

**Anna LIS, Łukasz PASON, Longina STĘPNIAK**

Politechnika Częstochowska, Instytut Inżynierii Środowiska  
ul. Brzeźnicka 60a, 42-200 Częstochowa  
e-mail: anna\_lis@outlook.com

## Przegląd stosowanych metod oznaczania aktywności biologicznej filtrów węglowych

### Review of Methods Used to Indication of Biological Carbon Filters Activity

Water purification based on granulated active carbon filters (GAC) is more and more popular recently. It's caused by simplicity, low overall costs and high efficiency of this method in disposal of the removing organic water contaminations. To achieve full productivity, granulated active carbon filters must be settled by microorganisms living in water. Living cells of bacteria use many organic water contaminations as a source of carbon. Mostly, from the GAC filters are isolated *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* or *Bacillus* genera. To establish working carbon filters true activity, defining amount of living bacteria cells at the granulated carbon volume unit is required. Today's researchers propose for that purpose both classical microbiological methods based on the bacteria culture and sophisticated colorimetric analysis of the enzymatic reactions conducted by microorganisms. Some of them are method using FDA reduction by esterases to the fluoresceine efficient to establish amount of living bacterial cells, method with TTC which is reduced to red formazan by bacteria, quantitative indication of ATP in samples or usage of glucose labeled by carbon <sup>14</sup>C isotope.

**Keywords:** water treatment, active carbon, biological activity, bacteria, TTC, FDA, fluoresceine, ATP

### Wstęp

Wody powierzchniowe i podziemne mogą zawierać zanieczyszczenia mikrobiologiczne oraz chemiczne, które muszą być usunięte i/lub inaktywowane podczas procesu uzdatniania wody. Jakość wody powinna spełniać odpowiednie warunki dotyczące jej czystości w zakresie tych parametrów [1]. Pogarszająca się jakość wód powierzchniowych wykorzystywanych do produkcji wody pitnej oraz rosnące wymagania stawiane wodzie przeznaczonej do spożycia wymuszają poszukiwanie bardziej skutecznych metod jej oczyszczania [2]. W ostatnich latach technologia uzdatniania wody na granulowanym węglu aktywnym (GWA) cieszy się coraz większym zainteresowaniem. Proces adsorpcji zanieczyszczeń na węglu aktywnym poprzedzają takie procesy, jak np: wstępne utlenianie, koagulacja czy filtracja na filtrach piaszkowych pośpiesznych. Ostatnim etapem uzdatniania wody niezależnie

od źródła ujmowania jest dezynfekcja, pozwalająca usunąć wszelkie potencjalnie niebezpieczne dla zdrowia ludzi mikroorganizmy, zapewniając tym samym bezpieczeństwo sanitarne wody [3].

Do najważniejszych zalet technologii wykorzystującej węgiel aktywny należy wysoka skuteczność usuwania z wody zanieczyszczeń organicznych, nawet tych występujących w ilościach śladowych. Węgiel adsorbuje również metale ciężkie, np. chrom i kobalt, oraz związki nieorganiczne. Sorpcji ulegają także wirusy odporne na chlorowanie. Inne zalety to: możliwość stabilizacji biologicznej uzdatnionej wody, brak wtórnych efektów zanieczyszczenia wody, obniżenie zapotrzebowania na środki dezynfekcyjne, akceptowalnie niskie koszty stosowania węgla aktywnego [4, 5].

Filtry węglowe są jednym z najskuteczniejszych instrumentów zaawansowanego oczyszczania wody z aktualnie stosowanych metod jej uzdatniania. Jednakże uzyskanie odpowiedniej jakości wody pod względem czystości chemicznej i biologicznej jest ograniczone przez szereg czynników. Ważnymi czynnikami, mającymi wpływ na pracę obecnie stosowanych filtrów węglowych, są etapy wstępnego uzdatniania wody. Proces koagulacji zanieczyszczeń przed podaniem wody na złoża węglowe prowadzi do znacznego zmniejszenia obciążenia węgla aktywnego, co umożliwia jego dłuższą i wydajną eksploatację. Proces wstępnego ozonowania zapewnia z kolei wysoką aktywność biologiczną w złożach filtrowych wskutek likwidacji większości mikroorganizmów obecnych w wodzie, które mogłyby stanowić konkurencję pokarmową dla mikroflory zasiedlającej złoża [4]. Biologiczna aktywacja granulowanego węgla aktywnego wydłuża czas jego pracy na skutek ciągłego odnawiania powierzchni dostępnej dla procesu adsorpcji i umożliwia skuteczniejsze usuwanie z wody niebezpiecznych zanieczyszczeń. Z drugiej jednak strony biofilm to żywa struktura zasiedlona przez liczne drobnoustroje, które w czasie nadmiernego wzrostu odrywają się od złoża i mogą przechodzić do wstępnie uzdatnionej wody i w rezultacie stać się źródłem trwałego skażenia mikrobiologicznego systemu uzdatniania wody [6].

Na jakość wody odpływającej z filtrów węglowych wpływa bezpośrednio rodzaj zastosowanego węgla aktywnego. Granulacja i struktura porowata, według badań Kijowskiej i innych [7], wpływa na zdolność biomasy do zasiedlania złoża, a więc i na intensywność procesów biochemicznych zachodzących w filtrze. Analizowany w badaniach wyżej wymienionych autorów węgiel Norit, charakteryzujący się granulacją  $0,6 \div 0,8$  mm, wykazywał niższą aktywność mikroorganizmów niż węgiel Chemviron, charakteryzujący się uziarnieniem  $0,8 \div 2,0$  mm. Nie bez znaczenia jest również skład jakościowy i ilościowy mikroorganizmów zasiedlających złoża węgla. Różne bowiem gatunki bakterii są zdolne do wykorzystywania różnego typu związków organicznych jako źródła węgla, co przekłada się na skuteczność degradacji poszczególnych związków organicznych [8]. Często izolowane ze złoża węgla aktywnego stosowanego w procesie uzdatniania wody gatunki bakterii to *Pseudomonas picketti* czy *Xantomonas maltophila* [9].

