

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Simon GUŠTIN

**OPTIMIZACIJA ATP TESTA ZA DOLOČANJE STRUPENOSTI  
ODPADNIH VODA IN PRIMERJAVA Z REFERENČNIMI  
METODAMI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE OPTIMISATION OF ATP WASTEWATER TOXICITY TEST  
AND COMPARISON WITH REFERENCE METHODS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo predstavlja zaključek Univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno na Kemijskem inštitutu v Ljubljani v Laboratoriju za kemijo, biologijo in tehnologijo voda in na Biotehniški fakulteti na Oddelku za zootehniko v Domžalah na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnobiotehnologijo.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je dne 1. julija 2005 za mentorico imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar in za somentorico dr. Tatjano Tišler. Za recenzenta je bil imenovan prof. dr. Franc Viktor Nekrep.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Somentorica: dr. Tatjana Tišler

Recenzent: prof. dr. Franc Viktor Nekrep

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ines MANDIČ-MULEC  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: dr. Tatjana TIŠLER  
Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za kemijo, biologijo in tehnologijo  
voda

Član: prof. dr. Franc Viktor NEKREP  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Simon Guštin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 628.35:579.66(043)=863  
KG odpadne vode/čiščenje odpadnih voda/aktivno blato/ATP/adenozin 5'-trifosfat/optimizacija/3,5-diklorofenol/strupenost/*Vibrio fischeri*/metoda zaviranja hitrosti porabe kisika  
AV GUŠTIN, Simon  
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/ TIŠLER, Tatjana (somentorica)/ NEKREP, Franc Viktor (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
LI 2006  
IN OPTIMIZACIJA ATP TESTA ZA DOLOČANJE STRUPENOSTI ODPADNIH VODA IN PRIMERJAVA Z REFERENČNIMI METODAMI  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 72 str., 17 pregl., 8 sl., 96 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Vtok na biološko čistilno napravo je lahko zaradi specifičnih industrijskih odpadnih voda strupen za mikroorganizme. Referenčna metoda za ugotavljanje akutne strupenosti odpadnih voda je metoda zaviranja hitrosti porabe kisika (SIST ISO 8192), uporablja se tudi test z bakterijami *Vibrio fischeri* z merjenjem luminiscence (SIST ISO 11348-2), ter metoda merjenja mikrobnega ATP z luminometrom. Referenčna metoda merjenja zaviranja hitrosti porabe kisika je dolgotrajna, zato smo iskali metode, ki so hitrejše in bi dale zadovoljive rezultate pri sledenju akutne strupenosti. Cilj raziskave je bil optimizirati metodo merjenja mikrobnega ATP in preveriti njeno učinkovitost. Preizkusili smo možnosti uporabe različnih komercialno razpoložljivih mikrobnih biomas zaradi težav pri izvedbi testa z biomaso iz laboratorijskega modela. Na različnih realnih odpadnih vodah smo opravili vse tri teste za ugotavljanje strupenosti ter primerjali rezultate. Ugotovili smo, da je optimalni čas izpostavitve aktivnega blata strupeni snovi 120 minut in z liofilizirano aktivno biomaso Micropan Complex dosežemo boljšo občutljivost ob boljši ponovljivosti poskusov. Pri primerjavi metod za ugotavljanje strupenosti smo ugotovili, da je najbolj občutljiv test z bakterijami *Vibrio fischeri*, vendar ni najbolj ustrezen, ker ne vsebuje mikroorganizmov aktivnega blata. Test zaviranja hitrosti porabe kisika in test merjenja mikrobnega ATP sta dosegla podobno občutljivost, vendar je test merjenja mikrobnega ATP krajši, zato menimo, da je uporaben, kot eden izmed več testov, za ugotavljanje strupenosti vtoka na čistilne naprave.

## KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 628.35:579.66(043)=863  
CX wastewater/wastewater treatment/activated sludge/ optimisation /ATP/adenozin 5'-triphosphate/ 3,5-dichlorophenol/toxicity/ *Vibrio fischeri*/test for the inhibition of oxygen consumption  
AU GUŠTIN, Simon  
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/ TIŠLER, Tatjana (co-advisor)/ NEKREP, Franc Viktor (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2006  
TI THE OPTIMISATION OF ATP WASTEWATER TOXICITY TEST AND COMPARISON WITH REFERENCE METHODS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 72 p., 17 tab., 8 fig., 96 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Specific industrial wastewaters which are treated on municipal wastewater treatment plants are potentially toxic. The reference method for evaluating acute toxicity of wastewaters is test for the inhibition of oxygen consumption by activated sludge (SIST ISO 8192) but the luminiscent bacteria test with *Vibrio fischeri* (SIST ISO 11348-2) and bioluminiscent assay of microbial ATP determination are also used. The procedure of reference method for assessing acute toxicity is quite long lasting, so we searched for faster methods which would give comparable results. The aim of this study was to optimize the time of the ATP assay and investigate the possibilities of using another source of active biomass since there were problems with the biomass from the laboratory model. We performed all three tests on real wastewaters and compared the results. The optimum exposure time of activated sludge in the ATP test was 120 minutes and we found out that the Micropan Complex biomass is equally sensitive to toxicants as the biomass from laboratory model with better reproducibility of the assay. With comparison of all three methods it was shown that the most sensitive method is the bioluminescence with *Vibrio fischeri* but it is not most appropriate test since it does not include organisms of activated sludge. The test for the inhibition of oxygen consumption by activated sludge and the ATP test were similarly sensitive but the time needed for ATP test is shorter, so we think the ATP test is suitable as one of the tests for assessing the toxicity of influent on wastewater treatment plants.

## KAZALO VSEBINE

	stran
Ključna dokumentacijska informacija.....	III
Key words documentation.....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic.....	VII
Kazalo slik.....	IX
Okrajšave in simboli.....	X
Slovar pojmov.....	XI
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN NAČRT DELA .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	3
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	<b>4</b>
2.1 ČIŠČENJE ODPADNIH VODA .....	4
2.2 AKTIVNO BLATO.....	6
<b>2.2.1 Potek postopka čiščenja z aktivnim blatom</b> .....	<b>7</b>
2.3 STRUPENOSTNI TESTI.....	8
<b>2.3.1 Bioluminiscenčne metode</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3.2 Merjenje celičnega ATP</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3.3 Respirometrične metode</b> .....	<b>13</b>
2.3.3.1 Zaviranje hitrosti porabe kisika .....	15
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>16</b>
3.1 STRUPENE SNOVI IN MEŠANICE .....	17
<b>3.1.1 Kemijske analize odpadnih vod</b> .....	<b>17</b>
3.2 BIOREAKTOR – LABORATORIJSKI MODEL BIOLOŠKE AEROBNE ČISTILNE NAPRAVE .....	18
3.3 MERJENJE KONCENTRACIJE MIKROBNEGA ATP V VZORCIH AKTIVNE BIOMASE .....	19
<b>3.3.1 Material</b> .....	<b>19</b>
3.3.1.1 Cepivo.....	19
3.3.1.2 Kemikalije .....	20
3.3.1.2.1 Kit za merjenje ATP (p.a., Sigma) .....	20
3.3.1.2.2 Tris-EDTA pufer .....	20
<b>3.3.2 Aparature</b> .....	<b>21</b>
3.3.2.1 Luminometer .....	21
<b>3.3.3 Priprava vzorcev</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3.4 Ekstrakcija ATP iz vzorcev</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3.5 Priprava reagentov in merjenje ATP</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3.6 Izračun koncentracije ATP v vzorcih in ugotavljanje zaviralnih koncentracij</b> .....	<b>23</b>
3.4 TEST ZAVIRANJA HITROSTI PORABE KISIKA.....	25
<b>3.4.1 Material</b> .....	<b>25</b>
3.4.1.1 Hranilne raztopine .....	25

3.4.1.2	Cepivo.....	26
3.4.1.2.1	Aktivno blato iz laboratorijskega modela.....	26
3.4.1.2.2	Komercialno cepivo BODseed.....	26
3.4.1.2.3	Komercialno cepivo Micropan Complex.....	26
<b>3.4.2</b>	<b>Aparature</b> .....	<b>27</b>
3.4.2.1	Winklerjeve stekleničke.....	27
3.4.2.2	Kisikova elektroda.....	27
3.4.2.3	Sistem za prezračevanje.....	28
<b>3.4.3</b>	<b>Priprava testnih mešanic</b> .....	<b>28</b>
3.4.3.1	Testna mešanica s strupeno snovjo (odpadno vodo).....	29
3.4.3.2	Ničelna kontrola.....	29
3.4.3.3	Fizikalno-kemijska kontrola.....	29
<b>3.4.4</b>	<b>Metoda z majhno koncentracijo aktivne biomase</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.5</b>	<b>Metoda z veliko koncentracijo aktivne biomase</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.6</b>	<b>Ugotavljanje ustreznih koncentracij komercialnih cepiv</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4.7</b>	<b>Ugotavljanje zaviralnih koncentracij strupenih snovi</b> .....	<b>31</b>
3.5	TEST STRUPENOSTI Z LUMINISCENČNIMI BAKTERIJAMI <i>Vibrio</i> <i>fischeri</i> .....	33
<b>3.5.1</b>	<b>Kulture bakterij</b> .....	<b>33</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Aparature</b> .....	<b>33</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Postopek testa strupenosti z luminiscenčnimi bakterijami <i>Vibrio fischeri</i></b> .....	<b>33</b>
3.5.3.1	Redčitvena vrsta po SIST ISO 11348, 1998 brez G1 stopnje.....	34
3.5.3.2	Geometrijska redčitvena vrsta.....	35
3.5.3.3	Potek testa in ugotavljanje zaviralnih koncentracij strupenih snovi.....	35
3.6	PRIKAZ REZULTATOV.....	36
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>37</b>
4.1	OPTIMIZACIJA ATP TESTA.....	37
<b>4.1.1</b>	<b>Optimalni čas izpostavitve aktivnega blata testirani snovi</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Primernost različnih virov biomase za testiranje strupenosti</b> .....	<b>43</b>
4.2	PRIMERJAVA OBČUTLJIVOSTI METOD ZA UGOTAVLJANJE STRUPENOSTI.....	45
<b>4.2.1</b>	<b>Referenčna snov 3,5-diklorofenol</b> .....	<b>45</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Testiranje strupenosti vzorcev odpadnih vod</b> .....	<b>46</b>
4.2.2.1	Rezultati kemijskih analiz odpadnih voda.....	50
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>53</b>
5.1	RAZPRAVA.....	53
5.2	SKLEPI.....	59
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>62</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	stran
<b>Preglednica 1:</b> Kemijske analize odpadne vode in metode, po katerih so bile opravljene. ....	18
<b>Preglednica 2:</b> Povprečje IC <sub>20</sub> 3,5-diklorofenola s standardnim odklonom za aktivno blato iz laboratorijskega modela.....	38
<b>Preglednica 3:</b> Povprečje IC <sub>50</sub> 3,5-diklorofenola s standardnim odklonom za aktivno blato iz laboratorijskega modela.....	39
<b>Preglednica 4:</b> Povprečje IC <sub>80</sub> 3,5-diklorofenola s standardnim odklonom za aktivno blato iz laboratorijskega modela.....	39
<b>Preglednica 5:</b> Povprečje IC <sub>20</sub> 3,5-diklorofenola s standardnim odklonom za aktivno blato iz komercialnega cepiva Micropan Complex. ....	41
<b>Preglednica 6:</b> Povprečje IC <sub>50</sub> 3,5-diklorofenola s standardnim odklonom za aktivno blato iz komercialnega cepiva Micropan Complex. ....	41
<b>Preglednica 7:</b> Povprečje IC <sub>50</sub> 3,5-diklorofenola s standardnim odklonom za aktivno blato iz komercialnega cepiva Micropan Complex. ....	42
<b>Preglednica 8:</b> Koncentracije aktivnega blata pri enakih aktivnostih za biomaso iz laboratorijskega modela in komercialne biomase. Aktivnost biomase smo ugotavljali s testom zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda z nizko koncentracijo aktivnega blata). ....	44
<b>Preglednica 9:</b> Primerjava strupenosti 3,5-diklorofenola za različne vrste aktivnih biomas. Poskusi so bili opravljeni s testom zaviranja hitrosti porabe kisika (SIST ISO 8192, metoda z majhno koncentracijo aktivnega blata). ....	45
<b>Preglednica 10:</b> Povprečne vrednosti in standardni odkloni zaviralnih koncentracij (IC) za 3,5-diklorofenol. Povprečne vrednosti so rezultat vsaj dveh neodvisnih meritev za posamezno metodo. Zaviralne koncentracije (IC) so podane v mg/l, x = 20, 50, 80 %. ....	46
<b>Preglednica 11:</b> Povprečne vrednosti in standardni odkloni zaviralnih koncentracij (IC) odpadne vode A iz farmacevtske industrije. Povprečne vrednosti so rezultati vsaj dveh neodvisnih meritev za posamezno metodo. Zaviralne koncentracije (IC) so podane v volumnskih odstotkih, x = 20, 50, 80 %. ....	47

<b>Preglednica 12:</b> Povprečne vrednosti in standardni odkloni zaviralnih koncentracij (IC) odpadne vode B iz kovinarske industrije. Povprečne vrednosti so rezultati vsaj dveh neodvisnih meritev za posamezno metodo. Zaviralne koncentracije (IC) so podane v volumskih odstotkih, $x = 20, 50, 80 \%$ .....	48
<b>Preglednica 13:</b> Povprečne vrednosti in standardni odkloni zaviralnih koncentracij (IC) odpadne vode C iz farmacevtske industrije. Povprečne vrednosti so rezultat vsaj dveh neodvisnih meritev za posamezno metodo. Zaviralne koncentracije (IC) so podane v volumskih odstotkih, $x = 20, 50, 80 \%$ . ..	49
<b>Preglednica 14:</b> Povprečne vrednosti in standardni odkloni zaviralnih koncentracij (IC) za odpadno vodo D iz deponije. Rezultate povprečnih vrednosti smo dobili iz vsaj dveh neodvisnih meritev za posamezno metodo. Zaviralne koncentracije (IC) so podane v volumskih odstotkih, $x = 20, 50, 80 \%$ .....	50
<b>Preglednica 15:</b> Rezultati analiz odpadne vode A.....	51
<b>Preglednica 16:</b> Rezultati analiz odpadne vode D.....	51
<b>Preglednica 17:</b> Rezultati analiz odpadne vode B.....	52



## KAZALO SLIK

	stran
<b>Slika 1:</b> Čistilna naprava Domžale-Kamnik (Institut za ekološki inženiring, 2005) .....	6
<b>Slika 2:</b> Interakcije v kosmu (Toprak, 2003). .....	7
<b>Slika 3:</b> Shema prikazuje osnovni princip nastanka bioluminiscenčne svetlobe v prisotnosti ATP z luciferin luciferaznim kompleksom (Weiß, 2005). .....	11
<b>Slika 4:</b> Shema poskusov .....	17
<b>Slika 5:</b> Shema razporeditve epruvetk na termo bloku Dr. Lange .....	34
<b>Slika 6:</b> Odvisnost $IC_{20}$ in $IC_{50}$ od časa izpostavitve aktivnega blata (iz laboratorijskega modela) 3,5-diklorofenolu. ....	40
<b>Slika 7:</b> Odvisnost $IC_{20}$ in $IC_{50}$ od časa izpostavitve aktivnega blata (komercialno aktivno blato Micropan Complex) 3,5-diklorofenolu. ....	42
<b>Slika 8:</b> Aktivnost različnih koncentracij aktivnega blata iz laboratorijskega modela (LM) in komercialno dostopne aktivne biomase. Primer za Micropan Complex (MC). ....	43

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b><math>\Delta t</math></b>	časovna razlika med dvema meritvama	(min)
<b>[ATP]</b>	molarna koncentracija ATP	mol/l
<b>3,5-DCP</b>	3,5-dichlorophenol (3,5-diklorofenol)	
<b>AMP</b>	adenosine 5'-monophosphat (adenozin monofosfat)	
<b>ATP</b>	adenosine 5'-triphosphat (adenozin trifosfat)	
<b>BPK</b>	biokemijska potreba po kisiku	mg/l
<b>CČN</b>	centralna čistilna naprava	
<b>DTT</b>	ditiotreitrol	
<b>EDTA</b>	etilendiaminotetraocetna kislina	
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency	
<b>FDA</b>	Fluorescein diacetat	
<b>FL-AAB</b>	ATP Assay Mix dilution Buffer	
<b>FL-AAM</b>	ATP Assay Mix	
<b>FL-AAS</b>	ATP Assay Standard disodium salt trihydrate	
<b>HRT</b>	hidravlični zadrževalni čas	H
<b>I</b>	zaviranje hitrosti porabe raztopljenega kisika	(%)
<b>IC</b>	inhibitorna koncentracija, zaviralna koncentracija	
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization	
<b>KPK</b>	kemijska potreba po kisiku	mg/l
<b>LM</b>	laboratorijski model	
<b>LWWTP</b>	laboratorijski sistem simulirane aerobne čistilne naprave	
<b>MC</b>	Micropan Complex	
<b>MLSS</b>	suha snov	mg/l
<b>nm</b>	nanometer	
<b>p.a.</b>	pro analysis	
<b>PPi</b>	difosfat	
<b>q<sub>1</sub></b>	prva meritev raztopljenega kisika na linearnem delu krivulje	(mg/l)
<b>q<sub>2</sub></b>	zadnja meritev raztopljenega kisika na linearnem delu krivulje	(mg/l)
<b>R</b>	hitrost porabe kisika	(mg/l min)
<b>R<sup>2</sup></b>	koeficient korelacije	
<b>R<sub>B</sub></b>	hitrost porabe kisika v kontrolni mešanici	(mg/l min)
<b>RLU</b>	relativne luminiscenčne enote	
<b>R<sub>PC</sub></b>	hitrost porabe kisika v fizikalno-kemijski mešanici	(mg/l min)
<b>R<sub>T</sub></b>	hitrost porabe kisika v vzorcu	(mg/l min)
<b>SD</b>	standardna deviacija	
<b>SHPK</b>	specifična hitrost porabe kisika	mg O <sub>2</sub> /h g
<b>SOO</b>	skupni organski ogljik	
<b>SRT</b>	minimalni zadrževalni čas aktivnega blata v sistemu	dan
<b>T</b>	temperatura	°C
<b>Tris</b>	Tris hidroksimetil aminometan hidroklorid	
<b>WERF</b>	Water Environment Research Foundation	

## SLOVAR POJMOV

**Aktivno blato** – akumulirana biološka masa v obliki kosmov, ki se proizvede med čiščenjem odpadne vode z rastjo bakterij in drugih mikroorganizmov v aerobnih pogojih (Roš, 2001).

**Akutna strupenost** – relativno kratkotrajni letalni ali drugi učinek strupene snovi ali odpadne vode na žive organizme (Clesceri in sod., 1998).

**Biokemijska potreba po kisiku (BPK)** – masna koncentracija raztopljenega kisika, ki se pri določenih pogojih porabi za biološko oksidacijo organskih in/ali anorganskih snovi v vodi (Dular in sod., 1997).

**Bioluminiscenca** – produkcija svetlobe različnih valovnih dolžin pri živih organizmih. Svetloba nastaja v procesu oksidacije beljakovine luciferina. Za potek reakcije sta potrebna še ATP in encim luciferaza, ki katalizira reakcijo oksidacije. Pojav bioluminiscence je znan pri glivah, bakterijah, žuželkah in morskih organizmih (Madigan in sod., 2000).

**Definitivni test** – test za ugotavljanje natančnih toksičnih koncentracij testnega materiala, ki sledi po preliminarnem testu in z njim natančno določimo  $IC_x$  vrednosti (Clesceri in sod., 1998).

**Gruča genov** – geni, ki se v določenem delu genoma lahko izražajo, ko zamenjajo mesto pa izražanje ni več mogoče (Singelton and Sainsbury, 1996).

**Hitrost porabe kisika** – poraba kisika s strani mikroorganizmov v aktivnem blatu na enoto volumna aktivnega blata, v časovni enoti. Izrazimo jo v miligramih na liter na uro – mg/l h (SIST ISO 8192, 1986).

**$IC_{50}$**  – zaviralna koncentracija strupene snovi ali odpadne vode, ki je potrebna, da pride do zmanjšanja rasti in zaviranja razmnoževanja mikrobne populacije za 50 % v primerjavi s slepo kontrolo brez strupene snovi ali odpadne vode (Clesceri in sod., 1998).

**Kosem** – skupek manjših delcev, zbranih v večje, lažje usedljive delce, ki nastanejo pri kemijskem, fizikalnem ali biološkem čiščenju (Dular in sod., 1997).

**Preliminarni test** – test za ugotavljanje približne strupenosti snovi ali odpadne vode oz. za določanje območja strupenega delovanja. V intervalu delovanja strupene snovi ali odpadne vode kasneje izvajamo definitivne teste (Clesceri in sod., 1998).

**Strupenost** – potencial ali kapaciteta strupene snovi ali odpadne vode, da povzroči neugoden učinek na žive organizme; ponavadi strup ali mešanica strupov. Strupenost je rezultat doze (količine) in časa izpostavljenosti, modificiranih s temperaturo, kemično obliko in dostopnostjo (Clesceri in sod., 1998).

