

# Stanovení asimilovatelného organického uhlíku ve vodárenských systémech

## **Autoři**

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D., Ing. Miroslav Váňa, Ing. Andrea Benáková, Ph.D.,  
Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, veřejná výzkumná instituce  
RNDr. Petr Gabriel, CSc., Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy v Praze

## **Recenzenti:**

Doc. RNDr. Petr Dolejš, CSc., W&ET Team  
Mgr. Karel Kolář, Pražské vodovody a kanalizace a.s.



## Obsah:

1.	Úvod	3
2.	Přehled problematiky	3
2.1.	Mikroorganismy a jejich výskyt v pitných vodách	3
2.2.	Charakteristika a význam asimilovatelného organického uhlíku	4
2.3.	Význam asimilovatelného organického uhlíku v systémech úpravy vody	4
2.4.	Vliv technologií úpravy vody na hodnoty asimilovatelného organického uhlíku	5
2.5.	Výsledky výzkumu asimilovatelného organického uhlíku	6
3.	Metody stanovení asimilovatelného organického uhlíku	7
3.1.	Stanovení asimilovatelného organického uhlíku kultivační metodou	8
3.1.1.	Princip kultivační metody	8
3.1.2.	Přístroje a pomůcky	8
3.1.3.	Pracovní postup	8
3.1.4.	Charakteristiky metody	10
3.2.	Stanovení asimilovatelného organického uhlíku metodou optické detekce	10
3.2.1.	Princip optické detekce	10
3.2.2.	Přístroje a pomůcky	12
3.2.3.	Pracovní postup	12
3.2.4.	Charakteristiky metody	14
3.3.	Hlavní kritické body stanovení asimilovatelného organického uhlíku	14
3.4.	Srovnání metod asimilovatelného organického uhlíku kultivační metodou a metodou optické detekce	15
4.	Shrnutí	16
5.	Odkazy	17
5.1.	Literární přehled	17
5.2.	Seznam publikací a prezentací, které předcházely vytvoření certifikované metodiky	18
6.	Seznam příloh	19

## 1. Úvod

Obsahem tohoto dokumentu je certifikovaná metodika, která je výstupem projektu Technologické agentury ČR „Stanovení asimilovatelného organického uhlíku metodou optické detekce“ (TA 02020621).

Certifikovaná metodika se zabývá významem asimilovatelného organického uhlíku v systémech výroby a distribuce pitné vody a je určena pracovníkům z oboru vodovodů a kanalizací, a to jak provozním technologům (část týkající se významu asimilovatelného organického uhlíku, jeho výskytu a změn ve vodárenských systémech), tak pracovníkům laboratoří (metodická část).

Součástí certifikované metodiky je popis nové metody stanovení asimilovatelného organického uhlíku pomocí optické detekce, která je využitelná pro rychlé stanovení asimilovatelného organického uhlíku v provozech.

Zavedení certifikované metodiky do praxe umožní využít tento doposud opomíjený ukazatel ke kontrole kvality vody, což povede k další možnosti identifikace a řešení problémů ve vodárenské praxi.

## 2. Přehled problematiky

### 2.1. Mikroorganismy, a jejich výskyt v pitných vodách

V systémech výroby a distribuce pitné vody je upravená pitná voda pravidelně kontrolována. Hlavními mikrobiologickými ukazateli jsou koliformní bakterie (indikující technologické závady při úpravě), *Escherichia coli* (indikátor fekálního znečištění) a kultivovatelné mikroorganismy při 22°C a 36°C (indikátory obecného znečištění, jako je např. nadbytek organických látek apod.). Jako doplňující ukazatel se stanovují intestinální enterokoky (indikátor fekálního znečištění) a v některých případech (zdroj surové vody povrchová voda, mělké studny apod.) *Clostridium perfringens*. Z druhů bakterií, běžně se vyskytujících v pitné vodě, lze jmenovat např. rody *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* a *Spirillum* (van der Kooij, 1990). Fluorescenční pseudomonády mohou tvořit 1 až 10 % heterotrofní bakteriální populace. Van der Kooij (1991) též zjistil, že se aeromonády mohou množit v distribučních systémech pitné vody i při velmi nízkých koncentracích nízkomolekulárních sloučenin uhlíku (pod 10 µg/l), a to především v případě nízkých počtů autochtonních bakterií, které substráty využívají rychleji. Rozvoj aeromonád je spojen s biofilmy. Pod mikroskopem (fázový kontrast, kontrast Nomarski) lze v pitné vodě rozlišit i další bakteriální rody, jako např. *Hyphomicrobium*, *Gallionella* a další. Z dalších mikroorganismů lze běžně detekovat mikromycety (plísňe), aktinomycety a kvasinky. Dále je v pitné vodě vysoký počet (až statisíce v 1 ml) bakterií, které nevyrostou na žádných neselektivních kultivačních médiích, používaných ke stanovení kultivovatelných mikroorganismů (např. trypton, sójový agar), jsou detekovatelné pouze mikroskopicky a nemají ani podrobné taxonomické zařazení.

Pitná voda odchází z úpraven vody (ÚV) hygienicky zabezpečená (desinfikovaná např. chlórem nebo jeho sloučeninami), obsah desinfekčních činidel pak postupně v distribuční síti

klesá. V případě poklesu pod určitou mez může dojít k sekundárnímu rozvoji heterotrofní mikroflóry v distribučních řadech a ke zhoršení organoleptických vlastností vody. Desinfekční činidla jsou velmi účinná na bakterie přítomné „ve vodě“, méně pak na přisedlou složku mikroflóry v tzv. biofilmech. Nadměrný bakteriální růst může také zvýšit korozi konstrukčních materiálů, nebo může dojít k rozvoji patogenních a potenciálně patogenních bakterií (*Legionella spp.*, *Mycobacterium spp.*). Podle „zjištěné úrovně“ nebo „potenciálu“ pitné vody podporovat další rozvoj mikroflóry ve vodovodních řadech rozlišujeme vodu biologicky stabilní a biologicky nestabilní. V případě, že je voda „biologicky stabilní“, je další nárůst mikroflóry omezen a je možné použít i menší množství desinfekčních látek. **Jedním z nejvýznamnějších ukazatelů biologické stability vody je asimilovatelný organický uhlík (AOC).** Tento ukazatel se dostal do popředí zájmu především proto, že některé technologické postupy (zejména v současné době rozšiřovaná ozonizace) jej mohou nadměrně zvyšovat. V České republice se AOC dosud běžně nestanovuje, na rozdíl od dalších zemí (např. Nizozemí, Portugalsko). V Nizozemí se kromě hodnoty AOC posuzuje kvalita vody i pomocí BFR (biofilm formation rate) a BFP (biofilm formation potential) testů, které určují schopnost a rychlost tvorby biofilmů (van der Kooij, 2000).

## 2.2. Charakteristika a význam asimilovatelného organického uhlíku

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) a většinou se uvádí v jednotkách  $\mu\text{g/l}$ . Na obsahu AOC se podílí především malé organické molekuly (Hem a Efraimsen 2001). Vodu o nižším obsahu AOC než je  $20 \mu\text{g/l}$  lze považovat za biologicky stabilní. Při obsahu AOC vyšším než je  $50 \mu\text{g/l}$  byl zjištěn (LeChevallier et al., 1991) sekundární nárůst koliformních bakterií v distribučních systémech (další korelace nárůstu koliformů byla zaznamenána v souvislosti s deštěm, teplotou vody nad  $15^\circ\text{C}$  a s celkovým organickým uhlíkem  $\text{TOC} > 2,4 \text{ mg/l}$ ). Opětovný růst koliformních bakterií (tzv. „regrowth“) v upravených vodách ze 79 různých ÚV o různém obsahu AOC studovali Kaplan et al. (1992). Jako modelový organismus použili druh *Enterobacter cloacae*. Nebyla zjištěna statisticky významná korelace mezi opětovným růstem koliformních bakterií a obsahem AOC (a ani biodegradabilním uhlíkem - BDOC). Hodnoty AOC a BDOC mezi sebou významně korelovaly ( $r=0,594$ ). Podobné výsledky získali i Rice et al. (1991) s tím, že vyšší nárůst koliformních bakterií byl zaznamenán ve vodách po ozonizaci. Další studie (LeChevallier et al. 1996) prokázala, že systém využívající jako hygienické zabezpečení volný chlór s hodnotou AOC nad  $100 \mu\text{g/l}$  měl 82 % vzorků pozitivních na koliformy a devatenáctkrát vyšší hodnoty koliformních bakterií, než systém s AOC pod  $99 \mu\text{g/l}$ . Van der Kooij (1992) zjistil významnou korelaci mezi obsahem AOC na odtoku z úpravené vody a heterotrofními mikroorganismy v distribuované vodě. Pokud byl obsah AOC v upravené vodě menší než  $10 \mu\text{g/l}$ , tak počty heterotrofních mikroorganismů vyhovovaly limitu pod  $100 \text{ KTJ/ml}$ , fekální koliformní bakterie nebyly detekovatelné ve 300 ml vzorku a koliformní bakterie byly zjištěny jen ojediněle (a více v případech, kdy byla zdrojem podzemní voda).

## 2.3. Význam asimilovatelného organického uhlíku v systémech úpravy vody

Surová voda může obsahovat různé množství asimilovatelného organického uhlíku. Obecně lze konstatovat, že v povrchové vodě je více AOC, než ve vodě podzemní, a byly zaznamenány i sezónní rozdíly v obsahu AOC během roku. Pro úpravu vody na vodu pitnou

se v České republice používají povrchové a podzemní zdroje vody. Jejich poměr je cca 1:1. Průměrná hodnota AOC v surové vodě pocházející z vodárenské nádrže Fláje (Česká republika, Krušné hory) byla 24,5 µg/l, v upravené vodě byla průměrná hodnota 9,43 µg/l (Baudišová, Lochovský 2005). Významným podílem organických látek v této lokalitě byly huminové kyseliny 60 - 85 % (Lochovský et al., 2004, Lochovský 2005). V surové vodě z řeky Úhlavy byly zjištěny hodnoty AOC od 25 do 120 µg/l (Dolejš et al. 2008). Van der Kooij (1990) uvádí hodnoty AOC v surové vodě z nádrží v rozmezí 30-100 µg/l. Hem a Efraimsen (2001) zjistili o 50 - 100 % vyšší obsah AOC v surové vodě pocházejících z bažin, než z jezer. Při měření AOC u vod s vysokým obsahem huminů prokázali Miettinen et al. (1999) důležitost přidávání anorganických nutrientů do testovacího média na stanovení AOC, neboť přírůstek nutrientů obsah změřeného AOC zvyšuje. Nejvyšší hodnotu AOC v podzemní vodě (zejména s anaerobními podmínkami) zjistili van der Kooij et al. (1982). Na druhé straně ve stejných lokalitách byl relativní obsah AOC (v % oproti DOC) nejvyšší v jezerní vodě a nejmenší v podzemní vodě.

