

Maria Łebkowska, Jacek Wąsowski, Urszula Wojsa-Ługowska

Zastosowanie analizy mikrobiologicznej do oceny biologicznej aktywności węgla aktywnych

Sorpcja zanieczyszczeń na granulowanym węglu aktywnym (GWA) jest obecnie jednym z podstawowych procesów technologicznych stosowanych w nowoczesnych stacjach uzdatniania wody. Mimo znacznych kosztów granulowane węgle aktywne są powszechnie wykorzystywane w technice, przede wszystkim z uwagi na konieczność biostabilizacji wody oraz dostarczenia odbiorcom wody o jakości spełniającej standardy europejskie. Istotny wpływ na efektywność filtrów węglowych mają – obok sorpcji – procesy biochemiczne, zachodzące na powierzchni węgla aktywnego. Działanie mikroorganizmów w filtrach węglowych polega na wykorzystywaniu rozpuszczonych związków organicznych jako substratów pokarmowych, dzięki czemu następuje ich usuwanie z wody poprzez utlenienie w procesach oddechowych oraz przyrost biomasy drobnoustrojów. Istotnym elementem efektywnego przebiegu tych procesów jest transformacja związków opornych na biochemiczny rozkład do postaci biodegradowalnej – BRWO (biodegradowalny rozpuszczony węgiel organiczny), którą uzyskuje się w procesie ozonowania wody poprzedzającym sorpcję. Ozon mający wysoki potencjał redukcyjno-oksydacyjny stanowi jednocześnie czynnik utleniający, sprzyjający usuwaniu z wody wielu związków na drodze chemicznej.

Biomasa mikroorganizmów jest częściowo usuwana podczas płukania filtrów i regulowana ilościowo przez pierwotniaki rozwijające się na powierzchni węgla. Spośród drobnoustrojów występujących w filtrach węglowych dominują bakterie z rodziny *Pseudomonas* (*Ps. putida*, *Ps. fluorescens*, *Ps. maltophilia*, *Ps. cepacia*, *Ps. acidoverans*) oraz *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, a także pojawiają się promieniowce i grzyby. W złożach węglowych zachodzi proces nityfikacji, prowadzony przez bakterie autotroficzne i heterotroficzne w warunkach tlenowych. W przypadku deficytu tlenu, jego źródłem może być ozon. Jakość wody odpływającej z filtrów węglowych zależy od właściwości adsorbcyjnych granulowanego węgla aktywnego oraz od intensywności procesów biochemicznych usuwania RWO (rozpuszczony węgiel organiczny), a więc od układu jakościowego i ilościowego mikroflory rozwijającej się w złożu.

W ostatnich latach opracowywane są metodyki badań biologicznych filtrów węglowych, w których brany jest pod uwagę sposób poboru próbek, ekstrakcji biomasy z porów węgla i oceny intensywności rozwoju mikroorganizmów. Przegląd danych literaturowych wskazuje, że metodyki tych badań są zróżnicowane. Pobór próbek węgla może być dokonywany przez [1,2]:

- wmywanie strumieniem wody,
 - zastosowanie specjalnych urządzeń do poboru próbki węgla z dowolnej wysokości złoża,
 - zawory umieszczone najczęściej na trzech wysokościach filtru.
- Ekstrakcję biomasy z filtru węglowego można natomiast przeprowadzić na drodze:
- homogenizacji z buforem fosforanowym [3,4],
 - homogenizacji z buforem Tris [1],
 - homogenizacji wg Capey'a [5],
 - wytrząsania z pirofosforanem sodu [7],
 - procedury Mc Illvina z buforem na gorąco [8],
 - traktowania ultradźwiękami [8].

