šterk, drcené kamenivo), 4 – mokřadní vegetace, 5 – výška vodní hladiny v kořenovém loži nastavitelná v odtokové šachtě, 6 – odtoková zóna (shodná s distribuční zónou), 7 – regulace výšky hladiny

2.2.2 Princip čištění vody v KČOV

KČOV fungují jako velký biologický filtr a současně jako reaktor. Procesy odbourávající znečištění se souhrnně nazývají biofiltrace. Podvodní části rostlin (kořeny, oddenky, stonky, listy) poskytují substrát, na němž žijí mikroorganismy, které využívají odpadní látky (organické sloučeniny, sloučeniny dusíku a fosforu, kovy i stopové prvky) ve svém metabolismu jako zdroj energie a atomů, ty pak využijí k množení svých buněk, a tím snižují množství daných látek ve vodě.

Při odbourávání nečistot v umělém mokřadu sehrávají významnou roli gradienty redoxního potenciálu pozorované uvnitř takovýchto systémů. Jejich výskyt je dáván do souvislosti s procesem aerace systému prostřednictvím kořenů mokřadní vegetace. V blízkosti kořenů se vyskytují úzké zóny s výrazně oxidačními vlastnostmi, zatímco obecně je pro mokřadní systémy charakteristická přítomnost redukovaných forem (např. Fe^{II} , Mn^{II} , NH_4^+)^(14,15). Umělé mokřady jsou schopné odstranit z vody mnoho kontaminantů, například zbytky organické hmoty, dusík, fosfor, stopové prvky, patogenní mikroorganismy a tenzidy⁽¹⁾.

Organické sloučeniny jsou v umělých mokřadech odbourávány za aerobních i anaerobních podmínek. Kyslík nutný pro aerobní degradaci se do umělého mokřadu dostává jednak difúzí z atmosféry přes vodní hladinu a také aerací skrz mokřadní rostliny, přičemž proces aerace je zodpovědný za dodávku většiny kyslíku do zaplavené půdy. Anaerobní odbourávání je proces, ke kterému dochází za nepřístupu kyslíku. Terminálním akceptorem elektronů je při mikrobiální respiraci za aerobních podmínek kyslík. Anaerobní mikroorganismy využívají při své respiraci řadu terminálních akceptorů elektronů. S klesajícími hodnotami redoxního potenciálu redukují postupně dusičnany na N_2O a dusík (denitrifikace), Mn^{IV} na Mn^{II} , Fe^{III} na Fe^{II} , sírany na sulfidy a při poklesu redoxního potenciálu pod -200 mV (proti standardní vodíkové elektrodě) může docházet k methanogenezi⁽¹⁶⁾.

2.3 HPLC/UV pro určení koncentrace LAS ve vzorcích vod.

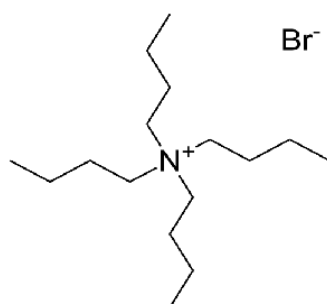
Vhodnost použití HPLC na reverzní fázi k separaci jednotlivých LAS^(17,18,19) a UV spektrometrie jako vhodného detektoru pro LAS byla již v minulosti ověřena⁽¹⁷⁾.

3. Metodika

3.1 Základní charakteristika použitých analytických metod

3.1.1 Iontově párová vysokoučinná kapalinová chromatografie

Iontově párová chromatografie je varianta HPLC zlepšující separaci sloučenin iontové povahy, je založená na tvorbě iontových asociátů mezi separovanými látkami iontové povahy a opačně nabitým iontem, jehož molekula obsahuje relativně velký nepolární podíl. Takto spárovaný navenek nepolární asociát se velice dobře rozděljuje na koloně s reverzní fází. Jako iontově párové činidlo pro stanovení LAS byl použit tetrabutylammonium bromid (TBAB), obrázek 3.



Obr. 3. Tetrabutylammonium bromid (TBAB)

3.1.2 UV spektrometrická detekce

Alkylbenzensulfonany jsou charakterizovány spektrem s maximem absorpce elektromagnetického záření při vlnové délce 222 nm⁽¹⁷⁾. K absorpci zde dochází v důsledku přítomnosti benzenového jádra ve struktuře analytu. Vlnová délka detekce byla v rámci této studie zvolena 220 nm. Kvantifikace detekovaných sloučenin byla provedena pomocí proměření kalibrační závislosti v její lineární části; byla využita metoda lineární regrese.

3.1.3 Extrakce tuhou fází (SPE – Solid Phase Extraction)

Extrakce tuhou fází je relativně jednoduchá separační metoda, sloužící k zakoncentrování a oddělení analyzované látky od rozpouštědla, případně od ostatních látek (matrice vzorku). Principem této metody je zavedení kapalného či plynného vzorku na kolonu s ukotvenou pevnou fází, která je výrazně afinitnější k analyzované látce než původní rozpouštědlo. Poté se látky z tuhé fáze eluují malým množstvím vhodného k analyzovaným látkám extrémně afinitního rozpouštědla.