## 1. Procesy biodegradacji zanieczyszczeń w złożach filtrów węglowych

O swoistych właściwościach granulowanych węgla aktywnych wykorzystywanych w procesach uzdatniania wody decyduje ich duża powierzchnia właściwa, sięgająca setek metrów kwadratowych w przeliczeniu na gram, dzięki dobrze rozbudowanej strukturze występujących w nich porów. Na wytworzenie takiej struktury ma wpływ wybór surowca do produkcji danego węgla aktywnego oraz sposób prowadzenia jego aktywacji. Dobre rezultaty w tym zakresie uzyskuje się, wytwarzając węgle aktywne z węgla kamiennego. Produkt taki jest wystarczająco wydajny, jeśli chodzi o oczyszczanie wody pitnej. Wyróżnia się trzy grupy porów w zależności od ich rozmiaru: makropory o średnicy  $> 50$  nm, mezopory o średnicy  $2\div 50$  nm, mikropory o średnicy  $< 2$  nm [10, 11]. Zasadniczo mikropory stanowią większość wewnętrznej powierzchni ziaren węgla i są w stanie zaadsorbować zanieczyszczenia rozmiarów pojedynczych cząsteczek chemicznych. Makropory i mezopory są za duże, aby w skuteczny sposób adsorbować. Pełnią rolę transportową, dzięki czemu cząsteczki doprowadzane są do obszarów adsorpcyjnych [12].

Wykorzystanie węgla aktywnego w procesach uzdatniania wody wiąże się nie tylko z procesami adsorpcji. Znaczenie mają tu również procesy biochemiczne, tj. biodegradacja zachodząca przy udziale mikroorganizmów rozwijających się na powierzchni ziaren węgla. Filtry węglowe po dość krótkim czasie pracy wykazują wzrost aktywności biologicznej. Jest to spowodowane ich szybkim zasiedlaniem przez mikroorganizmy wodne. Zdolność węgla aktywnego do zatrzymania niesionych wraz z wodą mikroorganizmów pozwala włączyć skumulowaną biomasę w złożony mechanizm wzajemnych oddziaływań między fazą stałą (węgiel aktywny, komórki bakterii) a zanieczyszczeniami znajdującymi się w wodzie [13, 14]. Zaadsorbowane na węglu substancje organiczne są doskonałym miejscem do rozwoju różnorodnej gatunkowo mikroflory. Mikroorganizmy znajdujące się w dopływającej na filtry wodzie, takie jak bakterie autotroficzne i heterotroficzne, grzyby, a także wiciowce i orzęski, po krótkim czasie kolonizują granulki węgla aktywnego, tworząc na ich powierzchni warstwę biofilmu. Po wytworzeniu tej struktury mówi się już o biologicznie aktywnych filtrach węglowych (BAFw) [10, 15]. Czas potrzebny na osiągnięcie pełnej aktywności biologicznej złoża węglowego zależy od odpowiednich warunków tlenowych, temperatury oraz wymaganego stężenia substancji biogennej. W badaniach przeprowadzonych przez Wolborską i innych [12] czas ten wynosił cztery miesiące, kluczowe znaczenie miała tu jednak temperatura wody, ponieważ początek badań przypadł na połowę listopada. Na podstawie badań Falkus i innych [16] stwierdzono, że najszybszy przyrost liczby mikroorganizmów zasiedlających filtry węglowe występuje w okresie od marca do maja, co najprawdopodobniej związane jest z nagłym wzrostem temperatury wody od 5 do ok. 20°C. Po tym okresie liczba bakterii stopniowo spada, aż do osiągnięcia pewnego stałego poziomu, który utrzymuje się do października.

Biofilm jest zbiorowiskiem mikroorganizmów zasiedlających wytwarzaną przez nie matrycę polimerową. Porasta różnego typu powierzchnie zanurzone w wodzie

lub też mające z nią częsty kontakt. Matrycę tę tworzą wielocukry i liczne białka, które nadają tej strukturze wytrzymałość i spójność. W jego strukturze wykazano również obecność kwasów nukleinowych, najprawdopodobniej jako pozostałość po obumarłych i ulegających lizie komórkach bakteryjnych [17]. Proces formowania biofilmu na biotycznych czy abiotycznych powierzchniach rozpoczyna się od adhezji pojedynczych komórek bakterii do zasiedlanej powierzchni. Tylko nieliczne mikroorganizmy mają zdolność do aktywnego przyczepiania się do podłoża i to one stanowią pierwszą grupę dokonującą kolonizacji. Wytwarzają też pierwsze warstwy biopolimerów, co umożliwia innym mikroorganizmom adhezję. W dalszym etapie kolejne mikroorganizmy przyłączają się do matrycy polimerowej lub do wcześniejszych „kolonistów”. Matryca polimerowa pełni funkcję strukturalną i budując szkielet biofilmu, chroni mikroorganizmy znajdujące się w jej głębszych warstwach przed działaniem czynników zewnętrznych (antybiotyków, środków dezynfekcyjnych). Ułatwia także komunikację pomiędzy mikroorganizmami dzięki kanałom wodnym, usprawniającym przenikanie substancji odżywczych oraz cząsteczek sygnałowych, służących bakteriom do komunikacji i modyfikacji procesów metabolicznych. Ze względu na te właściwości biofilm cechuje duża stabilność i trwałość. W procesach technologicznych oczyszczania wody należy kontrolować parametry związane np. z szybkością degradacji związków organicznych i ich sorpcji na powierzchni węgla aktywnego. Z tego powodu konieczne jest opracowanie procedur kontrolujących proces tworzenia się biofilmu lub hamowania jego rozwoju, a także opracowanie skutecznych metod jego usuwania z węglowego złoża filtracyjnego [18, 19].