#### **2.4. Vliv technologie úpravy vody na hodnoty asimilovatelného organického uhlíku**

Ze současně používaných vodárenských technologií množství AOC významně ovlivňuje proces ozonizace, kdy vzorky po ozonizaci mívají vyšší obsah AOC než vlastní surová voda. Zároveň se po ozonizaci zvyšuje procentuální zastoupení AOC a DOC (van der Kooij et al. 1982). Hodnoty AOC se snižují koagulací a rychlou filtrací, případně nanofiltrací. Filtry GAU (granulované aktivované uhlí) mohou snížit obsah AOC až o 60 % (Liu et al. 2002). Soonglerdsonghpa et al. (2011) zjistili snižování AOC pouze na oživeném aktivním uhlí (počty bakterií byly řádově  $10^8$ /g mokré hmotnosti). DGGE odhalila, že bakteriální společenstvo surové vody je zcela odlišné od bakteriálního společenstva na aktivním uhlí, kde převládaly zástupci tříd *Firmicutes*, *Alfaproteobacteria* a *Gammaproteobacteria* a dále cyanobakterie (sinice). Sterilní aktivní uhlí obsah AOC nesnižovalo. Zvýšení obsahu AOC po ozonizaci o 127 % (ze 70 µg/l na 148 µg/l) zjistili Escobar a Randall (2001). Následná nanofiltrace měla na snížení AOC (malé molekuly) oproti BDOC jen malý vliv. Stejná skupina autorů (Escobar et al., 2001) se taktéž zabývala odstraňováním AOC a BDOC v upravené vodě reversní osmózou a nanofiltrací. Nebyly zjištěny významné rozdíly odstraňování AOC v závislosti na materiálu membrán, účinnost odstranění byla při pH 7,5 nad 90 % a při pH 5,5 nad 75 %. Zvýšená tvrdost a iontová síla snížily účinnost odstraňování AOC. Negativní vliv pH, tvrdosti vody a iontové síly upravené vody na odstraňování AOC byla potvrzena i v další práci (Escobar et al., 2002). Kim et al. (2010) zjistili, že při maximální koncentraci ozónu 4 mg/l vzrostla koncentrace AOC z 50 na 86 µg/l a pak následně klesla, což autoři přičítají faktu, že ozón přetvořil organickou hmotu na inhibitory růstu mikroorganismů, nebo došlo k formaci oxidu uhličitého z BDOC. Hodnoty AOC 32 µg/l v upravené vodě uvádějí Hammes et al. (2010), celkové počty bakterií stanovili řádově  $10^4$ /ml (metoda cytometrie). Lehtola et al. (2002) studovali změny koncentrace AOC během provozů ve vodárnách (úpravnách vod) s podzemními i povrchovými zdroji surové vody. Chemická koagulace koncentraci AOC redukovala, koagulant PAC byl méně toxický vůči testovacímu kmenu P17 než železitý nebo hlinitý koagulant. Ozonizace obsah AOC výrazně zvýšila, filtrace přes aktivní uhlí odstranila 85 % AOC, úprava (zvýšení) pH a zvyšování tvrdosti vody zvýšily hodnotu koncentraci AOC o 26 %.

Obsah AOC se může dále postupně měnit na trase od úpravny vody ke spotřebiteli, významný vliv na to má i typ potrubí. Podle van der Kooij (1992) se v distribučním systému hodnota AOC snižuje se vzdáleností od úpravny vody. Ramseier et al. (2011) studovali pět různých oxidačních činidel (ozón, oxid chloričitý, chlór (jako HOCl), manganistan draselný a železan) z hlediska ovlivnění tvorby AOC ve vodě. Zjistili, že ozón a železan mají velký vliv na zvýšení AOC, ostatní oxidační činidla obsah AOC neovlivňují, nebo jen velmi limitovaně. Pomnožení koliformních a heterotrofních bakterií (především *Flavobacterium spp.* a *Pseudomonas vesicularis*) v distribučním systému studovali LeChevallier et al (1987). Velký nárůst bakterií našli po vzdálenosti kilometr v distribuční síti, heterotrofní bakterie silně korelovaly s místem odběru, pH, teplotou a zbytkovým chlórem. Koliformní bakterie s žádnou touto veličinou výrazně nekorelovaly. Naopak hodnota AOC v distribučním systému neustále klesala. Miettinen et al. (1997) zjistili, že hodnota AOC v distribučním systému u úpraven vody vyrábějící vodu z podzemních zdrojů klesala mírně, zatímco v distribučním systému u úpraven vody vyrábějících vodu z povrchových zdrojů až o 40 %.

Z experimentálních prací se dále stanovením AOC ve vodách z 5 úpraven vody v Číně zabývali Liu et al. (2002). Jenom 4 % vzorků upravené vody měla menší obsah AOC než 100 µg/l a 50 % vzorků menší než 200 µg/l. V případě, že byla použita jako surová voda voda podzemní, byly výsledky lepší, než u povrchové vody. Polanska et al. (2005) naměřili hodnoty AOC na úpravnách vody, kde nebyla prováděna chlorace, kolem 50 µg/l. AOC u upravené, hygienicky zabezpečené vody bylo průměrně 72 µg/l. Ozonizace a chlorace obsah AOC zvyšovaly. V případě ozonizace bylo dosaženo hodnoty AOC až 519 µg/l, přičemž více se zvyšovala složka stanovená pomocí kmene NOX oproti P17, chlorace zvýšila hodnoty AOC o 60 %. Granulované aktivní uhlí koncentraci AOC snižovalo. UV záření nemělo na koncentraci AOC vliv. Obsah AOC byl největší v létě a nejnižší v zimě. V létě může být zvýšený obsah AOC způsoben rozvojem řas (Kim et al., 2011).

## **2.5. Výsledky výzkumu asimilovatelného organického uhlíku ve vybraných úpravnách vody v České republice**

V rámci projektu TA 0202621 jsme stanovovali AOC a další mikrobiologické, fyzikálně - chemické a chemické ukazatele na vybraných úpravnách vody společnosti VAS, a.s., s různým typem surové vody a s různými technologiemi úpravy vody (pilotní průzkum byl proveden na 9 ÚV, podrobněji bylo studováno 5 ÚV). Hodnoty AOC v surové vodě se v průběhu roku lišily, nebyly však zaznamenány přímo sezónní trendy. Absolutní hodnoty AOC v surových vodách odpovídají výše uvedeným literárním údajům (Dolejš et al., 2008, Van der Kooij, 1990 apod.). Nejvyšší hodnoty byly zjištěny v úpravně vody, kde jsou zdroji surové vody prameniště a vrt. Taktéž změny obsahu AOC během technologické úpravy byly v souladu s výše uvedenou literaturou. Písková filtrace i GAU filtry hodnotu AOC snižovaly (podobně jako uvádějí Liu et al. 2002, van der Kooij et al. 1982), ozonizace jeho obsah naopak zvyšovala (ve shodě s Escobar a Randall 2001, Polanska et al. 2005, van der Kooij 1982 apod.). Na rozdíl od výsledků, předložených autory Polanska et al. (2005) došlo k určitému zvýšení obsahu AOC po aplikaci UV záření. Upravená voda měla vždy nejnižší hodnotu AOC, hygienické zabezpečení (vždy na bázi chlorace, na každé úpravně vody jiné) hodnotu AOC nezvyšovalo (referenční kmen P-17). Hodnoty AOC pod 50 µg/l vykazovaly všechny upravené vody. Jednotlivé hodnoty AOC dobře dokreslovaly aktuální stav na úpravnách vody (např. ucpané odběrové kohouty, stav GAU filtrů apod.). Nebyla zjištěna statisticky významná závislost mezi obsahem AOC a dalšími ukazateli (heterotrofní

mikroorganismy, elektrická konduktivita, pH, TOC). Určitá souvislost se může jevit mezi hodnotou AOC a TOC, neboť i hodnota TOC se po ozonizaci může mírně zvyšovat. Statisticky významná korelace mezi těmito dvěma ukazateli však prokázána nebyla.

Výsledky stanovení AOC ve třech různých úpravách vody (kultivační metodou) jsou uvedeny v příloze I. Poměr zastoupení AOC a BDOC v jednotlivých profilech je uveden v příloze II.

### 3. Metody stanovení asimilovatelného organického uhlíku

Stanovení AOC patří mezi skupinová stanovení, stanovuje se část organického uhlíku (většinou se jedná o malé molekuly), která je asimilovatelná do biomasy organismů (mikroorganismů). Vzhledem k jeho velmi nízkým koncentracím ( $\mu\text{g/l}$ ), nelze asimilovatelný organický uhlík stanovit tradičními chemickými metodami, k jeho detekci je nutné použít metody mikrobiologické (kultivační), nebo fyzikální (optické). Na stanovení AOC neexistuje žádná národní ani mezinárodní norma, určité informace jsou uvedeny v Amerických standardních metodách (USEPA 2012).

Součástí této certifikované metodiky je jednak popis a charakteristika kultivační metody stanovení AOC, která byla optimalizována a validována podle publikace van der Kooij (1992) a především nově navržená metoda stanovení AOC pomocí optické detekce za použití AOC turbidimetru. Srovnání obou metod je uvedeno v tabulce 1.

Hlavní výhody metody optické detekce jsou zkrácení celkové doby analýzy a relativní bezzásahovost procesu stanovení, což umožňuje průběžné sledování růstu kmenů a zachycení stacionární fáze růstu.

