

Teresa Jamroz, Stanisław Ledakowicz, Renata Żyła, Barbara Sencio

## Biologiczna ocena skuteczności odbarwiania roztworów barwników w procesie pogłębionego utleniania

Barwniki obecne w ściekach (najczęściej przemysłowych), jako związki trwałe, trudno ulegają degradacji, zarówno metodami fizyczno-chemicznymi jak i biologicznymi, i najczęściej są jedynie adsorbowane przez biomasę osadu czynnego i wraz z nią usuwane ze ścieków. Nawet niewielkie stężenia barwników w wodach naturalnych w znacznym stopniu ograniczają przepuszczalność światła. Zjawisko to zwiększa zagrożenie deficytem tlenowym, gdyż zostaje utrudniony proces fotosyntezy prowadzony przez glony i rośliny obecne w środowisku wodnym. W wielu wypadkach mikroorganizmy nie mogą metabolizować wszystkich zanieczyszczeń obecnych w ściekach (ze względu na ich trwałą budowę), a często także z powodu toksycznego działania tych związków. Z tych też względów, w celu rozkładu trudno degradowalnych cząsteczek do form bardziej podatnych na działanie mikroorganizmów, zalecane jest stosowanie metod bezpiecznego rozkładu chemicznego, nie powodującego wtórnego skażenia środowiska. Wymogi te spełniają tzw. metody pogłębionego utleniania (AOPs – *Advanced Oxidation Processes*), wykorzystujące działanie takich czynników utleniających, jak ozon i nadtlenek wodoru oraz promieniowanie UV.

Biologiczna kontrola oddziaływania zanieczyszczeń oraz produktów ich rozkładu na środowisko jest podstawą oceny stanu jego zagrożenia. Coraz częściej do określania działania substancji toksycznych wykorzystywane są organizmy żywe, tzw. bioindykatory, a wśród nich mikroorganizmy uczestniczące w biodegradacji zanieczyszczeń obecnych w ściekach [1]. Istotną grupę spośród nich stanowią bakterie reprezentujące ważne ogniwo łańcucha pokarmowego w ekosystemie wodnym. Zaletami wykorzystania bakterii jako organizmów wskaźnikowych są:

- możliwość uzyskania homogennej zawiesiny komórek,
- specyficzna wrażliwość gatunkowa organizmów,
- krótki czas odpowiedzi na reakcję z toksykantem.

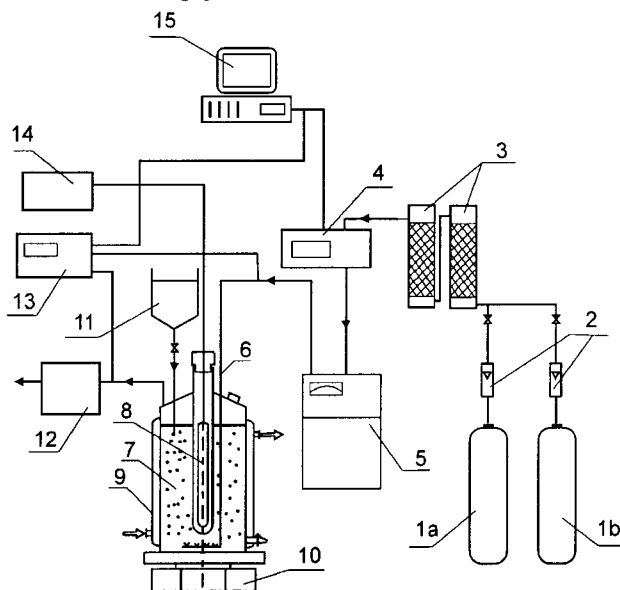
Zastosowanie metod bioindykacyjnych ze szczególnie wrażliwymi gatunkami pozwala na wykrycie obecności niebezpiecznych substancji biologicznie czynnych uwalnianych do środowiska wodnego, metabolizowanych przez organizmy należące do różnych poziomów łańcucha troficznego.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań modelowych dotyczących biologicznej oceny procesu odbarwiania wodnych roztworów barwnika azowego *Reactive Blue 81* metodą pogłębionego utleniania, z zastosowaniem ozonu, nadtlenku wodoru i promieniowania UV, w układach pojedynczych i złożonych.