Do oceny intensywności rozwoju mikroflory na węglach aktywnych stosowane są przeważnie metody posiewów na podłoża hodowlane, metody enzymatyczne, sposoby określania składników komórkowych oraz analiza mikroskopowa. Wśród metod hodowlanych wyróżnić można metody płytkowe, tj. posiewów bakterii na podłoża MPA [7,4], wg Van der Kooija [9], R2A [3,10], agarowe z erytrocytami [11], wg Klotza i Wernera [12], PCA [13]. Metody enzymatyczne obejmują badania nad szybkością poboru glukozy znakowanej C^{14} przez drobnoustroje rozwijające się na węglu [16,17] lub aktywności dehydrogenazy oznaczonej testem TTC. Ocena zawartości składników komórkowych polega na określeniu ATP metodą Chappella i Piccolo [14,15] oraz stężenia fosfolipidów [18,19]. Badania mikroskopowe stosowane są do oznaczenia liczby bakterii przy użyciu mikroskopu skaningowego [5,20] oraz na filtrach membranowych [20–24] w mikroskopach biologicznych.

Cel, zakres i metodyka badań

Podstawowym celem badań było sprawdzenie przydatności wybranych metod służących do oceny intensywności zasiedlenia złożów filtrów węglowych przez mikroorganizmy. Zakres badań obejmował:

- przeprowadzenie badań porównawczych związanych ze sposobem wstępnej obróbki próbek węgla w celu uzyskania biomasy odpłukanej z ziaren węgla,
- określenie liczebności mikroorganizmów w próbkach węgla metodą posiewów na podłożach MPA, R2A, Wernera-Klotza oraz metodą oznaczenia fosfolipidów w błonie biologicznej rozwijającej się na ziarnach węgla aktywnego,
- identyfikację mikroorganizmów zasiedlających badane złoża węglowe,
- przeprowadzenie oceny wyników badań mikrobiologicznych na tle analiz fizyczno-chemicznych wody, przed i po procesie uzdatniania na filtrach węglowych.

Dr hab. M. Łebkowska: Politechnika Warszawska, Instytut Systemów Inżynierii Środowiska, ul. Nowowiejska 20, 00–653 Warszawa

Dr inż. J. Wąsowski: Politechnika Warszawska, Instytut Zaopatrzenia w Wodę i Budownictwa Wodnego, ul. Nowowiejska 20, 00–653 Warszawa

Mgr inż. U. Wojsa-Ługowska: Polska Akademia Nauk, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, ul. L. Pasteura 3, 02–093 Warszawa

Wyboru metod dokonano pod kątem możliwości ich wykorzystania w praktyce, tzn. uwzględniono łatwości ich użycia w rutynowych badaniach kontrolnych, dostępność aparatury oraz koszty, przy równoczesnej dużej dokładności i powtarzalności wyników pomiarów. Do badań wykorzystano trzy filtry sorpcyjne pracujące równolegle na stacji pilotowej na jednym z wodociągów w Warszawie. Filtry wypełnione były różnymi węglami aktywnymi, tj. węglem typu Picabiol, Chemviron F-400 i Norit 0.8 Supra. Woda doprowadzona do modeli filtrów poddawana była ozonowaniu na stacji pilotowej. Badania prowadzono w okresie od początku marca do połowy czerwca 1996 r., w którym temperatura wody wahała się od 3,0 do 24,5 °C. Próbkę węgla do badań pobrano za pomocą specjalnych króćców zainstalowanych na ścianach kolumn sorpcyjnych z dwóch poziomów złóż węgla, tj. z wysokości 1,5 m oraz 1,0 m, licząc od spodu złoża. Całkowita wysokość złóż wynosiła 2,0 m.