3.2 Vlastní stanovení LAS

3.2.1 Postup stanovení koncentrace LAS ve vzorku vody z KČOV

Zhruba 550 ml vzorku vody z KČOV bylo přefiltrováno pod tlakem přes filtr ze slisovaných skleněných vláken, dále bylo odměřeno přesně 500 ml přefiltrovaného vzorku, jeho hodnota pH byla upravena na 6,5 pěti mililitry 0,5 M fosforečnanového tlumivého roztoku ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) a byl k němu přidán 1,0 ml roztoku TBAB (100 g/l). Takto upravený vzorek se pod tlakem aplikoval na aktivovanou (aktivace proběhla 2×3 ml methanolu, 5 ml redest. vody a 3 ml 0,5 mM TBAB) SPE kolonu (adsorbent na bázi kopolymeru polystyren-divinylbenzen). Po zavedení celého vzorku na SPE kolonu byla kolona promyta 3 ml redest. vody a následně vysušena. Eluce analytu z kolony byla provedena 3×0,5 ml roztoku dichlormethan-aceton (7:3 V/V), ten byl dále odpařen a analyt byl rozpuštěn v 1,0 ml redestilované vody.

Pro HPLC stanovení byl jako mobilní fáze použit roztok methanol:voda (80:20, V/V) s 0,01 M TBAB, dělení LAS proběhlo na chromatografické koloně s C-18 chemicky vázanou stacionární fází v rámci izokratické eluce. Nástřik vzorku činil 20 μl . Detekce proběhla při 220 nm na UV/VIS spektrometrickém detektoru. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,0 ml/min. Vyhodnocení výstupu z detektoru bylo provedeno v programu Clarity Lite.

3.2.2 Instrumentace a použité látky

Filtrace vzorků proběhla na filtrech Macherey-Nagel GF-5 (průměr 47 mm, zachycovací schopnost 0,4 μm , Macherey-Nagel, Düren, SRN). Pro SPE sloužily kolonky Chromabond[®] HR-P 3ml/200 mg, kopolymer polystyren-divinylbenzen (Macherey-Nagel, Düren, SRN). Extrakce tuhou fází byla provedena za použití SPE Manifoldu (Watrex, Praha, ČR). Extrakt byl vždy přefiltrován přes mikrofiltr PTFE 0,45 μm (Teknokroma, Barcelona, Španělsko). Na analýzu byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf skládající se z vysokotlakého čerpadla LCP 4100 (ECOM, Praha, ČR), UV/VIS spektrometrického detektoru SAPPHIRE (ECOM, Praha, ČR), šesticestného vysokotlakého dávkovacího ventilu (ECOM, Praha, ČR), a chromatografické kolony Watrex 250×4 mm Nukleosil 120 C-18 5 μm (Watrex, Praha, ČR). K vyhodnocení výstupních dat sloužil program Clarity Lite verze 3.0.2.244 (DataApex, Praha, ČR). Na odvzdušnění mobilní fáze byla použita ultrazvuková lázeň (Kraintek, Podhájska, Slovensko). Redoxní potenciál byl měřen pomocí milivoltmetru CPH 52 (Elteca, Turnov, ČR).

Pro kalibraci byl použit analytický standard (referenční materiál prvního druhu) undecylbenzensulfonan sodný (0.1 mg/ml, Chiron, Trondheim, Norsko). V rámci předúpravy vzorku bylo pH nastaveno tlumičem připraveným z Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN) a NaH₂PO₄ (Fluka, Buchs, Švýcarsko), a byl přidán roztok TBAB (Fluka, Buchs, Švýcarsko), tatáž sloučenina byla použita při přípravě mobilní fáze. Na kondicionování SPE kolony byly použity methanol pro HPLC (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN) a TBAB (Fluka, Buchs, Švýcarsko). Na eluci byla použita činidla: aceton (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN) a dichlormethan (Analytika, Praha, ČR). Pro přípravu mobilní fáze byl používán methanol o čistotě gradient grade (Merck, Darmstadt, SRN).

3.2.3 Validované parametry metody

Citlivost metody: Citlivost měřícího zařízení vyjadřuje transformační funkci výstup/vstup a je součinem konstrukčních a pro analyt specifických vlastností. Podmínkou správného měření je konstantní hodnota citlivosti pro různé množství analytu ⁽²⁰⁾. Citlivost metody je reprezentována směrnici lineární části kalibrační křivky.

Lineární dynamický rozsah (LDR): Lineární dynamický rozsah detektoru je rozsah množství analytu, na který detektor poskytuje odezvu v rámci povolené chyby linearity. Chyba linearity pro dosažení správných výsledků by neměla překročit +/- 5% ⁽²⁰⁾. Dolní mez intervalu představuje mez stanovitelnosti, horní mez intervalu byla určena experimentálně při kalibraci metody.

Mez detekce (LOD – limit of detection): Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez detekce byla stanovena na základě 3s_a kritéria z výsledků kalibrace.

Mez stanovitelnosti (LOQ – limit of quantification): Mez stanovitelnosti odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Mez stanovitelnosti byla určena pomocí 10s_a kritéria z výsledků kalibrace.

Správnost metody: Správnost metody je dána těsností shody změřené hodnoty a skutečné hodnoty obsahu analytu. Správnost analytické metody byla určena jako výtěžnost pomocí metody standardního přidavku. Při stanovení správnosti byl do již proměřeného vzorku LAS přidán roztok standardu o přesně známém objemu a koncentraci. Naměřená koncentrace byla porovnána s předpokládanou, získanou výpočtem.

Přesnost metody: Přesnost metody je údaj o míře shody mezi vzájemně nezávislými měřeními. Přesnost byla stanovena jako opakovatelnost HPLC stanovení, pomocí desetkrát co nejtěsněji za sebou provedeného měření kalibračního standardu o koncentraci 100 mg/l.