Tab. 1: Srovnání jednotlivých procesních kroků u obou popsaných metod

	<b>Kultivační metoda</b>	<b>Metoda optické detekce</b>
<b>Demineralizace vzorkovnic / kyvet</b>	Je nutná	Je nutná
<b>Předúprava vzorků</b>	Pasterizace	Filtrace, filtry o porozitě 0,22 $\mu\text{m}$ , před použitím propláchnout vodou s minimálním obsahem AOC
<b>Inokulace referenčních kmenů a kultivace</b>	Na 600 ml je 100 $\mu\text{l}$ inokula, kultivace 5-10 dní, 15°C	Na 180 ml je 30 $\mu\text{l}$ inokula, kultivace 5-10 dní, 15°C, lze průběžně kontrolovat nárůst

<b>Průběžné měření</b>	Jen se zásahem do vzorku, vyočkování kmenů je časově i materiálně náročné	Je možné, nedochází k zásahu do vzorku (a tím k možnosti kontaminace)
<b>Využití vnitřního inokula *</b>	Není možné	Je možné
<b>Celková doba analýzy</b>	Minimálně 14 dní	Maximálně 10 dní, možné je získat i průběžné výsledky

\*(tj. koncentrované autochtonní mikroflóry)

### 3.1. Stanovení asimilovatelného organického uhlíku kultivační metodou

#### 3.1.1. Princip kultivační metody

Kultivovatelné bakterie ve vzorku vody jsou zahubeny pasterizací, poté je vzorek zaočkován referenčními kmeny a po kultivaci jsou referenční kmeny narostlé na asimilovatelném organickém uhlíku ve vzorku vody vyočkovány a vykultivovány.

#### 3.1.2. Přístroje a pomůcky

- Demineralizované vzorkovnice z borosilikátového skla se zábrusovými zátkami
- Vodní lázeň se schopností udržovat teplotu  $(80 \pm 5)^\circ\text{C}$
- Inkubátor se schopností udržovat teplotu  $15^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  (Mettler)
- Inkubátor se schopností udržovat teplotu  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  (Mettler)
- Počítačka kolonií
- Petriho misky skleněné nebo plastové o průměru 90 mm
- Pipety (kalibrované sterilní, schopné odměřovat objemy 0,1 ml a výše)
- Roztírací tyčinky (hokejky)

#### 3.1.3. Pracovní postup

- *Odběr a uchování vzorků.* Vzorky musí být odebírány za dodržení platných pravidel pro vzorkování pitných vod (především podle ČSN ISO 5667-5) do předem připravených demineralizovaných (a vypálených minimálně po dobu 4 hodin při  $250^\circ\text{C}$ ) vzorkovnic. Pro kultivační metodu se odebírá minimálně 600 ml vzorku. Vzorky musí být dopraveny do laboratoře za stálého chlazení a zpracovány co nejdříve po odběru, maximálně do 24 hodin.
- *Příprava laboratorního skla a pomůcek.* Jak je uvedeno v tabulce 1, při stanovení AOC je třeba vždy vyloučit, nebo alespoň maximálně omezit, jakýkoli přísun AOC z vnějšího prostředí, čehož se dosáhne demineralizací použitého skla. Příklady postupů demineralizace jsou uvedeny v příloze III.



- *Příprava referenčních kmenů.* Při stanovení AOC se používají referenční kmeny *Pseudomonas fluorescens* (P17 - kmen ATCC 49642), případně *Spirillum spp.* (NOX – ATCC 49643) ve stacionární fázi svého růstu. Příprava referenčních kmenů je uvedena v příloze IV.
- Do připravené vzorkovnice se odměří 600 ml vzorku (vhodné je stabilně (např. zářezem pomocí diamantového nože) označit objem 600 ml na vzorkovnici). Pasterizuje se ve vodní lázni 45 minut při 80°C, každých 10 minut se vzorek promíchává. Po vyndání se nechá zchladnout na laboratorní teplotu. Pro větší přesnost stanovení je vhodné provádět paralelní zpracování vzorku ve dvou vzorkovnicích.
- *Inokulace vzorkovnic* se provede roztoky kmenů P17 (0,1 ml) a případně NOX (0,2 ml).
- *Inkubace vzorků* probíhá 7 – 10 dní při 15°C.
- *Vyočkování příslušně ředěného vzorku.* Ředění vzorku se provede podle ČSN EN ISO 8199 (jako vhodný ředicí roztok lze doporučit např. fyziologický roztok) tak, aby na plotnách vyrostlo 20-300 cílových kolonií. 0,5 ml ředěného vzorku se vyočkuje na předsušené misky s Lab-Lemco agarem (příloha IV) a rozetře se rozetírací tyčinkou („hokejkou“). Pro „běžné“ koncentrace AOC v naprosté většině případů postačuje ředění stonásobné, tisícinásobné a desetitisíci násobné.
- *Inkubace* probíhá 5 dní při (25 ±1)°C.
- *Odečítání.* Na tmavé podložce a pod zvětšovací (5-6x) lupou se spočítají kolonie, typické pro P 17 (mléčně zbarvené kolonie o průměru 3-5 mm, obr. 1) a NOX (drobné, mléčně zbarvené kolonie o průměru 1 mm). Výsledky se přepočítají na 1 ml vzorku.
- *Výpočet výsledků.* Na základě známého růstového výtěžku pro oba dva referenční kmeny se z jejich počtu vypočítá obsah AOC (v µg/l) ve vzorku podle vzorce:

$$AOC = (N_{max} * 1000) / Y$$

kdy  $N_{max}$  je hodnota nárůstu referenčního kmene v jednotkách KTJ/ml (hodnota po 7 nebo 10 dnech inkubace, podle toho, která je vyšší)

Y je růstový výtěžek, pro P 17 =  $4,1 * 10^6$  a pro NOX  $1,2 * 10^7$  (KTJ/µg AOC)



*Obr. 1: Růst kmenu P17 na L-L agaru*

#### **3.1.4. Charakteristiky metody**

Byl stanoven rozptyl měření u jednotlivých kritických kroků stanovení, který je v tabulce 2 vyjádřen jako relativní směrodatná odchylka z opakovaných měření. Opakovatelnost celého procesu měření se pohybuje okolo 40 %.

*Tab. 2: Rozptyl měření u jednotlivých kroků kultivační metody*

<b>Krok stanovení</b>	<b>Opakovatelnost</b>
Demineralizace vzorkovnic	-
Odměrování objemu vzorku	2,5 %
Očkování inokula	10 %
Mikrobiologické stanovení referenčních kmenů	25 %

### **3.2. Stanovení asimilovatelného organického uhlíku metodou optické detekce**

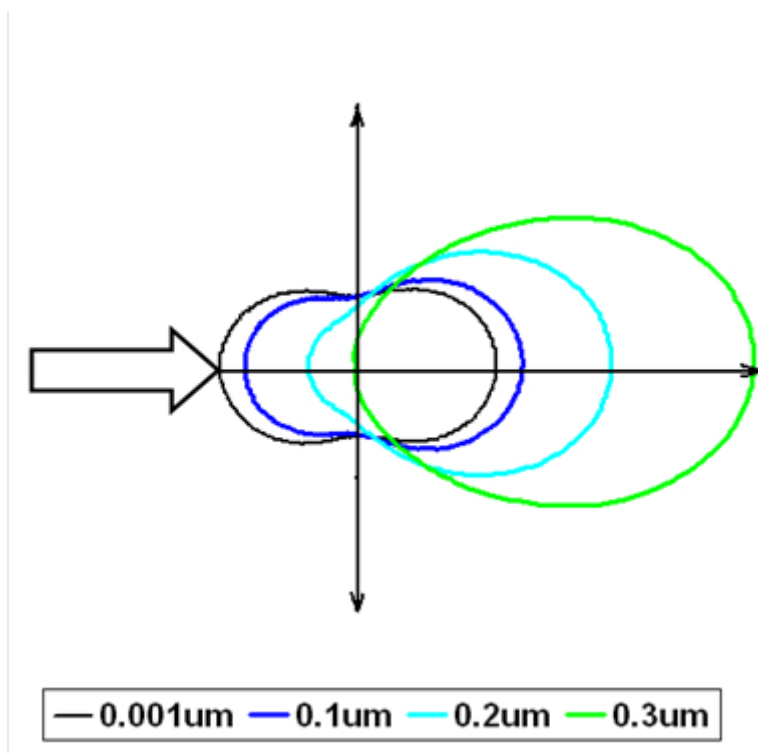
#### **3.2.1. Princip optické detekce**

Při použití metody optické detekce je růst mikroorganismů sledován přímo ve vzorcích pomocí měření elastického rozptylu světla v přímém směru pod malým úhlem 11°- 15°.

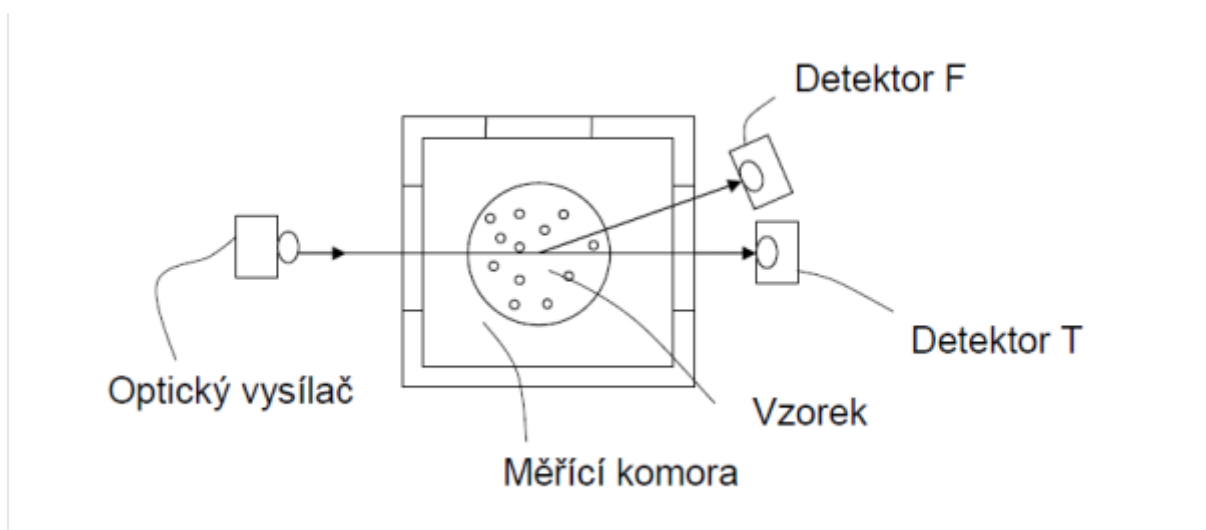
K elastickému rozptylu světla dochází na nehomogenitách v roztoku. Intenzita rozptýleného světla závisí na typu a velikosti rozptylující částice, na poměru vlnové délky světla a velikosti rozptylující částice a na rozdílu indexu lomu roztoku a částice. Pro nízké koncentrace rozptylujících center jsou příspěvky od jednotlivých částic aditivní a intenzita rozptýleného záření roste lineárně s jejich koncentrací.

