



# Praktické zkušenosti s coulometrickým stanovením parametru AT4 na respirometru DIROXAM®

Tomáš Bouda<sup>1)</sup>, Petr Podhájecký<sup>2)</sup>

1) ALS Czech Republic, s.r.o., Na Harfě 336/9, 190 00 Praha 9  
Laboratoř Česká Lípa, Bendlova 1687/7, 470 01 Česká Lípa

2) DIRAM s.r.o., Svojetická 1782/7, 100 00 Praha 10



# ÚVOD



Jednou z metod pro sledování biologické stability odpadů je stanovení **respirační aktivity za 4 dny**, označované jako **AT<sub>4</sub>** (z německého *Atmungsaktivität*). V anglické literatuře se tento parametr označuje též **RA<sub>4</sub>** (*Respiration Activity*). Měří se množství kyslíku vztažené na 1 gram sušiny, spotřebované v průběhu 4 dní aerobními bakteriemi ve vzorku biologicky rozložitelného odpadu.

**Biologická stabilita** je důležitý parametr pro charakterizaci kompostovaných odpadů, kalů, sedimentů atd. Podle **vyhlášky č. 61/2010 Sb.** je biologicky rozložitelný odpad klasifikován jako stabilizovaný, pokud je hodnota parametru **AT<sub>4</sub>** nižší než **10 mg** kyslíku na jeden gram sušiny odpadu.

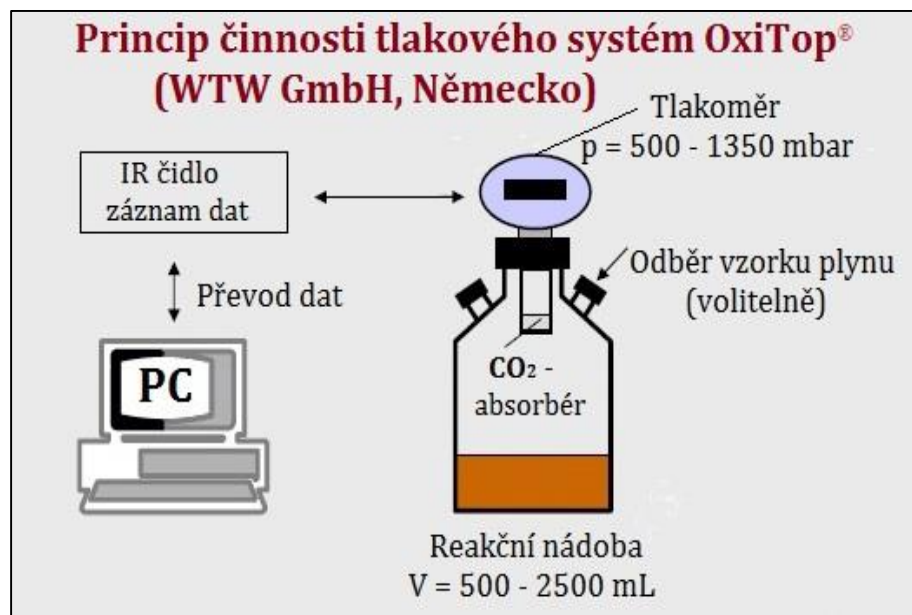
Metoda používaná v ALS Czech Republic, s.r.o. ke stanovení AT<sub>4</sub> vychází z rakouské normy **ÖNORM S2027-4**. Ke stanovení používáme coulometrický respiromat **DIROXAM®** od firmy DIRAM, s.r.o. (ČR).

# Obecné principy měření respirační aktivity $AT_4$



V podstatě existují dva principy stanovení respirační aktivity, a to podtlaková metoda (někdy metoda OxiTop, podle zařízení OxiTop<sup>®</sup> vyráběného firmou WTW GmbH v Německu), u které se stanovuje spotřeba kyslíku měřením poklesu tlaku vzduchu v reakční nádobě, a metoda využívající respirometr, ve kterém se průběžně elektrolyticky generuje spotřebované množství kyslíku.