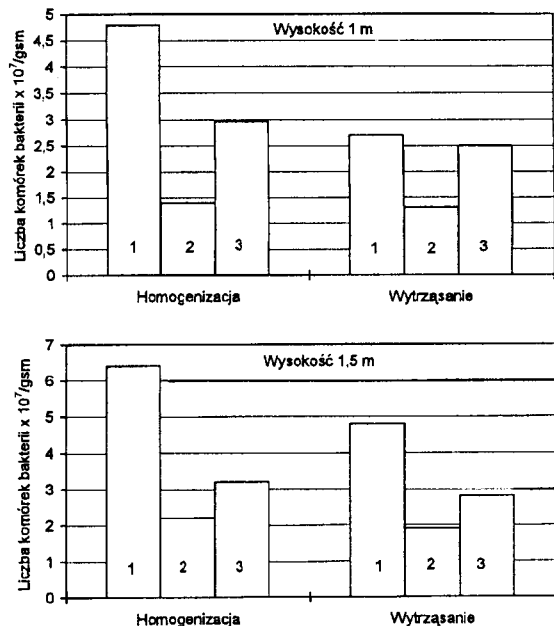
Badania nad efektywnością homogenizacji i wytrząsania próbek węgla z biomasą prowadzono dla węgla Picabiol. Zastosowano trzy rodzaje cieczy ekstrahującej bakterie: wodę, bufor Tris i bufor fosforanowy (po 90 cm³). Próbkę węgla o masie 10 g wytrząsano w łaźni wodnej lub homogenizowano w łaźni z lodem. Po takiej obróbce pobrano po 1 cm³ zawiesin i wykonano rozcieńczenia w sterylnej wodzie, a następnie posiano próbki na podłoże agarowe MPA. Hodowle inkubowano w temperaturze 26 °C w czasie od 10 do 14 dób. Wyniki podano jako liczbę mikroorganizmów w 1 cm³ zawiesin. Do oceny liczebności bakterii w zależności od rodzaju zastosowanej pożywki hodowlanej użyto standardowego podłoża agarowego MPA, podłoża wg Wenera-Klotza i podłoża R2A. W badaniach użyto po 10 g każdego z trzech rodzajów węgla. Próbkę zalano buforem fosforanowym (90 cm³) i umieszczono na 30 min na wytrząsarce w łaźni wodnej. Następnie pobrano po 1 cm³ uzyskanych zawiesin i wykonano rozcieńczenia oraz posiew gębinowy wg rutynowej metodyki mikrobiologicznej, po czym liczono wyrosłe kolonie. Wyniki podano jako liczbę bakterii w 1 cm³ zawiesin. Zawartość fosfolipidów w biomasie drobnoustrojów oznaczono zgodnie z procedurą Wanga. Fosfolipidy ekstrahowano do mieszaniny chloroformu, wody i metanolu przez wytrząsanie próbek węgla. Zawartość fosfolipidów oznaczono spektrofotometrycznie w odniesieniu do krzywej wzorcowej sporządzonej dla różnych stężeń KH₂PO₄.

Identyfikację bakterii prowadzono na podstawie oznaczeń ich cech morfologicznych, hodowlanych i biochemicznych. Zastosowano szybkie testy API oraz klucz *Bergey Manual*.