**Zaviranje hitrosti porabe kisika** – upadanje hitrosti porabe kisika aktivnega blata v prisotnosti strupene snovi v primerjavi s hitrostjo porabe kisika v enaki mešanici brez strupene snovi (SIST ISO 8192, 1986).

## 1 UVOD

Čiščenje odpadnih voda je pomembno področje uporabe mikroorganizmov za ljudem koristna opravila. S skokovitim naraščanjem populacije ljudi v zadnjih desetletjih se pritisk na okolje povečuje. Vedno več je onesnaževanja, zato morajo biti postopki čiščenja voda vedno bolj učinkoviti, da površinske vode ostajajo in postajajo bolj čiste in kot take primerne za življenje različne flore in favne.

Na komunalne čistilne naprave je priključeno tako urbano okolje, iz katerega prihajajo komunalne odpadne vode in pa različni industrijski obrati, iz katerih pritekajo industrijske odpadne vode. V industriji so odpadne vode zelo specifične in se razlikujejo od komunalnih odpadnih voda, zato lahko na komunalnih čistilnih napravah povzročajo težave. Pogosto vsebujejo strupene snovi, ki neugodno vplivajo na biološki del čiščenja na čistilni napravi. Take so npr. težke kovine, organofosfati, olja in maščobe. Njihov vpliv na mikroorganizme v biološki čistilni napravi je potrebno zaznati še preden povzročijo škodo. Zmanjšanje aktivnosti ali števila mikroorganizmov, ki čistijo odpadne vode, vodi v odtekanje neočiščene ali slabo očiščene odpadne vode s čistilne naprave v vodotoke. Izpust neočiščene odpadne vode lahko usodno vpliva na vodne organizme. To preprečimo tako, da preizkusimo vpliv določene odpadne vode na mikroorganizme aktivnega blata pred izpustom na čiščenje. V ta namen uporabljamo več testov, ki se razlikujejo po dolžini trajanja, zahtevnosti izvedbe, občutljivosti in nekaterih drugih parametrih.

Zelo pomemben je čas, v katerem pridobimo rezultate strupenosti odpadnih voda, zato iščemo nove, krajše metode, katerih rezultati omogočajo hitrejše ukrepanje. Referenčna metoda na tem področju je metoda zaviranja hitrosti porabe kisika (glede na strupenost testne mešanice opazujemo zmanjšanje hitrosti porabe kisika v primerjavi s kontrolo brez testne mešanice). Čas izvedbe celotne metode je nekoliko daljši, zato se uveljavlja kratkotrajnejši ATP test za ugotavljanje strupenosti odpadnih voda. S tem testom izmerimo količino mikrobne ATP, ki je sorazmerna količini žive biomase, ta pa je odvisna od strupenosti prisotnih snovi. Za ugotavljanje akutne strupenosti velikokrat uporabljajo tudi test z bakterijami *Vibrio fischeri* z merjenjem luminiscence, s katerim dobimo primerljive rezultate kljub temu, da testni sistem vsebuje morske bakterije. Za kvalitetno oceno

strupenosti določenega vzorca pa en test ni dovolj, saj ima vsak svoje pomanjkljivosti. Zato priporočajo, da se uporabi več različnih testov in se rezultati primerjajo (Dalzell in sod., 2002).

## 1.1 NAMEN IN NAČRT DELA

Namen diplomske naloge je bil prilagoditi in izboljšati metodo ugotavljanja akutne strupenosti z merjenjem vsebnosti mikrobnega adenozin trifosfata (ATP) v aktivnem blatu (poimenovan tudi ATP test za ugotavljanje strupenosti odpadnih voda). Optimiziran test smo nato preizkusili na realnih odpadnih vodah in ga primerjali z drugimi metodami.

V predhodnih raziskavah smo imeli težave z občutljivostjo testa, zato smo najprej ugotavljali, kakšen bi bil najprimernejši čas učinkovanja strupene snovi na aktivno blato. Prejšnji poskusi so pokazali, da se občutljivost testa s podaljšanim časom izpostavitve povečuje (Podgorelec, 2004), zato smo preizkusili različne časovne izpostavitve. Najkrajši čas izpostavitve strupene snovi aktivnemu blatu je bil 30 minut, najdaljši pa 180 minut. Iskali smo optimalen čas izpostavitve, ki upošteva čim krajšo izvedbo testa in čim večjo občutljivost in primerljivost rezultatov z drugimi metodami. Strupena snov, ki smo jo izbrali v ta namen, je bila 3,5-diklorofenol, ki je referenčna spojina za ugotavljanje občutljivosti aktivnega blata pri testu zaviranja hitrosti porabe kisika. 3,5-diklorofenol tudi pogosto uporabljajo pri testu z bakterijami *Vibrio fischeri* z merjenjem luminiscence.

Ponovljivost smo poskusili izboljšati z zamenjavo aktivnega blata iz laboratorijskega modela čistilne naprave s komercialno dostopnim, liofiliziranim aktivnim blatom. Aktivno blato iz laboratorijskega modela povzroča težave pri ATP testu, ker ni homogeno (je v obliki kosmičev), to pa onemogoča dodajanje enake količine mikroorganizmov v vse testne mešanice. Pojavljajo pa se še težave z občutljivostjo aktivnega blata, vzdrževanjem neprekinjenega delovanja, koncentracijo biomase in spreminjanjem mikrobne združbe. Preizkusili smo dva različna komercialna pripravka, da bi izboljšali ponovljivost.

Tako optimizirano metodo smo preizkusili na štirih vzorcih realnih odpadnih voda, jo primerjali s testom z bakterijami *Vibrio fischeri* z merjenjem luminiscence in referenčno metodo zaviranja hitrosti porabe kisika.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da bodo rezultati optimiziranega ATP testa za merjenje strupenosti bolj ponovljivi in občutljivi, in tako bolj primerljivi z rezultati referenčnega testa zaviranja hitrosti porabe kisika. Z uvedbo in testiranjem primernosti komercialne aktivne biomase pričakujemo, da bi lahko ta nadomestila aktivno blato iz laboratorijskega modela v primerih, ko zaradi težav ne bi deloval ali pa bi bila komercialna aktivna biomasa zaradi svojih lastnosti bolj primerna. Pričakujemo, da bi z optimiziranim ATP testom hitreje pridobili zanesljive podatke o strupenosti in bi bil ta uporaben za spremljanje strupenosti vtoka na čistilne naprave.

## 2 PREGLED OBJAV

Z industrijsko revolucijo se je pritisk onesnaževalcev na vode močno povečal. S časom smo spoznali, da onesnaženje ne bo izginilo samo od sebe, ampak bomo morali za to nekaj storiti. Tako se je začel razvoj čistilnih naprav in ostalih okoljskih tehnologij, ki zmanjšujejo onesnaženje. Čista voda je nujno potrebna za življenje tako ljudi kot vseh ostalih organizmov. Onesnaženje zelo poslabša kakovost življenja. Danes poznamo več vrst onesnaženja: onesnaženje z organskimi snovmi, z anorganskimi snovmi, toplotno onesnaženje, radioaktivno onesnaženje in onesnaženje s patogenimi mikroorganizmi (Tišler, 1992). Z različnimi tehnološkimi postopki in z uporabo mikroorganizmov poskušamo onesnaženje odpraviti in tudi preprečiti.

### 2.1 ČIŠČENJE ODPADNIH VODA

Odpadne vode so tekoči iztoki, ki nastanejo v gospodinjstvih (komunalna odpadna voda), v kmetijskih dejavnostih ali pa v industrijskih obratih (industrijska odpadna voda) in jih ne smemo izpustiti neочиščene v površinske vode zaradi vplivov na zdravje ljudi, ekonomskih, estetskih ali rekreacijskih razlogov (Madigan in sod., 2000) in vplivov na organizme. Odpadne vode v veliki večini čistimo na komunalnih čistilnih napravah.

Komunalne čistilne naprave so pomemben del infrastrukture čiščenja odpadnih voda. Na njih se zbira in čisti voda iz gospodinjstev, podjetij, bolnišnic in drugod. Take vode imajo bolj ali manj enotno sestavo in vsebujejo le približno 1 % skupne raztopljene in neraztopljene suhe snovi; od tega je do 200 mg/l neraztopljenih koloidov in usedljivih snovi (Roš, 2001). Poleg komunalnih odpadnih vod, pa so velikokrat na čistilne naprave priključeni industrijski uporabniki. Nekateri imajo že svoje predčiščenje odpadnih vod, ker bi izpuščanje nepredčiščene vode preveč vplivalo na delovanje komunalne čistilne naprave. Industrijske odpadne vode so specifične, tako po svoji organski kot anorganski sestavi in pogosto vsebujejo strupene snovi (Ren, 2004).



Čiščenje odpadnih voda lahko razdelimo v štiri glavne faze (Roš, 2001; Toman, 1992; Hammer in Hammer Jr., 2001):

- Predčiščenje: odstranjevanje večjih odpadkov (korenine, konzerve...), odstranjevanje kamenja in peska in odstranjevanje dela olj in maščob.
- Primarno čiščenje se nanaša na odstranjevanje netopnih snovi iz vode, kot so pesek, veje, maščobe in olja s postopki kot so usedanje, različne grablje in izplavljanje. V tej stopnji lahko odstranimo do 30 % organskega bremena.
- Sekundarno čiščenje je namenjeno odstranjevanju topnih organskih snovi, katerih razkroj zahteva kisik. Ponavadi je ta faza biološka in topne snovi mineralizirajo mikroorganizmi, večinoma bakterije z svojimi raznolikimi načini pridobivanja energije za življenje. Odstranjevanje organskih snovi v drugi fazi lahko poteka v več oblikah, vendar je najbolj pogost in učinkovit proces z aktivnim blatom. V aktivnem blatu je konzorcij mikroorganizmov, ki vključujejo bakterije, praživali in preprostejše mnogoceličarje, najbolj je zastopana skupina bakterij. Poleg heterotrofnih bakterij, ki so prisotne v vseh bioloških čistilnih napravah, najdemo v tistih, s katerimi odstranjujemo dušik, tudi nitrificirajoče bakterije, ki so avtotrofne. Heterotrofne odstranijo večji del organskih in tudi anorganskih snovi tako, da jih vgradijo v svojo biomaso, nitrificirajoče pa spremenijo amonijski dušik v nitratnega (sevi rodu *Nitrosomonas* pretvorijo amoniak v nitrit, sevi rodu *Nitrobacter* pa nastali nitrit v nitrat).
- V tretji fazi se še dodatno odstranijo suspendirane snovi, kot so biološko nerazgradljivi organski onesnaževalci okolja (klorofenoli, pesticidi, poliklorirani bifenili...) in raztopljene organske snovi, ki so ostale po sekundarnem čiščenju (odstranjevanje dušika, fosforja). V nekaterih primerih sledi na koncu še dezinfekcija, s katero se odstranijo patogeni mikroorganizmi.



**Slika 1:** Čistilna naprava Domžale-Kamnik (Institut za ekološki inženiring, 2005)

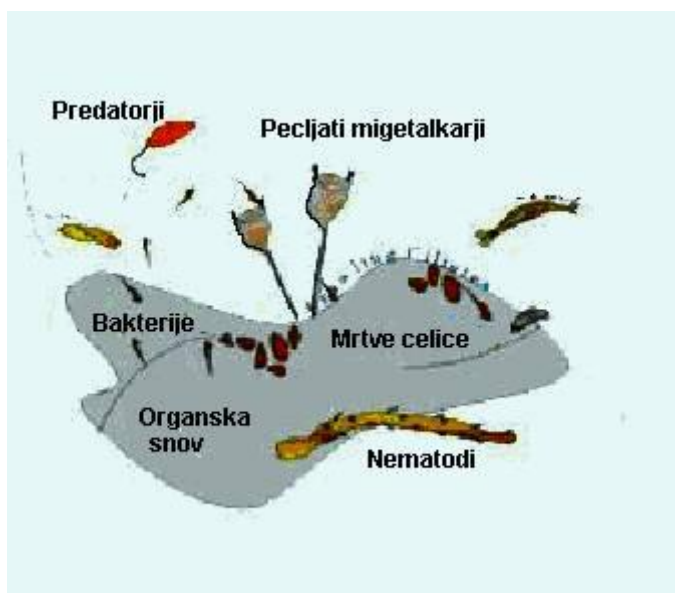
V Sloveniji je odvajanje komunalnih odpadnih voda po zakonu obvezno za vsa naselja ali del naselja, v katerem je letna obremenitev zaradi nastajanja komunalne odpadne vode, preračunana na 1 ha zemeljske površine, večja od 20 populacijskih enot, na vodovarstvenem območju pa so zahteve še strožje (Pravilnik o odvajanju in čiščenju komunalne odpadne in padavinske vode, 2002).

## 2.2 AKTIVNO BLATO

Biološka aktivnost aktivnega blata je nujno potrebna za čiščenje odpadne vode, zato strupene snovi, ki pritečejo z odpadno vodo, negativno vplivajo na proces čiščenja. Na primer Jönsson in sod. (2000) so pokazali, da okoli polovica vseh preiskanih odpadnih voda iz švedskih čistilnih naprav vsebuje različne snovi, ki zavirajo proces čiščenja. Prav tako poročata Grau in Da-Rin (1997), da je bilo čiščenje močno zavrto, ko je na čistilno napravo pritekla s fenolom močno obremenjena voda.

V aktivnem blatu so različne bakterije (med najbolj pogostimi je *Zooglea ramigera*), ki izdelujejo polisaharide, ki omogočajo nastanek kosmov. V aktivnem blatu je približno  $10^{11}$  živih bakterij na gram suhe teže (Takii, 1977). Na polisaharidno osnovo se pripnejo druge

bakterije, praživali in manjše živali (večinoma različni predstavniki razreda Nematoda). Pogosto so v kosmi prisotne tudi filamentozne bakterije in glive. V aktivnem blatu so našli bakterije rodov *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Comamonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* in *Sphaerotilus*. V velikem številu so našli tudi kvasovko iz rodu *Debaryomyces* (Benedict in Carlson, 1971). Rast mikroorganizmov v obliki kosma je zelo primerna za čistilni proces, saj se kosmi hitro posedejo in se lahko vrnejo v prezračevalni bazen, ne pa odplavijo z vodo, ki izteka (Madigan in sod., 2000).



Slika 2: Interakcije v kosmu (Toprak, 2003)

### 2.2.1 Potek postopka čiščenja z aktivnim blatom

Odpadna voda po primarni fazi čiščenja priteka v prezračevalnik (prezračevalni bazen), kjer se nahajajo predhodno razviti kosmi, ki pridejo v stik z organsko snovjo v odpadni vodi. Pritekajoča organska snov je izpostavljena presnovnim reakcijam mikroorganizmov. Vsebinsko prezračevalnika imenujemo suspenzija aktivnega blata. Aktivna biomasa, ki se nanaša na koncentracijo aktivnega blata (ang. MLSS – mixed liquor suspended solids), večinoma vsebuje mikroorganizme, inertne suspendirane snovi in nerazgradljive suspendirane snovi. Po reakciji v prezračevalniku odteka voda gravitacijsko iz prezračevalnika v bistrilnik ali sekundarni usedalnik, kjer se suspendirane snovi ločijo od

obdelane vode, ker so v obliki kosmov. Koncentrirana suspenzija aktivnega blata se vrača nazaj v prezračevalnik, saj vsebuje koncentrirano populacijo mikroorganizmov, ki čistijo odpadno vodo. Ker se mikroorganizmi v procesu konstantno razmnožujejo, je treba poskrbeti, da višek (prirast) aktivnega blata redno odstranjujemo iz sekundarnega usedalnika (Laubenberger in Hartmann, 1971; Roš, 2001; Hammer in Hammer Jr., 2001).

### 2.3 STRUPENOSTNI TESTI

Skupno vsem komunalnim čistilnim napravam je, da sta narava in koncentracija odpadnih snovi v odpadni vodi neznan, razen če ni vzpostavljenega nadzora kakovosti odpadne vode. V slovenski zakonodaji trenutno ni določila, ki bi uporabnike komunalnih čistilnih naprav obvezoval za testiranje strupenosti. Preiskave vtoka in sledeči korektivni ukrepi bi lahko preprečili upad biološke aktivnosti na čistilni napravi. Ti ukrepi obsegajo preusmeritev vode v kakšen zadrževalni bazen ali pa dodajanje nevtralizirajočih kemikalij v odpadno vodo (Ren, 2004). Še drugi načini preprečevanja posledic strupenih vtokov so opisani in ocenjeni v članku Ko-ja in sod. (2002). Potreba po čim hitrejšem odkrivanju strupenosti vtoka je že dolgo prepoznana (npr. Solymon in sod., 1976) in tudi komunalne čistilne naprave so zelo zainteresirane za takšno analitiko (WERF, 2000).

Biološki testi strupenosti so pri ocenjevanju kakovosti odpadne vode zelo zaželeni, ker samo kemijski in fizikalni testi ne pokažejo vplivov na vodne organizme (Environmental Protection Agency, 1991). S kemijskimi analizami ne moremo zaznati vseh možnih reakcij, ki potekajo v organizmih in različnih preoblikovanj drugače nestrupenih snovi. Biološki testi nam dajo celovitejšo sliko o vseh možnih strupenih učinkih neke snovi. Vendar moramo biti tudi pri razlagi rezultatov bioloških testov pazljivi, ker so različne vrste vodnih organizmov različno dovzetne za neko strupeno snov, občutljivost pa je odvisna tudi od življenjskega cikla, pogojev v okolju, drugih prisotnih snovi in prejšnje izpostavitve strupeni snovi (Clesceri in sod., 1998).

### 2.3.1 Bioluminiscenčne metode

Bioluminiscenčne metode pogosto uporabljajo za testiranje strupenosti (Thomulka in Lange, 1996; Chaudri in sod., 1999). Za ugotavljanje strupenosti odpadnih vod najpogosteje uporabljajo sistem Microtox® (Azur environmental, Carlsbad, CA), in pa Lumistox (Dr. Lange, Düsseldorf, Nemčija). Lumistox test temelji na morski bakteriji *Vibrio fischeri*, ki ima konstitutivni promotor, ki uravnava izražanje gruče genov *luxCDABE*, ki kodira encime za katalizo reakcije, pri kateri nastaja svetloba (Hastings in Nealson, 1977). Luminiscenca bakterije se zmanjša v prisotnosti strupenih snovi, zato tak sistem deluje na način »ugašanja svetlobe« (lights-off). Ugotovljeno je bilo, da je pri ugotavljanju strupenosti odpadnih voda test z *Vibrio fischeri* bolj občutljiv kot respirometrične metode z aktivnim blatom (npr. Reteuna in sod., 1986; Elnabarawy in sod, 1988) in zato ni najbolj primeren za spremljanje strupenosti odpadnih voda. Z rahlimi spremembami in izboljšavami so tudi ta test izboljšali. Tako sta Hoffman in Christofi (2001) uporabila aktivno blato za podlago (matriks) za *V. fischeri*. Tako prilagojena metoda je dala bolj primerljive rezultate, verjetno zato, ker se strupene snovi adsorbirajo na flokule aktivnega blata.

Za spremljanje strupenosti odpadnih voda so v uporabi tudi genetsko spremenjeni organizmi, ki imajo dodane gene za luminiscenco kot je na primer *Escherichia coli* z gručo genov *luxCDABE* iz *V. fischeri* (Belkin in sod., 1996; v uporabo prenesla Choi in Gu, 2002) in *Pseudomonas putida* z gručo genov *luxCDABE* iz *P. luminescens* (Whiteley in sod., 2001; v uporabo prenesli Wiles in sod., 2003).

Gu in Gill (2001) sta po pojavu gensko spremenjenih sevov razvila večkanalni pretočni sistem za spremljanje strupenosti. Vsak kanal je sestavljen iz dveh bioreaktorjev: v prvem bakterije rastejo in iz njega kontinuirano pritekajo v drugega, v katerem so izpostavljene strupeni snovi. Prvi je oblikovan kot turbidistat, drugi pa kot kemostat. Bakterije so bile v kontaktu s strupenimi snovmi 20 minut. V vsakem kanalu, razen enem (v tem zaznavamo skupno strupenost, kot z Lumistox sistemom) se je luminiscenca pojavila, če je prišla bakterija v stik s točno določeno snovjo (strupena snov je vključila promotor gruče genov *luxCDABE* in pojavila se je luminiscenca, zato temu rečemo sistem »prižiganja svetlobe«

(lights-on)). Glede na luminiscenco lahko ugotovimo, katere so toksične snovi v odpadni vodi, ne pa samo skupno zaviranje, kar nam pokaže Lumistox sistem. Ta sistem sta s spreminjanjem hitrosti rasti bakterij še izpopolnila (Gu in sod., 2002).

Ren in Frymier (2003a) sta razvila kontinuirni sistem (Shk1 test) za spremljanje strupenosti odpadne vode z bakterijo, ki sta jo izolirala iz aktivnega blata in so jo kasneje prepoznali kot *Pseudomonas fluorescens* (Lajoie in sod., 2003). V bakterijo sta vstavila gručo genov *luxCDABE* in spremljala zmanjšanje svetlobe ob večji koncentraciji strupenih snovi. S tem sistemom sta testirala nekaj težkih kovin in okoli 100 organskih kemikalij, ki jih najdemo v odpadnih vodah. Ugotovila sta, da so rezultati, ki sta jih dobila s takim sistemom, bolj primerljivi respirometriji z aktivnim blatom, kot pa sistemu z *V. fischeri* (Lumistox) (Ren in Frymer, 2003b).