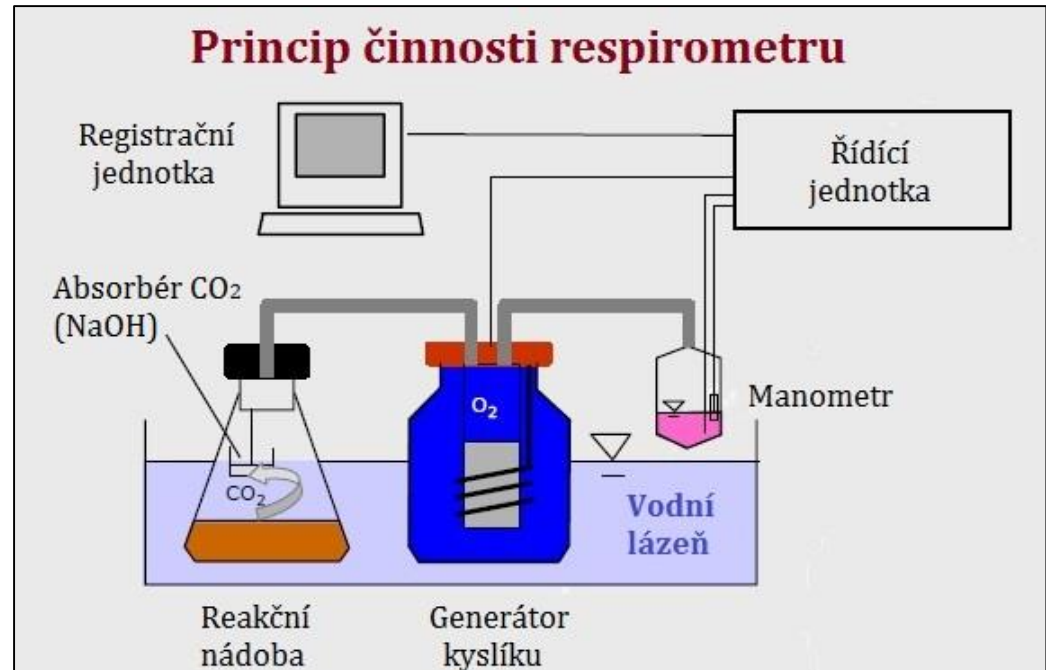
*Metoda je vhodná spíše pro nižší hodnoty parametru  $AT_4$ , je nutná průběžná kontrola tlaku, zařízení neumí automaticky dopouštět vzduch, takže může někdy dojít k znehodnocení měření (vyčerpání kyslíku v nočních hodinách; nelze měřit přes víkend).*



# Obecné principy měření respirační aktivity AT<sub>4</sub>



Princip stanovení respirační aktivity na respirometru **SAPROMAT**<sup>®</sup> (výrobce H+P Labortechnik AG, Německo) je znázorněn na vedlejším obrázku (pro kapalně vzorky, jež se musí navíc míchat). Vlivem aerobního procesu vzniká z organického uhlíku obsaženém ve vzorku CO<sub>2</sub>, který se absorbuje v absorbéru s tuhým NaOH. Vlivem spotřeby kyslíku dojde v reakční nádobě k poklesu tlaku, který je registrován pomocí manometru. Řídící jednotka na základě poklesu tlaku v systému vydá příkaz generátoru kyslíku, ve kterém se elektrolyticky vygeneruje množství kyslíku potřebné k vyrovnání tlaku plynu v systému na původní hodnotu.



Spotřebované množství náboje se registruje v čase. Celé zařízení je umístěno ve vodní lázni, k zajištění stabilní teploty. Po určené době je měření zastaveno a ze vstupních dat hmotností a sušin se vypočítá hodnota parametru AT<sub>4</sub>. Toto zařízení může pracovat automaticky, není závislé na tom, zda vzorek vykazuje nízké či vysoké hodnoty respirační aktivity. Je však poměrně komplikované a relativně velmi drahé.