Korelační koeficient: Korelační koeficient představuje rozptýlení bodů vzhledem ke středním hodnotám obou souborů a rozpětí jejich hodnot, vyjádřené hodnotou odhadů směrodatných odchylek⁽²⁰⁾. Určuje hodnotu linearity mezi závisle a nezávisle proměnou.

3.3 KČOV Slavošovice

3.3.1. Popis objektu KČOV Slavošovice

Kořenová čistírna odpadních vod ve Slavošovicích byla zprovozněna v srpnu roku 2001. Byla vybudována u obce Slavošovice (15 km východně od Českých Budějovic, v nadmořské výšce 480 m n. m.)

KČOV Slavošovice lze klasifikovat jako umělý mokřad s podpovrchovým horizontálním tokem. Dvojice jejích vegetačních polí je osázena rákosem obecným (*Phragmites australis*), sklon dna činí 1%. Ostatní parametry kořenové čistírny jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. I. Parametry KČOV a obce Slavošovice

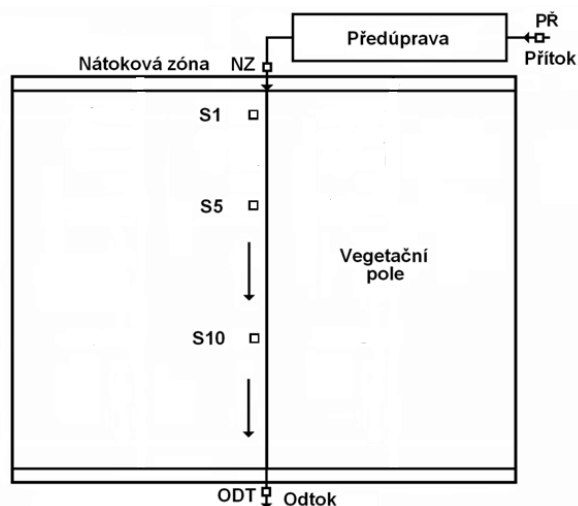
Parametr	Hodnota
Počet vegetačních polí	2
Délka vegetačního pole (m)	17
Šířka vegetačního pole (m)	22
Hloubka vegetačního pole (m)	0,9
Plocha vegetačního pole (m ²)	374
Počet ekvivalentních obyvatel (EO)*	150
Počet obyvatel připojených na kanalizační síť	60 - 80
Plocha vegetačního pole na 1 EO (m ²)	5
Hrubost substrátového štěrku (cm)	1 - 2
Hrubost štěrku v nátokové a odtokové zóně (cm)	5 - 10
Průměrná doba zdržení vody (dny)	9,8

*) Ekvivalentní obyvatel (EO) je definován produkcí znečištění 60 g BSK5 (biochemická spotřeba kyslíku při odbourávání organického znečištění za 5 dnů v temnu a při teplotě 20 °C) za den.

Jedno vegetační pole slouží ke studiu biologických a chemických procesů souvisejících s úpravou odpadní vody. Vegetační pole KČOV byla vybudována na lokalitě s přirozeným jílovým podložím zamezujícím průsaku odpadní vody do okolního půdního prostředí i vstupu balastních vod do systému. Lože vegetačních polí je vyplněno v nátokové a odtokové zóně hrubým kamenivem, v hlavní části jemným štěrkem.

Pro případ přívalových srážek je KČOV opatřena dešťovým odlehčovačem, který odkloní přebytek přitékající vody do kanalizačního okruhu mimo KČOV, aby nedošlo k přílišnému zaplavení předúpravy a vegetačních polí. Komunální odpadní voda je při průtoku čistírnou nejprve na česlech a v horizontálním lapáku písku zbavena hrubých nečistot, následně vstupuje do usazovací štěrbinové nádrže, kde dochází k sedimentaci jemnějších částic. Poté je protékající voda rovnoměrně rozvedena do dvou vegetačních polí, kde dochází k jejímu čištění. Systém pro odvod upravené vody ústí do nedalekého potoka⁽²¹⁾.

Přes vegetační pole určené k výzkumu vede v podélném směru (od nátokové zóny k zóně odtokové) lávka zajišťující přístup k místům odběru vzorků (obrázek 4). Ve vzdálenostech 1, 5 a 10 m od nátokové zóny jsou do štěrkového lože umělého mokřadu (do hloubky 60 cm) zapuštěny perforované trubky, z nichž jsou odebírány vzorky intersticiální vody pro analýzu. Uvnitř těchto trubek byla rovněž prováděna měření fyzikálně-chemických veličin (redoxního potenciálu a teploty).



Obr. 4. Schéma vegetačního pole v KČOV Slavošovice s vyznačením míst odběru vzorků.