Na obrázku 2 je zobrazen vliv velikosti rozptylující částice na intenzitu rozptylu v různých směrech. 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 koncentraci mikroorganismů ve vzorku.

Na obrázku 3 je schematicky zobrazeno uspořádání optické detekce. Světlo z optického zdroje prochází vzorkem umístěným v měřicí komoře. Intenzita záření rozptýleného pod malým úhlem je snímána detektorem F (Forward). Intenzita záření prošlého vzorkem v původním směru je snímána detektorem T (Transmission). Naměřené hodnoty transmise T monitorují změny intenzity měřícího paprsku například v důsledku nestability světelného zdroje, znečištění povrchů měřících vzorkovnic nebo v důsledku absorpce světla ve vzorku. Poměr výstupních signálů fotodetektorů F/T je na těchto jevech nezávislý a odpovídá obsahu a vlastnostem rozptylujících částic ve vzorku. Konstrukcí přístroje je zajištěno, že optické dráhy pro procházející i rozptýlený paprsek jsou stejné, takže změny intenzity sondujícího svazku nepříslušející rozptylu se projeví stejnou měrou jak v rozptylovém kanálu, tak v kanálu transmisním.



Obr. 2. Úhlové rozdělení intenzity záření s náhodnou polarizací, elasticky rozptýlené na kulové částici s indexem lomu 1,5 o různé velikosti. Vypočteno programem Mie Calculator (Prah 2009).



Obr. 3. Schéma navrženého uspořádání optické detekce funkčního vzorku.

Poměr hodnot výstupních signálů fotodetektorů F/T z rozptylového a transmisního detektoru udává tzv. relativní zákal ZR. Tento relativní zákal se přepočítává na výslednou hodnotu zákalu pomocí kalibrační křivky naměřené na roztocích standardní zákaloměrné suspenze s definovanou koncentrací. Ve většině norem se jako standardní kalibrační roztok používá formazinová suspenze a výsledky měření se udávají v mezinárodních jednotkách NTU, FTU nebo ppm. My jsme používali jednotky ppm.

### 3.2.2. Přístroje a pomůcky

- AOC turbidimetr (viz Příloha V)
- Demineralizované vzorkovnice/kyvety o kruhovém průřezu a o objemu 200 ml (viz Příloha VI)
- Magnetická míchačka
- Demineralizované magnetické míchadlo
- Třepačka typu Vortex
- Inkubátor se schopností udržovat teplotu  $15^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Memmert)
- Pipety (kalibrované sterilní, schopné odměřovat objemy 0,03 ml)
- Aparatura na membránovou filtraci a membránové filtry o porozitě  $0,22\ \mu\text{m}$
- Přístroj na přípravu ultračisté vody

### 3.2.3. Pracovní postup

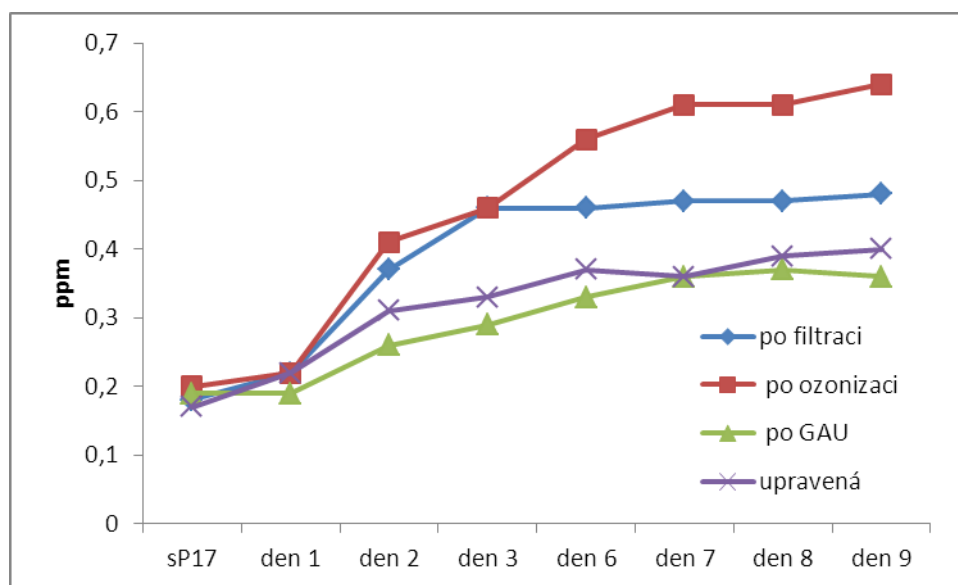
- *Odběr a uchování vzorků.* Vzorky musí být odebírány za dodržení platných pravidel pro vzorkování pitných vod (především podle ČSN ISO 5667-5) do předem připravených demineralizovaných (a vypálených minimálně po dobu 4 hodin při

250°C) vzorkovnic. Odebírá se minimálně 400 ml vzorku (část přefiltrovaného vzorku se použije k proplachu používaných pomůcek). Vzorky musí být dopraveny do laboratoře za stálého chlazení a zpracovány co nejdříve po odběru, maximálně do 24 hodin.

- *Demineralizace laboratorního skla a pomůcek.* Jak je uvedeno v tabulce 1, při stanovení AOC je třeba vždy vyloučit, nebo alespoň maximálně omezit, jakýkoli přísun AOC z vnějšího prostředí, čehož se dosáhne demineralizací použitého skla, případně propláchnutím veškerého použitého materiálu dostatečným množstvím vody o minimálním obsahu uhlíku (ultračistá voda) a posléze vlastním vzorkem. Příklady postupů demineralizace jsou uvedeny v příloze III.
- *Příprava referenčních kmenů.* Při stanovení AOC se používají referenční kmeny *Pseudomonas fluorescens* (P17 – kmen ATCC 49642) ve stacionární fázi svého růstu. Příprava referenčních kmenů je uvedena v příloze IV.
- *Předúprava vzorku.* Filtrovat vzorek přes membránový filtr (např. Cyclopore Track Etched membránové filtry Whatman o porozitě 0,22  $\mu\text{m}$ ) aby se odstranily nerozpuštěné látky a větší část původního inokula (odstranění původního inokula bylo kontrolováno ve fluorescenčním mikroskopu po barvení DAPI). Filtry a filtrační aparatura se před použitím promyje větším množstvím (minimálně 1000 ml) ultračisté vody bez přítomnosti (nebo s minimálním obsahem) AOC (např. voda z přístroje ELGA, Millipore nebo z podobného přístroje na přípravu ultračisté vody). Tato promývací voda zároveň slouží jako kontrolní stanovení (negativní kontrola). Byly vyzkoušeny různé typy filtrů (včetně skleněných), které však byly shledány jako nepoužitelné, protože se z nich vymýval tmel, který rušil měření zákalu. Pro jednu vzorkovnici je třeba přefiltrovat 400 ml vzorku (200 ml na propláchnutí viz výše, 180 ml na vlastní stanovení), v případě paralelního stanovení dvojnásobek.
- *Příprava vzorkovnice.* Vypláchnout demineralizovanou vzorkovnici (kyvetu) minimálně 200 ml přefiltrovaného vzorku. Před měřením zkontrolovat, jestli nejsou na povrchu vzorkovnice přítomny nějaké nečistoty, a případně ji šetrně dočistit. K tomuto účelu se výborně hodí vlhčené ubrousky pro čišťení brýlí (např. W 5 Brillen Putztuch – Lidl). Zároveň je třeba dbát, aby nedošlo k poškození (poškrábání) vzorkovnice při umísťování do optického přístroje a zejména vyndávání z něj. Umístit do vzorkovnice demineralizované a sterilizované magnetické míchadlo. Do vzorkovnice odměřit 180 ml vzorku. Vhodné je stabilně (např. zářezem pomocí diamantového nože) označit objem 180 ml na vzorkovnici.
- *Inokulace.* Dávkovat 30  $\mu\text{l}$  referenčního kmene *Pseudomonas fluorescens* (P 17) narostlého v předkultivačním médiu. Těsně před inokulací je třeba referenční kulturu pečlivě zhomogenizovat (např. na třepačce typu Vortex). Do zábrusové části vzorkovnice umístit sterilní alobalový proužek, aby během kultivace nedocházelo k podtlaku ve vzorkovnici / kyvetě a k obtížnému otvírání vzorkovnice / kyvety. Alobalový proužek zůstává v zábrusové části vzorkovnice během celé kultivace.
- *Optické měření.* Před optickým měřením nechat vzorek minimálně 60 sekund promíchat na magnetické míchačce (rychlost 100-150 rpm), případně 5 minut míchat přímo v komoře AOC turbidimetru. Pečlivě kontrolovat, případně očistit vnější povrch kyvety před každým optickým měřením a kontrolovat čistotu povrchu vzorkovnice a nepřítomnost bublin v měřeném vzorku (vzorkovnici je nutné uchopit pouze mimo střední část, kde prochází paprsek během optického měření). Změřit hodnotu zákalu po inokulaci vzorku (hodnota  $Z_0$ ). Před vlastním měřením zkontrolovat, jestli vzorek neobsahuje vzduchové bubliny (viditelné při procházejícím paprsku).