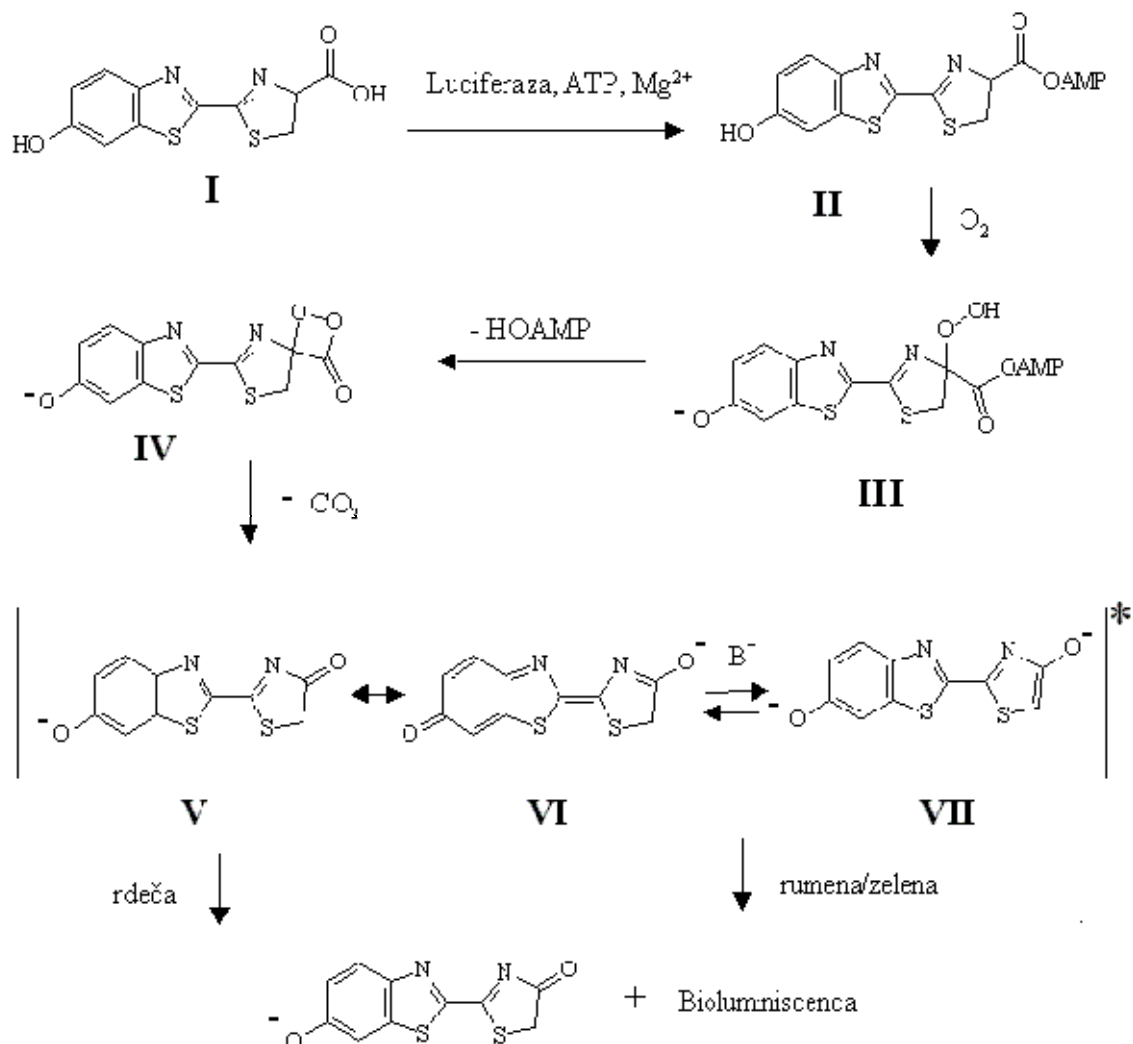
Philp in sodelavci (2003) so razvili tudi biosenzor iz organizma v aktivnem blatju (*Pseudomonas putida*), ki so ga imobilizirali in prilagodili za zaznavanje fenolov v odpadni vodi. Ta nosi gručo genov *luxCDABE* iz kopenske bakterije *Photobacterium luminescens*. Ta test je manj občutljiv kot Shk1 test, vendar še vedno primeren (Ren, 2004).

### **2.3.2 Merjenje celičnega ATP**

Med bioluminiscenčne metode spada tudi metoda merjenja mikrobnega ATP v aktivnem blatju. Metoda temelji na tem, da se z večanjem koncentracije strupene snovi zmanjšuje koncentracija živih mikrobnih celic, kar zaznamo z zmanjšanjem koncentracije ATP (Dalzell in Christofi, 2002). ATP metodo so tudi drugi prepoznali kot primerno za določanje števila živih celic (Lundin, 2000; Jørgensen in sod., 1992).

Adenozin trifosfat (ATP), temeljna energetska molekula vse celične aktivnosti, je prisotna v vseh živih celicah in hitro propade ob smrti organizma. Osnova testa je upadanje vsebnosti ATP v aktivni biomasi ob prisotnosti strupene snovi. ATP zaznamo z reakcijo encimskega sistema luciferin-luciferaza iz kresničke (Stanley, 1986), pri kateri nastaja

svetloba, katere količina je odvisna od količine v vzorcu prisotnega ATP (Patterson in sod., 1970).



**Slika 3:** Shema prikazuje osnovni princip nastanka bioluminiscenčne svetlobe v prisotnosti ATP z luciferin luciferaznim kompleksom. I – luciferin, II – luciferil adenilatni kompleks, III – s kisikom nastane peroksidna oblika luciferil adenilatnega kompleksa, IV – po odcepu AMP nastane dioksetanonska spojina, V, VI, VII – oksiluciferin v različnih tautomernih oblikah, ki dajejo različno svetlobo (Weiß, 2005).

V diplomskem delu smo uporabili luminiscenčni biotest za merjenje vsebnosti ATP mikroorganizmov, ki so vpleteni v proces z aktivno biomaso.

Skupno oddajanje svetlobe izmerimo z luminometrom in je direktno sorazmerno s količino ATP v reakcijski mešanici. ATP test se je pokazal kot učinkovit pri odkrivanju učinkov strupenih snovi na mikroorganizme (Kahru in sod., 1996). Drugo delo je pokazalo, da koncentracije ATP v *E. coli* ustrezajo spremembam v koncentraciji težkih kovin in organskih onesnaževal (Arretxe in sod., 1997) in da bi bila to primerna tehnika za druge izolirane mikroorganizme v čisti kulturi, kot tudi za celotno aktivno blato.

Raziskave so se osredotočile na količino ATP v aktivnem blatu kot merila mikrobne biomase in/ali metabolne aktivnosti (Patterson in sod., 1970; Roy in sod., 1983). V protoplazmi vseh celic je koncentracija ATP približno enaka (Patterson in sod., 1970), količina pa je odvisna od vrste in fiziološkega stanja celice in je zato povezana z živo biomaso in metabolno aktivnostjo (Roy in sod., 1983). Podatke o količini ATP lahko razširimo na parametre kot sta organski celični dušik in suha teža (Holm-Hansen in Karl, 1978). Merjenje ATP je primerno za ocenjevanje aktivnosti biomase v aktivnem blatu iz čistilnih naprav, pa tudi kot presejalni test za strupene snovi. Hiley (1996) je opisal, kakšen naj bi bil dober presejalni test:

- Vključeni morajo biti organizmi, ki živijo v okolju, katerega vpliv testiramo (v tem primeru, mikroorganizmi iz aktivnega blata)
- Ti organizmi morajo imeti pomembno vlogo v okolju (mikroorganizmi, ki odstranjujejo organsko breme v vodi, in se njihovo nedejavnost odraža na kvaliteti vode)
- Rezultati testa morajo biti jasni in tudi nedvomno pokazati, če ni učinka
- Razmere v testu morajo biti podobne dejanskim razmeram v čistilni napravi
- Presejalni test mora biti natančen in ponovljiv
- Materiali in aparati naj bi bili lahko dostopni, da vsakdo lahko ponovi test
- Rezultati testa morajo biti na voljo v nekaj urah
- Test mora imeti sposobnost, da zazna veliko različnih onesnaževal in s čim večjo občutljivostjo

Glavni organizmi, vpleteni v razgradnjo odpadnih snovi v vodi, so bakterije in strupene snovi vplivajo na njihovo vsebnost ATP (Dalzell in Christofi, 2002). Glede na zgornje



postavke, je merjenje ATP lahko primerno kot presejalni test. Težava je edino v tem, ker ni standardiziranega postopka, s katerim bi dobili jasne rezultate, čeprav je merjenje biomase preko merjenja ATP znano že tri desetletja.

Odziv organizma (organizmov) na strupeno snov je odvisen od koncentracije snovi, ki ji je izpostavljen. To ni nujno tista koncentracija snovi, ki smo jo dodali v sistem. Resnična koncentracija, ki so ji izpostavljeni mikroorganizmi, se lahko zmanjša zaradi zaradi adsorbcije (na steno testne posode, delce, testne organizme), prehoda v testne organizme, hlapenja, in/ali biološke razgradnje (Mayer in sod., 1999).

### 2.3.3 Respirometrične metode

V primerjavi z bioluminiscenco je respirometrija bolj direktna metoda za ocenjevanje aktivnosti aktivnega blata in zato tudi za ugotavljanje strupenosti odpadnih voda za heterotrofne in nitrificirajoče bakterije (Riedel in sod., 2002). Več metod je že uveljavljenih in že dalj časa obstajajo standardizirani testni postopki (SIST ISO 8192, 1986; Enviromental Protection Agency (EPA), 1996). Uporaba teh testov je dobro dokumentirana v literaturi (npr. Paixão in Anselmo, 2002). Osnova testa je, da se dihanje (respiracija) aktivnega blata v prisotnosti strupene snovi zmanjša. Najbolj pogost način za merjenje respiracije je merjenje hitrosti porabe kisika, vendar so v uporabi tudi druge metode in naprave, s katerimi izmerimo raven dihanja.

Liao in sod. (2001) poročajo o biosenzorju za zaznavanje strupenosti odpadne vode, ki temelji na zaviranju dihanja na kisik občutljivih bakterij, izoliranih iz aktivnega blata. Ko se dihanje bakterij zmanjša zaradi strupenosti vzorca, več kisika prehaja skozi membrano v biosenzor, kar vodi v spremembo hitrosti oksidacijsko-redukcijskih procesov na membrani. Odzivni čas takega biosenzorja je bil okoli 8 minut. V nadaljevanju poskusov so ugotovili, da se signali, pridobljeni z biosenzorjem dobro ujemajo z rezultati merjenja zaviranja hitrosti porabe kisika. Tzoris in sod. (2002) so opisali biosenzor Baroxymeter. Podobno kot pri prej opisanem postopku, se zaviranje dihanja bakterije *Pseudomonas putida* meri posredno in ne direktno z merjenjem količine raztopljenega kisika. Namesto tega se spremembe v dihanju bakterij odražajo na spremembah v pritisku v Baroxymetru.

Poročajo o odzivnem času okoli pet minut. Avtorji navajajo tudi, da bi bile uporabne tudi nitrificirajoče bakterije in bi tako dobili serijo testov (Tzoris in sod., 2002).

Farre in sod. (2001) so opisali uporabo biosenzorja CellSense za organske strupene snovi v odpadni vodi. Biosenzor CellSense je bil originalno razvit za odkrivanje fenolov v odpadni vodi. V njihovi študiji so uporabili imobilizirane bakterije vrste *Escherichia coli*, čeprav so na voljo tudi drugi organizmi, lahko pa tudi aktivno blato. V biosenzorju elektronski posrednik (fericjanid) usmeri elektrone iz dihalne verige *E. coli* na prevodnik (posrednik signala). Električni signal spremljan 30 minut in je indikator za bakterijsko dihalno aktivnost. Ta biosenzor so preizkusili tako na strupenih snoveh, kot tudi na različnih odpadnih vodah in zaključili, da je biosenzor uporaben tudi za spremljanje drugih strupenih snovi poleg fenolov. Opazili so veliko občutljivost biosenzorja na pentaklorofenol, na ostale klorofenole pa manjšo. To lahko verjetno razložimo s tem, da med klorofenoli edino pentaklorofenol deluje kot razklopljevalec dihalne verige, zato se pri merjenju dihanja pojavijo napake (Aptula in sod., 2002).

Respirometrične metode so prilagodili tudi za mikrotitrne plošče (Freitas dos Santos in sod., 2002). V tem testu so posredno merili dihanje tako, da so zmešali barvilo (tetrazolium vijolično) z bakterijami aktivnega blata v luknjicah mikrotitrskih plošč. Barvilo se je med bakterijskim dihanjem kemijsko reduciralo, kar se je odražalo v močni vijolični barvi. Okrepitev barve je pokazatelj bakterijskega dihanja, vendar je pri testu potreben inkubacijski čas 24 ur. Tako dolg čas omeji uporabnost metode za ugotavljanje strupenosti vtokov na čistilne naprave, kjer je potreben čim hitrejši odziv.

Archibald in sod. (2001) so razvili set štirih testov za spremljanje kvalitete in delovanja aktivnega blata v čistilnih napravah. Trije testi so bili osnovani na specifični hitrosti porabe kisika (SHPK) aktivnega blata. Prvi test v setu je predstavljal normalno hitrost odstranjevanja organske snovi, drugi skoraj maksimalno hitrost odstranjevanja organske snovi v aeracijskem bazenu, tretji pa je v primerjavi s skoraj maksimalno hitrostjo zaznal prisotnost strupenih snovi v odpadni vodi. Četrty test je temeljil na specifični vsebnosti ATP-ja v aktivnem blatu, kar je kazalo na količino aktivne biomase v aktivnem blatu. S temi štirimi testi opazimo spremembe v delovanju aktivnega blata v manj kot eni uri.

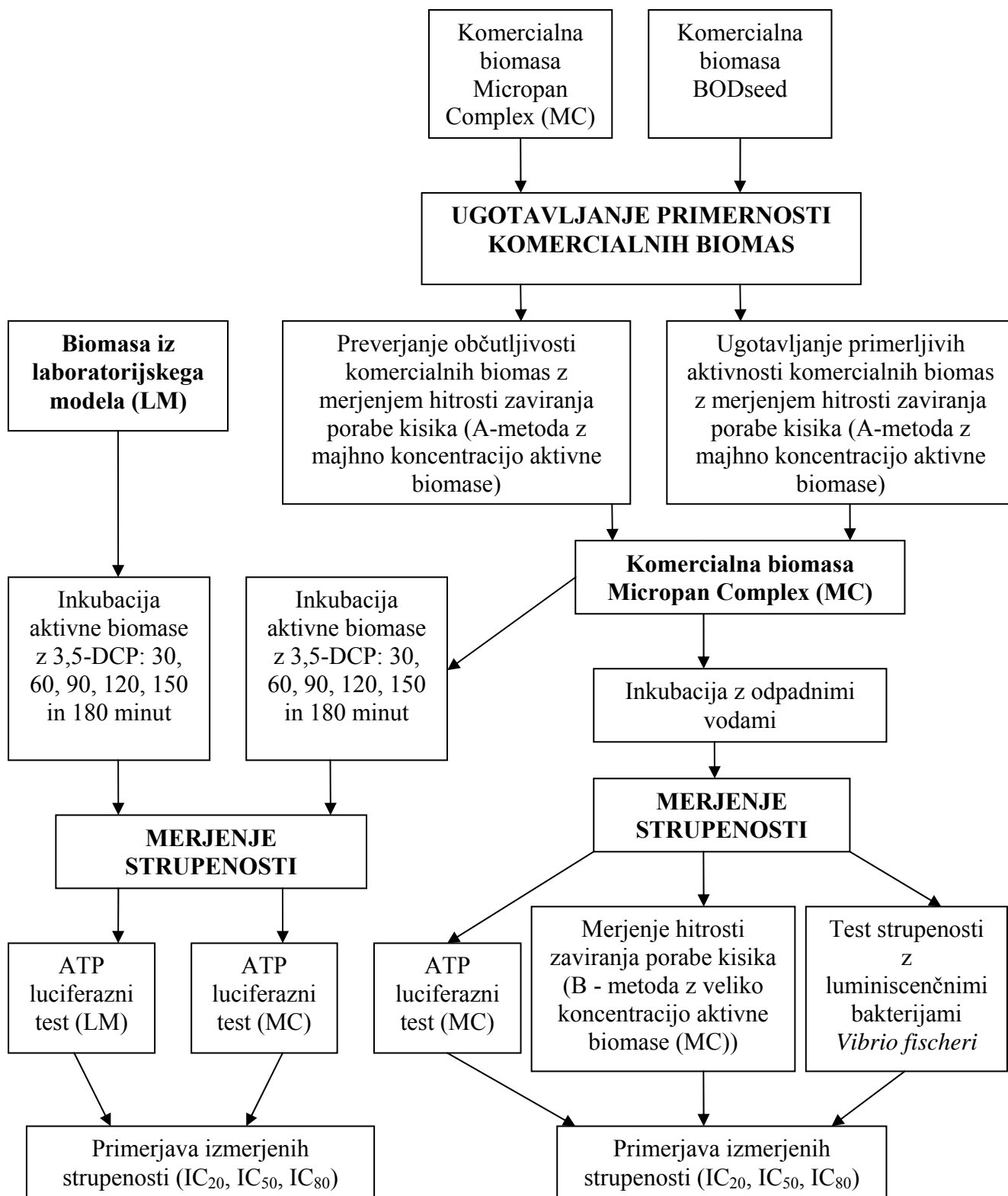
V testih zaviranja hitrosti porabe kisika aktivnega blata, ki jih so jih uporabili Perneti in sod. (2003), so poleg specifične hitrosti porabe kisika (SHPK) spremljali tudi odstranjevanje organskega ogljika. Merili so skupni organski ogljik (SOO) z SOO analizatorjem. Opazili so, da zaviranje ne narašča več po 1 uri pri SHPK in po treh urah pri SOO po dodatku bakrovega sulfata kot strupene snovi. S primerjanjem rezultatov obeh testov so ugotovili, da respirometrija precej natančno napove zmanjšanje odstranjevanja ogljika, razen pri majhnih koncentracijah strupene snovi. Z merjenjem SHPK dobimo rezultate vsaj eno uro prej kot z merjenjem skupnega organskega ogljika v odpadni vodi.

Gernaey in sod. (2001) so združili respirometer za aktivno blato s titrimetrično tehniko za spremljanje aktivnega blata. Titracijska enota je ohranjala pH v aeracijskem delu nad respirometrom z dodajanjem kisline ali baze. Celokupni dodatek kisline in baze so zabeležili in iz tega izračunali hitrost nastanka in porabe protonov zaradi bioloških aktivnosti aktivnega blata. Z dodatkom titracijske enote k respirometriji so dobili dodatne informacije o viru ogljika v procesu razgradnje in tako izboljšali razumevanje kinetike procesa biološke razgradnje.

#### 2.3.3.1 Zaviranje hitrosti porabe kisika

Merjenje zaviranja hitrosti porabe kisika (SIST ISO 8192, 1986) je v splošni uporabi kot standardna metoda za ocenjevanje potencialne strupenosti čistih ali mešanih snovi ter odpadnih voda za aktivno blato. Metoda temelji na merjenju zaviranja porabe kisika mikroorganizmov aktivnega blata, ki ga povzroči testni material. Zaviranje lahko vključuje vpliv na dihanje in na nitrifikacijo. Metoda je uporabna za vse snovi, ki so topne v vodi pri laboratorijskih pogojih (temperatura 20 °C). Obstajata dve metodi, po katerih lahko izvajamo test in sta uporabni pri različnih zahtevah. Metodo A (poglavje 3.4.4) uporabljamo za simulacijo pogojev v površinskih vodah, medtem ko je metoda B (poglavje 3.4.5) uporabna pri simulaciji pogojev laboratorijskega biološkega čistilnega sistema. Rezultati, ki jih dobimo po metodah A in B, se lahko razlikujejo, zato morajo poročila obvezno vsebovati še podatek, o uporabljeni metodi (SIST ISO 8192, 1986).

### 3 MATERIALI IN METODE



Slika 4: Shema poskusov

### 3.1 STRUPENE SNOVI IN MEŠANICE

Optimalni čas izpostavitve aktivnega blata delovanju vzorca smo ugotavljali s 3,5-diklorofenolom (3,5-DCP), ki je referenčna spojina za test zaviranja hitrosti porabe kisika v aktivnem blatu (SIST ISO 8192, 1986) in tudi ena izmed pogosteje uporabljenih snovi za test strupenosti z luminiscenčnimi bakterijami *Vibrio fischeri*. S to snovjo smo opravili tudi oba druga testa.

Standardno raztopino 3,5-DCP smo pripravili tako, da smo zatehtali določeno maso trdnega 3,5-DCP (p.a., Aldrich,  $M = 163,0 \text{ g/mol}$ ) in ga raztopili v destilirani vodi. Z destilirano vodo smo nato dolili do oznake na bučki. Pripravili smo raztopino s koncentracijo 1 g/l 3,5-diklorofenola.