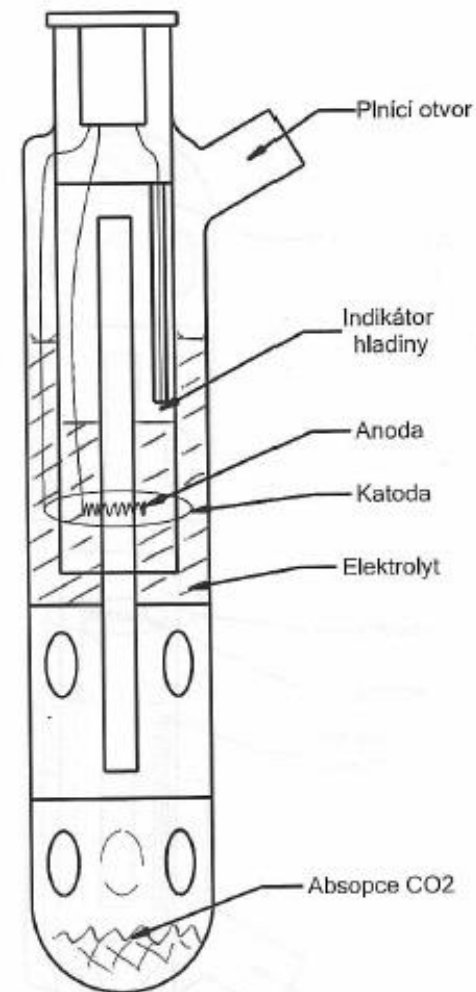
# Stanovení $AT_4$ na respirometru DIROXAM®



DIROXAM® je respirometr firmy Diram s.r.o. pro stanovení **respirační aktivity  $AT_4$** . Vzorky jsou vkládány do skleněných sterilizovatelných nádob, v jejichž víku je hermeticky umístěn elektrochemický manostat uvedený na vedlejším obrázku. Manostat udržuje v reakční nádobě stálý tlak tím, že automaticky doplňuje spotřebovaný kyslík elektrolýzou vody. Produkovaný oxid uhličitý k tlaku v nádobě nepřispívá, jelikož je pohlcován pevným hydroxidem sodným umístěným na dně manostatu. Respirometr ukládá do paměti průběh spotřeby kyslíku vzorkem.

## Přehled parametrů respirometru DIROXAM®

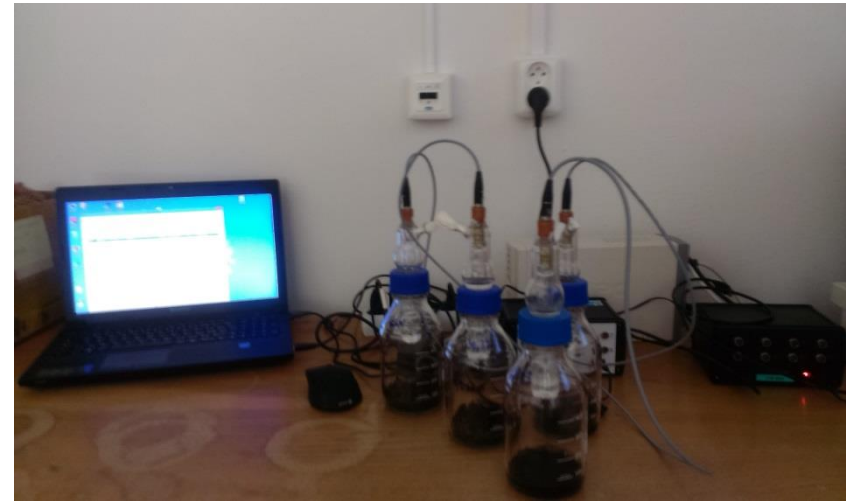
- Rozměry (š x h x v): 170 mm x 120 mm x 85 mm
- Hmotnost: cca 1,2 kg
- Napájení: 9 – 12 V DC, 1000 mA
- Připojení k počítači: konektor USB B
- Připojení reakčních nádob: konektor Rean RT3MP
- Počet nezávislých reakčních nádob: 8
- Objem nádoby: 500 mL



# Technické parametry respirometru DIROXAM®



Elektronika přístroje **DIROXAM®** umožňuje současné měření v osmi reakčních nádobách s elektrochemickými manostaty. Zadání vstupních parametrů testovaných vzorků, spuštění měření a vyhodnocení dat probíhá pomocí ovládacího programu „Diram Measure“. Přístroj se k PC připojuje standardním USB rozhraním. Během měření vzorků pracuje přístroj zcela autonomně, bez nutnosti připojení k počítači. Program dodávaný spolu s přístrojem poskytuje grafické zobrazení průběhu měření a vyhodnocuje parametr  $AT_4$ . Vzhledem k principu měření je třeba pracovat za konstantní teploty. Je možno měření provádět v termostatování místnosti nebo použít termostat.