- *Kultivace a průběžné měření zákalu.* Kultivovat vzorky při 15°C po několik dní, dokud vzorek nedosáhne maximálního zákalu (hodnota  $Z_{max}$ ), způsobeného nárůstem bakterií. Vždy před měřením vzorek promíchat. Pro výpočet hodnoty AOC se použije rozdíl naměřených hodnot ( $Z_{max}-Z_0$ ), který odpovídá nárůstu koncentrace referenčního kmene P 17 během kultivace.
- *Výpočet AOC.* Pro výpočet AOC slouží kalibrační přepočít **1 ppm = 303  $\mu\text{g}$  AOC /l**. Vlastní výpočet koncentrace AOC (výsledek v  $\mu\text{g}$  /l) se provede podle vzorce:  

$$(Z_{max}-Z_0)*303$$



Obr. 4: Postupné změny zákalu (ppm) v průběhu kultivace vzorků (ÚV 1, charakteristika v příloze I)

### 3.2.4. Charakteristiky metody

- Při dávkování kmene do vzorkovnic pro optickou detekci (180 ml vzorku, 30  $\mu\text{l}$ ) byla zjištěna opakovatelnost dávkování 12 % (opakované přidávání referenčního kmene do celého objemu vzorku testované na základě jeho vyočkování). Je o něco více, než je tomu u vzorkovnic používaných na kultivační metodu (600 ml vzorku).
- Opakovatelnost měření zákalu v jednotlivých vzorkovnicích byla stanovena do 10 %.

### 3.3. Hlavní kritické body stanovení asimilovatelného organického uhlíku

V této kapitole jsou shrnuty hlavní kritické body stanovení AOC oběma metodami, které lze částečně omezit zpracováním většího množství paralelních vzorků.

- *Vnos externího AOC do vzorku během manipulace a zpracování.* V případě metody optické detekce není možné všechny pomůcky demineralizovat, pouze důkladně proplachovat vodou bez obsahu uhlíku a vzorkem.

- *Stav referenčních kmenů, kultivovatelnost, versus nekultivovatelnost jednotlivých bakterií.* Na začátku stacionární fáze je 100 % buněk kultivovatelných, po 2 měsících podíl klesá, až na 40 %. To ovlivňuje samozřejmě i aktuální růstový výtěžek.
- *Homogenita bakteriální suspenze.* Bakterie mohou tvořit shluky, které lze velmi obtížně ve sterilních podmínkách šetrně dezintegrovat (aby se buňky nezničily), mohou tak do určité míry shluky zůstat i při použití vortexu.
- *Nejistoty při ředění a vyočkování referenčních kmenů* (platí pro kultivační metodu).

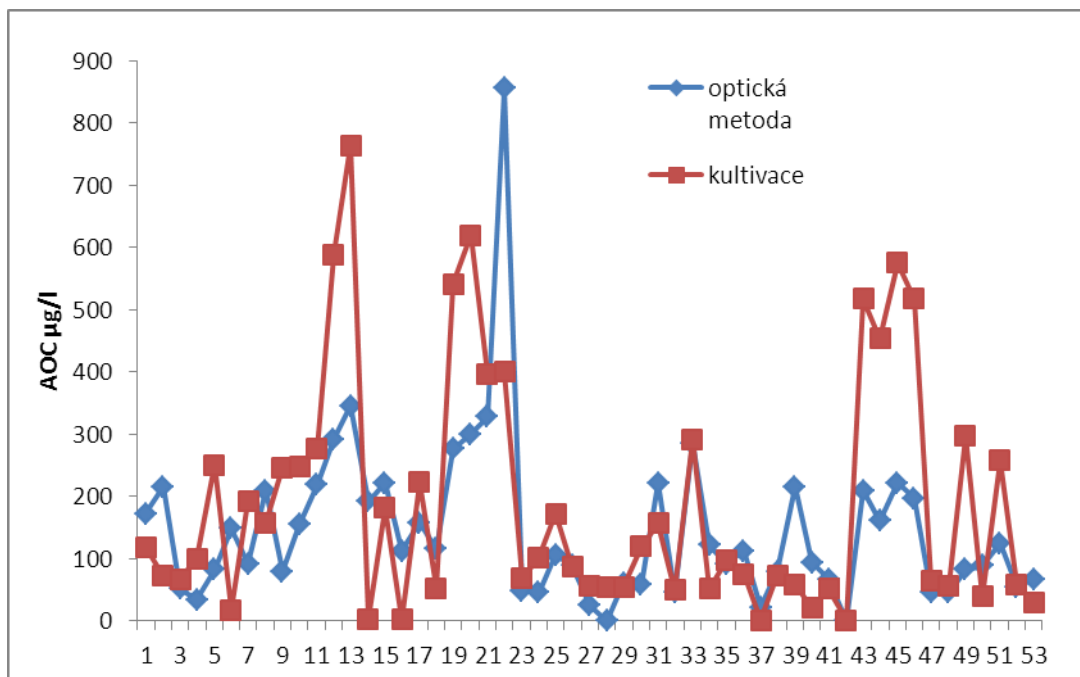
Celková opakovatelnost (tj. rozptyl paralelních vzorků) stanovení AOC optickou metodou je 33 % a kultivační metodou 40 %, což též přispívá k větším nejistotám měření (nejistoty stanovení při koeficientu rozšíření  $k=2$  by tak měly být 66 % resp. 80 %).

### 3.4. Srovnání metod stanovení asimilovatelného organického uhlíku kultivační metodou a metodou optické detekce

Je nutno připustit, že výsledky stanovení AOC oběma metodami jsou obtížně srovnatelné, a to zejména proto, že jsou založeny na zcela jiném principu stanovení (kultivace versus optická detekce). Odlišné jsou i metody předúpravy vzorků. U kultivační metody se jedná o pasterizaci, u optické metody se jedná o membránovou filtraci. Obě předúpravy eliminují autochtonní mikroflóru ve vzorku, membránová filtrace navíc eliminuje nerozpuštěné látky, které ruší stanovení. Vzorky na kultivační metodu lze místo pasterizace filtrovat (ale naopak to není možné). Membránová filtrace je však náročnější způsob předúpravy, včetně rizika vnosu alochtonního AOC. V každém případě je však nutné u výsledků uvádět, jakou metodou bylo stanovení AOC provedeno.

*(Lze poukázat i na fakt, že v případě mikrobiologických stanovení se statisticky mohou významně odlišovat i výsledky stanovení mikroorganismů kultivací na médiích o stejném složení a odlišném výrobci (srovnání u stanovení intestinálních enterokoků, Baudišová a kol. 2013)).*

Bylo provedeno 53 paralelních stanovení AOC optickou metodou a metodou kultivační. Koeficient determinace  $R^2 = 0,527$  považujeme za odpovídající a pro mikrobiologické metody přijatelný. O něco vyšší hodnoty AOC byly zjištěny po kultivaci (směrnice regresní přímky  $y=1,450$ ), což by však nemělo být pro interpretaci výsledků zásadní. Je nutné vzít v úvahu, že významné a k zamyšlení podstatné rozdíly ve výsledcích stanovení AOC **jsou na úrovni řádů**. Zásadní jsou hodnoty AOC do 20  $\mu\text{g/l}$  (voda biologicky stabilní) a dále jsou významné změny několikanásobného zvýšení resp. zvýšení koncentrace AOC v průběhu technologické úpravy vody (např. nad 150  $\mu\text{g/l}$ ). To jsme zjistili např. při ucpání filtrů apod.



Obr. 5: Paralelní výsledky stanovení AOC opticky a kultivačně

#### 4. Shrnutí

- Asimilovatelný organický uhlík (AOC) je významným ukazatelem biologické stability vody. V případě, že je hodnota AOC menší než 20 µg/l (podle některých autorů menší než 50 µg/l), lze vodu považovat za biologicky stabilní.
- Hodnoty AOC v surové vodě vykazují v průběhu roku výkyvy, nejedná se však vyloženě o sezónní změny. Změny v obsahu AOC jsou i v průběhu úpravy vody (jednotlivých stupních úpravy). Ozonizace obsah AOC zvyšuje, písková filtrace a filtrace přes GAU filtry obsah AOC snižuje. Neprokázali jsme významné zvýšení AOC po desinfekci.
- Ke stanovení AOC je možné použít buď klasickou kultivační metodu, nebo metodu optické detekce, obě jsou v metodice popsány a diskutovány, včetně kritických bodů stanovení. U výsledků AOC by se vždy mělo uvádět, jakou metodou bylo stanovení provedeno.
- Očekáváme, že další verifikace významu AOC (včetně verifikace limitní hodnoty pro stabilitu pitné vody) v průběhu úpravy vody bude možná po širším zavedení tohoto stanovení do vodárenské praxe.



