

STANOVENÍ ASIMILOVATELNÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKU POMOCÍ OPTICKÉ DETEKCE

**RNDr. Petr Gabriel, Ph.D.¹⁾, doc. Ing. Petr Sladký, CSc.^{1,2)},
RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.³⁾, Ing. Andrea Benáková, Ph.D.³⁾,
Ing. Miroslav Váňa³⁾, RNDr. Zdeňka Boháčková⁴⁾, Ing. Zdeňka Jedličková⁴⁾**

¹⁾ Matematicko fyzikální fakulta Univerzity Karlovy, katedra chemické fyziky a optiky,
Ke Karlovu 3, 121 16 Praha 2,

²⁾ Ústav termomechaniky AV ČR, v. v. i.,

³⁾ Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, v. v. i.,

⁴⁾ VODÁRENSKÁ AKCIOVÁ SPOLEČNOST a.s.

Úvod

Asimilovatelný organický uhlík (AOC) je ta část rozpuštěného organického uhlíku, která je asimilovatelná do biomasy mikroorganismů. AOC představuje poměrně malou část rozpuštěného organického uhlíku (0,1 – 9,0 % DOC). Obsah AOC je ve vodě nejčastějším limitujícím faktorem růstu heterotrofních mikroorganismů. Jeho zvýšená koncentrace vede ke zhoršení biologické stability upravené vody, zejména v souvislosti s možností sekundární tvorby biofilmů, které v rozvodných systémech negativně ovlivňují organoleptické vlastnosti pitné vody a díky rozvoji heterotrofní mikroflóry představují zvýšené hygienické riziko. Vodu o obsahu AOC nižším, než je 20 µg/l lze považovat za biologicky stabilní.

Asimilovatelný organický uhlík se doposud stanovoval kultivační metodou (van der Kooij, 1982), která je založena na pomnožení referenčních kmenů *Spirillum* spp. (NOX) a *Pseudomonas fluorescens* (P-17) a vlastním výpočtu na základě vytvořené biomasy a růstového výtěžku výše uvedených kmenů. Kultivační metoda spočívá v eliminaci bakterií přítomných ve vzorku pasterizací, dále se zaočkují referenční kultury, vzorek se kultivuje 5-10 dní při 15°C, a pak se referenční kmeny vyočkují na neselektivní živné médium a kultivují 5-7 dní při 25°C. Na základě jejich nárůstu a růstového výtěžku se spočítá obsah AOC ve vzorku. Vyočkování se provádí opakovaně až do doby dosažení konstantního počtu kolonií. Přestože je tato metoda dostatečně citlivá a reprodukovatelná, hlavní nevýhodou je skutečnost, že je relativně zdlouhavá a náročná na čas, práci a použitý materiál. Zpracování vzorků trvá minimálně 14 dní, vyočkování vzorků a počítání kolonií se provádí obden. Nedostatky původní procedury lze odstranit zavedením nových metod detekce počtu bakterií ve vzorku. V literatuře jsou popsány experimenty s moderní průtokovou cytometrií s fluorescenčním barvením (Hammes et al., 2005) a detekcí pomocí ATP (LeChevallier et al., 1993). Tyto metody detekce počtu bakterií nahrazují krok vyočkování vzorku a urychlují celou proceduru o přibližně 5 dní. Nevýhodou výše uvedených metod je zachování zvláště pracného a nejjednoduššího vzorkování v průběhu snímání růstových charakteristik. Jakákoliv manipulace se vzorkem je vždy spojená s nebezpečím kontaminace dodatečným organickým uhlíkem a znehodnocením výsledků. V neposlední řadě jsou nevýhodou i vysoké pořizovací náklady přístrojového vybavení.

Stanovením asimilovatelného organického uhlíku ve čtyřech úpravných vod se zabýval příspěvek přednesený na Vodárenské biologii 2014 (Baudišová et al. 2014).