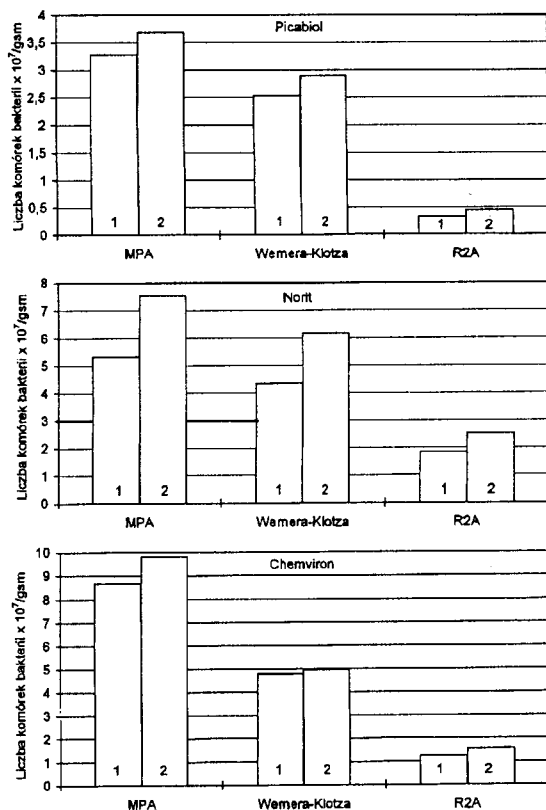
Analiza wyników badań

Przeprowadzone badania nad odpłukiwaniem mikroorganizmów z próbek złóż węglowych wykazały, iż ich homogenizacja pozwala na uzyskanie większej liczby oznaczonych drobnoustrojów niż wytrząsanie. Z kolei z punktu widzenia zastosowanych cieczy do ekstrakcji komórek, największą efektywność ekstrakcji otrzymano przy zastosowaniu buforu fosforanowego. Tendencja taka wystąpiła w przypadku próbek węgla pobranych zarówno z wysokości 1,5 m jak i 1,0 m, przy czym badania ilościowe drobnoustrojów wykazały, iż większa liczba mikroorganizmów rozwinęła się na wysokości 1,5 m, a więc w górnej warstwie złoża węglowego. Ilustracją powyższych wyników badań są wykresy zamieszczone na rysunku 1.

Na rysunku 2 przedstawiono wyniki badań nad liczebnością bakterii w próbkach węgla, w zależności od zastosowanych podłoży hodowlanych (metoda płytkowa). Uzyskane rezultaty wykazały, iż dla każdego rodzaju węgla aktywnego



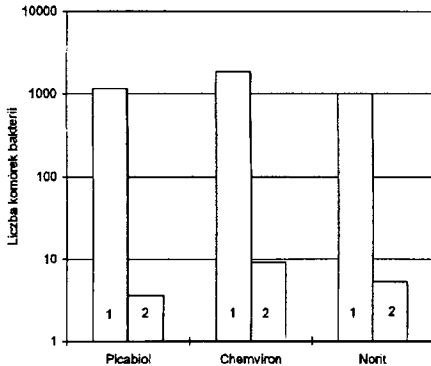
Rys. 1. Liczebność bakterii w próbkach granulowanego węgla aktywnego w zależności od sposobu oddzielenia biomasy i rodzaju cieczy ekstrakcyjnej (1 – bufor fosforanowy, 2 – bufor Tris, 3 – woda)



Rys. 2. Liczebność bakterii w próbkach granulowanego węgla aktywnego w zależności od rodzaju podłoża hodowlanego (1 – 1,0 m, 2 – 1,5 m)

największa liczebność bakterii wykrywana była na podłożu MPA, następnie na podłożu Wenera-Klotza, natomiast najmniejsza na podłożu R2A. W powyższym badaniu znalazł dodatkowo potwierdzenie fakt, iż górna warstwa złóż węglowych była liczniej zasiedlona przez mikroorganizmy, niż warstwa położona niżej. Rozpatrując natomiast wyniki badań w aspekcie liczebności mikroorganizmów, które rozwinęły się na węglach w całym okresie badawczym należy stwierdzić, iż najwięcej komórek bakteryjnych uzyskano z ekstrakcji próbek węgla Chemviron oraz kolejno Norit i Picabiol.

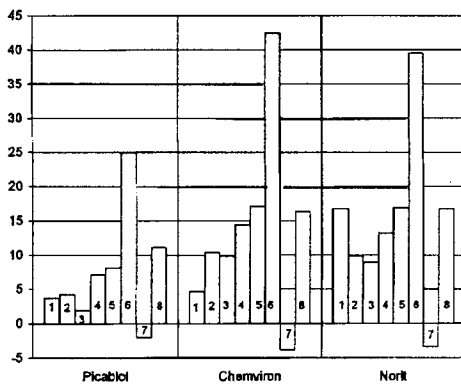
W celu porównania efektywności poszczególnych metod wykonano badania nad oznaczeniem liczebności bakterii w próbkach węgla za pomocą pomiaru stężenia fosfolipidów w biomacie. Wyniki przedstawione na rysunku 3 świadczą o tym, iż procedura określenia liczby bakterii na podstawie zawartości fosfolipidów wykazuje większą efektywność niż metoda posiewów na podłożu MPA. Różnice oznaczonej liczby bakterii w tym przypadku były nawet o trzy rzędy wielkości wyższe na korzyść metody fosfolipidowej.