Równie ważne dla prawidłowej pracy filtrów węglowych jest to, by nie dopuścić do zanieczyszczenia złoża węglowego zawiesiną obecną w wodzie oraz substancjami mineralnymi. W takim przypadku dochodzi do zatykania porów w granulach węgla aktywnego, co zmniejsza jego powierzchnię właściwą. Może to mieć miejsce np. w wyniku niewystarczającego oczyszczenia wody w procesach odżelaziania czy usuwania manganu oraz w sytuacji, gdy woda doprowadzana do filtrów węglowych zawiera znaczne ilości pozostałego w wodzie koagulantu. W przypadku zanieczyszczenia złoża zawiesinami konieczne jest częste płukanie powietrzem i czystą wodą, co powoduje jednak ścieranie się zewnętrznych warstw węgla i w konsekwencji ubytek jego masy [4].

Pomiędzy procesami sorpcji i biodegradacji zanieczyszczeń organicznych obecnych w uzdatnianej wodzie w zależności od długości pracy filtra może dojść do ustalenia równowagi. Niekiedy jeden z nich może przeważać, w zależności od aktualnych warunków fizykochemicznych, w tym np. temperatury wody, która wpływa na szybkość rozwoju mikroorganizmów. Sorpcja dominuje w pierwszej fazie procesu, czyli wpracowania złoża, dopiero po zaadsorbowaniu odpowiedniej ilości zanieczyszczeń rozpoczyna się drugi proces, w którym biorą udział bakterie wykorzystujące związki organiczne z wody jako pokarm [15, 16]. Intensywność procesów zachodzących w filtrze oraz wzajemne relacje między procesami sorpcji i biodegradacji można ocenić w oparciu o test EMS - test Eberhardta, Madsena

i Sontheimera. Test polega na ocenie ubytku ChZT do ubytku tlenu rozpuszczonego w wodzie odpływającej ze złoża [8].

Celem pracy jest charakterystyka wybranych metod stosowanych do oznaczania aktywności biochemicznej mikroorganizmów zasiedlających filtry węglowe oraz analiza ich przydatności do badań aktywności biologicznej filtrów węglowych. Przybliżone zostały zarówno zalety, jak i wady opisanych metod badawczych. Dzięki temu można określić ich przydatność do badania wydajności procesów biologicznego oczyszczania wody w filtrach z węglem aktywnym pracujących w stacjach uzdatniania.

## **2. Metody oznaczania aktywności bakterii w procesach biologicznych**

### **2.1. Oznaczanie liczby bakterii metodą hodowlaną**

Najprostszą klasyczną metodą mikrobiologiczną określania liczby drobnoustrojów w danej próbce jest metoda hodowlana. Stosowana jest ona od dawna do określania np. zanieczyszczenia mikrobiologicznego wody czy żywności. Oznaczanie liczby bakterii zasiedlających filtry węglowe rozpoczyna się od ekstrakcji biomasy. W tym celu stosuje się m.in. takie metody, jak: homogenizacja z buforem fosforanowym, homogenizacja z buforem Tris, homogenizacja wg Capeya, wytrząsanie z pirofosforanem sodu czy traktowanie ultradźwiękami. Badania przeprowadzone przez Łebkowską i innych [9] wykazały, że homogenizacja próbek jest o 25% skuteczniejszą metodą wypłukiwania mikroorganizmów z węgla aktywnego niż ich wytrząsanie. Najlepszym roztworem wykorzystywanym w tym celu jest bufor fosforanowy. Liczebność bakterii zawieszanych w buforze fosforanowym była o 60% większa niż przy zastosowaniu bufora Tris i o 40% wyższa niż ekstrakcja biomasy z zastosowaniem wody. Po otrzymaniu zawiesiny mikroorganizmów wykonuje się serię rozcieńczeń pobranej próbki w postępie dziesiętnym. Najczęściej do tego celu używany jest roztwór soli fizjologicznej, który jest neutralny wobec drobnoustrojów i nie wywiera na nie ciśnienia osmotycznego, co mogłoby negatywnie wpłynąć na wzrost żywych komórek w późniejszych etapach badania [20]. Przygotowane rozcieńczenia następnie wysiewa się w ilości 0,1 ml na podłoża mikrobiologiczne zestalone agarom. Po inkubacji w określonych warunkach zliczane są kolonie bakteryjne wyrosłe na płytkach. Czas inkubacji wynosi od 24 do 72 godzin. Najbardziej miarodajne są wyniki uzyskane przy największych rozcieńczeniach ze względu na to, że nierzadko dochodzi do łączenia się bakterii w większe agregaty lub też w roztworze ulegają zawieszaniu fragmenty biofilmu. Powoduje to, że wyrosła kolonia pochodzi nie od jednej, a od większej liczby komórek bakteryjnych tego samego gatunku. Liczba wyrosłych kolonii odzwierciedla ilość tzw. jednostek tworzących kolonię (JTK), *colony forming units* (CFU). W praktyce występują liczne modyfikacje tej metody. Można zatem nie tylko wysiewać zawiesiny bakterii na zestalone podłoże agarowe, ale również dodawać je bezpośrednio przed jego zestaleniem. Przy stosunkowo małej liczbie komórek

w próbce najbardziej przydatna jest metoda wykorzystująca filtry membranowe, które po przesączeniu próbki są następnie umieszczane na pożywce bakteriologicznej [20, 21]. Ze względu na skład jakościowy bakterii zasiedlających filtry węglowe stosuje się temperaturę inkubacji wynoszącą  $20 \pm 25^\circ\text{C}$ , co wiąże się ze stosunkowo długim czasem hodowli, który wynosi zwykle 72 godziny. Wyniki uzyskane w przypadku tej metody są w mniejszym lub większym stopniu zaniżone w stosunku do rzeczywistej liczby bakterii w próbce. Ważny jest też dobór odpowiedniego podłoża hodowlanego. Jak pokazują badania m.in. Łebkowskiej i innych [9], stosunkowo najlepsze rezultaty w postaci ilości wyrosłych kolonii bakteryjnych uzyskuje się w przypadku zastosowania pożywki agarowej MPA, czyli ogólnie stosowanego agaru odżywczego (*nutrient agar*) [10, 21].