## Příprava vzorku a jeho skladování

- **Prosívání dodaného vzorku** – na zrnitost menší než 20 mm.
- **Zmenšení velikosti částic** – nadržení pod 10 mm; inert oddělen a zvážen
- **Stanovení sušiny upraveného vzorku** – 100 g vzorku se suší se ve vrstvě silné maximálně 3 cm při  $105 \pm 3$  °C do konstantní váhy.
- **Stanovení pH** – pH výluhu (sušina vzorku/voda = 1:10; doba eluce nejméně 2 h). Hodnota pH musí být v rozmezí 6 – 9.
- **Příprava vzorku k analýze z původního (referenčního) vzorku** – Prosítovaný vzorek eventuálně nadrženy co do velikosti částic se zmenší ve více stupních postupnou kvartací nebo vhodným zařízením na dělení vzorku na množství potřebné k analýze a zbytek vzorku se archivuje.
- **Doprava vzorku a jeho skladování** – Nejpozději 48 hodin po odběru vzorku je třeba ukončit jeho přípravu a začít s měřením. Během této doby jsou teploty nad 4 °C přípustné maximálně po dobu 24 h. Pokud toto nelze dodržet, je třeba vzorek během 24 hodin po odběru zmrazit na -18 až -22 °C. Zamrazení vzorku se musí dokumentovat při vyhodnocování výsledků. Rozmrazení vzorku 24 h před analýzou se provádí maximálně při teplotě místnosti.

# Stručný popis metodiky stanovení AT<sub>4</sub>



## Nastavení obsahu vody na 40 – 50 %

Při obsahu vody ve vzorku mezi 40 % až 50 %, není potřeba vzorek vlhčit, ani sušit a lze ho použít rovnou k analýze.

### a) Obsah vody je nižší než 40 % – 50 %

Přibližně k 300 g analytického vzorku se přidá vhodné množství vodovodní vody, vzorek se dobře promísí a zkusí pěstním testem. Pokud má již správný obsah vody, vykazuje zrnitou strukturu, ale přesto se hned nerozpadá. Ruka může být jen lehce vlhká a měla by být po otevření pěsti lehce „špinavá“ (částice vzorků nezůstávají přilepené). Pokud je obsah vody ještě příliš malý, ruka po otevření pěsti je relativně suchá a čistá. Pokud naopak bylo přidáno příliš velké množství vody, z pěsti po sevření a stlačení voda vytéká a vzorek je nutno nechat vysychat na podložce.

### b) Obsah vody je vyšší než 40 % – 50 %

Přibližně 300 g vzorku se nechá v tenké vrstvě vysychat na podložce, dokud nedojde ke snížení obsahu vody. Správný obsah vody se ověří opět pěstním testem:

Vzorek by měl být v pěsti stlačován opatrně, protože může obsahovat rušivé látky s ostrými hranami (kousky skla, kovu), takže hrozí nebezpečí zranění. Naprostou nutností je použití rukavic.



## Odvětrávání vzorku

Po nastavení obsahu vody ve vzorku, se nechá vzorek ještě nějakou dobu odvětrat na podložce, aby se dobře provlhčil do nejmenších pórů a mikroorganismy měly čas se adaptovat. Toto opatření většinou významně **zkracuje případnou lag-fázi**. Odvětrávání nesmí trvat příliš dlouho, aby nedošlo k vysušení vzorku, který má již nastavený ideální obsah vody.

## Stanovení sušiny zvlhčeného vzorku – pro výpočet $AT_4$

### Příprava měřicí lahve

- Do horní části manostatu se nalije cca 10 mL 10% roztoku  $KH_2PO_4$ , objem se během měření doplňuje demineralizovanou vodou.
- Do střední části manostatu se vloží sušidlo (práškové aktivní uhlí).
- Do spodní části manostatu se vloží pecičkový NaOH v 1 cm vrstvě.
- Do měřicí lahve se naváží nejméně 30 g odvětraného vzorku. Lahev i se skleněným nástavcem se vloží to termostatu (šroubovací uzávěr s manostatem není dotažený) a nechá se cca 2 h vytemperovat při teplotě  $20 \pm 1$  °C.

# Stručný popis metodiky stanovení AT<sub>4</sub>



## Vlastní měření na respirometru DIROXAM®

Po vytemperování měřicích lahví se dotáhne šroubovací uzávěr s manostatem a lahve se připojí k respirometru. Bezprostředně poté se v ovládacím programu „*DIRAM Measure*“ spustí testování jednotlivých lahví (TESTOVAT), které spočívá v počátečním „natlakování“ lahve tak, že dojde k rozpojení obvodu proudu indikační elektrody. Pokud není lahev těsně uzavřena, nedojde k poklesu hladiny elektrolytu v manostatu a k rozpojení indikačního obvodu a není možno zahájit měření.