Princip optické detekce AOC

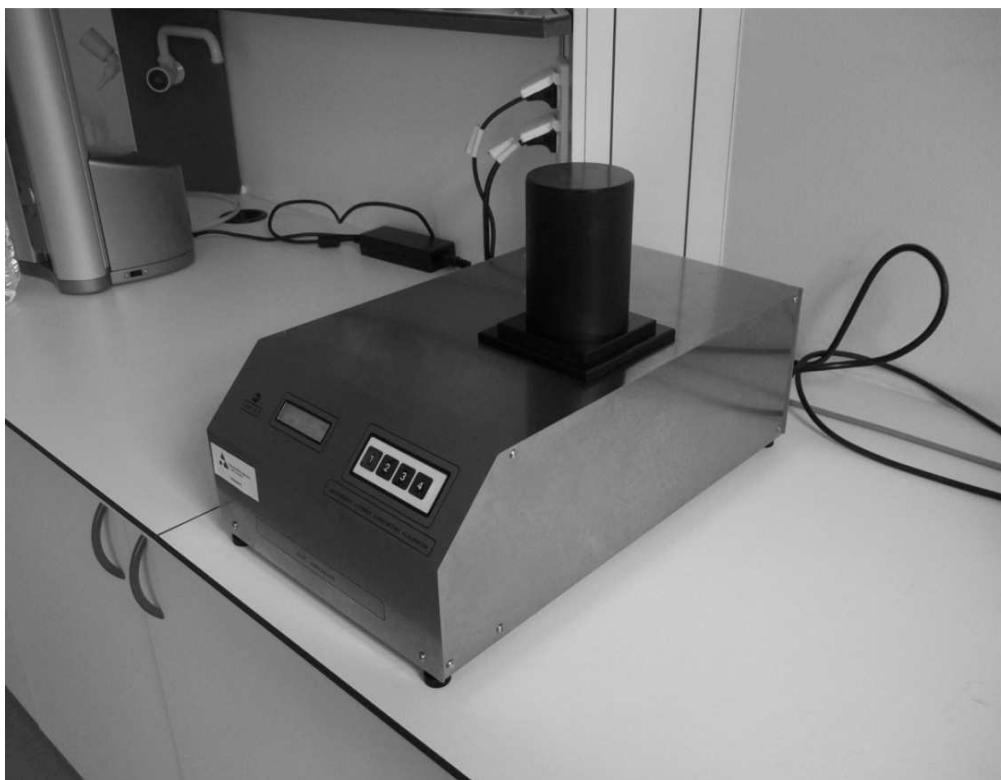
Pro odstranění výše zmíněných nedostatků byla navržena optimalizace původní metody AOC s využitím optické detekce růstu mikroorganismů. V námi navrhované metodě je růst mikroorganismů sledován přímo ve vzorcích pomocí měření elastického rozptylu světla v přímém směru pod malým úhlem 11°-15°. K elastickému rozptylu světla dochází na nehomogenitách v roztoku. Intenzita rozptýleného světla závisí na typu a velikosti rozptylující částice. Z teorie rozptylu světla plyne, že s rostoucí velikostí částice se výrazně zvyšuje intenzita záření rozptýleného v malých úhlech vzhledem ke směru šíření dopadajícího paprsku. Měření intenzity rozptylu pod malým úhlem umožňuje detekovat s velkou citlivostí mikroorganismy ve vzorku. Pro nízké koncentrace rozptylujících center jsou příspěvky od jednotlivých částic aditivní a intenzita rozptýleného záření roste lineárně s jejich koncentrací.

Základní výhody námi navrhované metody jsou:

- Zkrácení doby měření, odpadá fáze vyočkování bakteriálních kmenů a jejich kultivace na živných půdách
- Snížení pracnosti měření, úspora materiálu
- Snížení nebezpečí kontaminace vzorku, měření je bezkontaktní bez zásahu do vzorku, odpadá nebezpečí kontaminace organickým uhlíkem při odběru části vzorku pro vyočkování na živné půdy
- Možnost využití směsného inokula a měření růstu i nekultivovatelných bakterií. Optická detekce je citlivá i na růst těchto mikroorganismů.

Vývoj funkčního vzorku AOC turbidimetru

V rámci projektu TA02020621 - „Optimalizace metody stanovení asimilovatelného organického uhlíku s využitím optické detekce“ probíhá vývoj funkčního vzorku AOC turbidimetru pro optickou detekci AOC. Na obrázku 1 je fotografie první verze tohoto funkčního vzorku, instalovaného v laboratoři VÚV TGM, v.v.i.



Obr. 1. První verze funkčního vzorku AOC turbidimetru instalovaného v laboratoři VÚV T.G. Masaryka, v.v.i.