3.3.2 Odběr vzorků

Vzorky odpadní vody pro stanovení LAS byly odebírány devětkrát v pravidelných intervalech od března do října roku 2011. Odpadní voda byla vzorkována na přítoku do KČOV – v lapači písku (PŘ), z nátokové zóny po předčištění (NZ), na odtoku z KČOV

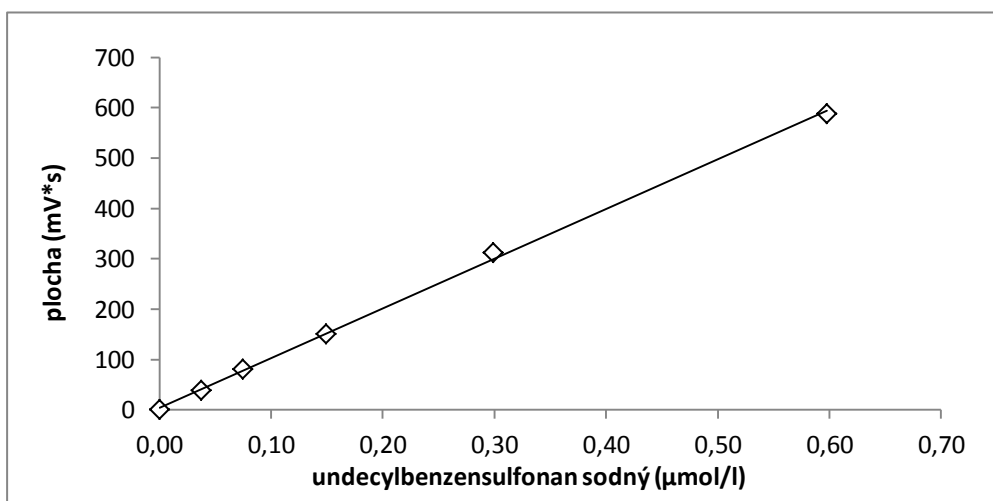
(ODT) a z vybraných míst řezu vedeného středem vegetačního pole od nátoky k odtoku (obrázek 4). Vzorok vody odebírané v profilu vegetačního pole byly odebírány z hloubky 50 cm pod povrchem šterkového lože. Jednotlivá vzorkovací místa se nacházela 1, 5 a 10 m od distribuční zóny umělého mokřadu (v rámci bakalářské práce označováno jako vzorky S1, S5 a S10). Vzorkovaná voda byla v profilu vegetačního pole odebírána pomocí plastové trubice pro odběr kapalných vzorků o délce 75 cm do plastových lahví o objemu 500 ml. Každá vzorkovnice byla vždy kompletně zaplněna vzorkem po zátku a pečlivě uzavřena. Téhož dne byly vzorky v laboratoři filtrovány podtlakem přes filtr ze slisovaných skleněných vláken. Vzorky byly zamrazeny a nejpozději do 3 dnů po jejich odběru bylo provedeno stanovení LAS.

4. Výsledková část

4.1 Validace metody

4.1.1 Kalibrace

Kalibrace (obrázek 5) byla provedena proměřením roztoků výše uvedeného analytického standardu. Koncentrace kalibračních roztoků byly zvoleny tak, aby jimi vymezený interval v sobě zahrnoval hodnoty koncentrací LAS, které lze očekávat ve vzorcích odpadní a intersticiální vody z KČOV Slavošovice.



Obr. 5. Kalibrační závislost stanovení LAS pomocí HPLC.

Ze získaných výsledků vyplývá, že v proměřovaném intervalu koncentrací standardu je závislost signálu na koncentraci undecylbenzensulfonátu lineární. Vypočtená hodnota koeficientu A lineární regrese je $4,475 \text{ mV}\cdot\text{s}$, hodnota koeficientu B je $986,3 \text{ mV}\cdot\text{s}\cdot\text{l}/\mu\text{mol}$.

4.1.2 Zjištěné charakteristiky použité metody.

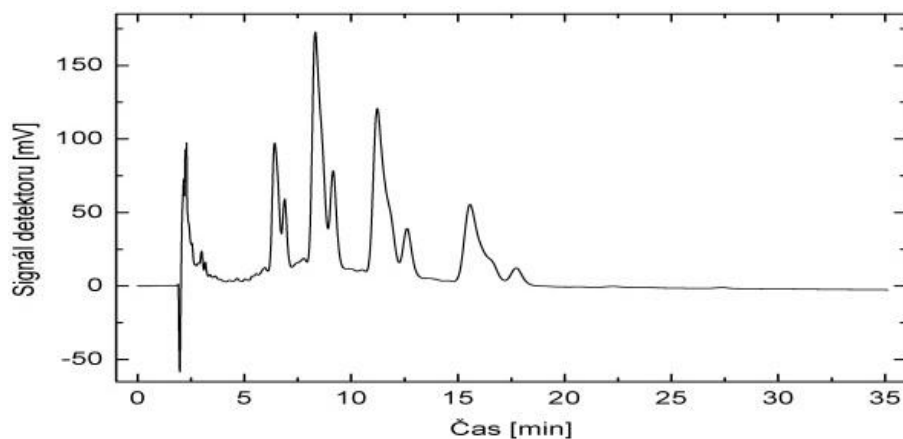
V rámci validace stanovení LAS pomocí HPLC byly určeny tyto základní charakteristiky: správnost, přesnost, LOD, LOQ, citlivost, LDR a korelační koeficient. Jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce II.

Tab. II. Validační parametry (charakteristiky) užití metody

Správnost	102,02 %
Přesnost	3,35 %
LOD	$8,22 \times 10^{-3} \mu\text{mol/l}$
LOQ	$3,80 \times 10^{-2} \mu\text{mol/l}$
Citlivost	986,3 mV*s*/ μmol
LDR	0,038 – 0,598 $\mu\text{mol/l}$
Korelační koeficient	0,999545

