

13. HODNOCENÍ ÚPLNÉ AEROBNÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ORGANICKÝCH LÁTEK VE VODNÍM PROSTŘEDÍ STANOVENÍM SPOTŘEBY KYSLÍKU V UZAVŘENÉM RESPIROMETRU [ČSN EN ISO 9408]

Zadání:

Stanovte průběhové závislosti BSK ($BSK=f(t)$) u zadaných vzorků (zkoušené látky a srovnávací látka) a následně podle parametrů D_{TSK} resp. $D_{CHSK_{Cr}}$ a D_{DOC} klasifikujte dané zkoušené látky:

a) zkoušená látka

- a.1 – methylester řepkového oleje ($CHSK_{Cr} = 2178 \text{ mg/g}$), popř. bionafta (ve vodě špatně rozpustná látka)
- a.2 – podle zadání vedoucího cvičení

b) srovnávací látka (benzoan sodný/glukoza – dobře biologicky rozložitelná látka)

Minimální znalosti pro zahájení praktika:

- v rozsahu obecné části skript Hoffmann J. a kol. Technologická cvičení z Ochrany prostředí II kap. 11 str. 6 – 11
- znalosti získané po absolvování předmětu Technologie vod
- znalosti získané po absolvování předmětu Biotechnologie a technická mikrobiologie

Definice:

Úplný aerobní biologický rozklad

Rozklad chemické sloučeniny nebo organické látky mikroorganismy za přítomnosti kyslíku na oxid uhličitý, vodu, minerální soli dalších přítomných prvků (mineralizace) a novou biomasu.

Primární biologický rozklad

Změny ve struktuře (transformace) chemické sloučeniny činností mikroorganismů vedoucí ke ztrátě specifických vlastností.

Podstata zkoušky:

Biologická rozložitelnost organické látky aerobními mikroorganismy se stanoví ve statickém zkušebním zařízení (respirometr). Zkoušená směs obsahuje anorganické médium, organickou látku (polutant/xenobiotikum, odpad aj.) jako jediný zdroj uhlíku a energie. Dále směsné iokulum získané na čistírně odpadních vod nebo z jiného zdroje prostředí.

Směs se míchá v uzavřené skleněné zkušební nádobě a spotřeba kyslíku se stanovuje buď měřením jeho množství potřebného k udržení konstantního objemu plynu v respirometrické nádobě (elektrochemický respirometr BI 2000, Bioscience USA), nebo měřením objemové nebo tlakové změny (OxiTop, WTW). Vznikající oxid uhličitý se absorbuje vhodnou látkou v respirometrické baňce. Spotřebu kyslíku lze stanovit také pomocí specifických typů

respirometrů např. mikrorespirometr MicroOxymax (Columbus, USA), kde dochází k měření koncentrace kyslíku v plynné fázi pomocí senzoru pracujícího na principu paramagnetické rezonance.

Rozklad se sleduje po dobu 28 dnů, nebo déle (pokud je zapotřebí) automatickým nebo manuálním stanovením spotřeby kyslíku. Spotřeba kyslíku organickou látkou (po korekci srovnáním se slepým stanovením) se vyjadřuje buď v procentech teoretické spotřeby kyslíku (TSK), vypočtené ze vzorce sloučeniny, nebo v procentech chemické spotřeby kyslíku ($CHSK_{Cr}$).

U látek ve vodě dobře rozpustných může být pro získání dodatečných informací o jejich úplném biologickém rozkladu vypočtena odstranitelnost rozpuštěného organického uhlíku (DOC) jeho stanovením na začátku a na konci zkoušky. Pokud je dostupná specifická analytická metoda, lze obdobným způsobem získat také informace o primárním biologickém rozkladu.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

A) zahájení experimentu

- stanovení sušiny zásobní suspenze aktivovaného kalu
- pH a DOC¹ u jednotlivých vzorků (viz. postup)

B) ukončení experimentu

- stanovte sušinu aktivovaného kalu, pH a DOC v jednotlivých reakčních lahvíčkách a pro jednotlivé testované látky podle pokynů vedoucího

A) ZAHÁJENÍ EXPERIMENTU

Chemikálie, roztoky a biologický materiál:

Destilovaná voda k přípravě biomédia (minerálního média)

Destilovaná nebo deionizovaná voda s koncentrací DOC menší než 1 mg/l. Čerstvě připravená destilovaná voda se provzdušňuje přibližně 24 hodin, uchovává nasycena vzdušným kyslíkem a chrání před znečištěním. **Zásobní skleněné láhve na destilovanou vodu se nesmí používat k jiným účelům (ani k přípravě zředovací vody).**

Biomedium (1 litr)

Do cca 800 ml provzdušněné (cca 24 hodin) destilované vody se přidá vždy 1 ml zásobních roztoků A, B, C a F, 5 ml zásobního roztoku D a 20 ml zásobního roztoku E a doplní se provzdušněnou destilovanou vodou po rysku na 1000 ml.

¹ pro stanovení DOC je nutno vzorky přefiltrovat přes filtrační papír min. 3x promytý vroucí destilovanou vodou !!!

Zásobní roztoky:

- A) 22,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 1 litru destilované vody,
- B) 27,5 g CaCl_2 se rozpustí v 1 litru destilované vody,
- C) 0,25 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 1 litru destilované vody,
- D) 10,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se rozpustí v 1 litru destilované vody,
- E) fosfátový pufr o pH 7,2 (8,2 g KH_2PO_4 ; 21,8 g K_2HPO_4 a 44,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 1 litru destilované vody),
- F) roztok stopových prvků: 0,75 g H_3BO_3 ; 3,00 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,10 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,50 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,1813 g $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 1 litru destilované vody.

Inokulum z aktivačního procesu - Zásobní suspenze aktivovaného kalu v biomédii: (5 g/l)

Aktivovaný kal z městské čistírny odpadních vod (odebraný z aerační nádrže), zbavený hrubých nečistot filtrací přes síto, 3x dekatován pitnou vodou a provzdušňován 24 hodin (dvojitý fermentor – laboratoř 106). Po 24 h je stanovena sušina biomasy.

Před zahájením experimentu odeberte pomocí odměrného válce vypočítané množství aktivovaného kalu, centrifugujte při 3000 ot/min po dobu 10 minut a po odlití supernatantu biomasu suspendujte ve zvoleném objemu biomédia tak, aby sušina kalu byla **při samotném testu 500 mg/l**. Zásobní suspenzi připravte **do kádinky (pozor kádinka není odměrné laboratorní sklo!!!)**. Suspenzi je nutné při další práci stále míchat. Stanovte aktuální sušinu AK.

Zásobní roztok srovnávací látky v biomédii (benzoan sodný/glukosa): 2 g/l

Jako srovnávací látka je používána organická látka známé biologické rozložitelnosti, např. benzoan sodný nebo glukosa, jejichž stupeň rozkladu je větší než 60 %. Zásobní roztok srovnávací látky v biomédii se připraví o takové koncentraci, aby vlastní koncentrace srovnávací látky **při samotném testu byla 200 mg/l**.

Zásobní roztok zkoušené látky a.2 v biomédii

Zásobní roztok zkoušené látky v biomédii se připraví o takové koncentraci, aby vlastní koncentrace srovnávací látky **při samotném testu byla 200 mg/l**.

Pracovní postup

Pracovní objem v reakčních lahvičkách je **50 ml**. Stanovení průběhu BSK je nutné provést 3krát vedle sebe. Konkrétní obsazení pozic na přístroji MicroOxymax určí vedoucí cvičení.

Slepý pokus – endogenní respirace:

Do reakční lahvičky se odměří 45 ml biomédia (automatickou byretou) a 5 ml inokula (zásobní suspenze aktivovaného kalu).

Vlastní pokus

A) látka dobře rozpustná ve vodě

Do reakční lahvičky se pipetuje 5 ml zásobního roztoku zkoušené resp. srovnávací látky, 40 ml biomédia a 5 ml inokula (suspenze aktivovaného kalu). Aktuální koncentrace modelové látky cca 200 mg/l (vypočte se z přesné koncentrace roztoku).