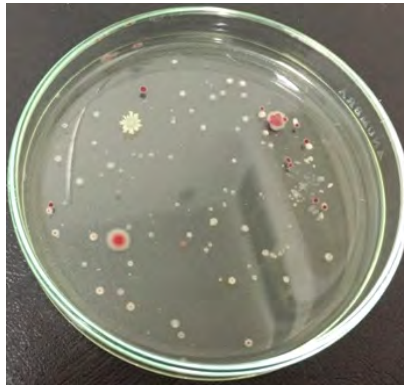
## 2.2. Określanie aktywności dehydrogenazy za pomocą TTC

Dehydrogenazy należą do enzymów występujących we wszystkich komórkach żywych. Są one obecne między innymi w szlakach oddechowych, w tym także w cyklu kwasu cytrynowego pod postacią np. dehydrogenazy bursztynianowej [19]. Podczas badań nad aktywnością oddechową mikroorganizmów wykorzystuje się najczęściej sole tetrazolinowe, które pełnią rolę akceptorów elektronów w procesach oksydo-redukcyjnych prowadzonych przez dehydrogenazy. Jednym z takich barwników jest chlorek 2,3,5-trifenyloitetrazolinowy. Jest on redukowany w trakcie utleniania głównego substratu przez enzym do nierozpuszczalnego w wodzie i zabarwionego na czerwono trifenyloformazanu. TTC pełni w tym przypadku rolę akceptora protonów i elektronów. Barwnik ten następnie można oznaczać metodą kolorymetryczną. Odczytu wyników dokonuje się na podstawie sporządzonej wcześniej krzywej wzorcowej.

Metoda ta jest powszechnie stosowana do oznaczania aktywności mikroorganizmów glebowych. Jest też skuteczna przy oznaczaniu aktywności dehydrogenaz w osadzie czynnym, co wykorzystuje się w oczyszczalniach ścieków. W przypadku węgla aktywnych występują pewne problemy. Filtry węglowe zasiedlone są głównie przez mikroorganizmy wodne z grupy psychrofilii, które w dużej części należą do tzw. niefermentujących pałeczek Gram-ujemnych [9, 10]. Rosną wolniej niż bakterie jelitowe stanowiące główną mikroflorę osadów ściekowych, jak również częściej brak im zdolności do wykorzystania różnego typu substratów pokarmowych, w tym licznych cukrów, co może przekładać się na zdolność do pobierania ze środowiska TTC. Badania przeprowadzone przez Reczek [22] potwierdzają niską czułość testu TTC w oznaczaniu aktywności dehydrogenazowej bakterii zasiedlających filtry węglowe. Zmianę zabarwienia roztworu, czyli reakcje enzymatycznego rozkładu TTC do formazanu, zaobserwowano dopiero, gdy liczba bakterii wyrosłych na podłożu MPA wynosiła  $4 \cdot 10^5$  w jednym ml zawiesiny (ekstrakcja z buforem fosforanowym).

Na podstawie obserwacji autorów niniejszej pracy także wykazano wielokrotnie, że wśród bakterii występujących na filtrach węglowych obecne są zarówno takie, które redukują TTC do trifenyloformazanu w czasie inkubacji po wysianiu

na podłoże agarowe, redukujące go z opóźnieniem, jak i takie, które nie są zdolne do jego redukcji. Na rysunku 1 przedstawiono płytkę z podłożem agarowym (agar odżywczy firmy BTL z dodatkiem roztworu TTC o stężeniu 0,01%) po okresie inkubacji wynoszącym 72 godziny w temperaturze 22°C. Mikroorganizmy wcześniej zawieszono w roztworze soli fizjologicznej poprzez wytrząsanie próbki węgla aktywnych pochodzących z wybranej stacji uzdatniania wody. Część kolonii jest prawie całkowicie wybarwiona przez trifeniloformazan. Niektóre z nich po tym czasie dopiero zaczynają wybarwiać się od środkowej części kolonii. W ich przypadku proces pobierania i redukcji TTC przebiega dłużej. Część natomiast nie wybarwia się wcale, co świadczyć może o braku zdolności pobierania TTC z podłoża, co związane jest z polarnością tego związku, który nie jest w stanie przenikać przez błony komórkowe na zasadzie prostej dyfuzji. Docelowe zaś enzymy, czyli dehydrogenazy, umiejscowione są w błonie komórkowej bakterii od jej wewnętrznej strony [20]. Konieczne jest zatem pobieranie TTC w sposób aktywny przez mikroorganizmy, by mógł on wziąć udział w reakcjach katalizowanych przez dehydrogenazy [21].