4.2 Naměřená data

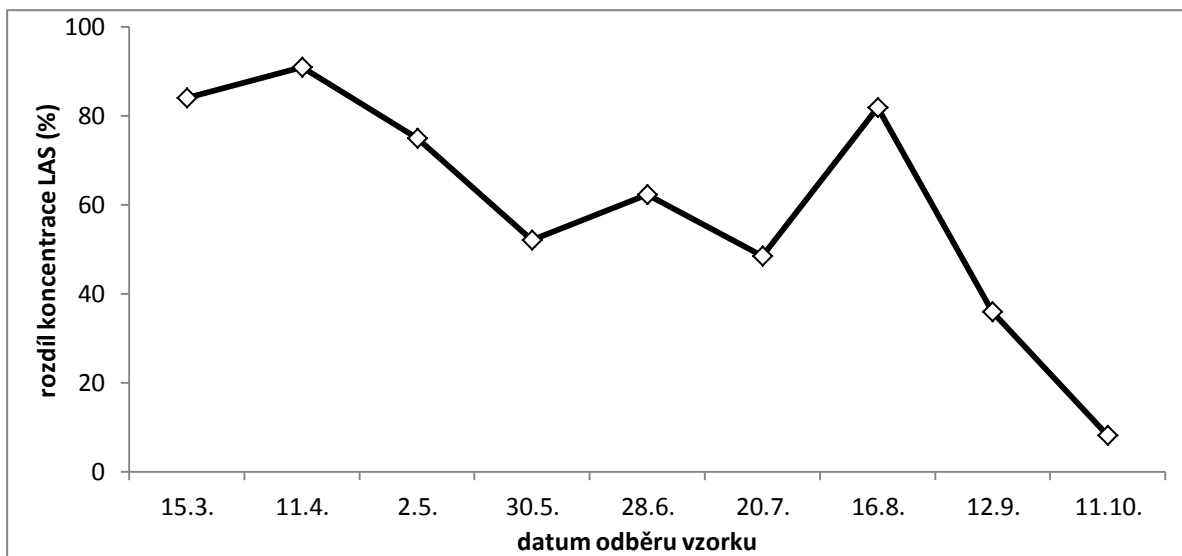
Ve vzorcích byly detekovány 4 homology LAS (10-13 C) a jejich konstituční izomery (obrázek 6), výskyt právě těchto 4 homologů byl očekáván, z důvodu výroby dnešních detergentů z komerční technické směsi, která obsahuje právě tyto homology.



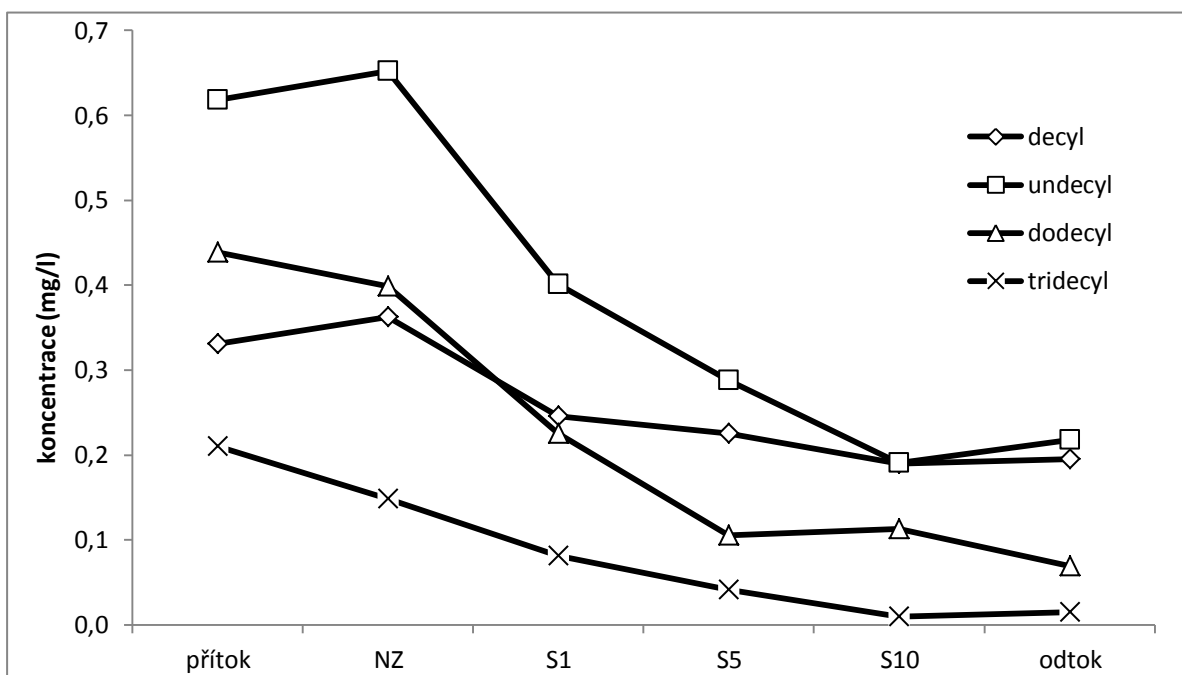
Obr. 6. Ilustrační chromatogram vzorku vody z KČOV Slavošovice. Píky odpovídají zleva: decyl, undecyl, dodecyl a tridecylbenzensulfonanu a jejich izomerům.

Účinnost odbourávání lineárních alkylbenzensulfonů v KČOV Slavošovice v období březen - říjen 2011 byla stanovena na 71,5%, účinnost byla vypočítána jako poměr průměrné koncentrace LAS v průběhu roku na přítoku a odtoku z KČOV vyjádřený v procentech.