Rys. 3. Liczebność bakterii w próbkach węgla aktywnych (1 – oznaczenie zawartości fosfolipidów, 2 – posiewy na podłożu MPA)

Przeprowadzone badania identyfikacyjne bakterii, które rozwinęły się na złożach filtrów węglowych wykazały, iż dominującymi liczbowo bakteriami we wszystkich badanych filtrach węglowych były bakterie *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas picketti*, *Xantomonas maltophila*. Były to bakterie typowo wodne, wykrywane w różnych typach złożów węglowych stosowanych do uzdatniania wody.

W tabeli 1 przedstawiono minimalne i maksymalne wartości wybranych wskaźników jakości wody w całym okresie badawczym, przed i po uzdatnieniu na filtrach węglowych, natomiast na rysunku 4 średnie zmniejszenie wartości tych wskaźników uzyskane na poszczególnych złożach sorpcyjnych.

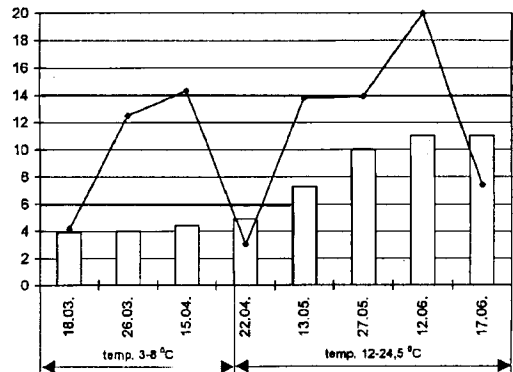


Rys. 4. Średnie wartości stopnia obniżenia wskaźników jakości wody (%) po sorpcji na poszczególnych filtrach węglowych [25] (1 – barwa, 2 – utlenialność, 3 – absorbancja, 4 – OWO, 5 – O_2 , 6 – NH_4^+ , 7 – NO_3^- , 8 – zapotrzebowanie na chlor)

Tabela 1. Wartości wskaźników jakości wody uzdatnionej na filtrach węglowych [25]

Parametr, jednostka	Woda przed filtrami węglowymi		Woda po filtrze Picabiol		Woda po filtrze Chemviron		Woda po filtrze Norit		Wymagania jakościowe		
	min.	maks.	min.	maks.	min.	maks.	min.	maks.	MZIOS	UE	WHO
Barwa, gPt/m ³	2	5	2	5	2	5	2	5	20	20	15
Utlenialność, gO ₂ /m ³	2,2	4,2	2,3	4,0	2,1	3,6	2,2	3,6	–	5	–
Absorbancja UV ₂₅₄	4,6	9,2	4,5	8,2	4,0	7,3	4,1	7,5	–	–	–
OWO, gC/m ³	3,3	4,3	2,9	4,2	2,6	3,8	2,6	3,9	–	–	–
Tlen rozp., gO ₂ /m ³	10,2	13,4	8,4	13,8	5,8	13,6	6,2	13,2	–	nas. >75%	–
Azot amonowy, gN/m ³	0,03	0,07	0,02	0,06	0,02	0,05	0,02	0,06	0,5	0,5	–
Azot azotanowy, gN/m ³	0,6	3,2	0,6	3,2	0,6	3,3	0,6	3,5	10	11	10

Analiza wyników badań wskazuje (rys.4), iż zastosowane granulowane węgle aktywne poprawiają fizyczno-chemiczne właściwości wody. Odnotowano bowiem obniżenie intensywności barwy wody oraz zmniejszenie zawartości substancji organicznych, wyrażonych utlenialnością, absorbancją, OWO i zapotrzebowaniem na chlor. Najlepsze efekty usuwania substancji organicznych uzyskano na węglu Chemviron, nieco niższe na węglu Norit, zaś najniższe na węglu Picabiol. Ubytek azotu amonowego w wodzie i towarzyszący mu przyrost azotu azotanowego wskazywał, iż na węglu aktywnym przebiegał proces nitrifikacji. Proces ten najintensywniej zachodził na węglach Chemviron i Norit, zaś nieco słabiej na węglu Picabiol. Usuwanie związków organicznych na poszczególnych filtrach sorpcyjnych korelowało z liczebnością mikroorganizmów rozwijających się na złożach węglowych. Dla przykładu na rysunku 5 przedstawiono zmianę utlenialności wody po sorpcji na węglu Chemviron w zestawieniu z liczebnością bakterii zasiedlających złożę tego węgla. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż wyraźna poprawa jakości wody następowała dzięki łącznemu zastosowaniu ozonowania i sorpcji wspomaganą procesami mikrobiologicznymi.