Odpadne vode smo obravnavali kot strupeno, založno raztopino mešanice kemikalij. Z vsemi tremi metodami smo primerjalno testirali vzorce štirih odpadnih vod. Odpadna voda A je izvirala iz iztoka farmacevtske industrije v kanalizacijo, odpadna voda B iz iztoka kovinske industrije v kanalizacijo, odpadna voda C prav tako iz farmacevtske industrije in odpadna voda D je bila izcedna voda iz deponije usnjarskih odpadkov.

#### 3.1.1 Kemijske analize odpadnih vod

Kemijske analize odpadnih vod A in B so opravili na Centralni čistilni napravi Domžale-Kamnik, odpane vode D pa v Laboratoriju za kemijo, biologijo in tehnologijo voda na Kemijskem Inštitutu. Metode, po katerih so opravili analize so navedene v preglednici 1.

**Preglednica 1:** Kemijske analize odpadne vode in metode, po katerih so bile opravljene.

<b>Parameter</b>	<b>Analizna metoda</b>
pH	SIST ISO 10523 (1994)
Temperatura (pri pH)	DIN 38 404-C4 (1976)
Usedljive snovi po 1 uri	DIN 38 409-H9 (1980)
Kjeldahlov dušik	SIST EN 5663 (1996)
Amonijev dušik	SIST ISO 5664 (1984)
Celotni fosfor	SIST ISO 6878 (1999)
Kemijska potreba po kisiku (KPK)	SIST ISO 6060 (1989)
Biokemijska potreba po kisiku (BPK <sub>5</sub> )	SIST ISO 5815-2 (2003)
Skupni organski ogljik	SIST ISO 8245 (1983)
Baker	SIST ISO 8288 (1986)
Cink	SIST ISO 8288 (1986)
Kadmij	SIST ISO 5961 (1994)
Svinec	SIST ISO 8288 (1986)
Železo	DIN 384069-32 (2000)
Klorid	Clesceri in sod. (2005)

### 3.2 BIOREAKTOR – LABORATORIJSKI MODEL BIOLOŠKE AEROBNE ČISTILNE NAPRAVE

Aktivno blato, ki nam je služilo kot vir mikroorganizmov za preskuse smo vzdrževali v laboratorijskem modelu aerobne biološke čistilne naprave.

Laboratorijski sistem za biološko obdelavo komunalnih odpadnih voda (LWWTP-Laboratory WasteWater Treatment Plant) z 8,3 litri delovne prostornine smo stalno prezračevali, zadrževalni čas suspendiranih snovi (Sludge Retention Time – SRT) je bil 9-11 dni in hidravlični zadrževalni čas (Hydraulic Retention Time - HRT) 6-7 ur. Sistem smo oskrbovali s sintetično komunalno odpadno vodo, ki je vsebovala 130 mg/l peptona, 0,9 mg/l fosforja dodanega v obliki  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 70 volumskih % destilirane vode in 30 volumskih % komunalne odpadne vode.

### 3.3 MERJENJE KONCENTRACIJE MIKROBNEGA ATP V VZORCIH AKTIVNE BIOMASE

#### 3.3.1 Material

##### 3.3.1.1 Cepivo

Aktivno blato smo odvzeli iz laboratorijskega sistema biološke čistilne naprave, ga trikrat sprali z prezračeno neklorirano vodo (iz potoka Iška) in odpipetirali v epruvete po Ependorfu. Med tem se je aktivno blato ves čas mešalo na magnetnem mešalu, da smo dobili enake dele aktivnega blata v vse epruvete in tako omogočili enakomerno difuzijo zraka iz okolja.

Komercialno cepivo Micropan Complex smo zatehtali v čašo in dodali prezračeno neklorirano vodo (iz potoka Iška) do 90 % končnega volumna (npr. 450 ml). Mešanico smo prezračevali in mešali 30 minut. Po tem času smo dodali še 10 % (npr. 50 ml) končnega volumna organskega dela hranilne raztopine (enaka kot pri testu zaviranja hitrosti porabe kisika) in prezračevali ter mešali čez noč.

### 3.3.1.2 Kemikalije

#### 3.3.1.2.1 Kit za merjenje ATP (p.a., Sigma)

Kit lahko uporabimo za kvantitativno bioluminiscenčno merjenje adenzin 5' – trifosfata (ATP) v vzorcih, v katerih je od  $2 \times 10^{-12}$  do  $8 \times 10^{-5}$  mol ATP/l (v naših vzorcih je bilo okoli  $10^{-6}$  mol ATP /l).

Adenosine 5' – triphosphate (ATP) bioluminescent assay kit (FL-AA) je sestavljen iz treh delov:

- FL-AAM (ATP Assay Mix): vsebuje encim luciferazo, luciferin,  $MgSO_4$ , DTT, EDTA, goveji serumski albumin in tricinske puferske soli. Za pripravo vodne raztopine smo liofilizirano snov raztopili v 5 ml sterilne destilirane vode.
- FL-AAB (ATP Assay mix dilution Buffer): vsebuje  $MgSO_4$ , DTT, EDTA, goveji serumski albumin in tricinske puferske soli. Za pripravo vodne raztopine smo raztopili liofilizirano snov v 50 ml sterilne destilirane vode.
- FL-AAS (ATP Assay Standard disodium salt trihydrate): vsebuje približno 1 mg ( $2,0 \times 10^{-6}$  mol) ATP. Za pripravo vodne raztopine smo raztopili liofiliziran prašek v 2 ml sterilne destilirane vode.

Vsi trije reagenti so v kitu v obliki liofiliziranega praška, zato smo po navodilih proizvajalca komercialno pripravljene reagente raztopili v ustrezni količini sterilne destilirane vode. Tako pripravljene raztopine reagentov smo odpipetirali v 1,5 ml epruvete po Ependorfu in jih zamrznili pri  $-20$  °C do uporabe.

#### 3.3.1.2.2 Tris-EDTA pufer

Tris pufer smo uporabljali kot ekstrakcijsko sredstvo za sproščanje ATP iz mikrobnih celic v aktivnem blatu. Pripravili smo mešanico 100mM Tris ( $C_4H_{11}NO_3$ )-HCl in 2mM EDTA ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ ), vrednost pH je bila 7,8. Pripravili smo 1l Tris-EDTA pufera in



sicer tako, da smo zatehtali 12,1135g Tris (SIGMA, T-6066) pufru in 0,7445g EDTA pufru ter vse skupaj raztopili v destilirani vodi do enega litra. Nato smo s klorovodikovo kislino (HCl) uravnali vrednost pH na 7,75, ki je optimalen za delovanje encima luciferaze.

### **3.3.2 Aparature**

#### **3.3.2.1 Luminometer**

Luminiscenco pripravljenih vzorcev za merjenje ATP smo merili z luminometrom *JUNIOR* LB 9509 (Berthold technologies). Detektor luminometra je fotopomnoževalka z optično občutljivostjo v območju od 380 do 630 nm. Luminometer je zajemal dolgovalovno luminiscenčno svetlobo deset sekund, nato pa so se rezultati izpisali na ekranu luminometra v RLU enotah (Relative Luminescent Units), ki smo jih zabeležili.

#### **3.3.3 Priprava vzorcev**

Testne mešanice smo pripravili v 1,5 ml epruvete po Ependorfu (Sigma, 1991). V vsako smo dodali aktivno blato (iz laboratorijskega modela ali pa prejšnji dan pripravljeno komercialno aktivno blato), vzorec (strupeno snov ali odpadno vodo) in sterilizirano destilirano vodo, da so imele vse testne mešanice enak volumen. Za strupene snovi smo v epruvete po Ependorfu dodajali po 900  $\mu$ l aktivnega blata, željeno količino vzorca (0-100  $\mu$ l) in destilirano vodo, da je bil končni volumen v vsaki epruvetki 1 ml. Ko smo testirali odpadne vode, smo dodajali po 500  $\mu$ l aktivnega blata, v ostalih 500  $\mu$ l smo zmešali željeno koncentracijo vzorca. Ta postopek smo uporabili, ker so bile odpadne vode že pripravljene kot založne raztopine in se jih ni dalo več koncentrirati, v testu pa so bile potrebne večje koncentracije zaradi njihove manjše strupenosti.

Ničelna kontrola je bila tista, ki ni vsebovala testnega vzorca in smo poleg aktivnega blata dodali samo sterilizirano destilirano vodo do 1 ml. Ta nam je služila za primerjavo učinkov strupenega vzorca na aktivno blato.

Preiskovano snov smo dodajali v aktivno blato v točno določenih presledkih (tako kot smo jih kasneje ekstrahirali), da smo dosegli enako časovno izpostavljenost aktivnega blata strupeni snovi (odpadni vodi) za vse testne mešanice. Vsako koncentracijo testirane snovi in kontrolo smo pripravili v treh ponovitvah. Tako pripravljene testne mešanice smo inkubirali od 30 do 180 minut na sobni temperaturi, da je vzorec učinkoval na mikrobnou združbo aktivnega blata in vmes smo večkrat premešali.

### **3.3.4 Ekstrakcija ATP iz vzorcev**

ATP smo iz testnih mešanic ekstrahirali po metodi z vrelim pufrom (Zrimec, 2001; Sestava za pufer Tris: Thore in sod. 1975). V 1,5 ml epruvete po Ependorfu smo pripravili po 900  $\mu$ l 0,1 M Tris-HCl z 2 mM EDTA in ga segrevali tri minute v vodni kopeli pri 100 °C. V vreli pufer smo vbrizgali 100  $\mu$ l dobro premešanega vzorca in vse skupaj segrevali tri minute v vodni kopeli pri 100 °C. Ekstrakcija je potekala časovno usklajeno z dodajanjem vzorca, tako da je bilo aktivno blato v vsaki posamezni epruvetki izpostavljeno testirani snovi enak čas. Tako pripravljene vzorce smo ohladili v ledeni kopeli. Po končani ekstrakciji ATP iz vseh pripravljenih testnih mešanic smo izmerili še koncentracijo ATP.

### **3.3.5 Priprava reagentov in merjenje ATP**

V ledeno kopel smo namestili še standard (reagent FL-AAS, že prej pripravljen po navodilih proizvajalca), reagent FL-AAB (pufer, s katerim redčimo FL-AAM) in reagent FL-AAM (encim luciferaza). Reagent FL-AAM smo redčili z reagentom FL-AAB, tako da dobimo okoli 30-kratne redčitve FL-AAM. Tako redčen FL-AAM že zadosti dobro zaznati tiste koncentracije ATP, ki so v testnih mešanicah. Redčili smo tudi standard, tako da smo dobili znane koncentracije ATP za umeritveno krivuljo (pripravili smo redčitve  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  in  $10^{-8}$ ).

V kiveto luminometra smo prenesli 50 µl redčenega FL-AAM. Med potekom diplomskega dela smo ugotovili, da tudi z 50 µl dobimo enake rezultate kot z 100 µl, zato smo zaradi ekonomičnosti testa nadomestili večjo količino reagenta FL-AAM z manjšo. Kiveto smo postavili na sobno temperaturo in počakali 3 minute, da se je porabil morebitni endogeni ATP in se je reagent ogrel na optimalno temperaturo za delovanje luciferaze. Nato smo izmerili luminiscenco samega reagenta FL-AAM, da smo ugotovili, koliko na luminiscenco vplivata kiveta in reagent FL-AAM. Izmerjeno luminiscenco smo upoštevali kot šum. Šum smo izmerili za vsako meritvev posebej in ga na koncu odšteli od dobljene RLU vrednosti posamezne meritve. Pri sobni temperaturi smo ogreli tudi testni vzorec (ali standard) in po treh minutah v kiveto z reagentom FL-AAM hitro vbrizgali 50 µl ali 100 µl (enak volumen kot smo dali v kiveto reagenta FL-AAM) vzorca (ali standarda). Kiveto smo rahlo premešali in jo hitro postavili v luminometer. Pri tem smo pazili, da v mešanici ni bilo mehurčkov, ki bi lahko motili meritve. Luminometer je izmeril intenziteto oddane svetlobe (bioluminiscence) in rezultat podal v relativnih luminiscenčnih enotah (RLU = Relative Luminescent Units), ki so odvisne od koncentracije ATP v vzorcu. Ker izsevana svetloba doseže vrhunec v nekaj sekundah (upad za približno 50 % v 1 minuti), mora od vbrizganja vzorca do merjenja luminiscence preteči čim manj časa. Iz zabeleženih meritev RLU vzorcev in šumov smo izračunali zaviralne koncentracije strupene snovi.

### 3.3.6 Izračun koncentracije ATP v vzorcih in ugotavljanje zaviralnih koncentracij

Luminometer prikaže rezultate meritev v RLU. V programu Microsoft Excel smo ob vsakem merjenju iz podatkov o redčitvah standardov narisali umeritveno krivuljo iz petih točk in izračunali njeno enačbo. V diagramu smo na os Y nanegli logaritmirane vrednosti RLU, na os X pa logaritmirane vrednosti molarnih koncentracij (mol/l) ATP standardov.

Enačba regresijske premice:

$$y = a \cdot x + b \quad \dots(1)$$

kjer je:

$$y = \text{logaritem RLU (logRLU)}$$

$x$  = logaritem molarne koncentracije ATP ( $\log [ATP]$ )

$a$ ,  $b$  = faktorja, ki ju na osnovi umeritvenih podatkov izračunamo s programom Microsoft Excel

Iz izmerjenih vrednosti  $RLU$  v vzorcih in enačbe umeritvene premice smo izračunali koncentracije ATP v vzorcih. Umeritvene premice smo vedno pripravili tako, da so bile koncentracije merjenih vzorcev v območju točk umeritvene krivulje.

Koncentracijo ATP v vzorcih smo izračunali z naslednjo enačbo:

$$10^{\frac{\log RLU - b}{a}} \times 10 = [ATP] \text{ (mol/l)} \quad \dots(2)$$

Log  $RLU$  je logaritmirana vrednost  $RLU$  vzorca,  $a$  in  $b$  sta faktorja iz umeritvene krivulje, enačbo množimo z  $10$  zaradi redčenja vzorca z vrelim pufrom (1:9) med postopkom ekstrakcije ATP in  $[ATP]$  pomeni molarno koncentracijo ATP.

Izračunali smo povprečje za vsako koncentracijo testirane snovi iz vseh treh ponovitev. Te vrednosti smo primerjali z izračunano vrednostjo koncentracije ATP kontrolne mešanice. Ker iz razmerja *koncentracija ATP vzorca : koncentracija ATP kontrolne mešanice* dobimo aktivnost, smo morali rezultat odšteti od 1 in množiti s 100, da smo dobili zaviranje mikrobne rasti izraženo v odstotkih.

$$I = \left(1 - \frac{[ATP]_{\text{vzorca}}}{[ATP]_{\text{kontrolne}}}\right) \times 100 \quad \dots(3)$$

kjer je:

$I$  = zaviranje aktivnosti mikroorganizmov v aktivnem blatu (%)

$[ATP]_{\text{vzorca}}$  = molarna koncentracija ATP v testni mešanici (mol/l)

$[ATP]_{\text{kontrolne}}$  = molarna koncentracija ATP v kontrolni mešanici (mol/l)

Tako smo izračunali zaviranje za vsako koncentracijo testnega vzorca. Iz dobljenih podatkov za zaviranje in koncentracije strupene snovi v vzorcu smo nato narisali diagram. Na diagramu smo na os Y nanegli odstotek zaviranja, na os X pa logaritemske vrednosti koncentracije strupene snovi v vzorcu. Odčitali ali izračunali smo koncentracije strupene snovi, ki so povzročile 20 %, 50 % in 80 % zaviranje mikrobov v aktivnem blatu ( $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$  in  $IC_{80}$ ).

### 3.4 TEST ZAVIRANJA HITROSTI PORABE KISIKA

#### 3.4.1 Material

##### 3.4.1.1 Hranilne raztopine

Hranilno raztopino smo pripravljali tako, da smo najprej v dveh steklenicah ločeno pripravili mineralni raztopini. V eno smo pripravili raztopino dikalijevega hidrogen fosfata ( $K_2HPO_4$ , p.a., Merck) raztopljenega v destilirani vodi, v drugi pa smo pripravili raztopino ostalih anorganskih mineralov: kalcijev klorid dihidrat ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , p.a., Merck), magnezijev sulfat heptahidrat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , p.a., Carlo Erba Reagenti), natrijev klorid ( $NaCl$ , p.a., Merck), ki smo jih prav tako raztopili v destilirani vodi. Raztopine soli in organski del smo pripravili v ločenih steklenicah, ker je tako anorganski del hranilne raztopine stabilen in ga ni potrebno pripravljati za vsak preskus sproti.

Vsak teden smo pred izvedbo testa na novo pripravili organski del hranilne raztopine (mesno juho - obstojnost je največ en teden v temi pri temperaturi od 0 do 4 °C). Organski del hranilne raztopine smo pripravili iz mesnega ekstrakta, (p.a., Fluka BioChemica), peptona (p.a., Merck) in sečnine (p.a., Kemika). Vrednost pH sintetičnega gojišča je bila med  $7,5 \pm 0,5$  (SIST ISO 8192, 1986).

### 3.4.1.2 Cepivo

#### 3.4.1.2.1 Aktivno blato iz laboratorijskega modela

Strupenost smo ugotavljali z mešano mikrobno združbo aktivnega blata. Vzorec aktivnega blata smo odvzeli iz laboratorijskega modela aerobne biološke čistilne naprave, v katerega so dotekale komunalne odpadne vode (poglavje 3.2). Vzorec odvzetega aktivnega blata smo pred uporabo v testu trikrat sprali s prezračeno neklorirano vodo (iz potoka Iška). Nato smo izmerili koncentracijo aktivnega blata v 25 ml odvzetega vzorca s filtriranjem in tehtanjem. Iz tega podatka smo izračunali volumen blata, ki smo ga morali dodati, da smo dobili koncentracijo 1500 mg suhe snovi/l (test z večjo koncentracijo aktivnega blata) oziroma med 100 in 200 mg suhe snovi/l (pri testu z manjšo koncentracijo aktivnega blata).

#### 3.4.1.2.2 Komercialno cepivo BODseed

Cepivo BODseed (številka izdelka: 2471200) proizvajalca Hach (Loveland, Colorado, ZDA) so kapsule z liofiliziranimi mikroorganizmi za pripravo testov biološke potrebe po kisiku (BPK). Ena kapsula vsebuje 0,4 g liofiliziranih mikroorganizmov.

Komercialno cepivo BODseed smo pa navodilih proizvajalca stresli v 1 l prezračene vode iz potoka (neklorirana prezračena voda) in prezračevali 1 uro. Nato smo dodali 50 ml organskega dela hranilne raztopine (enaka kot pri testu merjenja hitrosti porabe kisika) in prezračevali in mešali čez noč. Tako pripravljeno cepivo smo uporabili za teste.

#### 3.4.1.2.3 Komercialno cepivo Micropan Complex

Komercialno cepivo Micropan Complex je bakterijsko encimski kompleks za obdelavo odpadnih voda. Izgleda kot orehovo obarvan prah različne granulatne velikosti. Vsebuje bakterije rodov *Micrococcus* in *Bacillus*, migetalkarje rodov *Aspidisca*, *Vorticella*, *Carchesium*, *Euplotes*, encime, minerale in soli (Micropan Complex, tehniški opis; 2003).

Proizvaja ga Eurovix (Cazzago San Martino, Italija), zastopnik za Slovenijo je Geneza d.o.o. Pripravili smo ga po enakem postopku kot BODseed.

Liofiliziran prah smo zatehtali in dodali prezračeno vodo (do 90 % končnega volumna) tako, da smo dobili želeno koncentracijo aktivnega blata. To smo prezračevali in mešali približno 30 minut, nato smo dodali 10 % od končnega volumna organskega dela hranilne raztopine (poglavje 3.4.1.1) in prezračevali in mešali čez noč.

### 3.4.2 Aparature

#### 3.4.2.1 Winklerjeve stekleničke

Winklerjeve stekleničke so posebne stekleničke, ki jih uporabljajo za ugotavljanje koncentracije raztopljenega kisika. Oblika vratu je prilagojena širini kisikove elektrode tako, da jo ta popolnoma zapre in kisik iz okolice ne more prehajati vanjo. Steklenička ima izmerjen volumen do 0,01 ml natančno, ki je vgraviran nanjo.

#### 3.4.2.2 Kisikova elektroda

S kisikovo elektrodo OxiCal<sup>®</sup>-S (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmgH, Nemčija) smo merili koncentracijo raztopljenega kisika v preskusnih mešanicah.

Kisikova elektroda meri parcialni tlak raztopljenega kisika v vodi. Ko potopimo kisikovo elektrodo v vodo, raztopljeni kisik v vodi potuje skozi polprepustno hidrofobno membrano v kamrico z zlato (Au) katodo in srebrno (Ag) anodo, med katerima je konstantna napetostna razlika 800mV. Kamrica je zapolnjena z elektrolitom KCl, da lahko elektroni prehajajo med katodo in anodo. Na zlati katodi se kisikovi atomi reducirajo v hidroksilne ione (OH<sup>-</sup>), ki se s kalijem iz elektrolita vežejo v KOH. Na srebrni anodi poteče oksidacija:  $Ag \rightarrow Ag^+$ , pri čemer se  $Ag^+$  veže s  $Cl^-$ , da nastane  $AgCl_2$ .