B) emulze zkoušené látky a.1 (ve vodě nerozpustná látka) – připravuje se přímo do reakční nádob

Na malé kruhové míchadlo se naváží na analytických vahách cca 10 mg methylesteru řepkového oleje (RME), z přesné navážky se vypočte koncentrace RME v měrné baňce. Kruhové míchadlo se vzorkem se opatrně vloží do reakční baňky (tak aby pokud možno vzorek zůstal na povrchu míchadla). Poté se do baňky odměří 45 ml biomédia, baňka se uzavře zátkou, vloží se do UZ-vany a po dobu 10 minut se nechá ultrazvuk působit. Po této době se baňka vyndá a přidá se 5 ml inokula (suspenze aktivovaného kalu).

Pro oba modelové vzorky i slepé stanovení se totéž odměří do kádinky a po promíchání a filtraci (promytý filtrační papír - červená páska) se měří hodnota pH a provede se stanovení počáteční koncentrace rozpuštěného organického uhlíku. Stejná stanovení (pH, DOC) se provedou také na konci pokusu!!

B) UKONČENÍ EXPERIMENTU A VVYHODNOCENÍ

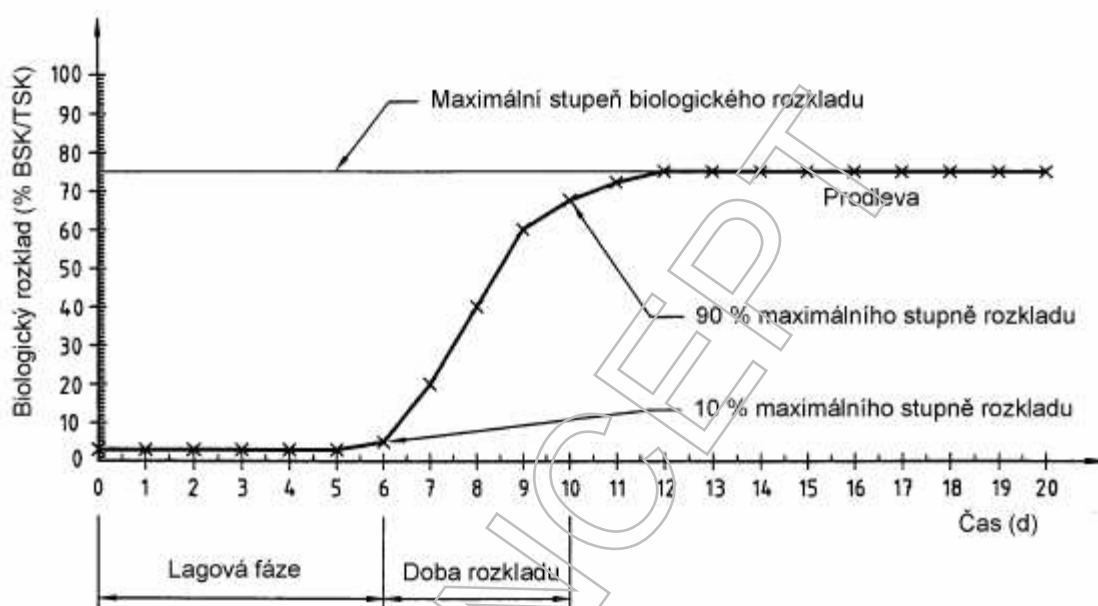
Zpracování a vyhodnocování výsledků měření

1. Do protokolu uveďte:
 - všechny údaje nutné k identifikaci zkoušené látky
 - všechny změřené a vypočtené údaje (např. v tabelární formě)
 - použité koncentrace zkoušené a srovnávací látky a odpovídající hodnoty TSK popr. $CHSK_{Cr}$
 - zdroj, charakteristiku a koncentraci nebo objem použitého inokula a informace o jeho adaptaci či aklimatizaci
 - jakékoliv odchylky od postupu a další okolnosti, které by mohly ovlivnit výsledky
2. Z naměřených dat sestrojte grafické závislosti $BSK_C = f(t)$ samostatně pro každou testovanou látku ve srovnání se sl. pokusem
3. Z naměřených dat sestrojte grafické závislosti $D_{TSK} = f(t)$ resp. $D_{CHSK_{Cr}} = f(t)$ pro všechny testované látky
4. Pro jednotlivé zkoušené látky stanovte následující parametry (viz. obr.1):
 - maximální stupeň rozkladu (podle D_{TSK} resp. $D_{CHSK_{Cr}}$, D_{DOC})
 - 90 % maximálního stupně rozkladu