Rys. 5. Stopień obniżenia utlenialności wody po sorpcji na węglu aktywnym Chemviron (%) w zestawieniu z liczebnością bakterii zasiedlających złożę

Wnioski

◆ Badania nad sposobem wypłukiwania mikroorganizmów z węgla aktywnego wykazały, że homogenizacja próbek jest o 25% efektywniejszą metodą niż ich wytrząsanie. Spośród zastosowanych roztworów do wymywania drobnoustrojów najbardziej odpowiedni okazał się bufor fosforanowy. Liczebność bakterii zawieszonych w buforze była większa o 60% niż w buforze Tris i o 40% większa niż w wodzie.

◆ Badania ilościowe mikroorganizmów wykazały, że największą liczbę bakterii uzyskano na podłożach hodowlanych, agarowym i MPA, w granicach $10^7 + 10^8$ kom./g węgla. Metoda określania liczby bakterii na podstawie zawartości fosfolipidów pozwoliła na oznaczenie znacznie większej liczby mikroorganizmów (o 2+3 rzędy), niż metody posiewów na płytkach Petriego. Ponadto stwierdzono wyraźnie większą liczbę bakterii na węglu pobranym z górnej warstwy złoża.

◆ Zastosowanie filtrów z granulowanym węglem aktywnym wpłynęło na poprawę jakości wody, przejawiającą się w obniżeniu utlenialności, absorbancji oraz stężenia OWO, na skutek adsorpcji i biologicznego rozkładu związków organicznych.

◆ Przedstawiony w artykule sposób kontrolnych badań biologicznych węzła aktywnego można stosować do oceny zasiedlenia przez mikroorganizmy różnych innych materiałów filtracyjnych, stosowanych na przykład jako wypełnienia filtrów powolnych, czy też filtrów suchych.