## 5. Odkazy

### 5.1. Literární přehled

- Baudišová D., Lochovský P. (2005). Stanovení biologicky dostupného uhlíku ve vodách povodí vodárenské nádrže Fláje (Krušné hory). In Jana Ambrožová Vodárenská biologie 2005. Sborník konference. Praha, 2.2.2005. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor s.r.o., 131-133.
- Baudišová D., Pumann P., Šašek J.: Mikrobiologické rozbory povrchových vod ke koupání. Technické doporučení, Sweco – Hydroprojekt. 2013.
- Dolejš P., Dobiáš P., Baudišová D. (2008). Změny koncentrace asimilovatelného organického uhlíku (AOC) podél technologické linky s ozonizací a filtrací aktivním uhlím. In Nataša Kalousková, Petr Dolejš Pitná voda 2008. Tábor, 2.6.2008. České Budějovice: W et ET Team, 107-112.
- Escobar I. C., Hong S., Randall A. A. (2000). Removal of assimilable organic carbon and biodegradable dissolved organic carbon by reverse osmosis and nanofiltration membranes, *Journal of Membrane Science*, 175, 1-17.
- Escobar I. C. and Randall A. A. (2001). Assimilable organic carbon (AOC) and biodegradable dissolved organic carbon (BDOC): complementary measurements, *Wat. Res.*, 35(18), 4444-4454.
- Escobar I. C., Randall A. A., Hong S. K., Taylor J. S. (2002). Effect of solution chemistry on assimilable organic carbon removal by nanofiltration: full and bench scale evaluation, *Journal of Water Supply: Research and technology-AQUA*, 51(2), 67-76.
- Hammes F. and 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., Berger C., Oliver Köster, Egli T. (2010). Assessing biological stability of drinking water without disinfectant residuals in a full-scale water supply system, *Journal of Water Supply: Research and technology-AQUA*, 59(1), 31-40.
- Hem L. J. and Efraim H. (2001). Assimilable organic carbon in molecular weight fraction of natural organic matter, *Wat. Res.*, 35(4), 1106-1110.
- Kaplan L. A., Reasoner D. J., Rice E. W., Bott T. L. (1992). A survey of assimilable organic carbon, biodegradable organic carbon and coliform growth response in US drinking waters, *Revue des Sciences de L'eau*, 5, 207-224.
- Kim J.-H., Kim Y.-J., Lee D. S., Qureshi T. I. (2010). Characteristic study of assimilable organic carbon (AOC) formation potential in drinking water, *J. Chem. Soc. Pak.*, 32(2), 140-146.
- Kim J.-H., Kim Y.-J., Qureshi T. I. (2011). Assimilable organic carbon generation from algogenic organic matter in drinking water, *Turk. J. Chem.*, 35, 245-253.
- 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 Association*, 540-547.
- van der Kooij D., Visser A., Oranje J. P. (1982). Multiplication of fluorescent pseudomonads at low substrate concentration in tap water, *Antonie van Leeuwenhoek*, 48, 229-243.
- van der Kooij D. (1990) Assimilable organic carbon (AOC) in drinking water. In: McFeters GA, editor. *Drinking Water Microbiology*. New York: Springer, 1990. p. 57-87.
- van der Kooij D. (1991). Nutritional requirements of aeromonads and their multiplication in drinking water, *Experientia*, 47, 444-446.
- van der Kooij D. (1992). Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth, *Research and Technology, Journal American Water Works Association*, 57-65.
- van der Kooij D. (2000). Biological stability: a multidimensional quality aspect of treated water, *Water, Air, and Soil Pollution*, 123, 25-34.
- LeChevallier M. W., Badcock T. M. and Lee R. G. (1987). Examination and characterization of distribution system biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2714-2724.

- LeChevallier M. W., Schulz W. and Lee R. G. (1991). Bacterial nutrients in drinking water. *App. Environ. Microbiol.*, 57(3), 857-862.
- LeChevallier M. W., Welsch N. J., Smith D. B. (1996). Full-scale studies of factors related to coliforms regrowth in drinking water, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 62(7), 2201-2211.
- Lehtola M. J., Miettinen I. T., Vartiainen T., Martikainen P. J. (2002). Changes in content of microbially available phosphorus, assimilable organic carbon and microbial growth potential during drinking water treatment processes, *Wat. Res.*, 36, 3681-3690.
- Liu W., Wu H., Wang Z., Ong S. L., Hu J. Y., Ng W. J. (2002). Investigation of assimilable organic carbon (AOC) and bacterial regrowth in drinking water distribution system, *Wat. Res.*, 36, 891-898.
- Lochovský P., Svobodová A., Baudišová D. (2004). Occurrence and composition of humic substances in waters of the catchment area of Fláje Reservoir. In Walter Geller et al. 11th Magdeburg Seminar on Waters in Central and Eastern Europe: Assessment, Protection, Management. Lipsko, 18.10.2004. Leipzig: UFZ Bericht 261-262.
- Lochovský P. (2005). Charakterizace organických látek ve vodě vodárenské nádrže Fláje z hlediska její udržitelnosti na vodu pitnou. *Vodní hospodářství*, 55(2), 11-13.
- Miettinen I., Vartiainen T., Martikainen P. J. (1997). Microbial growth and assimilable organic carbon in Finnish drinking waters, *Wat. Sci. Tech.*, 35 (11-12), 301-306.
- Miettinen I. T., Vartiainen T., Martikainen P. J. (1999). Determination of assimilable organic carbon in humus-rich drinking waters, *Wat. Res.*, 33(10), 2277-2282.
- Polanska M., Huysman K., van Keera C. (2005). Investigation of assimilable organic carbon (AOC) in Flemish drinking water, *Wat. Res.*, (39), 2259-2266.
- Ramseier M. K., Peter A., Traber J., von Gunten U. (2011). Formation of assimilable organic carbon during oxidation of natural waters with ozone, chlorine dioxide, chlorine, permanganate, and ferrate, *Wat. Res.*, (45), 2002-2010.
- Rice E. W., Scarpino P. V., Reasoner D. J., Logsdon G. S., Wild D. K. (1991). Correlation of coliform growth response with other water quality parameters, *J. AWWA*, 83, 98-102.
- Soonglerdsongpha Suwat, Kasuga Ikuro, Kurisu Futoshi, Furumai Hiroaki (2011). Comparison of assimilable organic carbon removal and bacterial community structures in biological activated carbon process for advanced drinking water treatment plants, *Sustain. Environ. Res.*, 21(1), 59-64.
- USEPA (2012) : Standard methods for the examination of water and wastewater 22<sup>nd</sup> edition . Edited by Rice E.W., Baird R.B., Eaton A.D., Clesceri L.S. kap. 9217.

## **5.2. Seznam publikací a prezentací, které předcházely vytvoření certifikované metodiky**

- Baudišová D., Váňa M. (2012). Metody stanovení asimilovatelného organického uhlíku. In: Sborník konference Pitná voda 2012 Tábor, W et ET team České Budějovice, 21.5.- 24.5. Str. 255-256.
- Baudišová D., Benáková A., Váňa M., Jedličková Z. (2013). Asimilovatelný organický uhlík v systémech výroby a distribuce pitné vody. In Jana Ambrožová (ed) Sborník Vodárenská biologie 2013. Sborník konference. Praha, 6.2.2013. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor s.r.o., str. 112-113.
- Gabriel P., Sladký P., Benáková A., Baudišová D. (2013). Optimalizace metody stanovení asimilovatelného organického uhlíku s využitím optické detekce (2013). In: Růžičková I., Fuka T., Wanner J (eds) – Sborník přednášek a posterových sdělení 10. Bienální konference CzWA VODA 2013, Poděbrady, 18.-20. září 2013, str. 426-428.
- Baudišová D., Váňa M., Benáková A., Boháčková Z., Jedličková Z., Gabriel P. (2014). Výzkum asimilovatelného organického uhlíku v systémech výroby a distribuce pitné

vody. Vodárenská biologie 2014, Praha, 5. - 6.2.2014, Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor s.r.o., 120-123

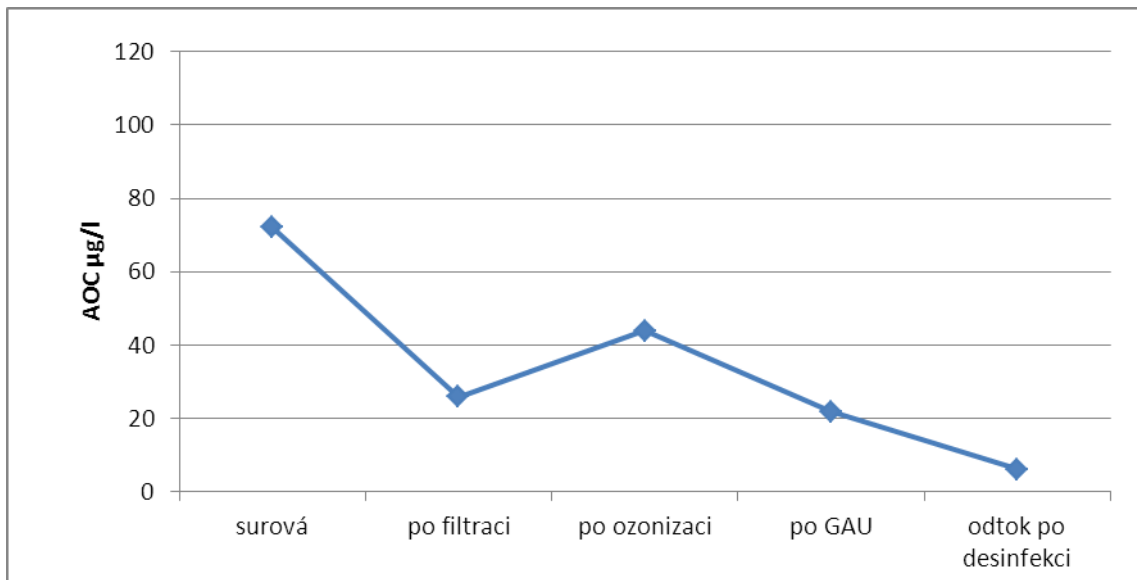
- Baudišová D., Váňa M., Boháčková Z., Jedličková Z., Benáková A. (2014). Asimilovatelný organický uhlík v systémech výroby a distribuce pitné vody. VTEI 56: 2/2014: 8-11
- Gabriel P., Sladký P., Baudišová D., Benáková A., Váňa M., Boháčková Z., Jedličková Z. (2014). Stanovení asimilovatelného organického uhlíku pomocí optické detekce. Pitná voda 2014, Tábor 26.5.-29.5.2014, W et ET Team České Budějovice, str. 199-204.