### Metodyka badań

W badaniach zastosowano reaktywny barwnik azowy *Reactive Blue 81*, który jest powszechnie stosowanym związkiem w przemyśle włókienniczym. Przygotowano wodne roztwory barwnika o stężeniach 100–1000 g/m<sup>3</sup>, które poddano odbarwianiu w układach czynników utleniających zawierających ozon, nadtlenek wodoru i promieniowanie UV. Badania wykonano w reaktorze o pojemności 1 dm<sup>3</sup>, wyposażonym w lampę emitującą promieniowanie UV o długości fali 254 nm. Schemat stanowiska doświadczalnego przedstawiono na rysunku 1, a zastosowane parametry odbarwiania podano w tabeli 1.

Proces utleniania prowadzono do momentu uzyskania całkowitego odbarwienia roztworu. Zanik barwy kontrolowano przy użyciu spektrofotometru HP 8452A na podstawie wygasania widma dla długości fali λ=584 nm, przy której uzyskano maksimum absorpcji barwnika *Reactive Blue 81*.



Rys. 1. Schemat aparatury badawczej (1 – butle z tlenem, 2 – rotametry, 3 – osuszacz gazu (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 4 – miernik przepływu tlenu, 5 – generator ozonu, 6 – wlot gazu, 7 – fotoreaktor, 8 – lampa UV, 9 – płaszczki termostatujące, 10 – mieszadło magnetyczne, 11 – dawkowownik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 12 – neutralizator ozonu, 13 – miernik stężenia ozonu, 14 – zasilacz lampy UV, 15 – komputer)

Tabela 1. Parametry procesu utleniania

Czynnik utleniający	Dawka O <sub>3</sub> mmol/dm <sup>3</sup>	Dawka H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mmol/dm <sup>3</sup>	Dawka UV hv/min·dm <sup>3</sup>
O <sub>3</sub>	4,79	–	–
O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4,79	7,25	–
O <sub>3</sub> /UV	5,41	–	3,23·10 <sup>20</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	–	72,5	3,23·10 <sup>20</sup>

Biologiczne skutki działania zastosowanych metod odbarwiania roztworów barwnika sprawdzono za pomocą testów z udziałem bakterii, które są zalecane do oceny toksyczności [2,3]. W badaniach zastosowano klasyczną metodę kontroli liczebności populacji z wykorzystaniem szczepów bakteryjnych, zarówno gatunków gram-ujemnych *Escherichia coli* i *Pseudomonas putida*, jak i gram-dodatniego gatunku *Bacillus subtilis*.

Do każdej serii doświadczeń przygotowano świeży materiał biologiczny. W tym celu zmyto kulturę bakterii ze skosów agarowych, a następnie przeszczepiono ją do podłoża bulionowego YMA o następującym składzie: wyciąg mięsny – 0,04%, enzymatyczny wyciąg kazeiny – 0,54%, hydrolizat drożdży – 0,17%, pepton – 0,4%, NaCl – 0,35%. Po 48-godzinnej inkubacji w temperaturze optymalnej dla każdego szczepu wyhodowaną kulturę bakterii odwirowano i przemyto trzykrotnie wodą buforowaną. Przygotowaną w ten sposób zawiesinę bakteryjną standaryzowano tak, aby stężenie wyjściowe populacji po wprowadzeniu do badanych próbek wynosiło  $10^8$  komórek w  $\text{cm}^3$ . W celu oznaczenia liczebności żywych komórek stosowano metodę Kocha. Posiewy z próbek wykonano w zakresie stężeń  $10^1$ – $10^8$   $\text{cm}^{-3}$ , stosując jako podłoże wzrostowe 1,5% agar odżywczy [4].