LITERATURA

1. S. J. FEAKIN, B. GUBBINS, I. MC GHEE, L. J. SHAW: Inoculation of granular activated carbon with s-triazine-degrading bacteria for water treatment at pilot scale. *Water Research*, 1995, Vol. 29, No. 7, pp. 1681–1688.
2. R. J. MILTNER, S. R. SUMMERS, J. Z. WANG: Biofiltration performance: Part 2 Effect of backwashing. *J. AWWA*, 1995, No. 12, pp. 123–132.
3. A. K. CAMPER, S. C. BROADAWAY: Operational variables and the release of colonized granular activated carbon particles in drinking water. *Journal AWWA*, 1987, No. 5, pp. 70–74.
4. A. LATOSZEK, A. BENEDEK: Some aspects of the microbiology of activated carbon columns treating domestic wastewater. *Environmental Science and Technology*, 1979, Vol. 13, No. 10, pp. 1285–1286.
5. M. W. LECHEVALLIER, T. S. HASSENAUER, A. K. CAMPER: Disinfection of bacteria attached to granular activated carbon. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, No. 11, pp. 918–923.
6. W. S. BREWER, W. W. CARMICHAEL: Microbiological characterization of granular activated carbon filter systems. *Journal AWWA*, 1979, No. 12, pp. 738–740.
7. D. P. WILCOX, E. CHANG, K. L. DICKSON, K. R. JOHANSSON: Microbial growth associated with granular activated carbon in a pilot water treatment facility. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, pp. 406–416.
8. D. VAN DER KOOIJ: Some investigations into the presence and behavior of bacteria in activated carbon filters. *Special Problems of Water Technology*, 1976, Vol. 9, EPA 600/9-76030.
9. D. J. REASONER, E. E. GELDREICH: A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, Vol. 49, No. 1, pp. 1–7.
10. A. FIORE, K. BABINEAU: Activated carbon water filter. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, Vol. 34, pp. 167–171.
11. M. KLOTZ, P. WERNER: Investigations concerning the microbiology of activated filters. *Translations of Reports on Special Problems of Water Technology*, 1976, Vol. 9, EPA 600/9-76030.
12. D. VAN DER KOOIJ: Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *Journal AWWA*, 1992, No. 2, pp. 57–67.
13. D. P. WILCOX, E. CHANG, K. L. DICKSON, K. R. JOHANSSON: Microbial growth associated with granular activated carbon in a pilot water treatment facility. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, Vol. 46, No. 8, pp. 406–416.
14. D. E. NUZBACK et al.: Relation of rumen ATP concentration to bacterial and protozoal numbers. *Appl. and Envir. Microbiol.*, 1983, Vol. 46, No. 3, pp. 533–538.
15. P. SERVAIS, G. BILLEN, C. VENTRESQUE, G. P. BABLON: Microbial activity in GAC filters at the Choisy-le-Roi Treatment Plant. *Journal AWWA*, 1991, No. 2, pp. 62–68.
16. P. SERVAIS, G. BILLEN, P. BONILLOT: Biological colonization of granular activated carbon filters in drinking-water treatment. *Journal of Environmental Engineering*, 1994, Vol. 120, No. 4, pp. 888–899.
17. R. J. MILTNER, S. R. SUMMERS, J. Z. WANG: Biofiltration performance: Part 2 Effect of backwashing. *Journal AWWA*, 1995, No. 12.
18. J. Z. WANG, R. S. SUMMERS, R. J. MILTNER: Assessment of biofiltration performance, Part 1 Relationship to biomass. *Journal AWWA*, 1995, No. 12.
19. W. J. WEBER, M. PIRBAZARI, G. L. MELSON: Biological growth on activated carbon: An investigation by scanning electron microscopy. *Environmental Science and Technology*, 1978, Vol. 12, No. 7, pp. 817–819.
20. B. E. SODERSTROM: Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biol. Biochem.*, 1987, Vol. 9, pp. 59–63.
21. G. G. RODRIGUES, K. PHIPPS, K. ISHIGURO: Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, Vol. 58, No. 7, pp. 1801–1808.
22. S. W. WATSON, T. J. NOVITSKY, H. L. QUINBY: Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, Vol. 4, No. 4, pp. 940–946.
23. J. E. HOBBIE, R. J. DALEY, S. JASPER: Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, Vol. 33, pp. 1225–1228.
24. G. BRUNIUS: Technical aspects of the use of 3', 6'-diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria. *Current Microbiology*, 1980, Vol. 4, pp. 321–323.
25. Wyniki analiz wykonanych w laboratorium MPWiK w m.st. Warszawie.
26. Materiały informacyjne firmy Pica.

On the Utility of Microbiological Analysis in Measuring the Biological Activity of Carbon Filters Used in Water Treatment

Some of the methods made use of in evaluating microorganism growth in carbon filters which are part of a water treatment train were analyzed in terms of their efficiency. Comparative tests were run to establish how the method of carbon sample preparation or microorganism number determination might affect the results obtained. Dominant organisms (in terms of quantity) were identified. Evaluated were the results of microbiological and physicochemical analyses before and after treatment on filter beds made of Chemviron F-400, Norit 0.8 Supra or Picabiol activated carbons. Homogenization and a phosphate buffer as the rinsing solution were found to be best suited for the removal of microorganisms from the carbon grains.

The highest number of microorganisms was the one obtained with the method of phospholipids determination in the carbon bed film. The results of physicochemical analysis (which had been performed after passage through the filter beds) substantiated a higher efficiency of Chemviron and Norit 0.8 Supra carbons as compared to Picabiol. Pseudomonas bacteria were found to be dominant. Bacterial growth was more intensive in the upper than in the lower layers of the carbon beds. The proposed microbiological method of bacteria growth control for granular activated carbon beds are of utility in evaluating the efficiency of the water treatment process.