### 3.4.2.3 Sistem za prezračevanje

Zrak, s katerim smo prezračevali testne mešanice, je potoval iz jeklenke preko vodne zapore v testne mešanice. Vodna zapora je odstranila oljne delce in prah in ustrezno navlažila zrak. Zrak je v čaše dotekal prek difuzorjev, ki so enakomerno prezračevali testne mešanice.

### 3.4.3 Priprava testnih mešanic

Test z zaviranjem porabe kisika SIST ISO 8192 (1986) lahko izvajamo na dva načina. Po metodi A z majhno koncentracijo aktivnega blata in po metodi B z veliko koncentracijo aktivnega blata. Razlika v obeh metodah je edino v tem, da z majhno koncentracijo aktivnega blata simuliramo pogoje v površinskih vodah, z veliko pa pogoje v čistilni napravi.

Aktivno blato v prisotnosti hitro razgradljivega substrata porablja kisik, koncentracijo raztopljenega kisika merimo s kisikovo elektrodo. Hitrost porabe je odvisna od več parametrov, med njimi je tudi koncentracija mikroorganizmov. Če so v dodanem vzorcu strupene snovi, se koncentracija mikroorganizmov in njihova aktivnost zmanjša in tako se posledično zmanjša tudi hitrost porabe kisika. Iz tega nato sklepamo na strupenost vzorca v primerjavi s kontrolo, ki ne vsebuje preiskovane snovi.

Metodo z majhno koncentracijo aktivnega blata smo uporabljali za primerjavo občutljivosti blata iz laboratorijskega modela z različnima komercialnima cepivoma in za ugotavljanje po aktivnosti primerljivih koncentracij aktivnega blata iz laboratorijskega modela in komercialno dostopnih cepiv. Metodo z veliko koncentracijo aktivnega blata smo uporabljali za ugotavljanje strupenosti različnih odpadnih vod.

Strupenost industrijskih odpadnih vod smo preverjali v treh stopnjah. S prvim, preliminarnim testom, smo ugotovili približno območje koncentracij, v katerem odpadna voda zavira delovanje mikroorganizmov. Test smo izvedli s ničelno kontrolo, tremi koncentracijami odpadne vode in fizikalno-kemijsko kontrolo. V drugem preliminarnem



testu smo širino intervala koncentracij skrčili glede na rezultate prvega preliminarnega testa: v test smo vključili ničelno kontrolo in 4 različne koncentracije odpadne vode. Na koncu smo opravili še definitivni test, prav tako z ničelno kontrolo in 4 različnimi koncentracijami odpadne vode. Vsak test smo naredili v dveh ponovitvah (paralelkah).

#### 3.4.3.1 Testna mešanica s strupeno snovjo (odpadno vodo)

V 500 ml bučko smo dodali 16 ml raztopine  $K_2HPO_4$ , 16 ml raztopine soli in 16 ml raztopine mesne juhe (organski del raztopine), vse pripravljeno po standardu SIST ISO 8192, 1986 (priprava je opisana v poglavju 3.4.1.1). Dodali smo ustrezno množino vzorca, da smo dosegli željeno koncentracijo. Tik pred začetkom testa (da ni prišlo do predčasne porabe hranil) smo dodali še takšen delež aktivnega blata, da je bila koncentracija v bučki 150 mg/l in dopolnili z destilirano vodo do oznake.

#### 3.4.3.2 Ničelna kontrola

V 500 ml bučko smo dodali 16 ml raztopine  $K_2HPO_4$ , 16 ml raztopine soli in 16 ml raztopine mesne juhe, vse pripravljeno po standardu SIST ISO 8192 (1986). Temu smo dodali samo še delež aktivnega blata in dodali destilirano vodo do oznake (brez vzorca – brez potencialno strupene snovi).

#### 3.4.3.3 Fizikalno-kemijska kontrola

V 500 ml bučko smo dodali 16 ml raztopine  $K_2HPO_4$ , 16 ml raztopine soli in 16 ml raztopine mesne juhe, vse pripravljeno po standardu SIST ISO 8192 (1986) in najvišjo, v testu uporabljeno koncentracijo odpadne vode (strupene snovi). Dodali smo tudi 1 ml  $HgCl_2$  s koncentracijo 10 g/l, da smo preprečili biološko porabo kisika. Nato smo z destilirano vodo dopolnili do oznake. Aktivnega blata nismo dodali, ker z fizikalno-kemijsko kontrolo ugotavljamo porabo kisika zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti vzorca.

#### **3.4.4 Metoda z majhno koncentracijo aktivne biomase**

Pri testu je bila koncentracija aktivne biomase okoli 150 mg MLSS/l (mixed liquor suspended solids) pri aktivni biomasi iz modela in okoli 50 mg MLSS/l pri aktivni biomasi iz komercialnih pripravkov. Te koncentracije so ustrezale taki aktivnosti, da se je koncentracija raztopljenega kisika v kontrolni mešanici v treh urah zmanjšala od okoli 9 na 1 mg/l (SIST ISO 8192, 1986).

Testne mešanice smo pripravili tako, da smo v bučko dodali raztopini soli in mineralov, mesno juho in testni vzorec (v ničelno kontrolo ne), nato pa smo tik pred prezračevanjem dodali še aktivno biomaso (v fizikalno-kemijsko kontrolo ne) in z destilirano vodo dopolnili do oznake. Vsebino smo prelili v čašo in prezračevali in mešali 15 minut (v tem času se je mešanica nasitila s kisikom). Z zamikom 5 minut smo enako naredili tudi z ostalimi bučkami, v katerih so bile pripravljene mešanice. Ko se je določena mešanica prezračevala 15 minut, smo vsebino čaše prelili v Winklerjevo stekleničko, jo neprodušno zaprli s kisikovo elektrodo in nadaljevali z mešanjem. Koncentracijo raztopljenega kisika smo odčitavali vsakih 15 minut tri ure ali dokler se ni koncentracija raztopljenega kisika zmanjšala pod 1 mg/l. Test smo izvajali pri temperaturi  $20 \pm 2$  °C.

#### **3.4.5 Metoda z veliko koncentracijo aktivne biomase**

Za poskus smo pripravili komercialno dostopno biomaso s koncentracijo 500 mg/l MLSS in je ustrezala koncentraciji 1500 mg/l MLSS aktivnega blata iz laboratorijskega modela, tako da se je koncentracija kisika zmanjšala od nasičenja do 1 mg/l v petih do desetih minutah.

Mešanice smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.4.3., razlika je bila v tem, da je bil volumen pripravljenih mešanic 1l, ker smo delali v dveh ponovitvah. Ob začetku testa smo dodali komercialno aktivno blato, dopolnili do oznake, prelili vsebino bučke v čašo in prezračevali in mešali. Z zamikom 10 minut smo enako ravnali tudi z ostalimi bučkami, v katerih so bile pripravljene mešanice. Ko se je posamezna mešanica prezračevala 30 minut smo vsebino čaše prelili v dve Winklerjevi steklenički in vsako neprodušno zamašili s kisikovo elektrodo. Vsebino stekleničke smo mešali in v 15

sekundnih razmikih odčitavali koncentracijo raztopljenega kisika. Koncentracijo kisika smo merili 10 minut ali dokler se ni koncentracija raztopljenega kisika v stekleničkah zmanjšala pod 1 mg/l. Če bi želeli več podatkov, bi morali postopek ponoviti tudi po 180-ih minutah (SIST ISO 8192, 1986).

#### **3.4.6 Ugotavljanje ustreznih koncentracij komercialnih cepiv**

Za ugotavljanje ustreznih koncentracij komercialno dostopnih cepiv, ki so primerljive z aktivnostjo aktivnega blata iz laboratorijskega modela, smo pripravili kontrolne mešanice, kot je opisano v poglavju 3.4.3. Na prvem mestu je bila ničelna kontrola z aktivno biomaso iz laboratorijskega modela s koncentracijo 150 mg/l, v ostale bučke pa smo pripravili kontrolne mešanice z različnimi koncentracijami komercialno pripravljene biomase. Ta postopek smo uporabili za aktivno biomaso BODseed in Micropan Complex.

Ko smo ugotovili ustrezne koncentracije komercialno dostopnih cepiv, smo preverili njihovo občutljivost. Občutljivost smo preverili po metodi z majhno koncentracijo cepiva (poglavje 3.4.4), pri kateri smo za cepivo uporabili eno od obeh komercialno dostopnih biomas. Občutljivost smo ugotovili z referenčno snovjo 3,5-diklorofenolom. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali zaviralne koncentracije in ugotovili občutljivost cepiva. Nato smo postopek ponovili še za drugo komercialno dostopno biomaso.

#### **3.4.7 Ugotavljanje zaviralnih koncentracij strupenih snovi**

Po opravljenih meritvah smo po postopku, opisanem v navodilih za standardni test SIST ISO 8192 (1986), ugotavljali zaviralne koncentracije (IC) odpadnih vod in strupenih snovi. Ugotavljali smo IC vzorcev, ki povzročijo 20 % (IC<sub>20</sub>), 50 % (IC<sub>50</sub>) in 80 % (IC<sub>80</sub>) zaviranje hitrosti porabe kisika v testni mešanici.

Za vsako stekleničko smo narisali krivuljo odvisnosti koncentracije raztopljenega kisika (mg/l) od časa (minute). Iz linearnega dela krivulje smo nato izračunali hitrost porabe kisika:

$$R = \frac{q_1 - q_2}{\Delta t} \times 60 \quad \dots (4)$$

kjer pomeni:

R = hitrost porabe kisika (mg/l min)

q<sub>1</sub> = prva meritev raztopljenega kisika na linearnem delu krivulje (mg/l)

q<sub>2</sub> = zadnja meritev raztopljenega kisika na linearnem delu krivulje (mg/l)

Δ t = časovna razlika med dvema meritvama (min)

Pri metodi z veliko koncentracijo aktivne biomase smo iz dveh ponovitev izračunali povprečje hitrosti porabe kisika za vsako testno mešanico.

Odstotek zaviranja hitrosti porabe kisika (I) za vsako koncentracijo testne mešanice smo izračunali po enačbi:

$$I = \frac{R_B - (R_T - R_{PC})}{R_B} \times 100 \quad \dots (5)$$

kjer pomeni:

I = zaviranje hitrosti porabe raztopljenega kisika (%)

R<sub>B</sub> = hitrost porabe kisika v kontrolni mešanici (mg/l min)

R<sub>T</sub> = hitrost porabe kisika v vzorcu (mg/l min)

R<sub>PC</sub> = hitrost porabe kisika v fizikalno-kemijski mešanici (mg/l min)

Na diagram smo nato narisali odstotke zaviranja v odvisnosti od logaritma koncentracije vzorca – premica zaviranja. Iz narisane premice smo izračunali koncentracije vzorcev, ki so povzročile 20 %, 50 % in 80 % zaviranje hitrosti porabe kisika (IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> in IC<sub>80</sub>).

### 3.5 TEST STRUPENOSTI Z LUMINISCENČNIMI BAKTERIJAMI *Vibrio fischeri*

S tem testom ugotovimo akutno strupenost vzorca za luminiscenčne bakterije (SIST ISO 11348-2, 1998). Bakterije *Vibrio fischeri* sev NRRL-B-11177 naravno oddajajo svetlobo, katere intenziteta se zmanjša ob dodatku strupene snovi, ker se zmanjša število bakterij ali pa pride do zaviranja sistema za proizvodnjo svetlobe. Učinek snovi merimo glede na kontrolo, v katero ne damo vzorca (testirane snovi), in jo primerjamo s testnimi mešanici, v katere dodamo določeno količino vzorca. Rezultate izrazimo v odstotkih zaviranja.

Test uporabljamo za ugotavljanje strupenosti komunalnih in industrijskih odpadnih vod, izlužkov zemlje in različni trdnih odpadkov, raztopin čistih snovi in površinskih vod.

#### 3.5.1 Kulture bakterij

V testu smo uporabljali zamrznjene luminiscenčne bakterije proizvajalca Dr. Lange (Hach Lange GMBH, Düsseldorf, Nemčija). Testni komplet Dr. Lange: Luminiscent bacteria test LCK 480 vsebuje epruvete z liofiliziranimi luminiscenčnimi bakterijami vrste *Vibrio fischeri* sev NRRL-B-11177, reaktivacijsko raztopino (glukoza, natrijev klorid, pH uravnan na 7.0) in standardno raztopino (7,5 % natrijev klorid).

#### 3.5.2 Aparature

Luminiscenco smo merili z luminometerom Lumistox (proizvajalec Dr. Lange GMBH, Düsseldorf, Nemčija), uporabljali smo tudi grelni blok dr. Lange, programsko opremo LUMIsoft4, nameščeno na osebni računalnik, in pH meter.

#### 3.5.3 Postopek testa strupenosti z luminiscenčnimi bakterijami *Vibrio fischeri*

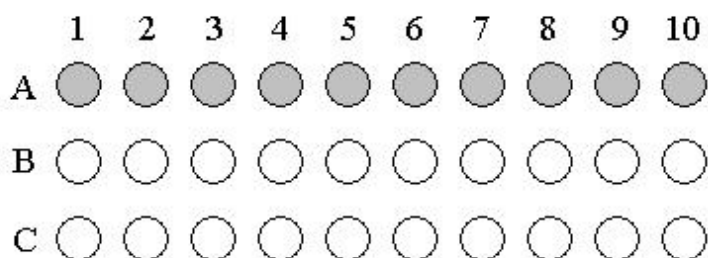
Test smo izvajali po navodilih proizvajalca (Dr. Lange: Luminiscent bacteria test LCK 480).

Za vsako strupeno snov ali odpadno vodo smo najprej opravili dva preliminarna testa, da smo ugotovili primerno redčenje vzorca pred izvedbo testa, nato pa še definitivni test. Prvi preliminarni test je bil pripravljen z geometrijsko redčitveno vrsto (koncentracije strupene snovi se zmanjšujejo po geometrijskem zaporedju, ker razredčitev v naslednjem koraku 2-krat redčimo), ker z njo pokrijemo širše območje koncentracij. Drugi preliminarni in definitivni test pa sta bila pripravljena z redčitveno vrsto po standardu SIST ISO 11348, 1998 brez G1 (G1 je dodatna stopnja redčenja, ki omogoča testiranje najvišjih koncentracij strupene snovi), ker tako dobimo več točk v območju delovanja strupenosti, iz katerega program LUMIsoft4 izračuna EC50.

V grelnem bloku smo temperaturo naravnali na  $15 \pm 1$  °C. Vanj smo postavili kivete za merjenje luminiscence in reaktivacijsko raztopino in pustili, da se termostatira. Med tem smo pripravili testni vzorec. Vzorec mora imeti ustrezno slanost (dodamo potrebno količino NaCl, da je v vzorcu 2 % raztopina NaCl) in vrednost pH (uravnamo na  $7,0 \pm 0,2$ ). Pripravili smo 50 ml vzorca, da smo lažje uravnali vrednost pH in slanost.

### 3.5.3.1 Redčitvena vrsta po SIST ISO 11348, 1998 brez G1 stopnje

Redčitveno vrsto po SIST ISO 11348, 1998 brez stopnje G1 smo pripravili po navodilih, ki so priložena testu LCK 480 (proizvajalec Dr. Lange GmbH, Düsseldorf, Nemčija). Tako je bila v prvi kiveri v vrsti A ničelna kontrola (brez vzorca), v drugi šestnajstkrat razredčen vzorec, v tretji dvanajstkrat, v četrti osemkrat, v peti šestkrat, v šesti štirikrat, v sedmi trikrat, v osmi dvakrat, v deveti enainpolkrat in v deseti nerazredčen vzorec (slika 5).



**Slika 5:** Shema razporeditve epruvetk na termo bloku Dr. Lange

V vrsti B in C na grelnem bloku smo odpipetirali 0,5 ml revitalizirane suspenzije bakterij v vse epruvetke. Po merjenjem luminiscence brez vzorca (samo 0,5 ml suspenzije bakterij) smo dodali 0,5 ml tako pripravljenih razredčitev iz vrste A v vrsti B in C, zato so redčitve na koncu dvakrat večje (32-krat, 24-krat, 16-krat, 12-krat, 8-krat, 6-krat, 4-krat, 3-krat, 2-krat).

### 3.5.3.2 Geometrijska redčitvena vrsta

Geometrijsko redčitveno vrsto smo pripravili po navodilih, ki so priložena testu LCK 480 (proizvajalec Dr. Lange GMBH, Düsseldorf, Nemčija). Geometrijsko redčitveno vrsto smo pripravili tako, da smo vsak naslednji korak razredčitev redčili dvakrat. Razredčitve smo pripravljali z 2 % raztopino NaCl. Tako je bilo v prvi epruvetki v vrsti A samo 1,5 ml 2 % raztopine NaCl (ničelna kontrola), v drugi 256-krat razredčen vzorec, v tretji 128-krat, v četrti 64-krat, v peti 32-krat, v šesti 16-krat, v sedmi 8-krat, v osmi 4-krat in v deveti 2-krat, v deseti pa nerazredčeni vzorec (slika 5).

V vrsti B in C na grelnem bloku smo odpipetirali 0,5 ml revitalizirane suspenzije bakterij v vse epruvetke. Po merjenju vpliva brez vzorca (strupene snovi) smo dodali 0,5 ml tako pripravljene razredčitve iz vrste A v vrsti B in C, zato so razredčitve na koncu dvakrat večje (512-krat, 256-krat, 128-krat, 64-krat, 32-krat, 16-krat, 8-krat, 4-krat in 2-krat).

### 3.5.3.3 Potek testa in ugotavljanje zaviralnih koncentracij strupenih snovi

Na osebнем računalniku smo aktivirali program LUMIsoft4 in nastavili vse potrebne parametre meritve (čas inkubacije, čas med meritvami, kakšno redčitev smo pripravili, ime vzorca in ostalo). Program pokaže, katero kiveto moramo izmeriti in čas ob katerem jo izmerimo, tako, da je čas inkubacije med serijama meritev za vse kivete enak. Po navodilih programa smo najprej izmerili luminiscenco pred dodanim vzorcem (strupeno snovjo), nato pa smo k bakterijam dodali po 0,5 ml prej pripravljenega in razredčenega vzorca in inkubirali 30 minut. Po času inkubacije smo izmerili luminiscenco v enakem zaporedju kot prej. Program iz primerjave med izmerjeno luminiscenco pred dodanim vzorcem in luminiscenco po inkubaciji z vzorcem izračuna koncentracije vzorca, pri katerih pride do

20 %, 50 % in 80 % zaviranja ( $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$  in  $IC_{80}$ ). Program poda regresijo med točkami, dobljenimi v testu in nariše diagram, ki kaže povezavo med stopnjo zaviranja in koncentracijo vzorca (strupene snovi). Vrsti B in C na grelnem bloku sta dve paralelki za vsako koncentracijo, s čimer se poveča natančnost in točnost meritev.

### 3.6 PRIKAZ REZULTATOV

Vse rezultate smo podali kot aritmetično sredino dveh ali več meritev posameznega testa (Košmelj, 2001). Poleg rezultata smo navedli tudi oceno variabilnosti (standardni odklon od povprečne vrednosti). Statistične operacije smo opravili s programom Microsoft Excel, v katerem smo uporabili funkciji <average> in <stdev>.

Povprečna vrednost,  $\bar{X}$  :

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots(6)$$

n = število meritev

$X_i$  = vrednost i-te meritve

Standardni odklon, SD:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad \dots(7)$$

n = število meritev

$X_i$  = vrednost i-te meritve

$\bar{X}$  = povprečna vrednost



## 4 REZULTATI

S spreminjanjem pogojev pri ATP testu zmerjenja luminiscence (Podgorelec, 2004) smo hoteli izboljšati ponovljivost in občutljivost te metode za ugotavljanje strupenosti. Aktivno blato iz laboratorijskega modela čistilne naprave smo izpostavili strupeni snovi 3,5-diklorofenolu. Čas izpostavitve smo spreminjali, da bi ugotovili, kje je najbolj ugodno razmerje med trajanjem in občutljivostjo testa (poglavje 4.1).

Spreminjali smo tudi vir aktivne biomase v testu. Aktivno blato iz laboratorijskega modela čistilne naprave smo primerjali z dvema komercialno dostopnima aktivnima biomasama: BODseed, ki se uporablja pri izvajanju BPK (biokemijska potreba po kisiku) testa in Micropan Complex, ki se uporablja za zagon manjših čistilnih naprav. Najprej smo poiskali koncentracije biomas, ki so bile primerljive glede na aktivnost, nato pa smo preverili še občutljivost aktivne biomase. Na podlagi pridobljenih rezultatov smo se odločili za najprimernejši čas izpostavitve aktivnega blata testirani snovi in najprimernejši vir aktivne biomase (poglavje 4.1.2).

S tako optimiziranim ATP testom smo nato testirali 4 vzorce odpadnih vod in rezultate primerjali še s testom zaviranja hitrosti porabe kisika po standardni metodi SIST ISO 8192 in testom z bakterijami *Vibrio fischeri* z merjenjem luminiscence, ki je tudi standardna metoda. Pri vseh testih smo izračunali krivuljo zaviranja in nato z njeno pomočjo izračunali koncentracije testne snovi (IC) pri 20, 50 in 80 % zaviranju mikrobne aktivnosti (IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>80</sub>) (poglavje 4.2).