Rys. 1. Kolonie bakterii z badanego węgla aktywnego po zastosowaniu metody z TTC (72 godziny inkubacji, rozcieńczenie  $10^{-6}$ ) [materiały własne]

Fig. 1. Bacteria colony from tested activated carbon after TTC method application (72 hours incubation, dilution  $10^{-6}$ ) [authors' source]

### 2.3. Oznaczanie ilości ATP

Adenozynotrifosforan (ATP) jest związkiem występującym we wszystkich komórkach żywych, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Bierze on udział w licznych procesach biochemicznych, a jego podstawową funkcją jest magazynowanie energii w postaci wiązań fosfodiestrowych [20]. Ilość ATP w komórkach bakteryjnych zależy od gatunku drobnoustroju czy też jego aktywności metabolicznej. W przybliżeniu jego stężenie w cytoplazmie wynosi  $10^{-18}$  M. Poza komórkami żywymi związek ten występuje w śladowych ilościach, ponieważ w momencie śmierci komórki jest on rozkładany przez fosfatazy i ATP-azę. Z tego względu ATP jest dobrym markerem do oznaczania ilości żywych komórek drobnoustrojowych.

ustrojów. Wykorzystuje się tę metodę powszechnie w przemyśle spożywczym czy farmaceutycznym. Jest ona również przydatna do oceny skuteczności dezynfekcji powierzchni i przedmiotów [23].

W trakcie oznaczania liczby bakterii z użyciem ATP wykorzystuje się zjawisko bioluminescencji. Do przygotowanej zawiesiny bakteryjnej dodaje się enzymy lucyferazę oraz lucyferynę. Reakcja enzymatyczna jest napędzana przez hydrolizę wiązań fosfodiesterowych w ATP. Im większa jest zawartość tego związku w próbce, tym silniejsza jest intensywność luminescencji. Konieczne jest sporządzenie krzywej wzorcowej odzwierciedlającej ilościową zależność między stężeniem ATP a aktywnością lucyferazy. Pomiarów absorbancji dokonuje się przy długości fali 600 nm. Minusem tej metody jest fakt, że oznacza się całą pulę ATP występującą w próbce, obecną zarówno w komórkach bakterii, jak i w komórkach pierwotniaków i grzybów [24]. Obecnie dostępne są gotowe zestawy do oznaczania ilościowego mikroorganizmów za pomocą pomiaru zawartości ATP w próbce. Jednym z nich jest system HY-LiTE firmy Merc. Odczytu dokonuje się w lumenometrze, a wynik podawany jest we względnych jednostkach świetlnych (RLU - *relative light units*). Zaletą tej metody jest stosunkowo krótki czas wykonania badania oraz jej uniwersalność, jeśli chodzi o drobnoustroje. Na podstawie wyników uzyskanych przez Nuzbacka i innych [24] należy stwierdzić, że metoda ta pozwala skutecznie ocenić ogólną liczebność żywych komórek bakteryjnych w próbce. Ilość ATP koreluje z ilością mikroorganizmów, dotyczy to zwłaszcza fazy logarytmicznej ich wzrostu i w tym przypadku uzyskuje się najdokładniejsze wyniki. Nieco większe wahania danych uzyskali oni w przypadku stacjonarnej fazy wzrostu. Na aktywność metaboliczną bakterii, a co za tym idzie, ilości wytwarzanego przez nie ATP, ma wpływ ilość składników pokarmowych w danym środowisku. Z tego powodu wyniki uzyskane przy tej samej liczbie mikroorganizmów, lecz różnej zasobności w substancje odżywcze wykorzystywane przez nie jako źródło pokarmu mogą się nieco różnić. To wpływa na pewną niedokładność opisywanej metody w aspekcie odzwierciedlenia realnej liczby drobnoustrojów w badanej próbce. Można ją jednak z powodzeniem wykorzystywać do określania ogólnej aktywności metabolicznej mikroorganizmów [25].

#### 2.4. Oznaczanie aktywności esteraz

Enzymy z grupy esteraz występują we wszystkich komórkach żywych. Mogą one dostarczyć informacji na temat ich stanu metabolicznego. Związkiem wykorzystywanym najczęściej do oznaczania aktywności tych enzymów jest diocetan fluoresceiny (FDA). Związek ten nie wykazuje fluorescencji, lecz wskutek działania esteraz wewnątrzkomórkowych zostaje przekształcony do fluoresceiny. Ze względu na swój niepolarny charakter bez trudności przenika przez dwuwarstwą lipidów błony komórkowej i dociera do miejsc w komórce, gdzie umiejscowione są esterazy. Fluoresceina zaś powstająca z wyżej wymienionego estru jest związkiem polarnym i nie może wydostać się z żywych komórek na zasadzie prostej dyfuzji. W związku z tym pozostaje w ich wnętrzu, co wykorzystuje się do oznaczania ilości



żywych komórek w danej próbce. Martwe komórki natomiast szybko pozbywają się fluoresceiny i w obrazie mikroskopowym są praktycznie bezbarwne. Często również wykonuje się w trakcie badań dodatkowe barwienie martwych komórek za pomocą np. jodku propidyny (PI), co ułatwia rozróżnienie komórek żywych i martwych. Z tego powodu niepolarne pochodne fluoresceiny z powodzeniem można wykorzystywać do wybarwiania i oznaczania liczebności żywych komórek bakteryjnych [26]. Badania przeprowadzone przez Reczek dotyczące oceny przydatności testów TTC i FDA do oceny pracy BAFw ukazują wyższość testu aktywności hydrolitycznej mikroorganizmów zasiedlających filtry węglowe nad testem aktywności dehydrogenazowej. Test FDA jest szybki, tani i prosty, a ponadto trwa krócej i jest bardziej efektywny, ponieważ pozwala na oznaczenie aktywności hydrolitycznej nawet dla niewielkiej ilości biomasy [22]. Podobnie badania Kijowskiej i innych [8] dowodzą przydatności tego testu w rutynowych badaniach kontroli procesu biodegradacji materii organicznej w BAFw.