AOC turbidimetr je mikroprocesorem řízený, plně automatizovaný přístroj. Jako optický zdroj je instalována vysoce výkonná LED dioda svítící v červené části spektra. Měřicí komora umožňuje měření ve vzorkovnicích až do průměru 70 mm. Pod dnem měřicí komory je umístěno magnetické míchadlo. Prototyp je kalibrován na jednotky zákalu NTU standardní kalibrační formazinové stupnice. Instalovaný detektor umožňuje měření zákalu až do hodnoty 1000 NTU. Při nízkých hodnotách zákalu (koncentracích rozptylujících částic) je stabilita detektoru lepší než 0,001 NTU.

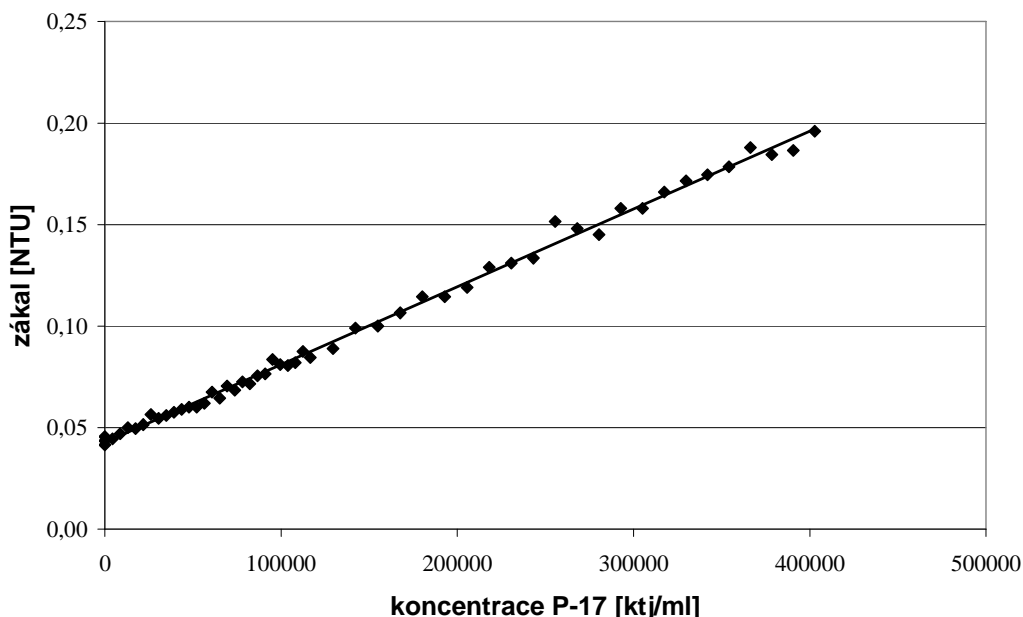
Optika fokusuje měřicí paprsek do úzkého svazku. Detektor snímá světlo ze středu měřicí komory tak, aby se minimalizoval vliv vzorkovnic na naměřené hodnoty. Pro měření AOC byly navrženy a vyrobeny válcové kyvety z optického borosilikátového skla uzavřené krytem se zábrusem (obr. 2). Kyvety a kryty je možné demineralizovat, v kyvetách je možné vzorky případně i pasterizovat, kryty chrání vzorek před kontaminací organickým uhlíkem. Tyto kyvety s kruhovým průřezem by šly využít i přímo pro odběr vzorku (v případě, že by se vzorek nefiltroval) a lze v nich i provádět kultivaci kmenů mikroorganismů a vlastní optické měření, tudíž odpadá jakékoliv přelévání vzorků a veškerá procedura probíhá v jedné nádobě. Tak lze provádět i opakované měření optické denzity (tj. sledovat změny nárůstu kmenů průběžně).



Obr. 2. Optická kyveta (vlevo) ve srovnání s klasickou vzorkovnicí, používanou na kultivační metodu

Na obrázku 3 jsou zobrazeny hodnoty zákalu naměřené prototypem na vzorcích s různou koncentrací referenčního kmene *Pseudomonas fluorescens* (P-17). Ze směrnice naměřené závislosti vychází citlivost AOC turbidimetru pro bakterie *Pseudomonas fluorescens* (P17) $4 \cdot 10^{-7}$ NTU/1 ktj P17/ml. Podle literatury (Hammes, 2006) odpovídá při standardním stanovení AOC 1 μg asimilovatelného uhlíku na litr přibližně nárůstu počtů buněk 10^4 buněk/ml. Z těchto hodnot vychází předpokládaná

citlivost detektoru 0,004 NTU na 1 µg asimilovatelného uhlíku na liter (1 µg C AOC/l) a detekční limit detektoru lepší než 0,3 µg C AOC/l.