- 10 % maximálního stupně rozkladu
- lagová fáze
- celkovou dobu rozkladu (vč. lagové fáze)
- klasifikujte zkoušenou látku

PŘÍLOHA :

Příklad křivky biologického rozkladu



Obr.1 Ukázka časového průběhu biologického rozkladu zkoušené látky vyjádřeného jako závislost $D_{TSK} = f(t)$

Substrátová (specifická) biochemická spotřeba kyslíku zkoušené látky

Spotřeba kyslíku v každé nádobě odečtená z respirometru se vyjádří jako biochemická spotřeba kyslíku. Substrátová nebo-li specifická biochemická spotřeba kyslíku BSK_S se vypočte podle rovnice 1.

$$BSK_S = \frac{BSK_C - BSK_{END}}{c_{vz}} \quad /1/$$

kde

BSK_S	substrátová (specifická) biochemická spotřeba kyslíku zkoušené látky	[mg/g]
BSK_C	změřená biochemická spotřeba kyslíku zkoušené látky změřená v čase	[mg/l]
BSK_{END}	změřená biochemická spotřeba kyslíku slepého stanovení (endogenní respirace)	[mg/l]
c_{SL}	hmotnostní koncentrace zkoušené látky	[g/l]

Procento biologického rozkladu zkoušené látky

Biologický rozklad je definován jako poměr substrátové (specifické) biochemické spotřeby kyslíku buď k teoretické spotřebě kyslíku (TSK) nebo k chemické spotřebě kyslíku ($CHSK_{Cr}$). Pro každou zkoušenou látku se vypočte procento biologického rozkladu podle rovnice 2 a/nebo 3.

$$D_{TSK} = \frac{BSK_s}{TSK} \cdot 100 \quad /2/$$

$$D_{CHSK_{Cr}} = \frac{BSK_s}{CHSK_{Cr}} \cdot 100 \quad /3/$$

kde

D_{TSK}	procento biologického rozkladu v TSK	[%]
$D_{CHSK_{Cr}}$	procento biologického rozkladu v $CHSK_{Cr}$	[%]
BSK_s	substrátová (specifická) biochemická spotřeba kyslíku zkoušené látky	[mg/g]
TSK	teoretická spotřeba kyslíku zkoušené látky	[mg/g]
$CHSK_{Cr}$	chemická spotřeba kyslíku zkoušené látky	[mg/g]

Výpočet odstranitelnosti DOC

Jestliže se stanovuje odstranitelnost DOC ve vodě rozpustných látek, vypočte se pro každou nádobu (reakční lahvička) se zkoušenou látkou procento odstranění rozpuštěného organického uhlíku D_{DOC} podle rovnice 4:

$$D_{DOC} = \left(1 - \frac{c_{DOC\ vz\ t} - c_{DOC\ SL\ t}}{c_{DOC\ vz\ t_0} - c_{DOC\ SL\ t_0}} \right) \cdot 100 \quad /4/$$

kde

D_{DOC}	procento odstraněného rozpuštěného organického uhlíku	[%]
$c_{DOC\ vz\ t}$	DOC v reakční lahvičce pro zkoušenou látku v čase t	[mg/l]
$c_{DOC\ SL\ t}$	DOC v reakční lahvičce pro slepé stanovení v čase t	[mg/l]
$c_{DOC\ vz\ t_0}$	DOC v reakční lahvičce pro zkoušenou látku v čase t_0 (na začátku experimentu)	[mg/l]
$c_{DOC\ SL\ t_0}$	DOC v reakční lahvičce pro slepé stanovení v čase t_0 (na začátku experimentu)	[mg/l]

Pokud se $c_{DOC\ vz\ t_0}$ vypočte z koncentrace zkoušené látky, zanedbá se $c_{DOC\ SL\ t_0}$