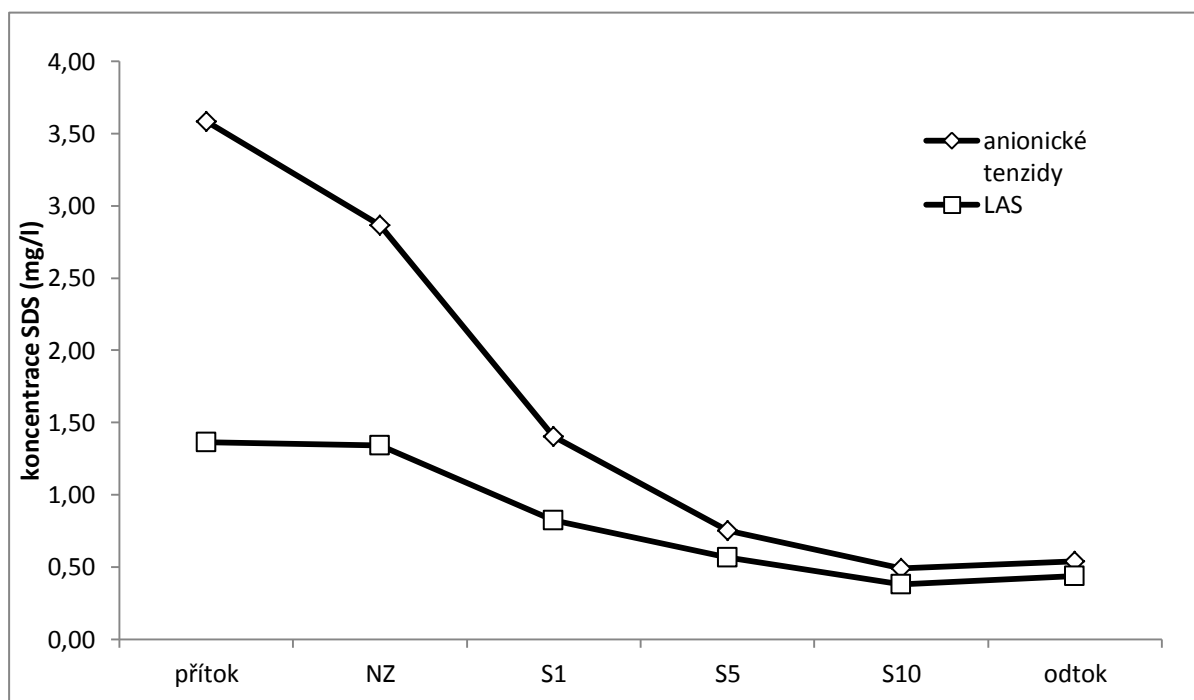
Následující grafy (obrázek 7, 8 a 9) ukazují rozdíl naměřených koncentrací LAS na přítoku a odtoku z KČOV Slavošovice v jednotlivých měsících (vyjádřený v %), průměrné naměřené koncentrace jednotlivých homologů ze všech měření v jednotlivých místech odběru vzorků a srovnání výsledků získaných metodou HPLC a extrakční spektrofotometrií (celkové anionické tenzidy). Při posuzování rozdílu koncentrace LAS na přítoku-odtoku v jednotlivých termínech odběru (obrázek 7) byly hodnoty koncentrace LAS na přítoku z 15.3 a 11.10 vyloučeny jako odlehlé, místo nich byly použity hodnoty z nátokové zóny.



Obr. 7. Rozdíl koncentrace LAS na přítoku a odtoku v jednotlivých termínech odběru vzorků vyjádřený v procentech.



Obr. 8. Průměrné koncentrace jednotlivých lineárních alkybenzensulfonanů v místech odběru vzorků.



Obr. 9. Porovnání výsledků získaných při stanovení LAS za použití SPE/HPLC s výsledky stanovení celkových anionických tenzidů pomocí extrakční spektrofotometrie s methylenovou modří. (Výsledky z roku 2011, stejné termíny odběru vzorků pro obě metody, metodika extrakční spektrofotometrie převzata z předchozí studie⁽²⁰⁾, pro porovnání jsou koncentrace tenzidů vždy vyjádřeny jako koncentrace dodecylsírany sodného (SDS).)

5. Diskuze výsledků

Celkové množství studovaných LAS bylo na odtoku z KČOV průměrně o 71,5 % nižší než na přítoku. Rozdíl koncentrace LAS mezi přítokem a odtokem byl vyšší na jaře, 75-90%. V letních měsících poklesl na 50-60 %. V srpnu byl opět vyšší, 82%. V září a říjnu prudce klesl, byl naměřen rozdíl pouhých 36% a 8% (obrázek 7). Nižší rozdíl LAS na přítoku/odtoku v letních měsících roku 2011 lze dát do souvislosti s vysokou mírou evapotranspirace vody z vegetačního pole. Při nepoměru srážek a evapotranspirace se LAS ve vodě tekoucí mokřadem zakonzentrovávají i přes jejich celkový úbytek. Naopak při zvýšených srážkách dojde k poklesu koncentrace LAS ve vodě odtékající z KČOV i bez jejich výrazné mikrobiální degradace. Neobvykle malý rozdíl koncentrací na přítoku/odtoku v říjnu může být způsoben nízkou koncentrací LAS na počátku systému (ve šterbinovém lapáku písku), z důvodu odběru vzorku v brzkých ranních hodinách, kdy je na přítoku a částečně i v nátokové zóně přítomna přes noc přitéklá čistší voda.