Obr. 3. Hodnoty zákalu naměřené AOC turbidimetrem na vzorcích s různou koncentrací *Pseudomonas fluorescens* (P-17)

Optimalizace metody optické detekce stanovení AOC

Byl studován vliv jednotlivých parametrů na stanovení AOC optickou detekcí a byly určeny kritické body metody, týkající se především manipulace s optickými kyvetami a předúpravy vzorků.

Hlavní kritické body metody optické detekce jsou:

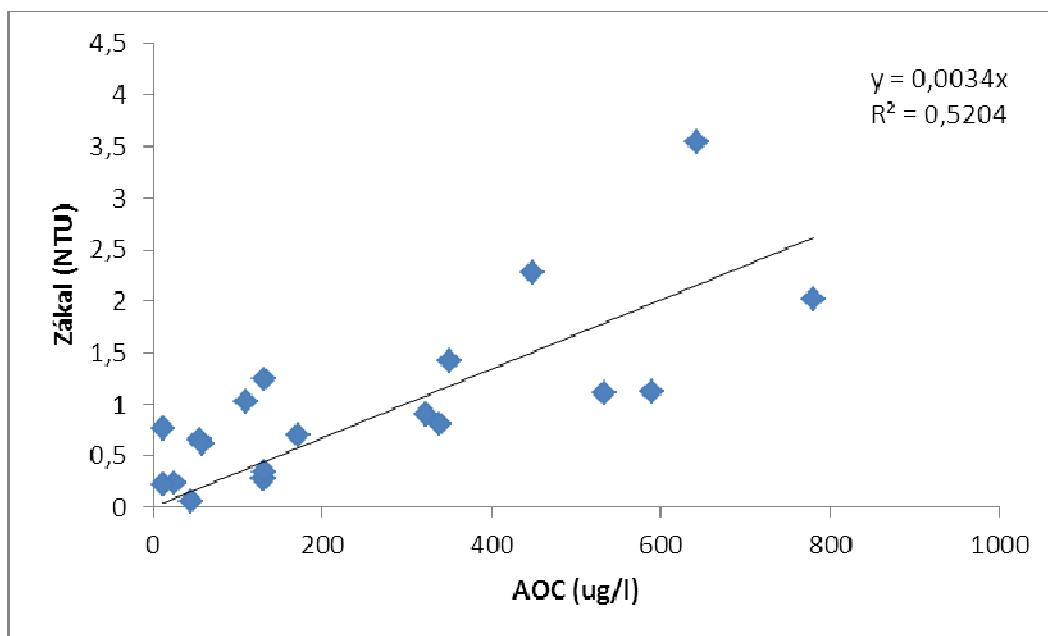
- Je nutné přefiltrovat vzorek přes filtr s porozitou 0,2 µm (např. Cyclopore Track Etched membránové filtry od firmy Whatman), pokud je jeho zákal vysoký (vyšší než 0,5 NTU), ale je to vhodné i u vod s nižším zákalem. Tímto se odstraní i naprostá většina bakterií, přítomných ve vzorku a není nutná pasterizace. Před vlastní filtrací se filtr promyje větším množstvím (až 1000 ml) vody s minimálním obsahem organického uhlíku.
- Je nutné vypláchnout kyvetu s demineralizovaným magnetickým míchadlem i uzávěrem minimálně 200 ml vzorku.
- Při dávkování referenčního kmene je třeba zásobní kulturu pečlivě zhomogenizovat (např. pomocí vortexu), aby byly minimalizovány shluky buněk, apod. Při dávkování (na 200 ml se dávkuje pouze 33 µl) byla zjištěna opakovatelnost 11,6 %, což je o něco více než u klasických vzorkovnic (kde se očkuje 100 µl do 600 ml) – 6 %.
- Je třeba vložit sterilní aluminiový pásek pod uzávěr kyvety, aby nedošlo k podtlaku při přísátí uzávěru.
- Vždy je nutné pečlivě omýt vnější povrch kyvety před každým optickým měřením (vhodné jsou jednorázové vlhčené ubrousky určené na čištění optiky – tj. například i brýlí) a kontrolovat čistotu povrchu kyvety a nepřítomnost bublin

v měřeném vzorku (kyvety je nutné uchopit pouze mimo střední část, kde prochází paprsek během optického měření).