### 4.1 OPTIMIZACIJA ATP TESTA

#### 4.1.1 Optimalni čas izpostavitve aktivnega blata testirani snovi

Pred vsakim merjenjem ATP v vzorcih smo izmerili znane standardne koncentracije ATP, ki smo jih pripravili iz standarda (FL-AAS). S programom Microsoft Excel smo nato narisali umeritveno krivuljo iz petih točk, potegnili trendno črto in izračunali njeno enačbo.

To je bilo potrebno, ker so reagenti shranjeni pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in se sčasoma zmanjšuje produkcija svetlobe (encim je manj aktiven) in s tem občutljivost testa manjša.

Preglednica 2 prikazuje odvisnost koncentracije 3,5-diklorofenola, ki izzove 20 % zmanjšanje koncentracije ATP ( $\text{IC}_{20}$ ), od časa izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela (LM) 3,5-diklorofenolu.  $\text{IC}_{20}$  smo izbrali, ker je to koncentracija strupene snovi, pri kateri se pokaže začetek strupenosti (SIST ISO 11348-2). Pri vsakem času izpostavitve smo test naredili dvakrat in iz teh podatkov izračunali aritmetično sredino in standardni odklon. Trend zmanjševanja  $\text{IC}_{20}$  ni opazen, vrednosti so približno enakomerno raztresene okoli povprečja, kar je razvidno tudi iz grafičnega prikaza na sliki 6. Standardni odklon je pri nekaterih meritvah večji, ker so se pojavljale razlike med ponovitvami zaradi nehomogenih vzorcev.

**Preglednica 2:** Povprečje  $\text{IC}_{20}$  3,5-diklorofenola s standardnim odklonom za aktivno blato iz laboratorijskega modela.

čas izpostavljenosti [min]	$\text{IC}_{20}$ 3,5-diklorofenola [mg/l]		povprečje	standardni odklon
	prvič	drugič		
30	5,1	4,7	4,9	0,3
60	1,9	4,5	3,2	1,8
90	2,7	5,2	3,9	1,8
120	5,0	3,7	4,3	0,9
150	1,8	3,5	2,7	1,2
180	2,4	7,3	4,9	3,5

Preglednica 3 prikazuje odvisnost koncentracije 3,5-diklorofenola, ki izzove 50 % zmanjšanje koncentracije mikrobnega ATP ( $\text{IC}_{50}$ ), od časa izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela (LM) 3,5-diklorofenolu. Vse čase izpostavitve smo preizkusili dvakrat in iz teh podatkov izračunali aritmetično sredino in standardni odklon. Prav tako smo izračunali koncentracije 3,5-diklorofenola, ki izzovejo 80 % zaviranje glede na ničelno kontrolo. Rezultati so prikazani v preglednici 4. Opazen je trend zmanjševanja  $\text{IC}_{50}$

s podaljšanim časom, tako pri posameznih meritvah kot povprečno. Standardni odklon je pri nekaterih meritvah večji, kar se verjetno nanaša na nehomogenost vzorcev.

**Preglednica 3:** Povprečje IC<sub>50</sub> 3,5-diklorofenola s standardnim odklonom za aktivno blato iz laboratorijskega modela.

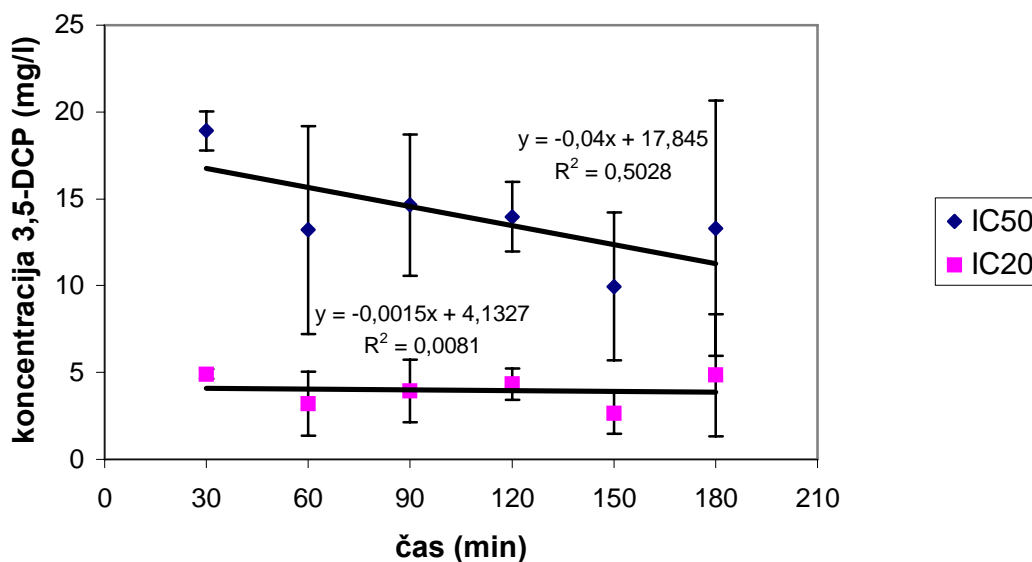
čas izpostavljenosti [min]	IC <sub>50</sub> 3,5-diklorofenola [mg/l]		povprečje	standardni odklon
	prvič	drugič		
30	18,1	19,7	18,9	1,1
60	9,0	17,4	13,2	6,0
90	11,8	17,5	14,7	4,1
120	15,4	12,5	14,0	2,0
150	6,9	13,0	10,0	4,2
180	8,1	18,5	13,3	7,3

**Preglednica 4:** Povprečje IC<sub>80</sub> 3,5-diklorofenola s standardnim odklonom za aktivno blato iz laboratorijskega modela.

čas izpostavljenosti [min]	IC <sub>80</sub> 3,5-diklorofenola [mg/l]		povprečje	standardni odklon
	prvič	drugič		
30	64,2	82,5	73,3	12,9
60	42,3	67,7	55,0	17,9
90	52,3	58,9	55,6	4,6
120	47,7	42,6	45,1	3,6
150	26,7	47,9	37,3	15,0
180	27,8	46,6	37,2	13,3

Odvisnost IC<sub>20</sub> in IC<sub>50</sub> za 3,5-diklorofenol od časa izpostavitve je grafično prikazana na sliki 6. Iz grafičnega prikaza je razviden trend zmanjševanja koncentracije 3,5-

diklorofenola, ki povzroči 50 % zmanjšanje koncentracij mikrobnega ATP s podaljšanim časom izpostavitve. Iz istega grafičnega prikaza takega trenda za IC<sub>20</sub> ne moremo prepoznati.



**Slika 6:** Odvisnost IC<sub>20</sub> in IC<sub>50</sub> od časa izpostavitve aktivnega blata (iz laboratorijskega modela) 3,5-diklorofenolu.

Spreminjanje koncentracije 3,5-diklorofenola, ki izzove 20 % zmanjšanje koncentracije ATP (IC<sub>20</sub>), glede na čas izpostavitve komercialne aktivne biomase Micropan Complex (MC) 3,5-diklorofenolu prikazuje preglednica 5. Vse čase izpostavitve smo preizkusili dvakrat in iz teh podatkov izračunali aritmetično sredino in standardni odklon. Opazen je trend zmanjševanja IC<sub>20</sub> s podaljšanim časom izpostavitve, kar pri aktivni biomasi iz laboratorijskega modela ni razvidno. Standardni odklon je podoben, kot pri poskusih z aktivnim blatom iz laboratorijskega modela.

**Preglednica 5:** Povprečje IC<sub>20</sub> 3,5-diklorofenola s standardnim odklonom za aktivno blato iz komercialnega cepiva Micropan Complex.

čas izpostavljenosti [min]	IC <sub>20</sub> 3,5-diklorofenola [mg/l]		povprečje	standardni odklon
	prvič	drugič		
30	3,6	9,7	6,6	4,3
60	3,7	7,4	5,6	2,6
90	3,7	7,6	5,7	2,7
120	5,7	5,2	5,4	0,3
150	2,4	5,3	3,9	2,1
180	3,2	5,1	4,1	1,4

Spreminjanje koncentracije 3,5-diklorofenola, ki izzove 50 % zmanjšanje koncentracije ATP (IC<sub>50</sub>), glede na čas izpostavitve komercialne aktivne biomase Micropan Complex (MC) 3,5-diklorofenolu prikazuje preglednica 6. Vse čase izpostavitve smo preizkusili dvakrat in iz teh podatkov izračunali aritmetično sredino in standardni odklon. Opazen je trend zmanjševanja IC<sub>50</sub> s podaljšanim časom izpostavitve, tako pri posameznih meritvah kot povprečno. Standardni odklon je bistveno manjši kot pri preskusih z aktivnim blatom iz laboratorijskega modela. Prav tako smo izračunali koncentracije 3,5-diklorofenola, ki izzovejo 80 % zaviranje glede aktivno blato brez dodane strupene snovi (preglednica 7).

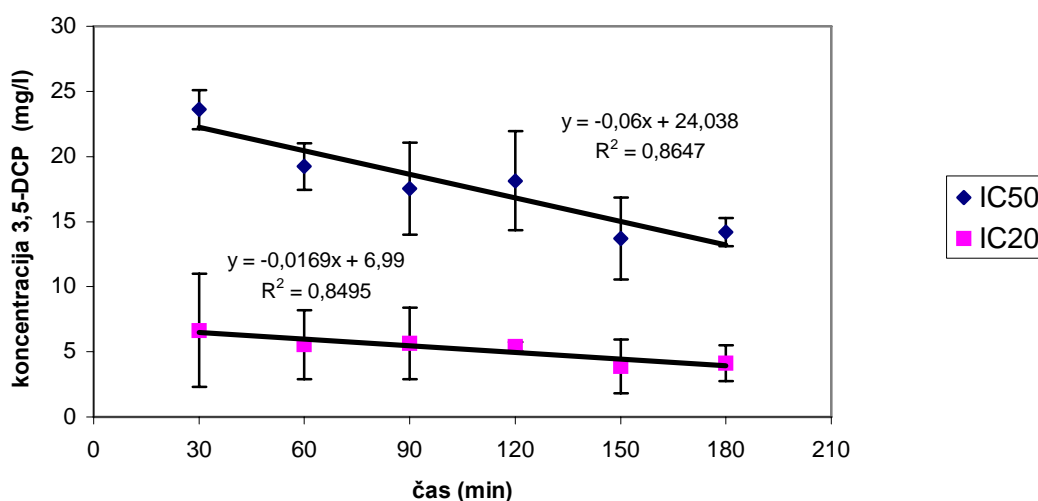
**Preglednica 6:** Povprečje IC<sub>50</sub> 3,5-diklorofenola s standardnim odklonom za aktivno blato iz komercialnega cepiva Micropan Complex.

čas izpostavljenosti [min]	IC <sub>50</sub> 3,5-diklorofenola [mg/l]		povprečje	standardni odklon
	prvič	drugič		
30	22,6	24,7	23,6	1,5
60	18,0	20,5	19,2	1,8
90	15,0	20,0	17,5	3,5
120	20,8	15,5	18,1	3,8
150	11,5	15,9	13,7	3,1
180	14,9	13,4	14,2	1,1

**Preglednica 7:** Povprečje IC<sub>80</sub> 3,5-diklorofenola s standardnim odklonom za aktivno blato iz komercialnega cepiva Micropan Complex.

čas izpostavljenosti [min]	IC <sub>80</sub> 3,5-diklorofenola [mg/l]		povprečje	standardni odklon
	prvič	drugič		
30	142,7	62,7	102,7	56,6
60	87,5	56,8	72,1	21,7
90	60,8	52,7	56,7	5,7
120	76,7	46,1	61,4	21,6
150	54,3	47,5	50,9	4,8
180	70,8	35,5	53,1	25,0

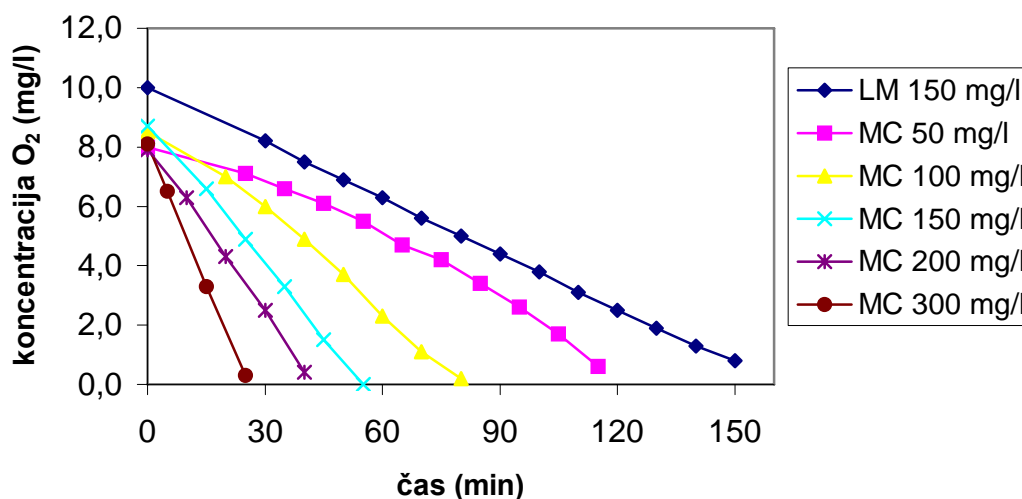
Odvisnost IC<sub>20</sub> in IC<sub>50</sub> za 3,5-DCP od časa izpostavitve komercialne biomase Micropan Complex je grafično prikazana na sliki 7. Iz grafičnega prikaza na sliki 7 je dobro opazen trend zmanjševanja IC<sub>20</sub> in IC<sub>50</sub> s povečevanjem časa izpostavitve biomase Micropan Complex.



**Slika 7:** Odvisnost IC<sub>20</sub> in IC<sub>50</sub> od časa izpostavitve aktivnega blata (komercialno aktivno blato Micropan Complex) 3,5-diklorofenolu.

#### 4.1.2 Primernost različnih virov biomase za testiranje strupenosti

S testom zaviranja porabe kisika (SIST ISO 8192, metoda z majhno koncentracijo aktivnega blata) smo primerjalno preizkusili aktivnost biomase iz laboratorijskega modela ter dve komercialni biomasi: Micropan Complex in BODseed. Tako smo preverili, ali lahko komercialna biomasa zamenja biomaso iz laboratorijskega modela pri nadaljnjih preskusih strupenosti odpadnih vod. Slika 8 prikazuje primer poskusa, s katerim smo ugotavljali, kakšna je hitrost porabe kisika (aktivnost) aktivne biomase Micropan Complex in aktivnega blata iz laboratorijskega modela.



**Slika 8:** Aktivnost različnih koncentracij aktivnega blata iz laboratorijskega modela (LM) in komercialno dostopne aktivne biomase. Primer za Micropan Complex (MC).

Na preglednici 8 so predstavljene koncentracije komercialnih biomas, ki ustrezajo aktivnosti aktivnega blata iz laboratorijskega modela. Ugotovili smo, da je pri koncentraciji 150 mg suhe snovi/l aktivnega blata iz laboratorijskega modela hitrost porabe kisika približno enaka kot pri 50 mg suhe snovi/l aktivne biomase Micropan Complex (slika 8) in 30 mg suhe snovi/l aktivne biomase BODseed.

**Preglednica 8:** Koncentracije aktivnega blata pri enakih aktivnostih za biomaso iz laboratorijskega modela in komercialne biomase. Aktivnost biomase smo ugotavljali s testom zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda z nizko koncentracijo aktivnega blata).

<b>koncentracija komercialne biomase, ki ima enako aktivnost</b>			
	<b>biomasa iz laboratorijskega modela</b>	<b>BODseed</b>	<b>Micropan Complex</b>
<b>koncentracija suhe snovi aktivnega blata (mg/l)</b>	150	30	50

Preiskusili smo tudi občutljivost teh treh virov biomas. Standard SIST ISO 8192 določa, da mora biti občutljivost aktivnega blata izražena kot  $IC_{50}$ , tako za metodo z majhno koncentracijao aktivnega blata kot za metodo z veliko koncentracijo aktivnega blata, med 5 in 30 mg/l za 3,5-diklorofenol, ki je referenčna snov. Preglednica 9 prikazuje občutljivost 3 virov biomase za 3,5-diklorofenol. Občutljivost aktivnega blata iz laboratorijskega modela je v predpisanem intervalu vendar blizu spodnje meje, komercialni biomas pa sta na sredini v standardu določenega intervala. Na podlagi teh rezultatov smo nadaljne poskuse izvajali z aktivno biomaso Micropan Complex (aktivna biomasa BODseed vsebuje samo bakterije in je ekonomsko bolj neugodna).



**Preglednica 9:** Primerjava strupenosti 3,5-diklorofenola za različne vrste aktivnih biomas. Poskusi so bili opravljeni s testom zaviranja hitrosti porabe kisika (SIST ISO 8192, metoda z majhno koncentracijo aktivnega blata).

	<b>biomasa iz laboratorijskega modela</b>	<b>BODseed</b>	<b>Micropan Complex</b>
<b>IC<sub>20</sub> (mg/l)</b>	1,7	5,4 ± 1,9	7,7 ± 0,4
<b>IC<sub>50</sub> (mg/l)</b>	7,3	12,0 ± 3,5	15,8 ± 1,7
<b>IC<sub>80</sub> (mg/l)</b>	31,8	26,7 ± 6,0	32,6 ± 8,4

## 4.2 PRIMERJAVA OBČUTLJIVOSTI METOD ZA UGOTAVLJANJE STRUPENOSTI

### 4.2.1 Referenčna snov 3,5-diklorofenol

Preskusili smo občutljivost treh metod za ugotavljanje strupenosti za strupeno snov 3,5-diklorofenol, ker smo hoteli ugotoviti, če z metodo merjenja mikrobnega ATP dobimo primerljive rezultate drugima dvema metodama. V preglednici 10 so podane povprečne vrednosti zaviralnih koncentracij (IC<sub>x</sub>) s standardni odkloni (±SD). Pri ATP testu in testu strupenosti z zaviranjem hitrosti porabe kisika smo uporabili aktivno biomaso Micropan Complex, pri merjenju bioluminiscence z *Vibrio fischeri* pa v standardu določen sev bakterij *V. fischeri*. Ob dodatku 3,5-diklorofenola se zmanjša aktivnost tako aktivnega blata kot luminiscenčnih bakterij *V. fischeri*. Pri vseh treh metodah se z večanjem koncentracij 3,5-diklorofenola zmanjšuje aktivnost mikroorganizmov. Test z merjenjem zaviranja hitrosti porabe kisika in ATP test z merjenjem luminiscence kažeta zelo podobne rezultate (IC<sub>50</sub> za prvi test je 15,8 ± 1,7 mg/l in 14,5 ± 1,7 mg/l za drugega), IC<sub>50</sub> pri testu z *V. fischeri* je manjši (4,3 ± 0,3 mg/l).

**Preglednica 10:** Povprečne vrednosti in standardni odkloni zaviralnih koncentracij (IC) za 3,5-diklorofenol. Povprečne vrednosti so rezultat vsaj dveh neodvisnih meritev za posamezno metodo. Zaviralne koncentracije (IC) so podane v mg/l, x = 20, 50, 80 %.

<b>zaviralna koncentracija (IC<sub>x</sub>) za 3,5-diklorofenol</b>	<b>test zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda z majhno koncentracijo aktivnega blata)</b>	<b>metoda merjenja koncentracije mikrobnega ATP</b>	<b>test z bakterijami <i>Vibrio fischeri</i> z merjenjem luminiscence</b>
<b>IC<sub>20</sub>(mg/l)</b>	7,7 ± 0,4	4,6 ± 0,8	2,5 ± 0,1
<b>IC<sub>50</sub>(mg/l)</b>	15,8 ± 1,7	14,5 ± 1,7	4,3 ± 0,3
<b>IC<sub>80</sub>(mg/l)</b>	32,6 ± 8,4	45,5 ± 2,6	7,3 ± 0,8

#### 4.2.2 Testiranje strupenosti vzorcev odpadnih vod

S preiskušeni testnimi postopki za metodo SIST ISO 8192 (test zaviranja hitrosti porabe kisika, biomasa Micropan Complex), z metodo ugotavljanja koncentracij mikrobnega ATP in s testom z bakterijami *Vibrio fischeri* smo primerjalno ugotavljali strupenost štirih odpadnih vod. Odpadni vodi A in C izvirata iz farmacevtske industrije, odpadna voda B iz kovinske industrije in odpadna voda D iz deponije usnjarskih odpadkov.

Odpadna voda A iz farmacevtske industrije ni imela velikega negativnega vpliva na testne mikroorganizme, kar je prikazano v preglednici 11. Ob dodatku odpadne vode A smo zmanjšanje mikrobne aktivnosti zaznali samo s testom z bakterijami *V. fischeri*. Pri tem testu je bila zaviralna koncentracija (IC<sub>50</sub>) precej majhna (6,5 vol % odpadne vode), kar kaže na veliko občutljivost bakterij *V. fischeri*. Druga dva testa sta bila precej neobčutljiva. Z ATP testom smo zaznali največje zaviranje 4 % pri koncentraciji odpadne vode 50 vol %, pri testu z zaviranjem hitrosti porabe kisika pa 25 odstotno zaviranje pri koncentraciji odpadne vode 25 vol %. Preiskusili smo tudi večjo koncentracijo odpadne vode, vendar je bilo zaviranje manjše.