Obecnie w praktyce wykorzystuje się nie tylko FDA, ale też jego pochodne. Przykładowo są to diocyan karboksylfluoresceiny (CFDA), estry CFDA czy też komercyjne zestawy, takie jak ChemChrome B i ChemChrome V6. Diocyan fluoresceiny wykazuje stosunkowo słabą retencję wewnątrz komórek żywych w porównaniu do pozostałych wyżej wymienionych pochodnych fluoresceiny i lepszym rozwiązaniem jest użycie np. CFDA. W przypadku FDA następuje też stopniowy wyciek z komórek wytworzonej przez esterazy fluoresceiny, co należy uwzględnić podczas fluorescencyjnego oznaczania ogólnej liczby wybarwionych mikroorganizmów. W tym przypadku wyniki uzyskane przy zastosowaniu FDA mogą być nieco niższe w porównaniu do oznaczenia wykonanego z użyciem CFDA. Bardzo dużą zaletą opisywanej metody jest możliwość szybkiego uzyskania wyników (przy zastosowaniu np. cytometru przepływowego już po kilkunastu minutach od wybarwienia próbki). Jepras i inni wykazali również dużą korelację wyników uzyskanych z zastosowaniem pochodnych fluoresceiny do oznaczania żywych komórek bakteryjnych i standardowej metody hodowlanej, gdzie określa się CFU (*colony forming units*) [27].

Największą skutecznością, według badań wykonanych przez Diapter i Edwards [26], jeśli chodzi o oznaczanie aktywności esteraz komórkowych, charakteryzują się komercyjne zestawy barwiące. Przykładem może tutaj być produkt o nazwie ChemChrome B lub ChemChrome V6. Ich skład jest tajemnicą producenta, jednak dzięki dodatkowym składnikom tego zestawu barwiącego ograniczono w nich niekontrolowany wpływ barwnika oraz problemy z wybarwianiem niektórych drobnoustrojów dzięki zastosowaniu np. odpowiednio dobranych buforów. Przy jego użyciu udało się trwale wybarwić największą liczbę gatunków mikroorganizmów [26]. Po wybarwieniu komórek przy użyciu jednego z wyżej wymienionych barwników fluorescencyjnych do oceny ilościowej mikroorganizmów w badanej próbce wykorzystuje się np. cytometr przepływowy. Dzięki temu szybkość uzyskiwanych wyników jest największa, co znacząco ogranicza czas potrzebny na wykonanie badania. Można również dokonać analizy ilościowej mikroorganizmów w mikroskopie fluorescencyjnym przy użyciu komór służących do zliczania

komórek w jednostce objętości płynu. Uzyskane w ten sposób wyniki przedstawiają wiarygodnie liczebność żywych i aktywnych metabolicznie mikroorganizmów w badanej próbce. Warunkiem koniecznym do wykorzystania tej metody w przypadku węgli aktywnych jest zawieszenie bakterii w rozworze poddanym analizie. Dzięki temu uzyskane wyniki odzwierciedlają rzeczywistą aktywność drobnoustrojów. Pewne utrudnienia podczas stosowania pochodnych estrowych barwników fluorogennych mogą wystąpić w przypadku niektórych bakterii, np. z rodziny *Pseudomonas*, u których dochodzi do większego niż u innych mikroorganizmów wycieku barwnika przekształconego przez esterazy. Problemy tego typu zostały wyeliminowane w przypadku komercyjnych zestawów barwiących [28].

## 2.5. Wykorzystanie glukozy znakowanej izotopem węgla $^{14}\text{C}$

Do określania liczebności mikroorganizmów występujących na powierzchni filtrów węglowych i ich aktywności wykorzystywano również metodę oznaczania produktów rozkładu glukozy znakowanej radioaktywnym izotopem węgla  $^{14}\text{C}$ . Analizę skuteczności tej metody prowadzili między innymi Servais i inni [29, 30] z użyciem opracowanej przez siebie autorskiej metody badań. Wykorzystali oni w charakterze znacznika wyżej wymieniony izotop węgla wbudowany w strukturę cząsteczki glukozy. Z założenia mikroorganizmy zasiedlające badane środowisko po wykorzystaniu tego cukru wydzielają dwutlenek węgla, w którym znajdują się atomy węgla  $^{14}\text{C}$  i na tej podstawie można wyznaczyć ogólną ich aktywność. Glukozę taką dodaje się w określonej ilości do próbki pobranego z filtra węgla aktywnego wraz z niewielką ilością wody. Po inkubacji w temperaturze  $20^\circ\text{C}$  przez 3 godziny dodawany jest kwas siarkowy w celu ekstrakcji wytworzonego w tym czasie z glukozy dwutlenku węgla. Całość procesu prowadzi się w pojemniku zamkniętym gumową przegrodą, która uniemożliwia ucieczkę analizowanego gazu. W trakcie ekstrakcji dwutlenku węgla jest on wychwytywany za pomocą komercyjnych zestawów, takich jak Carbo-Sorb. Ostatnim etapem oznaczania jest analiza radioaktywności związanego dwutlenku węgla. Im jest ona wyższa, tym wyższa jest aktywność mikroorganizmów zasiedlających filtr węglowy. Wyniki podawane są w nanomolach wykorzystanej glukozy na godzinę. Proces kolonizacji i dojrzewania biofilmu na powierzchni węgla aktywnych jest stosunkowo długi i może trwać około 3 miesięcy. W tym czasie następują zmiany aktywności metabolicznej mikroorganizmów na tych filtrach, co przekłada się na pewien rozrzut uzyskiwanych wyników. Dopiero po zakończonym etapie formowania się biofilmu czy tzw. wpracowaniu złoża węglowego ustala się pewien poziom aktywności bakterii zasiedlających jego strukturę. Właśnie od tego momentu wyniki uzyskiwane dzięki zastosowaniu tej metody są w wysokim stopniu powtarzalne.