Po 48-godzinnej ekspozycji zawiesiny bakterii w roztworach barwnika określono liczbę żywych komórek w populacji i obliczono stopień inhibicji bakterii (I, %) z zależności:

$$I = \frac{B_0 - B_n}{B_0} 100 \quad (1)$$

gdzie:

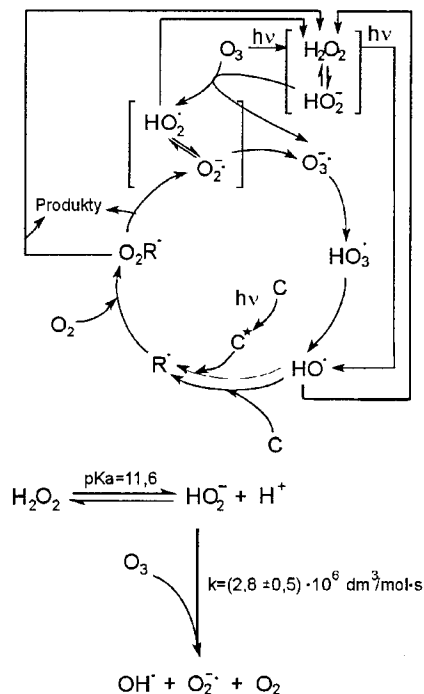
$B_n$  – liczba komórek w 1  $\text{cm}^3$  próbki po czasie  $t_n$

$B_0$  – liczba komórek w 1  $\text{cm}^3$  próbki kontrolnej (bez barwnika) w czasie  $t_0$

## Dyskusja wyników

Bezpośredni atak ozonu następuje częściej w środowisku kwasowym lub wtedy, gdy substancje rozpuszczone w roztworze reagują bardzo szybko z cząsteczką ozonu. Są to reakcje bardzo selektywne i tylko nieliczna grupa związków może być w ten sposób utleniona. Pośredni atak ozonu odbywa się poprzez wolne rodniki, wytworzone podczas reakcji z wodą i jej składnikami. Dominującą rolę w tym procesie odgrywają rodniki hydroksylowe, które są bardzo reaktywne. Procesy rodnikowe przeważają w środowisku zasadowym i przez to, że nie są selektywne, mogą utleniać bardzo różne typy związków [5]. Z tych względów w procesach pogłębionego utleniania wprowadza się czynniki promujące powstawanie rodników hydroksylowych, takie jak  $\text{H}_2\text{O}_2$  lub promieniowanie UV. W obecności promieniowania UV ozon rozkłada się do form rodnikowych z wytworzeniem niewielkiej ilości  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Wytworzony nadtlenek wodoru reaguje z cząsteczką ozonu tworząc rodniki, które z kolei mogą reagować ze związkami organicznymi. Wprowadzenie do układu dodatkowej porcji nadtlenu wodoru powoduje zwiększenie wydajności tej reakcji (rys.2).

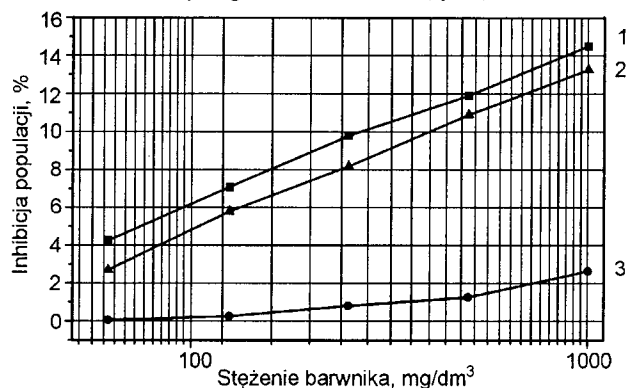
W wypadku utleniania prowadzonego w układzie  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  mechanizm reakcji jest taki sam jak na schemacie przedstawionym na rysunku 2, przy czym w reakcjach nie uczestniczą rodniki pochodzące bezpośrednio z rozkładu ozonu. Nadtlenek wodoru pod wpływem promieniowania UV – podobnie jak ozon – rozkłada się do rodników. Określenie



Fys. 2. Mechanizm działania ozonu w obecności  $\text{H}_2\text{O}_2$  i UV

ewentualnych zagrożeń wynikających z rodnikowego mechanizmu procesów pogłębionego utleniania jest trudne i wymaga specyficznych badań fizyczno-chemicznych oraz biologicznych.