**Preglednica 11:** Povprečne vrednosti in standardni odkloni zaviralnih koncentracij (IC) odpadne vode A iz farmacevtske industrije. Povprečne vrednosti so rezultati vsaj dveh neodvisnih meritev za posamezno metodo. Zaviralne koncentracije (IC) so podane v volumskih odstotkih, x = 20, 50, 80 %.

<b>zaviralna koncentracija (IC<sub>x</sub>) za odpadno vodo A</b>	<b>test zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda z veliko koncentracijo aktivnega blata)</b>	<b>metoda merjenja koncentracije mikrobnega ATP</b>	<b>test z bakterijami <i>Vibrio fischeri</i> z merjenjem luminiscence</b>
<b>IC<sub>20</sub> (vol %)</b>	premajhno zaviranje, zato povprečje in standardni odklon nista izračunana	premajhno zaviranje, zato povprečje in standardni odklon nista izračunana	1,7 ± 0,4
<b>IC<sub>50</sub> (vol %)</b>			6,5 ± 1,0
<b>IC<sub>80</sub> (vol %)</b>			26,6 ± 7,3

Odpadna voda B izvira iz kovinske industrije. Vsebovala je večje količine težkih kovin (preglednica 17). Ob dodatku odpadne vode B smo zmanjšanje mikrobne aktivnosti zaznali z ATP testom in testom zaviranja hitrosti porabe kisika, pri testu z bakterijami *V. fischeri* pa zaviranja nismo zaznali (preglednica 12). Pri ATP testu je bila zaviralna koncentracija manjša (IC<sub>50</sub> je bil 14,4 ± 6,8 vol %), kot pa pri testu z zaviranjem porabe kisika (IC<sub>50</sub> je bil 39,7 ± 3,0 vol %). Test z bakterijami *V. fischeri* je bil za to odpadno vodo premalo občutljiv (pri koncentraciji odpadne vode 50 vol % smo zaznali 15 % zaviranje). Kaže, da je odpadna voda B strupena za mikroorganizme aktivnega blata, za bakterije *V. fischeri* pa ne.

**Preglednica 12:** Povprečne vrednosti in standardni odkloni zaviralnih koncentracij (IC) odpadne vode B iz kovinarske industrije. Povprečne vrednosti so rezultati vsaj dveh neodvisnih meritev za posamezno metodo. Zaviralne koncentracije (IC) so podane v volumskih odstotkih,  $x = 20, 50, 80$  %.

<b>zaviralna koncentracija (IC<sub>x</sub>) za odpadno vodo B</b>	<b>test zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda z veliko koncentracijo aktivnega blata)</b>	<b>metoda merjenja koncentracije mikrobnega ATP</b>	<b>test z bakterijami <i>Vibrio fischeri</i> z merjenjem luminiscence</b>
<b>IC<sub>20</sub> (vol %)</b>	6,3 ± 4,7	6,0 ± 4,2	premajhno zaviranje, zato povprečje in standardni odklon nista izračunana
<b>IC<sub>50</sub> (vol %)</b>	39,7 ± 3,0	14,4 ± 6,8	
<b>IC<sub>80</sub> (vol %)</b>	več od 100 vol %	36,5 ± 11,0	

Vse tri metode za ugotavljanje strupenosti smo preizkusili tudi na odpadni vodi C, ki je prav tako kot odpadna voda A izviralna iz iztoka farmacevtske industrije. Ob dodatku odpadne vode C smo zmanjšanje mikrobne aktivnosti zaznali samo z testom z luminiscenčnimi bakterijami *V. fischeri*, z drugima dvema pa zaviranja nismo zaznali (preglednica 13). Test z merjenjem ATP je pri koncentraciji odpadne vode 50 vol % pokazal pospeševanje, test z merjenjem hitrosti porabe kisika pa pri koncentraciji odpadne vode 20 vol % samo 6 odstotno zaviranje. Pri testu z luminiscenčnimi bakterijami *V. fischeri* je bila zaviralna koncentracija (IC<sub>50</sub>) precej velika (22,0 ± 4,7 vol %), kar kaže, da odpadna voda (glede na uporabljene teste) ni strupena.

**Preglednica 13:** Povprečne vrednosti in standardni odkloni zaviralnih koncentracij (IC) odpadne vode C iz farmacevtske industrije. Povprečne vrednosti so rezultat vsaj dveh neodvisnih meritev za posamezno metodo. Zaviralne koncentracije (IC) so podane v volumskih odstotkih,  $x = 20, 50, 80$  %.

<b>zaviralna koncentracija (IC<sub>x</sub>) za odpadno vodo C</b>	<b>test zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda z veliko koncentracijo aktivnega blata)</b>	<b>metoda merjenja koncentracije mikrobnega ATP</b>	<b>test z bakterijami <i>Vibrio fischeri</i> z merjenjem luminiscence</b>
<b>IC<sub>20</sub> (vol %)</b>	premajhno zaviranje, zato povprečje in standardni odklon nista izračunana	premajhno zaviranje, zato povprečje in standardni odklon nista izračunana	2,0 ± 0,3
<b>IC<sub>50</sub> (vol %)</b>			22,0 ± 4,7
<b>IC<sub>80</sub> (vol %)</b>			več od 100 vol %

Zadnji vzorec odpadne vode, na katerem smo primerjali občutljivost metod za ugotavljanje strupenosti je bil vzorec odpadne vode D (deponija usnjarskih odpadkov). Vpliv vzorca na testne mikroorganizme prikazuje preglednica 14. Ob dodatku odpadne vode D smo zmanjšanje mikrobne aktivnosti zaznali z vsemi tremi testi. Najbolj občutljiv je bil test z luminiscenčnimi bakterijami *V. fischeri*, pri katerem je bil IC<sub>50</sub> že pri  $1,8 \pm 0,1$  vol %. Test z zaviranjem porabe kisika in ATP test sta pokazala veliko manjšo strupenost (IC<sub>50</sub> je bil  $59,8 \pm 7,0$  vol % pri prvem in več od 100 vol % pri drugem). Tudi v tem primeru kaže, da so bile bakterije *V. fischeri* bolj občutljive na strupene snovi v odpadni vodi kot aktivna biomasa Micropan Complex.

**Preglednica 14:** Povprečne vrednosti in standardni odkloni zaviralnih koncentracij (IC) za odpadno vodo D iz deponije. Rezultate povprečnih vrednosti smo dobili iz vsaj dveh neodvisnih meritev za posamezno metodo. Zaviralne koncentracije (IC) so podane v volumskih odstotkih,  $x = 20, 50, 80 \%$ .

<b>zaviralna koncentracija (IC<sub>x</sub>) za odpadno vodo D</b>	<b>test zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda z veliko koncentracijo aktivnega blata)</b>	<b>metoda merjenja koncentracije mikrobnega ATP</b>	<b>test z bakterijami <i>Vibrio fischeri</i> z merjenjem luminiscence</b>
<b>IC<sub>20</sub> (vol %)</b>	14,0 ± 0,3	53,1 ± 13,7	0,5 ± 0,1
<b>IC<sub>50</sub> (vol %)</b>	59,8 ± 7,0	več od 100 vol %	1,8 ± 0,1
<b>IC<sub>80</sub> (vol %)</b>	več od 100 vol %	več od 100 vol %	6,6 ± 1,4

#### 4.2.2.1 Rezultati kemijskih analiz odpadnih voda

Rezultati kemijske analize odpadne vode A iz farmacevtske industrije in odpadne vode B iz kovinarske industrije (analize so opravili na Centralni čistilni napravi Domžale-Kamnik) so prikazani na preglednicah 15 in 17. Rezultati analiz kažejo, da so v odpadni vodi A ostanki polarnih organskih topil, veliki sta tudi vrednosti KPK in BPK<sub>5</sub> kar kaže na organsko onesnaženje. V odpadni vodi B so povečane koncentracije nekaterih težkih kovin. Podjetje, iz katerega izvira odpadna voda C ne dovoli javne objave rezultatov fizikalno-kemijskih analiz. Kemijske analize odpadne vode D so bile opravljene v sklopu diplomske naloge v Laboratoriju za kemijo, biologijo in tehnologijo voda na Kemijskem inštitutu (Dovgan, 2005). Odpadna voda D je bila močno organsko onesnažena in je vsebovala velike koncentracije klora (preglednica 16).

**Preglednica 15:** Rezultati analiz odpadne vode A

<b>Parameter</b>	<b>Enote</b>	<b>Rezultat</b>
pH	/	7,03
Temperatura (pri pH)	°C	25,6
Usedljive snovi po 1 uri	ml/l	18
Kjeldahlov dušik	mg N/l	75
Celotni fosfor	mg P/l	5,6
Kemijska potreba po kisiku (KPK)	mg O <sub>2</sub> /l	2595
Biokemijska potreba po kisiku (BPK <sub>5</sub> )	mg O <sub>2</sub> /l	1398
Polarna organska topila	mg/l	370

**Preglednica 16:** Rezultati analiz odpadne vode D

<b>Parameter</b>	<b>Enote</b>	<b>Rezultat</b>
pH	/	8,0
Skupni organski ogljik	mg C/l	1950
Amonijev dušik	mg NH <sub>4</sub> /l	3027
Organski dušik	mg N/l	129
Kemijska potreba po kisiku (KPK)	mg O <sub>2</sub> /l	5520
Biokemijska potreba po kisiku (BPK <sub>5</sub> )	mg O <sub>2</sub> /l	2490
Klor	mg Cl/l	2750

**Preglednica 17:** Rezultati analiz odpadne vode B

<b>Parameter</b>	<b>Enote</b>	<b>Rezultat</b>
pH	/	10,02
Temperatura (pri pH)	°C	19,1
Usedljive snovi po 1 uri	ml/l	100
Baker	mg Cu/l	139
Cink	mg Zn/l	0,86
Kadmij	mg Cd/l	<0,05
Celotni krom	mg Cr/l	9,13
Krom 6+	mg Cr/l	<0,01
Nikelj	mg Ni/l	35,8
Svinec	mg Pb/l	0,184
Železo	mg Fe/l	17,2
Kjeldahlov dušik	mg N/l	12,7
Celotni fosfor	mg P/l	6,0
Kemijska potreba po kisiku (KPK)	mg O <sub>2</sub> /l	25,3



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Test merjenja ATP z luminometrom se je v predhodnih raziskavah pokazal kot primeren za ugotavljanje strupenosti odpadnih voda, vendar je bil slabo občutljiv in rezultati so precej nihali med ponovitvami (Podgorelec, 2004). Potrebno je bilo podaljšati čas izpostavitve mikroorganizmov aktivnega blata strupeni snovi in poiskati še kakšen način za izboljšanje ponovljivosti. To smo storili s preizkušanjem različnih virov liofilizirane, komercialno dostopne biomase. Naše raziskave kažejo, da je tako prilagojen ATP test bolj primeren za ocenjevanje strupenosti vtoka na čistilne naprave.

Aktivno blato iz laboratorijskega modela smo različno dolgo izpostavili strupeni snovi 3,5-diklorofenolu, da bi ugotovili, če se občutljivost aktivnega blata z daljšanjem izpostavitve povečuje. Rezultati raziskave kažejo (preglednica 3), da taka odvisnost obstaja. Takšna odvisnost se ujema z pričakovano, saj ima strupena snov 3,5-DCP več časa, da reagira z bakterijsko celico in jo poškoduje ali uniči (Dutka in sod., 1983).  $IC_{20}$  aktivnega blata iz laboratorijskega modela (preglednica 2) ne pokaže naraščanja strupenosti s časom, trendna črta, ki smo jo potegnili med točkami je skoraj vodoravna ( $R^2$  vrednost prikazana na sliki 6 je majhna).  $IC_{20}$  je slabši pokazatelj občutljivosti aktivne biomase, ker se pri tej koncentraciji učinki zaviranja šele začno kazati (Clesceri in sod., 1998). Čase izpostavitve smo izbrali glede na trajanje primerljivih metod. Daljši časi niso smiselni, saj je ena izmed zahtev za dober test strupenosti tudi čim krajša izvedba in čim hitrejša razpoložljivost rezultatov (Hiley, 1996), da lahko ukrepamo in preprečimo negativne učinke na biološki čistilni napravi. Krajši časi izpostavitve so prekratki in ne dopuščajo dovolj intenzivnih interakcij med celico in strupeno snovjo, ki bi jih lahko ustrezno ovrednotili (Dutka in sod., 1983). Med dvema ponovitvama serije poskusov pri nekaterih časih izpostavitve so se pojavile večje razlike, kar nam pokaže standardni odklon. Do razlik lahko pride v več korakih, eden pomembnejših je pipetiranje aktivnega blata v epruvete po Eppendorfu. Ker je aktivno blato iz laboratorijskega modela v različno velikih kosmičih je zelo težko dodati v vsako epruveto po Eppendorfu enako količino biomase. Vsebnost mikroorganizmov je zelo odvisna od tega, ali s pipeto potegnemo več večjih kosmov ali pa manj manjših.

Aktivnega blata pred pipetiranjem ni mogoče homogenizirati, ne da bi poškodovali celice, kar pa vpliva na količino ATP, ki ga kasneje izmerimo. Podobne napake se zgodijo tudi pri ekstrakciji ATP iz mikobnih celic. Razlike izhajajo tudi iz samega aktivnega blata, ki se spreminja v sestavi glede na čas (v laboratorijskem modelu je aktivno blato najbolj kvalitetno za preskuse, ko pride sveže iz čistilne naprave) in tudi koncentracijsko (uporaba tudi za druge poskuse v laboratoriju) (Shoji in sod., 2000).

Za iskanje drugega vira biomase smo se odločili zaradi ugotovljenih težav z aktivno biomaso iz laboratorijskega modela. Poleg zgoraj opisanih se pojavljajo še drugi. Aktivno blato se včasih napihne in se ne poseda, zato ga ne moremo uporabiti v poskusih (Smith in sod., 2003). Težavna je tudi občutljivost aktivnega blata v laboratorijskem modelu, saj je na spodnji meji, ki je predpisana v standardnem postopku SIST ISO 8192 ( $IC_{50}$  za 3,5-diklorofenol naj bi bil med 5 in 30 mg/l, pri metodi z zaviranjem hitrosti porabe kisika). To težavo smo rešili z uporabo liofilizirane aktivne biomase, ki je komercialno dostopna, saj je v taki obliki vedno na voljo in ima sestavo, ki se ne spreminja s časom (vedno lahko pripravimo aktivno biomaso določene starosti). Laboratorijske modele je treba tudi redno vzdrževati, liofilizirane biomase pa ne. Preden smo izbrali aktivno biomaso za nadaljne poskuse smo preiskusili dve komercialni biomasi: BODseed, ki jo uporabljajo kot cepivo vzorcev pri testiranju BPK in Micropan Complex, ki jo uporabljajo za zagon manjših bioloških čistilnih naprav (Micropan Complex: tehniški opis, 2003). Obe komercialni biomasi sta se izkazali bolj aktivni in občutljivi v primerjavi z biomaso iz laboratorijskega modela pri metodi z zaviranjem hitrosti porabe kisika. Aktivnost je bila celo boljša kot pri laboratorijskem modelu, verjetno zato, ker smo uporabili isti substrat (mesno juho, poglavje 3.4.1.1) pri revitalizaciji liofilizirane biomase in pri testu z zaviranjem hitrosti porabe kisika, s katerim smo ugotavljali aktivnost. Tako je imela revitalizirana biomasa izražene že vse potrebne encime in ni bilo faze prilagajanja, ko smo jo predstavili v testno mešanico (Brandt in sod., 2004). Občutljivost obeh biomas je bila v sredini predpisanega intervala ( $IC_{50}$  za 3,5-diklorofenol naj bi bil med 5 in 30 mg/l, pri metodi z zaviranjem hitrosti porabe kisika) in je znašala  $12,0 \pm 3,5$  mg/l za BODseed in  $15,8 \pm 1,7$  mg/l za Micropan Complex (preglednica 9). Manjša občutljivost liofilizirane biomase je mogoče posledica zaščitnih snovi, ki jih celice proizvedejo pred liofilizacijo ali pa dodatkov k celicam pred liofilizacijo (Chen in sod., 2001). Verjetno so prisotne v liofilizirani biomasi

tudi drugačne bakterije in praživali, zato se občutljivost razlikuje. Razlike v občutljivosti različnih virov aktivnega blata so znane iz raziskav drugih avtorjev (Strotmann in sod., 1993; Strotmann in Eglsäer, 1994a; Strotmann in sod., 1994b; Dalzell in Christofi, 2002). Po pregledu teh podatkov smo se odločili, da je bolj primerna komercialna biomasa Micropan Complex, ker je v primerjavi z BODseed veliko cenejša in bolj primerna za uporabo (je v 10 kg embalaži in lahko zatehtamo željeno koncentracijo potrebno za preskus, BODseed pa je pakirana v kapsulah v katerih je po 0,4 g liofiliziranih bakterij). V kapsulah BODseed je poseben konzorcij izbranih vrst bakterij, ki zagotavlja ponovljive rezultate za BPK test in v njej niso vključeni vsi mikroorganizmi, ki običajno sodelujejo pri biološkem čiščenju (BOD reagents for wastewater testing, 1995). Aktivna biomasa Micropan Complex pa vsebuje več različnih bakterij in praživali in je tudi zato bolj podobna združbi na čistilni napravi (Micropan Complex: tehniški opis, 2003).

Odvisnost občutljivosti aktivne biomase od časa izpostavitve smo dokazali z aktivnim blatom iz laboratorijskega modela, zato smo preskus ponovili z enakimi časi izpostavitve strupeni snovi, vendar s komercialno dostopno biomaso Micropan Complex. Za nadaljevanje ugotavljanja strupenosti odpadnih vod smo morali ugotoviti tudi najprimernejši čas izpostavitve komercialne biomase strupeni snovi. Rezultati naših raziskav kažejo na zmanjševanje  $IC_{20}$  in  $IC_{50}$  z daljšanjem izpostavitve komercialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu, vendar s precej manjšim standardnim odklonom (preglednici 5 in 6). Trend naraščanje občutljivosti z daljšanjem časa izpostavitve je opazen že pri  $IC_{20}$ . Aktivno biomaso Micropan Complex sestavljajo liofilizirane bakterije (Micropan Complex: tehniški opis, 2003). Biomaso v prahu smo en dan prej rehidrirali in dodali vsa potrebna hranila, tako, da je bila v preskusu vedno približno enako stara. Tako smo zagotovili čim bolj podobno biomaso med ponovitvami poskusov. Aktivna biomasa Micropan Complex je tudi veliko bolj homogena, saj nastajajo manjši kosmi, ki ne povzročajo težav pri pipetiranju in tako je v vsaki testni epruveti zagotovljena enaka količina biomase. Rezultati kažejo (slika 6), precej večjo  $R^2$  vrednost trendne črte kot pri aktivnem blatu iz laboratorijskega modela (slika 5). To pomeni, da se trendna črta precej bolje prilega podatkom. Naklon obeh trendnih črt je zelo podoben, kar potrjuje našo domnevo, da se z daljšanjem časa izpostavitve aktivnega blata strupeni snovi 3,5-diklorofenolu, povečuje občutljivost testa. Iz teh rezultatov smo zaključili, da je

najprimernejši čas izpostavitve aktivnega blata strupeni snovi 120 minut. Ta čas predstavlja kompromis med trajanjem testa, ki naj bi bil čim krajši in občutljivostjo testa, ki je poleg ostalih dejavnikov odvisna tudi od kontaktnega časa med strupeno snovjo in mikroorganizmi v aktivnem blatu (Gendig in sod., 2003).

Metode za ugotavljanje strupenosti smo najprej primerjali z uporabo referenčne spojine 3,5-diklorofenol. Najbolj je bil občutljiv test z merjenjem luminiscence z *V. fischeri* (preglenica 8) verjetno zato, ker bakterije niso vključene v kosme in strupena snov takoj prodre v celice (Hoffman in Christofi, 2001). *V. fischeri* je morska bakterija in ni prilagojena na strupene snovi, ki pa so ji združbe v aktivnem blatu lahko (Santos in sod., 2005). Ta test je imel tudi najmanjši standardni odklon, kar dokazuje, da je zelo standariziran in ni mogočih veliko drugih vplivov na rezultate testa. Test zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda z majhno koncentracijo aktivnega blata) in test z merjenjem koncentracije mikrobne ATP sta dala primerljive rezultate ( $IC_{50}$  za prvi test je  $15,8 \pm 1,7$  mg/l in  $14,5 \pm 1,7$  mg/l za drugega), kar kaže, da bi v tem primeru ATP test služil enako dobro kot standardna metoda. Tudi standardni odklon ni velik, kar kaže na izboljšano ponovljivost ATP metode v primerjavi s postopkom, ki ga je opisala Podgorelec (2004).