Największym ograniczeniem tej metody jest fakt, że liczne mikroorganizmy nie są zdolne do wykorzystania tego cukru jako substratu pokarmowego. Wśród nich jest wiele gatunków bakterii izolowanych również z filtrów węglowych, w tym np. niektóre gatunki należące do rodzaju *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* czy *Achromobacter*. Fakt ten powoduje często znaczne zaniżenie wyników analizy

aktywności bakterii za pomocą glukozy znakowanej za pomocą izotopu węgla  $^{14}\text{C}$  w stosunku do stanu rzeczywistego. Należy to uwzględnić w przypadku zastosowania tej metody, jeżeli w próbce obecne są wyżej wymienione bakterie [31].

## Podsumowanie

Określanie aktywności mikroorganizmów zasiedlających filtry z węgla aktywnych jest jednym z podstawowych badań, które pozwala ocenić skuteczność procesu uzdatniania wody. Każda z opisanych powyżej metod ma swoje wady i zalety. Standardowo stosuje się ciągle jeszcze metodę hodowlaną, gdzie wyznacza się liczbę żywych i zdolnych do wzrostu bakterii. Pozwala ona ocenić liczbę mikroorganizmów w próbce i w kolejnych etapach ich skład gatunkowy, co jest jej niewątpliwą zaletą. Wymaga ona jednak czasu potrzebnego na wzrost kolonii bakterii na podłożu agarowym oraz wydajnego procesu ich zawieszania w roztworze i sporządzenia z niego serii rozcieńczeń. Obecnie coraz częściej zastępowana jest ona przez metody wykorzystujące aktywność wybranych enzymów bakteryjnych. Są one o wiele mniej pracochłonne i czasochłonne. Najbardziej uniwersalną metodą wydaje się oznaczanie aktywności esteraz komórkowych z wykorzystaniem pochodnych estrowych fluoresceiny. Barwniki te bez problemu przenikają do żywych komórek przez błony lipidowe, a samo oznaczenie trwa bardzo krótko. Dzięki tej metodzie można łatwo odróżnić komórki martwe od żywych, jeżeli użyje się dodatkowego barwnika w postaci jodku propidyny. Najbardziej wydajne są w tym przypadku komercyjne zestawy do barwienia mikroorganizmów. Stosunkowo prostą i szybką metodą jest też oznaczanie ilości ATP w badanej próbce, co pozwala ocenić ogólną aktywność metaboliczną drobnoustrojów. Oznacza się w jej przypadku całą pulę obecnego ATP, w tym w organizmach pierwotniaków i grzybów, a nie tylko bakterii. Wyniki uzyskuje się jednak bardzo szybko. Dodatkową jej zaletą jest fakt, że związek ten jest obecny we wszystkich żywych komórkach, niezależnie od przynależności gatunkowej. Jeżeli chodzi o metodę kolorymetryczną z TTC do oznaczania aktywności dehydrogenaz komórkowych, również w przypadku bakterii zasiedlających filtry węglowe istnieją pewne problemy. Przede wszystkim nie każdy gatunek bakterii jest w stanie pobrać ze środowiska TTC i wykorzystać go jako kosubstrat w reakcji enzymatycznej prowadzonej przed dehydrogenazy. Często też pobierają go i redukują do barwnego trifenyloformazanu z opóźnieniem. W przypadku wykorzystania glukozy znakowanej radioizotopami głównym problemem jest fakt, że nie wszystkie bakterie rozkładają ten cukier, co wpływa na uzyskiwane wyniki i są one zaniżone w stosunku do stanu rzeczywistego. Z tego powodu metoda ta może nie dawać wystarczająco dokładnych wyników w przypadku mikroflory zasiedlającej filtry węglowe.