W wstępnym etapie badań scharakteryzowano oddziaływanie barwnika na zachowanie aktywności życiowej szczepów *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* oraz *Bacillus subtilis*. W oparciu o przeprowadzoną kontrolę liczebności populacji otrzymano dane niezbędne do wykreślenia krzywych inhibicji, charakteryzujących odpowiednio każdy z trzech testowanych gatunków bakterii (rys.3).

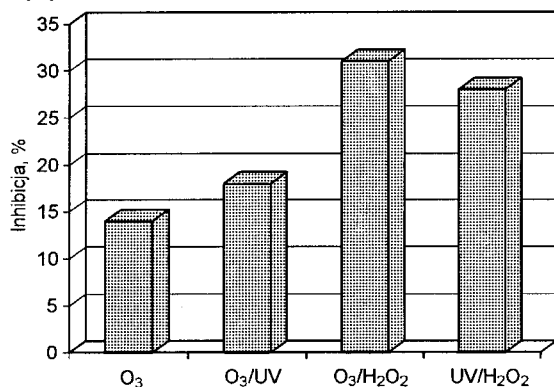


Fys. 3. Inhibicja wzrostu bakterii *E. coli* – 1, *B. subtilis* – 2 i *P. putida* – 3 po 48 h ekspozycji w roztworach barwnika azowego Reactive Blue 81

Na podstawie analizy uzyskanych wyników można stwierdzić, że reaktywny barwnik azowy Reactive Blue 81 w stężeniu do 1000  $\text{g}/\text{m}^3$  nie wykazywał toksycznego działania w stosunku do badanych szczepów. Najbardziej wrażliwym szczepem na obecność tego barwnika okazał się gatunek *E. coli*, w wypadku którego wartość inhibicji była najwyższa i wynosiła 14,5%. Z tego względu do dalszych badań wytypowano bakterie z gatunku *E. coli*.

Obecność reaktywnych rodników powstałych w wyniku zastosowania metod pogłębionego utleniania stwarza niebezpieczeństwo wystąpienia niekontrolowanych reakcji prowadzących

do powstania szkodliwych związków biologicznie aktywnych. W celu określenia działania powstałych rodników w przeprowadzono badania kontrolne przeżywalności bakterii *E. coli* w wodzie po zastosowaniu czynników utleniających (rys.4). W wypadku działania samego ozonu, jak również w połączeniu z promieniowaniem UV, nie stwierdzono ich negatywnego wpływu na komórki wybranego szczepu, co potwierdzają dane, których wartość inhibicji nie przekroczyła 18%. Zastosowanie natomiast skojarzonego działania ozonu z nadtlaniem wodoru i nadtlenu wodoru z promieniowaniem UV wywołało znacznie wyższą inhibicję populacji szczepu, wynoszącą około 30%



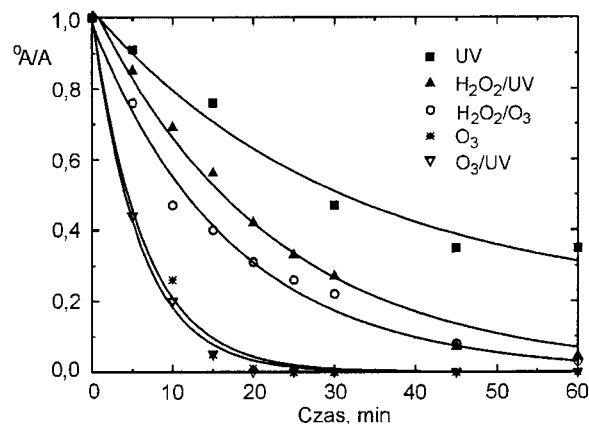
Rys. 4. Inhibicja populacji *E. coli* w wodzie po działaniu czynników utleniających