## **6. Seznam příloh**

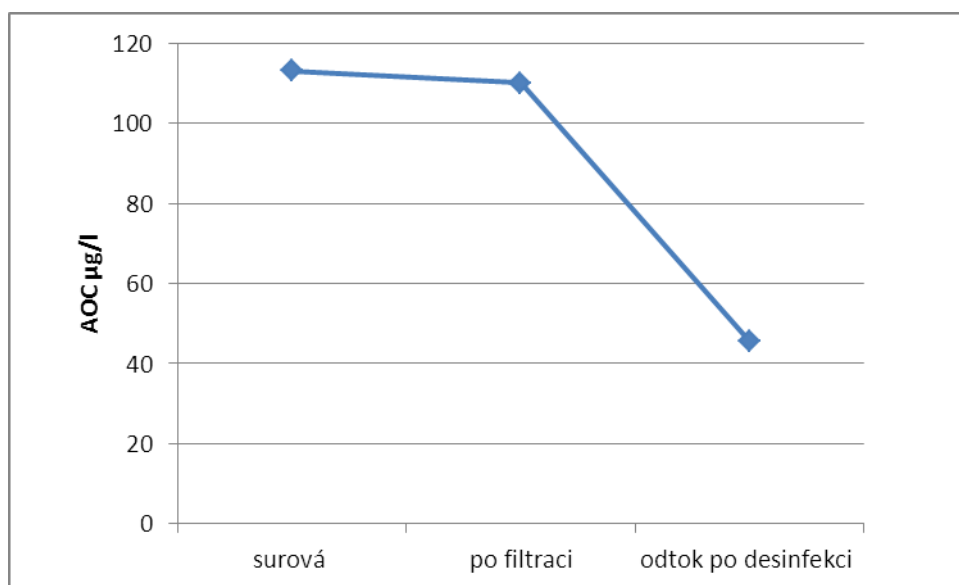
- Příloha I: Stanovení asimilovatelného organického uhlíku v různých úpravách vody
- Příloha II: Hodnoty asimilovatelného organického uhlíku (AOC) a biodegradabilního organického uhlíku (BDOC) v jednotlivých profilech úpravny vody
- Příloha III: Předúprava vzorkovnic a dalších pomůcek
- Příloha IV: Příprava referenčních kmenů
- Příloha V: AOC turbidimetr
- Příloha VI: Vzorkovnice (sloužící též jako kyvety) pro optickou detekci

## Příloha I: Stanovení asimilovatelného organického uhlíku v různých úpravnách vody

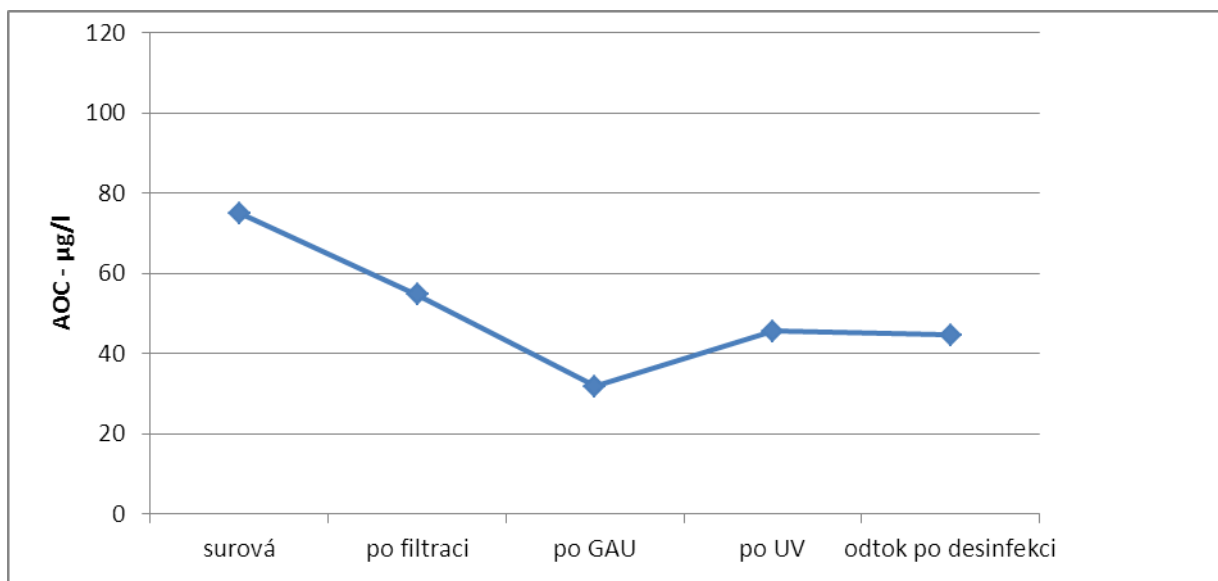
Na následujících obrázcích jsou uvedeny průměrné hodnoty AOC (stanovené kultivační metodou) na třech různých úpravnách vody. Je uvedena průměrná hodnoty za 7 odběrů, provedených v letech 2013 až 2014. Nebyly zjištěny významné sezónní rozdíly.



ÚV 1: Úpravna vody s množstvím vyráběné vody více než 150 l/s, zdroj surové vody údolní nádrž, desinfekce  $\text{ClO}_2$ .

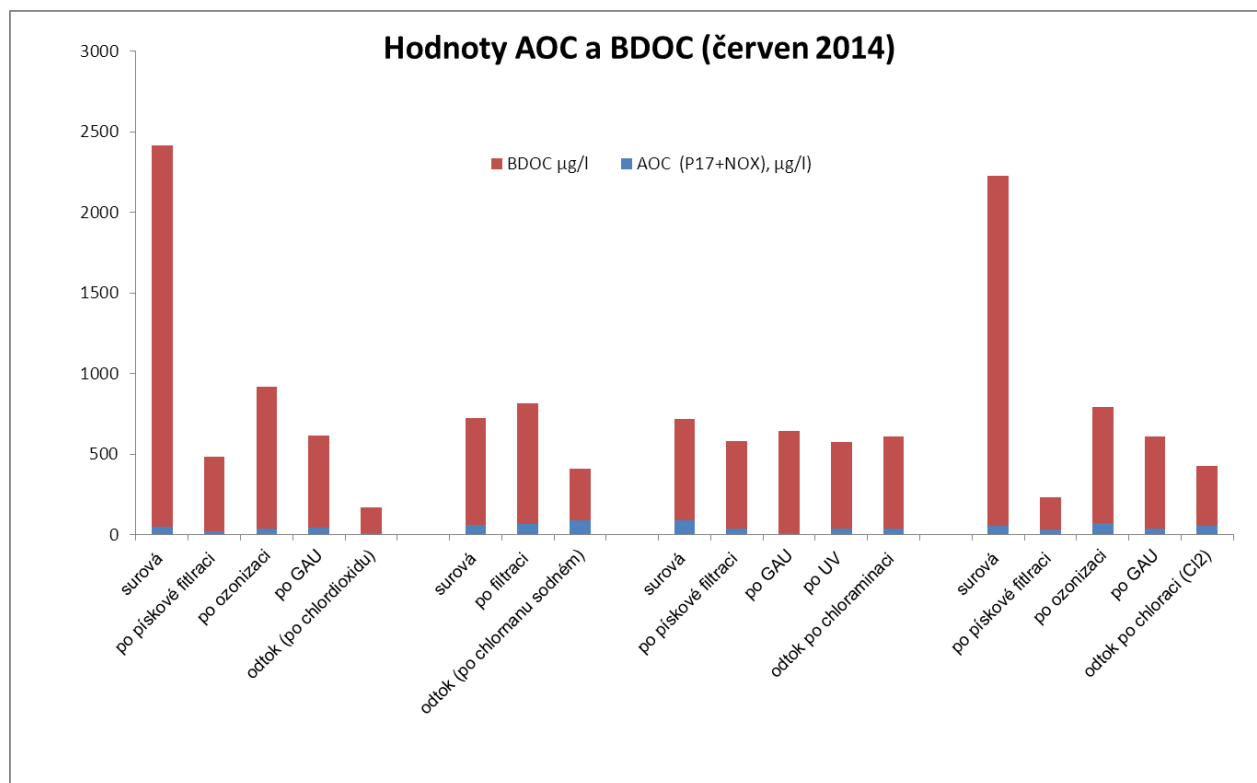


ÚV 2: Úpravna vody s množstvím vyráběné vody méně než 50 l/s, zdroj surové vody prameniště a vrt, desinfekce  $\text{NaClO}$ .



ÚV 3: Úpravna vody s množstvím vyráběné vody více než 150 l/s, zdroj surové vody údolní nádrž, desinfekce  $\text{NH}_2\text{Cl}$ .

**Příloha II: Hodnoty asimilovatelného organického uhlíku (AOC) stanovené kultivační metodou a biodegradabilního organického uhlíku (BDOC) v jednotlivých profilech úpravní vody**



*První tři úpravní vody jsou shodné jako v příloze I (ÚV 1 až 3), čtvrtá úpravní voda je s množstvím vyráběné vody více než 150 l/s, zdroj surové vody údolní nádrž, desinfekce Cl<sub>2</sub>.*

## Příloha III: Předúprava (demineralizace) vzorkovnic a dalších pomůcek

### 1. Předúprava (demineralizace) skleněného nádobí

Vzorkovnice musí být zhotoveny z borosilikátového skla.

#### 1.1. Složení roztoků pro deminarilizaci

##### **Roztok A:**

###### Složení:

NaOH	1000 g
Destilovaná voda	2 000 – 3 000 ml
KMnO <sub>4</sub>	300 g
Destilovaná voda	6 000 ml

*Příprava: Chemikálie se postupně rozpustí ve vodě, pak se oba roztoky spojí a doplní se do 10 l destilovanou vodou. Roztok se skladuje ve tmě po dobu 1 roku. Lze ho opakovaně používat.*

##### **Roztok B:**

###### Složení:

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	150 g
HCl konc.	150 ml
Destilovaná voda	5000 ml

*Příprava: Chemikálie (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) se rozpustí v destilované vodě a přidá se koncentrovaná HCl. Roztok se skladuje ve tmě po dobu 1 roku. Lze ho opakovaně používat.*

#### 1.2. Přístroje a pomůcky

- Třepačka s kruhovým pohybem
- Digestoř
- Vypalovací pec nebo sušárna schopná udržet teplotu minimálně 250°C

#### 1.3. Pracovní postup

- Do vzorkovnic případně do nádob s dalším sklem (pipety), které je třeba demineralizovat, se nalije roztok A, a to tak, aby při třepání bylo smáčené i hrdlo vzorkovnic nebo celé pipety. Umístí se do třepačky a třepe se 15-20 minut. Poté se roztok odlije a nádobí se několikrát vypláchne dočista destilovanou vodou.
- Jako druhý se nalije roztok B (práci je nutné provádět v digestoři) a opět se třepe 15-20 minut a pak se opakovaně opláchne ve vodě s minimálním obsahem uhlíku.
- Sklo se vysuší v sušárně
- Vypeče se v peci při 250°C 4 hodiny, mezi hrdlo a zátku se vloží drátek, nebo aluminiová páska (např. z alobalu), aby se sklo nespeklo dohromady.