5.1 Stupeň odbourávání jednotlivých homologů

Snížení koncentrace jednotlivých homologů se výrazně lišilo (obr. 8), nejvýraznější průměrný úbytek byl změřen u tridecylbenzensulfonanu a to 91,4 %, dále dodecyl 81,1 %, undecyl 56,2 % a decylbenzensulfonanu 30,1 %. Výrazně menší s homologickou řadou souhlasně klesající účinnost odbourávání pro nižší homology, zejména pro undecyl a decyl, lze vysvětlit přechodem vyšších homologů na nižší během jejich metabolické dráhy, což se ale z důvodu nenaměřené koncentrace kratších homologů než decyl nezdá jako pravděpodobné. Tento jev je tedy nejspíše způsoben přednostním mikrobiálním odbouráváním delších homologů ve srovnání s kratšími.

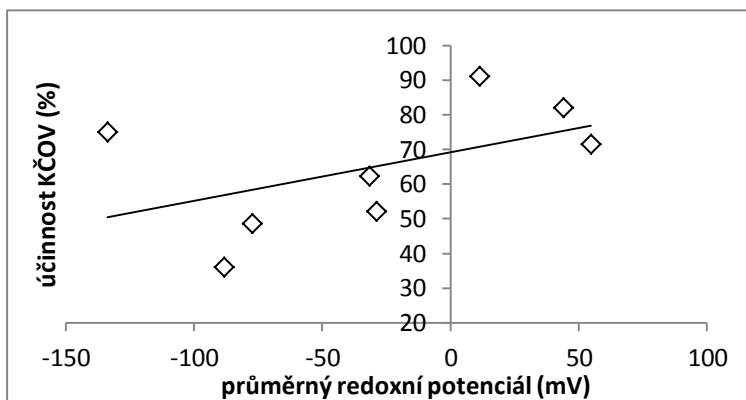
5.2 Vliv redoxního potenciálu, teploty vody a množství přitékající vody do KČOV na odbourávání LAS.

Naměřené hodnoty redoxních potenciálů, teplot, přítoku a rozdílu koncentrace LAS na přítoku/odtoku z KČOV jsou uvedeny v tabulce III. Naměřené hodnoty potvrzují závislost mezi odbouráváním LAS a redoxním potenciálem vody. S rostoucí hodnotou red. potenciálu (oproti vodíkové elektrodě) se zvyšuje schopnost systému odbourávat organické látky (obrázek 10). Nejredukčnější prostředí, reprezentované výrazně záporným red. potenciálem a způsobené nízkou koncentrací kyslíku, bylo změřeno ve vzdálenosti jednoho metru od začátku vegetačního pole, což souhlasí s hypotézou, že největší část odbourávání organických látek probíhá na počátku mokřadu. U konce vegetačního pole red. potenciál (měřen v hloubce 10 cm) vzrůstá, jak se zaplavená půda opět prokysličuje a kyslík už není tolik spotřebováván na oxidaci.

Tab. III. Hodnoty přítoku odpadní vody, teploty vody, redoxního potenciálu a rozdíl koncentrace LAS na přítoku/odtoku v jednotlivých termínech odběru vzorků.

Odběr vzorku	15.3.	11.4.	2.5.	30.5.	28.6.	20.7.	16.8.	12.9.	11.10.
Přítok (l/s)	1,151	0,262	0,265	0,671	0,160	0,216	0,477	0,271	0,296
t (přítok, °C)	6,7	9,0	10,1	13,2	15,6	15,7	17,2	16,4	13,6
t (S1, °C)	0,4	7,2	9,5	14,1	15,1	16,2	16,5	16,3	12,3
t (S10, °C)	0,0	4,8	8,2	12,3	13,5	15,1	15,9	15,3	10,7
E (přítok, mV)	+168	+143	-74	+111	+154	+19	+140	-156	+122
E (S1, mV)	-51	-82	-187	-130	-150	-168	-55	-55	-110
E (S10, mV)	+47	-29	-140	-68	-99	-83	+47	-54	59
Rozdíl LAS (%)	84,1	91,0	75,1	52,1	62,4	48,5	81,9	36,0	8,2

Naopak teplota vody se při odbourávání LAS neukazuje jako významný faktor. Neukázala se žádná korelace mezi teplotou vody a množstvím odbouraných LAS a to jak v pozitivním či negativním směru. Množství vody přitékající do KČOV se také neukázalo jako faktor výrazně ovlivňující degradaci LAS.



Obr. 10. Závislost účinnosti odbourávání LAS na průměrném redoxním potenciálu vody. Průměr byl vždy určen z hodnot E(přítok), E(S1) a E(S10) v období 15.3 – 12.9.

5.3 Lineární alkybenzonsulfonany ve vztahu k anionickým tenzidům

Na obrázku 9 je porovnána koncentrace LAS s celkovými anionickými tenzidy dle hodnot zjištěných ze vzorků odebraných z KČOV. Z tohoto srovnání vyplývá, že lineární alkybenzonsulfonany tvoří minimálně 38% všech používaných anionických tenzidů a jsou obtížněji degradovatelné než ostatní anionické tenzidy. Možná variabilita této hodnoty směrem k většímu zastoupení LAS je způsobena pravděpodobným úbytkem koncentrace LAS ve vzorcích z nátoků a nátokové zóny v průběhu předúpravy vzorku filtrací přes mikrofiltr před SPE/HPLC; LAS mohou být adsorbovány na nerozpustné částice, které mikrofiltrem neprojdou a tak výsledná hodnota je o toto odfiltrované množství menší. Při stanovení metodou extrakční spektrometrie byly vzorky filtrovány přes filtr s výrazně menší zachycovací schopností (analytické sítko o velikosti oka 0,1 mm), tudíž případné ztráty jsou menší. Průměrná účinnost odbourávání celkových anionických tenzidů činila 85,9 %.