Je-li vše v pořádku, spustí se měření příkazem **SPUSTIT**. Zadá se název datového souboru a základní údaje o měření:

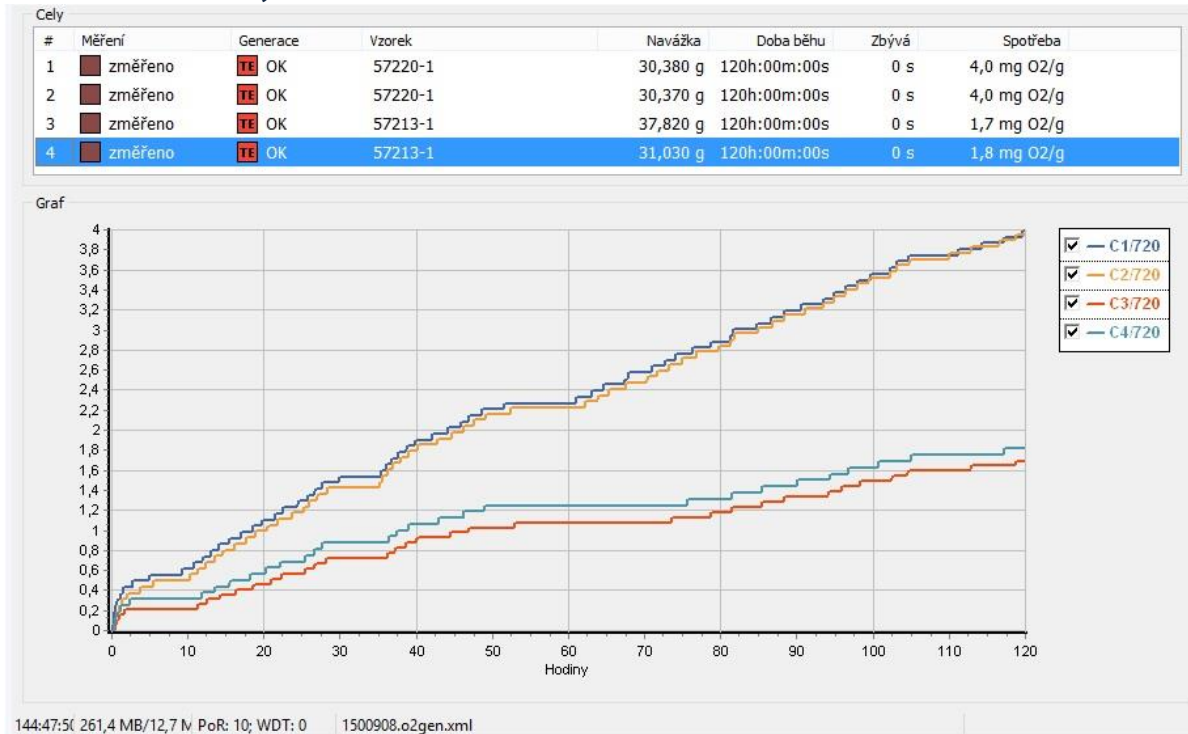
- název vzorku
- sušina upraveného původního vzorku v %
- obsah nedrtitelného podílu (inertní látky) nad 20 mm v %
- sušina zvlhčeného vzorku v %
- navážka zvlhčeného vzorku v g
- doba měření se nastavuje na více dní než požadované 4 dny z důvodu výskytu případné lag-fáze.

**Pokud v průběhu měření je zjištěno, že lag-fáze nenastala, měření je možno ukončit po 4 dnech.**

# Stručný popis metodiky stanovení AT<sub>4</sub>



Během měření se kontinuálně zaznamenává spotřeba kyslíku. Do grafu v ovládacím programu se vynášejí hodinové hodnoty spotřeby kyslíku v mg/g suš. v závislosti na čase, kumulativní křivka:



Po skončení měření se nádoba odpojí od záznamového zařízení a povolí se šroubový uzávěr s manostatem. Pro následující měření se zkontroluje hladina elektrolytu a vloží se nová náplň absorbéru (pecičkový NaOH).