Proces odbarwienia roztworów barwników metodą utleniania przebiega w dwu etapach. W pierwszej kolejności następuje szybkie utlenienie do związków bezbarwnych, natomiast dalsze utlenienie przejściowych produktów bezbarwnych zachodzi już znacznie wolniej. Obniżenie barwy roztworu z zastosowaniem zaawansowanego utleniania nie jest równoznaczne z całkowitym rozkładem związku do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O, i z tego względu należy sprawdzić, czy metoda odbarwienia jest bezpieczna dla środowiska, w którym zachodzą te procesy.

W wypadku analizowanych metod odbarwienia roztworów barwnika azowego *Reactive Blue 81* najszybszy efekt nastąpił dla układów, w których zastosowano ozon. Ozon charakteryzuje się dużą reaktywnością w stosunku do grup chromoforowych. Szczególnie szybko reaguje on z grupą karboksylową wchodzącą w skład cząsteczek barwników kadziowych i indygosoli oraz skutecznie oddziałuje z grupą azową [6]. Wzmocnienie działania ozonu przez wprowadzenie do układu promieniowania UV nie spowodowało zmiany szybkości odbarwienia roztworów barwnika. Krzywe zaniku barwy podczas utleniania ozonem i w układzie O<sub>3</sub>/UV praktycznie się pokrywały (rys.5).

Podczas procesu odbarwienia z zastosowaniem układów zawierających O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/UV oraz O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> możliwy jest podobny przebieg reakcji utleniania barwnika, a więc można by było się spodziewać, że powstałe produkty będą wykazywać taki sam charakter oddziaływania biologicznego. Przy zastosowaniu układu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV mechanizm reakcji przebiega z udziałem rodników, w związku z czym produkt utleniania może być inny niż w pozostałych wypadkach.

W oparciu o wyniki badań przeżywalności bakterii *E. coli* stwierdzono, że odbarwienie roztworów barwnika za pomocą ozonu (80% żywych komórek) oraz połączonego działania ozonu i promieniowania UV (76% żywych komórek) pozwoliło na zachowanie życiowej aktywności *E. coli* na poziomie porównywalnym z wynikami dla roztworu przed procesem utleniania (94% żywych komórek). Potwierdzeniem tego



Rys. 5. Przebieg krzywych zaniku barwy w roztworach *Reactive Blue 81* pod wpływem utleniania (dawka UV – 3,23 hv/min·dm<sup>3</sup>, dawka O<sub>3</sub> – 4,79 mmol/dm<sup>3</sup>, dawka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 72,5 mmol/dm<sup>3</sup>)

faktu było niewielkie obniżenie liczebności populacji badanego szczepu z poziomu 10<sup>8</sup> do 10<sup>6</sup> komórek w 1 cm<sup>3</sup>, co stanowiło dla czynników utleniających zastosowanych w układzie O<sub>3</sub> inhibicję 20%, natomiast dla układu O<sub>3</sub>+UV inhibicję 24%. Odbarwienie roztworów barwnika prowadzone przy udziale nadtlenu wodoru i promieniowania UV spowodowało 48% inhibicję szczepu, co związane było z obniżeniem liczebności populacji do poziomu 10<sup>4</sup> komórek w 1 cm<sup>3</sup>. W wypadku odbarwienia roztworu barwnika przy udziale nadtlenu wodoru i ozonu inhibicja wzrosła do 67%, a liczba żywych bakterii *E. coli* obniżyła się do 10<sup>2</sup> w 1 cm<sup>3</sup>. Proces odbarwienia roztworów barwnika prowadzony w układzie skojarzonego działania nadtlenu wodoru z ozonem, bądź z promieniowaniem UV, wywarł najbardziej niszczący wpływ na komórki testowanego szczepu. Efekt takiego działania mógł być spowodowany pozostałością nieprzereagowanego nadtlenu wodoru w roztworze lub zwiększonym tworzeniem wolnych rodników w tym układzie utleniającym.