6. Závěr

- Použití SPE a HPLC s UV detekcí se potvrdilo jako vhodné pro stanovení jednotlivých homologů LAS ve vzorcích odpadní a intersticiální vody odebrané z umělého mokřadu.
- Účinnost odbourávání LAS v KČOV Slavošovice v jarním až podzimním období 2011 byla stanovena na 71,5%.
- Bylo zjištěno, že LAS dnes tvoří minimálně 38 % všech používaných anionických tenzidů.

7. Reference

- (1) Vymazal J.: Constructed Wetlands for Wastewater Treatment: Five Decades of Experience. *Environmental science & technology*, **45**, 1, 61-69. (2011)
- (2) Vymazal J.: Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. *Ecological engineering*, **25**, 5, 478-490. (2005)
- (3) Gerátová L.: Vliv eutrofizace na mikrobiální procesy v půdách mokřadního ekosystému. Diplomová práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice (2004)
- (4) Šmidrkal J.: Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*, **93**, 421-427. (1999)
- (5) Mcevoy J., Giger W.: Determination of linear alkylbenzenesulfonates in sewage-sludge by high-resolution gas-chromatography mass-spectrometry. *Environmental science & technology*, **20**, 4, 376-383. (1986)
- (6) Campos-Garcia J., Esteve A., Vazquez-Duhalt R., Ramos J.L., Soberon-Chavez G.: The branched-chain dodecylbenzene sulfonate degradation pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D involves a novel route for degradation of the surfactant lateral alkyl chain. *Applied and environmental microbiology*, **65**, 8, 3730-3734. (1999)
- (7) Sigoillot J.C., Nguyen M.H.: Complete oxidation of linear alkylbenzene sulfonate by bacterial communities selected from coastal seawater. *Applied and environmental microbiology*, **58**, 4, 1308-1312. (1992)
- (8) Lara-Martin P.A., Gomez-Parra A., Luis Sanz J., Gonzalez-Mazo E.: Anaerobic Degradation Pathway of Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS) in Sulfate-Reducing Marine Sediments. *Environmental science & technology*, **44**, 5, 1670-1676. (2010)
- (9) Lara-Martin P.A., Gomez-Parra A., Kochling T., Sanz J.L., Amils R.: Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonates in coastal marine sediments. *Environmental science & technology*, **41**, 10, 3573-3579. (2007)
- (10) Huang Y., Latorre A., Barceló D., García J., Aguirre P., Mujeriego R., Bayona J. M.: Factors Affecting Linear Alkylbenzene Sulfonates Removal in Subsurface Flow Constructed Wetlands. *Environmental Science Technology*, **38**, 2657-2663. (2004)
- (11) Fountoulakis M. S., Terzakis S., Kalogerakis N., Manios, T.: Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and linear alkylbenzene sulfonates from domestic wastewater in pilot constructed wetlands and a gravel filter. *Ecological engineering*, **35**, 12, 1702-1709. (2009)
- (12) Sima J., Havelka M., Holcova V.: Removal of Anionic Surfactants from Wastewater Using a Constructed Wetland. *Chemistry & biodiversity*, **6**, 9, 1350-1363. (2009)
- (13) Holcová V.: Stanovení doby zdržení vody v umělém mokřadu v souvislosti s vlivem vegetačního pokryvu. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. (2007)
- (14) Diáková K., Holcová V., Šíma J., Dušek J.: The distribution of iron oxidation states in a constructed wetland as an indicator of its redox properties. *Chemistry & Biodiversity*, **3**, 1288-1300. (2006)

- (15) Šíma J., Holcová V., Dušek J., Diáková K.: Analytické přístupy ke studiu redoxních vlastností umělého mokřadu. *Chemické listy*, **100**, 10, 911-918. (2006)
- (16) Šíma J., Diáková K., Holcová V.: Redox Processes of Sulfur and Manganese in a Constructed Wetland. *Chemistry & Bioiversity*, **4**, 2900-2912. (2007)
- (17) Sarrazin L., Arnoux A., Rebouillon P.: High-performance liquid chromatographic analysis of linear alkylbenzenesulfonate and its environmental biodegradation metabolites. *Journal of Chromatography A*, **760**, 285-291. (1996)
- (18) Lara-Martin P.A., Gomez-Parra A., Kochling T., Sanz J.L., Gonzalez-Mazo E.: Monitoring the primary biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates and their coproducts in anoxic sediments using liquid chromatography-mass spectrometry. *Environmental science & technology*, **41**, 10, 3580-3586. (2007)
- (19) Duarte I. C. S., Oliveira L. L., Buzzini A. P., Adorno M. A. T., Varesche M. B. A.: Development of a method by HPLC to determine LAS and its application in anaerobic reactors. *Journal of the brazilian chemical society*, **17**, 7, 1360-1367. (2006)
- (20) Ševčík J. G. K.: Metodologie měření v analytické chemii, Nakladatelství Karolinum, Praha. (1999)
- (21) Havelka M.: Účinnost odbourávání anionaktivních tenzidů ve vegetačním poli umělého mokřadu. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. (2008)

Příloha



Obr. 11. Vegetační pole KČOV Slavošovice na jaře po vysekání rákosu z předchozího roku.



Obr. 12. Vegetační pole KČOV Slavošovice v létě s vzrostlou vegetací.