# Stručný popis metodiky stanovení $AT_4$



## Výpočty respirační aktivity $AT_4$

Výpočet hodnoty respirační aktivity  $AT_4$  provádí ovládací program automaticky ze zadaných vstupních hodnot a z naměřené celkové spotřeby kyslíku  $C$  za 4 dny (program umožňuje odečíst hodnotu  $C$  pro čtyřdenní interval na kumulativní křivce s ohledem na lag-fázi; tj. umožňuje nastavit počáteční čas čtyřdenního intervalu na konec lag-fáze).

$$Y = \frac{K \times 100}{(100 - K) \times SP} \quad AT_4 = \frac{C \times 100}{(M \times SZVL) \times (1 + Y)}$$

- SP** [%] - sušina původního upraveného vzorku (odstraněn inert; vzorek nadrcen pod 10 mm);
- K** [%] - obsah nedrtitelného podílu (inertu) v původním vzorku;
- Y** [-] - podíl inertu vůči sušině neinertu v původním vzorku;
- C** [mg] - celková spotřeba kyslíku na analyzované množství zvlhčeného vzorku za 4 dny s ohledem na lag-fázi;
- M** [g] - navážka zvlhčeného vzorku;
- SZVL** [%] - sušina zvlhčeného vzorku;
- $AT_4$**  [mg/g suš.] - spotřeba kyslíku vyjádřená v mg/g sušiny původního vzorku.

# Stručný popis metodiky stanovení AT<sub>4</sub>



## Výsledkový protokol

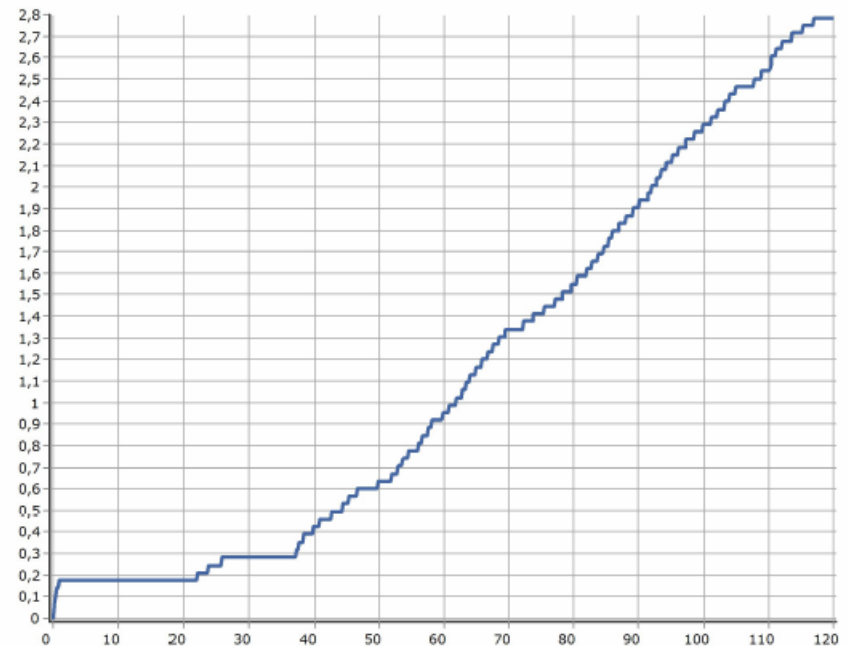
Na dalším obrázku je uveden výpis měřicího protokolu po ukončení měření vzorku na respirometru DIROXAM<sup>®</sup>.

## Vyjadřování výsledků

Výsledky se uvádějí na 2 platné číslice ve tvaru **X (U<sub>r</sub>)**, kde X je výsledek stanovení AT<sub>4</sub> a U<sub>r</sub> je relativní rozšířená nejistota stanovení v %, odpovídající 95% intervalu spolehlivosti. Jestliže je stanovená hodnota menší než mez stanovitelnosti metody, uvádí se výsledná hodnota formou “< mez stanovitelnosti”.