### 2. Předúprava pomůcek z teflonu (míchadla, uzávěry vzorkovnic apod.)

Vaření pomůcek po dobu 1 hodiny při 60 °C v 10 % roztoku persulfátu sodného, poté důkladně opláchnout ve vodě o minimálním obsahu organického uhlíku a sterilizovat.

## Příloha IV: Příprava referenčních kmenů

### 1.1. Složení médií a roztoků

#### **Minerální médium**

##### Složení:

Roztok A	10 ml
Roztok B	10 ml
Roztok C	10 ml
Destilovaná voda	97 0ml

*Příprava: Jednotlivé roztoky se spojí dohromady a doplní destilovanou vodou do 1 l. Dále se rozplní po 80 ml do infuzních sklenic a sterilizuje se v autoklávu při 121°C 15 minut. Roztok lze uchovávat při teplotě 2-6°C po dobu 1 roku.*

#### **Roztok A**

##### Složení

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,27 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,53 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
Destilovaná voda	1000 ml

*Příprava: Chemikálie se rozpustí v destilované vodě. Uchovává se ve tmě a při pokojové teplotě po dobu 1 roku.*

#### **Roztok B**

##### Složení

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,0 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,005 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,01 g
Destilovaná voda	1000 ml

*Příprava: Chemikálie se rozpustí v destilované vodě. Uchovává se ve tmě a při pokojové teplotě po dobu 1 roku.*

#### **Roztok C**

##### Složení

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 g
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,008 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,3 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g
Destilovaná voda	1000ml

*Příprava: Chemikálie se rozpustí v destilované vodě. Uchovává se ve tmě a při pokojové teplotě po dobu 1 roku.*

#### **Předkultivační médium**

Roztok A	0,8 ml
Roztok B	0,8 ml
Minerální médium	80 ml



### **Roztok A**

#### Složení:

NH <sub>4</sub> Cl	38,2 mg
Destilovaná voda	500 ml

*Příprava: Chemikálie se rozpustí v destilované vodě. Roztok se rozplní do patřičných lahví a sterilizuje se v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. Uchovává se při 4°C po dobu 1 roku.*

### **Roztok B**

#### Složení:

C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	34 mg
Destilovaná voda	100 ml

*Příprava: Chemikálie se rozpustí v destilované vodě. Roztok se rozplní do patřičných lahví a sterilizuje se v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. Uchovává se při 4°C po dobu 1 roku.*

### **Lab-lemco agar**

#### Složení:

Pepton	5 g
Masový extrakt	3 g
Agar	15g
Destilovaná voda do	1 000 ml

*Příprava: Předepsané ingredience se zahříváním na vodní lázni či v proudící páře rozpustí ve vodě, upraví se pH tak, aby po sterilizaci bylo 7,4±0,2 při teplotě 25°C. Potom se plní do patřičných nádob a sterilizuje se v autoklávu při teplotě 121°C±3°C po dobu 15min. Po zchladnutí na teplotu pod 50°C se rozlévá do Petriho misek. Uchovává se ve tmě a při teplotě 4°C po dobu 10 dnů.*

#### 1.2. Přístroje a pomůcky

- Inkubátor se schopností udržovat teplotu 25°C
- Bakteriologická očkovací klička
- Analytické váhy s přesností na tři desetinná místa
- Petriho misky
- Reagenční lahve o objemech 100 a 1000 ml

#### 1.3. Pracovní postup

- Kmen *Pseudomonas fluorescens* (P17) se přes noc kultivuje na Lab-Lemco agaru při 25°C. V 9 ml autoklávaného vodovodní vody se udělá zakalená suspenze. Z této suspenze se 0,3 ml převedou do předkultivačního média. Počáteční koncentrace kmene by měla být cca 2000 KTJ/ml. Inkubuje se při 15°C. Počet KTJ se opakovaně měří, dokud se nedosáhne koncentrace 3·10<sup>6</sup>/ml (cca 5 dní).
- Kmen *Spirillum spp.* (NOX) se připravuje stejně až na to, že počáteční kultivace na L-L agaru musí být minimálně třídní.
- Kmeny narostlé v předkultivačním médiu se uchovávají v lednici po dobu maximálně 2 měsíců. Čistota kmenů musí být kontrolována křížovým roztěrem, případně dalšími testy (cytochromoxidázový test, mikroskopická čistota apod.).

## Příloha V: AOC turbidimetr

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 ppm standardní kalibrační formazinové stupnice. Instalovaný detektor umožňuje měření zákalu až do hodnoty 1000 ppm. Při nízkých hodnotách zákalu (koncentracích rozptylujících částic) je stabilita detektoru lepší než 0,001 ppm.

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. Kyvety a kryty je možné demineralizovat, v kyvetách je možné vzorky případně i pasterizovat, kryty chrání vzorek před kontaminací organickým uhlíkem z okolí. Tyto kyvety s kruhovým průřezem by bylo možné 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).

Do nové čtvercové měřicí komory, která umožňuje měření vzorků ve vzorkovnicích až do průměru 70 mm, byly zabudovány porty pro instalaci měřicí optiky.

Ve funkčním vzorku byly instalovány 2 optické detektory (viz. obr. níže - vpravo).

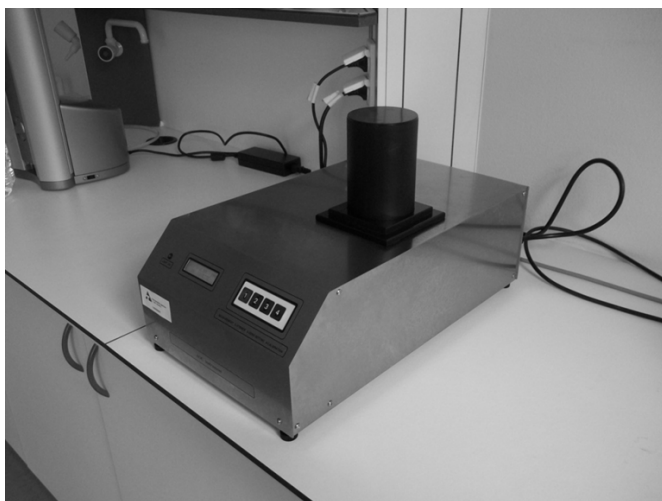
F – detektor snímá intenzitu záření rozptýleného pod úhlem  $11^{\circ}$ - $15^{\circ}$

T – detektor snímá intenzitu záření prošlého vzorkem

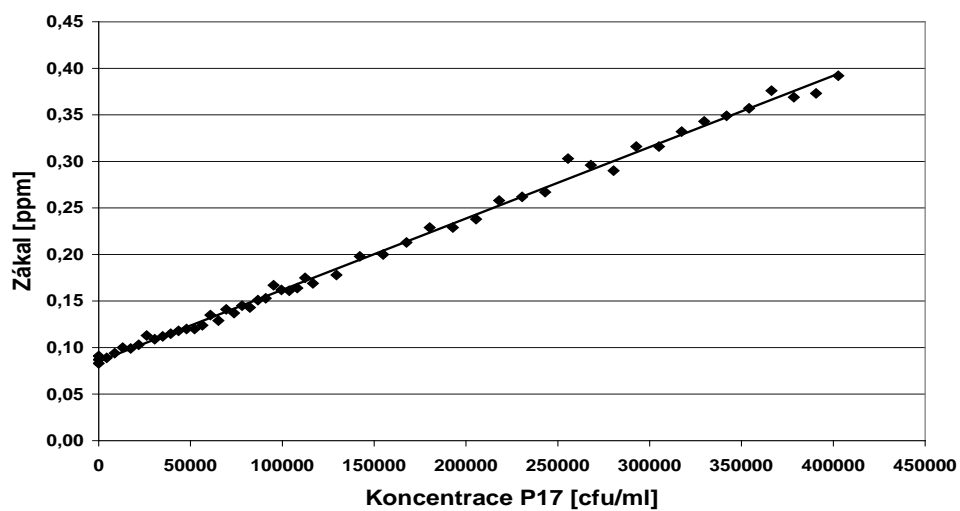
Jako standardní „Zákal“ je míněn zákal naměřený F detektorem (značen Zákal nebo Zákal 12).

AOC turbidimetr může být vybaven doplňkovým software pro záznam primárních dat.

Na obrázku níže 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* (P 17)  $8 \cdot 10^{-7}$  ppm/1 KTJ P17/ml. Podle literatury (Hammes a Egli 2005 a USEPA 2012) je růstový výtěžek 1  $\mu\text{g}$  AOC asimilovatelného uhlíku přibližně  $4,1 \cdot 10^6$  buněk. Z těchto hodnot vychází předpokládaná citlivost detektoru 0,0033 ppm na 1  $\mu\text{g}$  asimilovatelného uhlíku na litr (1  $\mu\text{g}$  AOC/l) a detekční limit detektoru lepší než 3  $\mu\text{g}$  AOC/l.



*AOC turbidimetr – celkový pohled (vlevo) a) pohled dovnitř (vpravo)*



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

## **Příloha VI: Vzorkovnice (sloužící též jako kyvety) pro optickou detekci**

Pro kultivaci vzorku a vlastní měření se používají vzorkovnice kruhového průřezu z borosilikátového skla se zábrusovým uzávěrem. Výroba je technicky možná a cenově dostupná. Na základě objednávky byly vyrobeny (sklářny Sklo Dáša, Petr Prokeš) vzorky vzorkovnic různých průměrů a série vzorkovnic o průměru 56 mm a objemu 200 ml (viz obr.).



*Vzorkovnice kruhového průřezu z borosilikátového skla se zábrusovým uzávěrem*

Určité technické problémy způsobila šířka použitého zábrusu, neboť vzorkovnice/kyveta se nemůže v horní části zužovat, což bylo vyřešeno založením sterilního alobalového proužku.