## Podziękowania

*Praca została sfinansowana ze środków grantu wydziałowego BS/MN-401-305/15.*

## Literatura

- [1] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2015 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, DzU 2015, poz. 1989.
- [2] Zimoch I., Szostak A., Ocena pracy filtrów węglowych eksploatowanych w Zakładzie Produkcji Wody Goczałkowice, Węgiel aktywny w ochronie środowiska i przemyśle 2006, 247-258.
- [3] Nawrocki J., Uzdatnianie wody. Procesy fizyczne, chemiczne i biologiczne t. 1, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2010.
- [4] Wilmański K., Warunki i efekty długotrwałego stosowania granulowanych węgla aktywnych w wodociągach, Węgiel aktywny w ochronie środowiska i przemyśle 2006, 225-235.
- [5] Lach J., Wpływ sposobu modyfikacji węgla aktywnych na adsorpcję metali ciężkich, Seria Monografie Nr 197, Wyd. Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2011.
- [6] Dunne W.M., Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiol. Rev.* 2002, 15, 155-166.
- [7] Kijowska E., Leszczyńska M., Sozański M.M., Test aktywności metabolicznej w badaniach biodegradacji materii organicznej w złożach biologicznych filtrów węglowych, IV Międzynarodowa konferencja nt. Zaopatrzenie w wodę, jakość i ochrona wód, Kraków, 11-13 września 2000, 477-488.
- [8] Pruss A., Maciołek A., Lasocka-Gomuła I., Wpływ aktywności biologicznej złóż węglowych na skuteczność usuwania związków organicznych z wody, *Ochrona Środowiska* 2009, 4, 31-34.
- [9] Łebkowska M., Wąsowski J., Wojsa-Ługowska U., Zastosowanie analizy mikrobiologicznej do oceny biologicznej aktywności węgla aktywnych, *Ochrona Środowiska* 1997, 3(66), 43-46.
- [10] Gibert O., Lefevre B., Fernandez M., Bernat X., Paraira M., Calderer M., Martinez-Llado X., Characterising biofilm development on granular activated carbon used for drinking water production, *Water Research* 2013, 47, 1101-1110.
- [11] Choma J., Jaroniec M., Podstawowe metody adsorpcyjne stosowane do oceny powierzchniowych i strukturalnych właściwości węgla aktywnych, *Ochrona Środowiska* 2005, 3, 3-8.
- [12] Wolborska A., Zarzycki R., Cyran J., Grabowska H., Wybór M., Ocena biologicznej aktywności filtrów węglowych w uzdatnianiu wód powierzchniowych na przykładzie wodociągu „Sulejów-Łódź”, *Ochrona Środowiska* 2003, 25, 4, 27-32.
- [13] Bansal R.C., Goyal M., Adsorpcja na węglu aktywnym, WNT, Warszawa 2009.
- [14] Ignatowicz-Owsieniuk K., Zastosowanie metod biologiczno-fizycznych do usuwania zanieczyszczeń pestycydowych z wody, *Rocznik Ochrona Środowiska* 2002, 4, 229-240.
- [15] Olesiak P., Stępiak L., Metody intensyfikacji procesu sorpcji w uzdatnianiu wody, *Interdyscyplinarne zagadnienia w inżynierii i ochronie środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2014, 621-634.
- [16] Falkus B., Handzlik A., Kajdas E., Liczebność mikroorganizmów zasiedlających złoża filtrów węglowych w ZPW „Dzieńkowice”, *Ochrona Środowiska* 1999, 2(73), 29-34.
- [17] Branda S.S., Vik A., Friedman L. et al., Biofilms: The matrix revisited, *Trends Microbiol.* 2005, 13, 20-26.
- [18] Simpson D.R., Biofilm processes in biologically active carbon water purification, *Water Research* 2008, 42, 2839-2848.
- [19] Jeswani H.K., Gujba H., Brown N.W., Roberts E.P.L., Azapagic A., Removal of biofilm from activated carbon in industrial adsorption filters, *Journal of Cleaner Production* 2015, 89, 203-213.
- [20] Kunicki-Goldfinger W.J.H., *Życie bakterii*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2006.
- [21] Grzybowski J., Reista J., *Praktyczna bakteriologia lekarska i sanitarna*, Bellon, Warszawa 2001.
- [22] Reczek L., Oznaczanie liczebności i aktywności enzymatycznej mikroorganizmów zasiedlających granulowane węgle aktywne stosowane w procesie uzdatniania wody, IV Międzynarodowa i XVI Krajowa Konferencja nt. Zaopatrzenie w wodę, 2000, 509-518.

- [23] Lundin A., [w:] Stanley P.E., McCarthy B.J., Smither R. (red.), ATP Luminescence Rapid Methods in Microbiology, Blackwell Scientific Publications, London 1989, 11-27.
- [24] Nuzback D.E., Bartley E.E., Dennis S.M., Nagaraha T.G., Galitzer S.J., Dayton A.D., Relation of rumen ATP concentration to bacterial and protozoal numbers, Applied and Environmental Microbiology 1983, 46, 533-538.
- [25] Gutarowska B., Piotrowska M., Żakowska Z., Gwoździński K., Analiza przydatności metod oznaczania adenozyntrifosforanu (ATP) oraz mikroskopii fluorescencyjnej do oceny żywotności i adhezji bakterii na powierzchni bioaktywnych polimerów, Polimery 2012, 57, 236-245.
- [26] Diapter J.P., Edwards C., The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry, Journal of Applied Bacteriology 1994, 77, 221-228.
- [27] Jepras R.I., Carter J., Pearson S.C., Paul F.E., Wilkinson M.J., Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria, Applied and Environmental Microbiology 1995, 61, 2696-2701.
- [28] Sadowska J., Grajek W., Analiza stanu fizjologicznego pojedynczych komórek bakterii za pomocą barwienia fluorescencyjnego, Biotechnologia 2009, 4(87), 102-114.
- [29] Servais P., Billen G., Ventresque C., Bablon P.G., Microbial activity in GAC filters at the Choisy-le-Roi treatment plant, Journal of American Water Works Association 1991, 62-68.
- [30] Servais P., Billen G., Bouillot P., Biological colonization of granular activated carbon filters in drinking-water treatment, Journal of Environmental Engineering 1994, 888-899.
- [31] Szewczyk E.M. (red.), Diagnostyka bakteriologiczna, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2011.

## Streszczenie

W ostatnich latach wykorzystywana w procesie uzdatniania wody technologia filtracji oparta na granulowanych węglach aktywnych (GWA) cieszy się coraz większą popularnością. Jest to spowodowane jej prostotą, stosunkowo niskimi kosztami eksploatacji i wydajnością w usuwaniu zanieczyszczeń organicznych rozpuszczonych w wodzie. By uzyskać pełną wydajność, złoża węglowe musi zostać zasiedlone przez mikroorganizmy wodne, które wykorzystują zanieczyszczenia organiczne jako źródło węgla. Najczęściej ze złoży węglowych izolowane są bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* czy *Bacillus*. W celu oceny realnej aktywności pracującego złoża należy określić ilość żywych komórek bakteryjnych przypadających na jednostkę objętości granulatu węglowego. W związku z tym proponuje się wykorzystanie nie tylko tradycyjnych metod hodowlanych, ale również nowoczesnych, bazujących na np. kolorymetrycznym oznaczaniu produktów reakcji enzymatycznych prowadzonych przez bakterie. Można tutaj wymienić metodę wykorzystującą diocetan fluoresceiny redukowany przez esterazy do fluoresceiny, służący do barwienia żywych komórek mikroorganizmów, metodę wykorzystującą zdolność bakterii do redukcji TTC do czerwono zabarwionego formazanu, oznaczanie ilościowe ATP w próbce czy też wykorzystanie glukozy znakowanej izotopem węgla <sup>14</sup>C.

**Słowa kluczowe:** uzdatnianie wody, węgle aktywne, aktywność biologiczna, bakterie, TTC, FDA, fluoresceina, ATP