## Podsumowanie

Do oceny efektów działania metod pogłębionego utleniania przy udziale ozonu, ozonu z nadtlaniem wodoru, ozonu z promieniowaniem UV oraz nadtlenu wodoru z promieniowaniem UV, zastosowanych do odbarwienia roztworów barwnika azowego *Reactive Blue 81*, przeprowadzono badania toksyczności powstałych związków przy udziale szczepu *Escherichia coli*. W oparciu o analizę wyników badań można stwierdzić, że metody pogłębionego utleniania, wykorzystujące działanie ozonu oraz ozonu w obecności promieniowania UV, spowodowały najszybsze odbarwienie roztworu i jednocześnie pozwoliły na zachowanie wysokiej przeżywalności analizowanego szczepu bakterii. Silnie niszczące działanie w stosunku do populacji szczepu *E. coli* stwierdzono w wyniku zastosowania układów utleniania zawierającego nadtlenu wodoru w połączeniu z ozonem oraz nadtlenu wodoru w połączeniu z promieniowaniem UV.

Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że do uzyskania efektu odbarwienia roztworów barwnika preferowany jest mechanizm bezpośredniej reakcji ozonu z barwnikiem, a wprowadzenie dodatkowo innych czynników promujących rodniki hydroksylowe znacznie podwyższa toksyczność produktów utleniania.

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że przy wyborze skutecznych metod odbarwienia konieczne jest prowadzenie

dodatkowo oceny ich biologicznego oddziaływania, uwzględniającej bezpieczeństwo warunków życia organizmów w środowisku wodnym.

#### LITERATURA

1. Z. KAŃSKA, M. ŁEBKOWSKA: Badanie toksykologiczne dla kontroli jakości wód. *Biotechnologia*, 1994, 2(25), ss. 98–113.
2. G. BITTON, B. J. DUTKA: *Toxicity Testing Using Microorganisms*. CRC Press Inc., I, II, 1989.
3. G. PERSOONE, C. R. JANSSEN: *Handbook of Ecotoxicology* [Ed. P. CALOW]. Blackwell Scientific Publication, I, 1993.
4. Z. KAŃSKA, A. GRABIŃSKA-ŁONIEWSKA, M. ŁEBKOWSKA, E. RZECZOWSKA: *Ćwiczenia laboratoryjne z biologii sanitarnej*. Wyd. Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1993.
5. B. LANGLAIS, D. A. RECKKOW, D. R. BRINK: *Ozone in Water Treatment, Application and Engineering*. Cooperative Research Report, Lewis Publishers, New York 1991.
6. S. LEDAKOWICZ, L. GĘBICKA, J. PERKOWSKI, R. MACIEJEWSKA: Kinetics of the decolourisation by Fenton's reagent. *Proc. Int. Regional Conference, IOA, Poitiers 1998*, pp. 381–388.

### Biological Estimation of the Effect of Dye Removal via Advanced Oxidation Processes

*The decolorization process under test carried out by advanced oxidation processes (AOPs) and its effect on the survival of bacteria was studied. Aqueous solutions of reactive dyestuff (Reactive Blue 81; 100 mg/dm<sup>3</sup>) were decolorized by using O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>/UV, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV as oxidizing agents. Each oxidation process was discontinued after complete decolorization had been achieved. The toxicity of the intermediates formed in the course of the AOPs was determined by the growth test method.*

*The results showed that untreated dyestuff had no toxic effect on the bacterial cultures made use of in the study (*E. coli*, *P. putida*, *B. subtilis*) up to the dye concentration of 1000 mg/dm<sup>3</sup>. Decolorization in the presence of O<sub>3</sub> or O<sub>3</sub>/UV exerted no detrimental effect on *E. coli*. In the presence of O<sub>3</sub>/HO<sub>2</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, bacterial growth was seriously inhibited (from 48 to 67%).*