- Před optickým měřením nechat vzorek minimálně 30 sekund promíchat demineralizovaným magnetickým míchadlem přímo v komoře AOC turbidimetru.
- Měřit hodnotu zákalu po inokulaci vzorku a po kultivaci. Pro výpočet hodnoty AOC se použije rozdíl naměřených hodnot, který odpovídá nárůstu koncentrace bakteriálních kmenů během kultivace.

Srovnání výsledků stanovení AOC klasickou kultivační metodou a metodou optické detekce

Byla provedena série experimentů vedoucí ke srovnání výsledků stanovení AOC kultivační metodou a optickou detekcí. Byly použity vzorky s různým obsahem AOC (balená voda, surová voda). Experimenty probíhaly v nových kyvetách (viz výše). Po přidání inokula byl na AOC turbidimetru změřen zákal a vzorky byly ponechány v termostatu při 15°C týden na kultivaci. Po 5 dnech kultivace ve vzorkovnicích byl znovu změřen zákal. Rozdíl v naměřených hodnotách zákalu před a po kultivaci odpovídá nárůstu koncentrace *Pseudomonas fluorescens* P17 ve vzorku. Poté byly vzorky vyočkovány na půdy a po kultivaci při 25°C byla vyhodnocena koncentrace bakteriálního kmene. Na obr. 4 je vynesena závislost zákalu (rozdíl zákalu před a po kultivaci) naměřeného na funkčním vzorku AOC turbidimetru na koncentraci AOC, vypočteného z růstového výtěžku vykultivovaných bakterií. Z obr. 4 je zřejmé, že výsledky optické detekce a klasické kultivační metody spolu korelují. Domníváme se, že míra korelace půjde ještě zvýšit dalším vylepšením jednotlivých kroků procedury (viz kapitola výše), např. vylepšením homogenizace vzorků, měřením většího počtu vzorků, zavedením paralelních analýz apod.



Obr. 4. Srovnání výsledků stanovení AOC kultivačně a optickou metodou (rozdíl v zákalu před a po kultivaci)

V letošním roce bude prováděno měření AOC na vybraných úpravnách vody již paralelně oběma metodami.

Závěr

Dosavadní měření potvrdila použitelnost optické detekce pro stanovení AOC. Optická detekce zkracuje a snižuje pracnost měření, snižuje nebezpečí kontaminace vzorků dodatečným organickým uhlíkem. Tyto výhody by měli pomoci většímu rozšíření AOC metody do praxe.

Literatura

- Baudišová D., Váňa M., Benáková A., Boháčková Z., Jedličková J., Gabriel P. (2014): Výzkum asimilovatelného organického uhlíku v systémech výroby a distribuce pitné vody. In: Říhová Ambrožová J.(Ed.): *Vodárenská biologie 2014*, Praha, str. 120-124.
- Hammes F., Egli T. (2005). New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculum. *Environmental Science and Technology*, (39), 3289-3294.
- Hammes, F., Salhi, E., Koster, O., Kaiser, H. P., Egli, T., von Gunten, U. (2006). Mechanistic and kinetic evaluation of organic disinfection by-product and assimilable organic carbon (AOC) formation during the ozonation of drinking water. *Water Research* 40, 2275-2286.
- Hem L. J., Efraimson H. (2001). Assimilable organic carbon in molecular weight fraction of natural organic matter, *Wat. Res.*, 35(4), 1106-1110.
- LeChevallier, M.W., Shaw, N.E., Kaplan, L.A., Bott, T.L. (1993) Development of a rapid assimilable organic carbon method for water. *Applied and Environmental Microbiology* 29(5), 1526 – 1531.
- van der Kooij D., Visser A., Hijnen W. A. M. (1982). Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water, *Research and Technology, Journal American Water Works Assotiation*, 540-547.

Poděkování

Zpracováno s podporou projektu Technologické agentury České republiky „Optimalizace metody stanovení asimilovatelného organického uhlíku s využitím optické detekce“ TA 02020621