### PROTOKOL MĚŘENÍ

Vzorek:	27568-2a		
Poznámka:			
Procentický obsah inertu ve vstupním vzorku:	12,0 %	Plán běhu:	120h:00m:00s
Sušina neinertní části vstupního vzorku:	84,0 %	Začátek měření:	13. 5. 2015 8:23:03
Sušina zvlhčeného vzorku ke stanovení AT <sub>4</sub> :	63,0 %	Konec měření:	18. 5. 2015 8:23:03
Navážka zvlhčeného vzorku ke stanovení AT <sub>4</sub> :	36,94 g	Doba měření:	120h:00m:00s
pH vzorku:	7,9		
Celkové množství generovaného O <sub>2</sub> :	75,3 mg		
Celková spotřeba:	2,8 mg O <sub>2</sub> /g suš.		
Vyhodnocení provedeno:	Ano		
Datum vyhodnocení:	18. 5. 2015 12:59:12		
Metoda:	AT <sub>4</sub>		
Respirační aktivita:	2,1 mg O <sub>2</sub> /g suš. (22 - 118 h)		





# Validační charakteristiky metody stanovení $AT_4$



## Přesnost metody stanovení respirační aktivity $AT_4$

Coulometrické metoda je absolutní metoda, pokud je zajištěna těsnost nádoby, což řídicí program respirometru kontroluje, odpovídá množství náboje prošlé elektrolyzérem manostatu aerobní spotřebě kyslíku.

Ověřeno spotřebou kyslíku na oxidaci tuhého siřičitanu sodného (průměrný výtěžek z 5 měření byl 91.3 %) resp. porovnáním spotřeby kyslíku respirometrem a ekvivalentního množství kyslíku odpovídající vyloučenému množství stříbra za dobu měření (výtěžek 105,7 %).

## Preciznost metody stanovení respirační aktivity $AT_4$

Preciznost stanovení  $AT_4$ , vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, byla při validaci metody stanovená z 6-sobného opakovaného měření 2 různých vzorků (9.1 % a 12.5 %).

Vyhodnocením 42 duplicitních stanovení respirační aktivity provedených v posledních 6 měsících, viz následující tabulku, byly stanoveny hodnoty relativní směrodatné odchylky opakovatelnosti 9.2 % až 10.2 %, což odpovídá **relativní rozšířené nejistotě stanovení 20 %**. Tato NM v podstatě odpovídá NM zjištěné při validaci metody, a odpovídá i NM zjištěné v jiných laboratořích (např. Sv. Krýsl, 2012).

# Validační charakteristiky metody stanovení AT<sub>4</sub>



Vyhodnocení preciznosti metody stanovení AT<sub>4</sub> z duplicitních stanovení

Interval AT <sub>4</sub>	n	Průměr AT <sub>4</sub>	Sm. odch. AT <sub>4</sub>	RSO	NM
mg/g suš.		mg/g suš.	mg/g suš.	%	%
0.0 – 4.0	20	2.14	0.21	9.8	20
4.1 – 10.0	13	5.60	0.57	10.2	20
10.0 – 75	9	24.6	2.25	9.2	20

## Detekční limit a mez stanovitelnosti metody stanovení AT<sub>4</sub> na respirometru DIROXAM®

Detekční limit metody  $L_D(AT_4)$ , odhadnutý ze směrodatné odchylky opakovatelnosti duplicitních stanovení s hodnotou AT<sub>4</sub> pod 1.2 mg/g suš., je 0.2 mg/g suš.

Mez stanovitelnosti metody  $L_Q(AT_4)$ , odhadnutý jako trojnásobek detekčního limitu  $L_D(AT_4)$ , je 0.6 mg/g suš.

# Další možnosti použití respirometru DIROXAM®



V respirometru DIROXAM® lze snadno měřit kromě respirační aktivity po 4 dnech,  $AT_4$ , též respirační aktivitu po 7 dnech,  $AT_7$ , pouhým prodloužením měření. Též lze měření respirační aktivity provádět při různých teplotách.



Respirometr DIROXAM® opatřený bočním míchadlem lze velmi efektivně používat i ke stanovení biodegradability různých látek, měření probíhá kontinuálně podle normy OCDE/OECD Ready Biodegradability, Part 301 F, „MANOMETRIC RESPIROMETRY TEST“.

## DĚKUJEME ZA POZORNOST!

Veškeré dotazy na stanovení  $AT_4$  nebo na stanovení biologické odbouratelnosti směřujte na Ing. T. Boudu, CSc.:

[Tomas.Bouda@ALSglobal.com](mailto:Tomas.Bouda@ALSglobal.com)

+420 602 144 727

Technické problémy týkající respirometru DIROXAM® a jeho dodání směřujte na ing. P. Podhájeckého, CSc.:

[DIRAM@DIRAM.cz](mailto:DIRAM@DIRAM.cz)

+420 603 713 834