Rezultati ugotavljanja strupenosti odpadnih voda so pokazali drugačno sliko. Odpadna voda A, ki je izhajala iz farmacevtske industrije je bila premalo strupena kar za dva testa. Samo v testu z bakterijami *V. fischeri* z merjenjem luminiscence smo dokazali zadostno strupenost odpadne vode, da smo lahko izračunali zaviralne koncentracije ( $IC_{50}$  je bil  $6,5 \pm 1,0$  vol %). Tako ne moremo primerjati koncentracij zaviranja, vendar lahko predpostavimo, da je test z *V. fischeri* najbolj občutljiv. Oba testa z uporabo aktivnega blata sta pokazala premajhno občutljivost na odpadno vodo za izračun zaviralnih koncentracij, kar namiguje na to, da odpadna voda ne bi bila strupena za organizme aktivnega blata na čistini napravi, kot to prikazuje test z bakterijami *V. fischeri*. Ta test pokaže večje zaviranje zaradi razlogov, ki smo jih že opisali v prejšnjem odstavku. Rezultati kemijskih analiz Centralne čistilne naprave Domžale-Kamnik kažejo, da so v odpadni vodi A ostanki polarnih organskih topil, ki vplivajo na strupenost vzorca, vendar so glede na naše teste, v dovolj majhnih koncentracijah, da ne vplivajo na proces čiščenja

na čistilni napravi. Odpadna voda A je bila organsko onesnažena, ker sta se pokazali velike KPK in  $BPK_5$  vrednosti.

Obratno sliko dobimo z vzorcem odpadne vode B iz kovinske industrije. Tukaj pokažeta strupenost test zaviranja hitrosti porabe kisika ( $IC_{50}$  je bil  $39,73 \pm 3,0$  vol %) in merjenje koncentracije mikrobnega ATP ( $IC_{50}$  je bil  $14,4 \pm 6,8$  vol %), test z merjenjem luminiscence *V. fischeri* pa ne (preglednica 12). To ni v skladu s trditvijo, da je test z *V. fischeri* bolj občutljiv, zato sklepamo, da so bile v odpadni vodi snovi, ki ovirajo zanesljivo izvedbo testa z *V. fischeri*. Kemijska analiza odpadne vode B, ki so jo opravili na CČN Domžale-Kamnik, je pokazala, da so v odpadni vodi velike koncentracije kovin (preglednica 17). Tudi drugi avtorji poročajo, da kovine v vzorcu vplivajo na test z *V. fischeri* (Christofi in sod., 2002; Codina in sod., 1993), kar ima za posledico slabšo občutljivost testa. Opazimo tudi, da je test z merjenjem ATP bolj občutljiv kot referenčna metoda z merjenjem zaviranja hitrosti porabe kisika. Kaže, da smo z optimizacijo časa in spremembo aktivne biomase resnično dosegli izboljšanje občutljivosti ATP testa (Podgorelec, 2004).

Tudi odpadna voda C iz farmacevtske industrije je bila premalo strupena za dva testa enako, kot odpadna voda A. Zaviranje smo zaznali samo s testom z bakterijami *V. Fischeri*,  $IC_{50}$  je bil  $22,0 \pm 4,7$  vol % (preglednica 13). Prav tako kot preskusi z odpadno vodo A, kažejo, da so bakterije *V. fischeri* bolj občutljive na strupene snovi in zato ne pokažejo primerljive občutljivosti in realnih vplivov na mikroorganizme aktivnega blata.

Z odpadno vodo D iz usnjarske deponije smo zaznali zaviranje z vsemi tremi testi. S testom z bakterijami *V. fischeri* smo zaznali zelo veliko strupenost, že  $1,8 \pm 0,1$  vol % odpadne vode je pokazalo 50% zmanjšanje luminiscence.  $IC_{50}$  za test zaviranja hitrosti porabe kisika je bil kar precej višji, in sicer  $59,8 \pm 7,0$  vol %, z ATP testom pa smo ugotovili, da je bil  $IC_{50}$  večji od 100 vol % (preglednica 14). Ta rezultat ni ustrezen, saj je standardni odklon precej velik, kar verjetno izhaja iz težav pri vzorčenju (nehomogenost vzorca). V vodi so bili namreč delci, ki so se zelo hitro posedali in za ATP test je potrebno veliko manj vzorca, kot pri testu zaviranja hitrosti porabe kisika zato so možna večja

odstopanja. Kemijske analize so pokazale, da je voda močno onesnažena (preglednica 16), zato velika strupenost v primerjavi z ostalimi preiskanimi vodami ne preseneča.

S prilagoditvijo časa izpostavitve aktivnega blata strupeni snovi v ATP testu in spremembo vira biomase smo izboljšali občutljivost in ponovljivost testa v primerjavi s postopkom, ki ga je opisala Podgorelec (2004). Iz primerjav metod lahko sklepamo, da so bakterije *V. fischeri* preveč občutljive, da bi pokazale ustrezne vplive na aktivno blato, vendar bi test vseeno lahko služil za hiter pregled (screening) odpadne vode, ker traja manj časa kot drugi dve preizkušani metodi. Za ustrezno oceno vpliva odpadne vode na delovanje čistilne naprave je smiselno in bolj zanesljivo uporabiti aktivno blato, ki je nosilec biološkega čiščenja. Metoda merjenja koncentracije mikrobnega ATP je nekoliko krajša od testa zaviranja hitrosti porabe kisika in z njo dobimo primerljive rezultate, zato bi jo lahko uporabljali tudi v rutinskem ugotavljanju strupenosti vtoka na čistilne naprave. S testiranjem odpadnih vod smo potrdili (Dalzell in sod., 2002), da z uporabo enega samega testa vedno ne moremo ustrezno ugotavljati strupenosti, zato priporočamo uporabo več testov, ki temeljijo na različnih principih, med njimi tudi metodo merjenja koncentracije mikrobnega ATP.

## 5.2 SKLEPI

- S podaljšanjem časa izpostavitve aktivnega blata strupeni snovi na 120 minut smo izboljšali občutljivost metode merjenja mikrobne ATP, ki je tako primerljiva s testom zaviranja hitrosti porabe kisika po standardu SIST ISO 8192.
- Izbor ustreznega vira aktivne biomase je pozitivno doprinesel k izboljšani ponovljivosti metode merjenja mikrobne ATP in olajšal izvedbo testa. Komercialna biomasa Micropan Complex lahko uspešno nadomesti zamudno namnoževanje biomase v laboratorijskem modelu čistilne naprave.
- Preskusi na industrijskih odpadnih vodah so potrdili primernost metode merjenja mikrobne ATP za ocenjevanje strupenosti vtoka odpadnih vod na čistilne naprave.
- Ker z eno samo metodo ne moremo zanesljivo ugotavljati strupenosti, priporočamo uporabo več metod z različnimi načini ugotavljanja strupenosti, saj so takšni rezultati veliko bolj zanesljivi.
- V nadaljnjih preiskavah bi bilo potrebno ATP metodo validirati in jo standarizirati, potem bi jo lahko rutinsko uporabljali za ugotavljanje strupenosti vtoka odpadnih voda na čistilne naprave.

## 6 POVZETEK

Razvoj v gospodarstvu in povečanje populacije, pa tudi vedno večje zavedanje za ohranjanje okolja so sprožili zahteve po vedno večji učinkovitosti čiščenja odpadnih voda. Dobro delovanje čistilnih naprav pa je pomembno tudi za življenje v vodah, kamor se odpadne vode iztekajo. Če pride do vtoka strupenih snovi na čistilno napravo, je biološko čiščenje le-te okrnjeno in tako lahko vsa voda odteče neočiščena v reke in ima kot taka usodne posledice za življenje v rekah. Zato so razvili različne teste strupenosti, s katerimi ugotavljamo vplive odpadnih voda na mikroorganizme, ki sodelujejo pri čiščenju. Ker se je metoda merjenja mikrobnega ATP izkazala kot primerna za ugotavljanje strupenosti (Podgorelec, 2004), smo metodo optimizirali v smislu povečanja občutljivosti metode in zanesljivosti rezultatov. Tako prilagojeno metodo smo nato primerjali z dvema standardnima testoma (metodo merjenja zaviranja hitrosti porabe kisika po standardu SIST ISO 8192 in test z bakterijami *Vibrio fischeri* z merjenjem luminiscence po standardu SIST ISO 11348-2) na resničnih vtokih odpadnih vod na čistilne naprave.

Najprej smo ugotavljali najprimernejši čas izpostavitve mikroorganizmov aktivne biomase strupeni snovi 3,5-diklorofenolu z namenom izboljšanja občutljivosti metode ob čim krajšem trajanju izvedbe testa. Najprimernejši se je izkazal čas 120 minut, zato smo vse naslednje teste z merjenjem ATP izvajali pri taki časovni izpostavitvi. Zaradi tehničnih težav z aktivnim blatom iz laboratorijskega modela, ki so po našem mnenju najbolj vplivali na ponovljivost rezultatov metode merjenja mikrobnega ATP, smo se odločili, da preizkusimo druge vire aktivne biomase. Z metodo zaviranja hitrosti porabe kisika smo preverili, če aktivni biomasi BODseed in Micropan Complex ustrezata zahtevam v standardu SIST ISO 8192 (1986). Na osnovi ekonomskih in manipulativnih razlogov smo za primernejšo določili aktivno biomaso Micropan Complex, čeprav sta bili obe aktivni biomasi primerno aktivni in občutljivi.

S tako prilagojeno metodo smo nato primerjali strupenostne teste na vzorcih vtokov na čistilne naprave. Kot najbolj strupeno se je izkazala voda iz usnjarske deponije, kot najmanj pa voda iz farmacevtske industrije. Poleg metode z merjenjem mikrobnega ATP in metode merjenja zaviranja hitrosti porabe kisika smo vključili še test z bakterijami *Vibrio*



*fischeri* z merjenjem luminiscence, ki se je izkazala za najbolj občutljivo od vseh treh metod ocenjevanja strupenosti. Ker pa v testu niso vključeni mikroorganizmi aktivnega blata kot pri drugih dveh metodah, je težko trditi, da s to metodo realno ocenimo vpliv odpadne vode na združbo v čistilni napravi. Drugi dve metodi sta dali v večini primerov primerljive rezultate, kar je potrdilo hipotezo, da bomo z prilagoditvami izboljšali občutljivost metode merjenja mikrobnega ATP. Glede na prejšnje rezultate (Podgorelec, 2004) smo izboljšali tudi ponovljivost metode, saj je v večini primerov standardni odklon manjši kot prej.

Ugotovili smo, da je metoda merjenja mikrobnega ATP primerna kot ena izmed metod za ugotavljanje strupenosti strupenih snovi ali odpadnih vod in z njo dobimo podobne rezultate kot s standardno metodo z merjenjem zaviranja hitrosti porabe kisika. V prihodnosti bi bilo potrebno narediti še validacijo metode in tako uradno potrditi primernost. Ker traja krajši čas in je njena izvedba prostorsko ugodnejša, bi se ta metoda lahko uvedla za spremljanje strupenosti vtoka na čistilne naprave. Zadnji del raziskave nam je tudi pokazal, kako različne rezultate lahko dobimo z uporabo različnih metod, zato priporočamo, da se strupenostni testi ne bi izvajali samo z enim testom, kljub temu, da to pogosto zaradi časovnih in denarnih omejitev ni mogoče.

## 7 VIRI

Aptula A.O., Netzeva T.I., Valkova I.V., Cronin M.T.D., Schultz T.W., Kühne R., Schuurmann G. 2002. Multivariate discrimination between modes of toxic action of phenols. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 21: 12-22

Archibald F., Method M., Young F., Paice M.G. 2001. A simple system to rapidly monitor activated sludge health and performance. *Water Research*, 35: 2543-2553

Arretxe M., Heap J.M., Christofi N. 1997. The effect of toxic discharges on ATP content in activated sludge. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 12: 23-29

Belkin S., Smulski D.R., Dadon S., Vollmer A.C., Van Dyk T.K., LaRosa R.A. 1996. Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a *katG::lux* fusion. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2252-2256

Benedict R.G., Carlson D.A. 1971. Aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge. *Water Research*, 5, 11: 1023-1030

BOD reagents for wastewater testing. 1995. Loveland, Hach Company

<http://www.hach.com/fmmimghach?/CODE%3AL14124900%7C1> (junij 2005): 1 str.

Brandt B.W., Kelpin F.D.L., van Leeuwen I.M.M., Kooijman S.A.L.M. 2004. Modelling microbial adaptation to changing availability of substrates. *Water Research*, 38, 4: 1003-1013

Chaudri A.M., Knight B.P., Barbosa J.V.L., Preston S., Paton G.I., Killham K. et al. 1999. Determination of acute Zn toxicity in pore water from soils previously treated with sewage sludge using bioluminescence assays. *Environmental Science and Technology*, 33: 1880-1885

Chen L.C., Chian C.Y., Yen P.S., Chu C.P., Lee D.J. 2001. High-speed sludge freezing. *Water Research*, 35, 14: 3502-3507

Choi S.H., Gu M.B. 2002. A portable toxicity biosensor using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, 17: 433-440

Christofi N., Hoffmann C., Tosh L. 2002. Hormesis responses of free and immobilized light-emitting bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52, 3: 227-231

Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20<sup>th</sup> ed. Baltimore, Maryland, U.S.A., United Book Press: 1161 str.

Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D., Rice E.W. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21<sup>st</sup> ed. Baltimore, Maryland, U.S.A., United Book Press: 1368 str.

Codina J.C., Perez-Garcia A., Romero P., de Vicente A. 1993. A comparison of microbial bioassays for the detection of metal toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25, 2: 250-254

Dalzell D.J.B., Alte S., Aspichueta E., de la Sota A., Etxebarria J., Gutierrez M., Hoffmann C.C., Obst U., Christofi N. 2002. A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere*, 47:535-545

Dalzell D.J.B., Christofi N. 2002. An ATP luminiscence method for direct toxicity assessment of pollutants impacting on the activated sewage sludge process. *Water Research*, 36: 1493-1502

DIN 38 404-C4. Determination of temperature. 1976: 12 str.

DIN 38 409-H9. Determination of sediment volume in water and waste water with a sample volume of 1 l. 1980: 7 str.

DIN 38406-32. German standard methods for the examination of water, wastewater and sludge – Cations (Group E) – Determination of iron by atomic absorption spectrometry (AAS) (E32). 2000: 15 str.

Dovgan R. 2005. Študij sposobnosti biorazgradnje izcedne vode usnjarske deponije. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerzitetni študijski program biokemije: 102 str.

Dular M., Roš M., Trontelj A., Kompare B., Tišler T. 1997. Izrazje s področja voda. Ljubljana, Slovensko društvo za zaščito voda: 107 str.

Dutka B.J., Nyholm N., Petersen J. 1983. Comparison of several microbiological toxicity screening tests. *Water Research*, 17, 10: 1363-1368

Elnabarawy M.T., Robideau R.R., Beach S.A. 1988. Comparison of three rapid toxicity test procedures: Microtox<sup>®</sup>, Polytox<sup>®</sup>, and activated sludge respiration inhibition. *Toxicity Assessment*, 3: 361-70

Environmental Protection Agency. 1991. Technical support for water-quality based toxics control. EPA 505/2-9-001 (PB91-127415). Washington D.C., Environmental Protection Agency: 335 str.

Environmental Protection Agency. 1996. Ecological effects test guidelines: OPPTS 850.6800 Modified activated sludge, respiration inhibition test for sparingly soluble chemicals. EPA 721-C-96-168. Washington D.C., Environmental Protection Agency,: 7 str.

Farre M., Pasini O., Alonso M.C., Castillo M., Barcelo D. 2001. Toxicity assessment of organic pollution in wastewaters using a bacterial biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 426: 155-165

Freitas dos Santos L.F., Defrenne L., Krebx-Brown A. 2002. Comparison of three microbial assay procedures for measuring toxicity of chemical compounds: ToxAlert 10, CellSense and Biolog MT2 microplates. *Analytica Chimica Acta*, 456: 41-54

Gendig C., Domogala G., Agnoli F., Pagga U., Strotmann U.J. 2003. Evaluation and further development of the activated sludge respiration inhibition test. *Chemosphere*, 52, 1: 143-149

Gernaey A.K., Petersen B., Ottoy J-P., Vanrolleghem P. 2001. Activated sludge monitoring with combined respirometric-titrimetric measurements. *Water Research*, 35: 1280-1294

Grau P., Da-Rin B.P. 1997. Management of toxicity effects in large wastewater treatment plant. *Water Science Technology*, 36, 2-3: 1-8

Gu M.B., Gil G.C. 2001. A multi-channel continuous toxicity monitoring system using recombinant bioluminescent bacteria for classification of toxicity. *Biosensors and Bioelectronics*, 16: 661-666

Gu M.B., Gil G.C., Kim J.H. 2002. Enhancing the sensitivity of a two-stage continuous toxicity monitoring system through the manipulation of the dilution rate. *Journal of Biotechnology*, 93. 283-288

Hammer M.J., Hammer M.J. Jr. 2001. *Water and wastewater technology*. 4<sup>th</sup> ed. New Jersey, Prentice Hall: 536 str.

Hastings J.W., Nealson K.H. 1977. Bacterial bioluminescence. *Annual Review of Microbiology*, 31: 549-95

Hiley P. 1996. Selection of toxicity assays for multiple test protocols used in wastewater quality control and treatment optimisation. V: Trapp J.F., Hunt S.M., Wharfe J.R. (eds.). Toxic impacts of wastes on the aquatic environment. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 200-207

Hoffmann C., Christofi N. 2001. Testing the toxicity of influents to activated sludge plants with the *Vibrio fischeri* bioassay utilising a sludge matrix. Environmental Toxicology, 16: 422-427

Holm-Hansen O., Karl D.M. 1978. Biomass and adenylate energy charge determination in microbial cell extracts and environmental samples. Methods in Enzymology, 57: 73-58

Institut za ekološki inženiring. 2005. Domžale, Centralna čistilna naprava Domžale-Kamnik.

<http://www.iei.si/projekti/slo/DetailsPDF/Domzale.pdf> (avgust 2005): 3 str.

Jönson K., Grunditz C., Dalhammar G., Jansen Jla C. 2000. Occurrence of nitrification inhibition in Swedish municipal wastewater. Water Research, 34: 2455-2462

Jørgensen P.E., Eriksen T., Jensen B.K. 1992. Estimation of viable biomass in wastewater and activated sludge by determination of ATP, oxygen utilization rate and FDA hydrolysis. Water Research, 26, 11: 1495-1501

Kahru A., Kurvet M., Külm I. 1996. Toxicity of phenolic wastewater to luminescent bacteria *Photobacterium phosphoreum* and activated sludges. Water Science and Technology, 33, 6: 139-146

Ko J., Woo H., Copp J.B., Kim S., Kim C. 2002. Evaluation of several respirometry-based activated sludge toxicity control strategies. Water Science and Technology, 45, 4-5: 143-150

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.

Lajoie C.A., Lin S-C., Kelly C.J. 2003. Comparison of bacterial luminescence with activated sludge oxygen uptake rates during zinc toxic shock loads in a wastewater treatment system. *Journal of Environmental Engineering*, 129: 879-883

Laubenberger G., Hartmann L. 1971. Physical structure of activated sludge in aerobic stabilization. *Water Research*, 5, 6: 335-341

Liao J-D., Wang S-H., Hsu D-J. 2001. Studies on early detection of wastewater's toxicity using a microbial sensing system. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 72, 2: 167-173

Lundin A. 2000. Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Methods in Enzymology*, 305: 346-370

Madigan T.M., Martinko J.M., Parker J. 2000. *Brock biology of microorganisms*. 9<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River, Prentice Hall: 991 str.

Mayer P., Wernsing J., Tolls J., de Maagd P.G.J., Sijm D.T.H.M. 1999. Establishing and controlling dissolved concentrations of hydrophobic organics by partitioning from a solid phase. *Environmental Science and Technology*, 33, 13: 2284-2290

Micropan Complex, tehniški opis. 2003. Vransko, Zavod za biotehnologijo življenja in ekologijo Vransko, Svetovanje, zastopanje in projektiranje na področju ekologije.

<http://www.geneza.ekologija.zavod.web.siol.com/page12.html> (maj 2005): 1 str.

Paixão S.M., Anselmo A.M. 2002. Effects of olive mill wastewaters on the oxygen consumption by activated sludge microorganisms: an acute toxicity test method. *Journal of Applied Toxicology*, 22, 3: 173-176

Patterson J.W., Brezonik P.L., Putnam H.D.1970. Measurement and significance of adenosine triphosphate in activated sludge. *Environmental Science and Technology*, 4: 569-575

Pernetti M., Di Palma L., Merli C. 2003. A real time toxicity bioassay for activated sludge reactor. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 1 (A17): 1-11

Philp J.C., Balmand S., Hajto E., Bailey M.J., Wiles S., Whiteley A.S., Lilley A.K., Hajto J., Dunbar S.A. 2003. Whole cell immobilized biosensors for toxicity assessment of wastewater treatment plant treating phenolics-containing waste. *Analytica Chimica Acta*, 487,1: 61-74

Podgorelec M. 2004. Ugotavljanje akutne strupenosti različnih kemikalij za mikroorganizme aktivnega blata. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 65 str.

Pravilnik o odvajanju in čiščenju komunalne odpadne in padavinske vode. 2002. Uradni list Republike Slovenije, 12, 105: 12311- 12315

Ren S. 2004. Assessing wastewater toxicity to activated sludge: recent research and developments. *Environment International*, 30: 1151-1164

Ren S., Frymier P.D. 2003a. The use of genetically engineered *Pseudomonas* species (Shk1) as a bioluminescent reporter for heavy metal toxicity screening in wastewater treatment plant influent. *Water Environment Research*, 75: 21-29

Ren S., Frymier P.D. 2003b. Comparative study of two bioassays for applications in influent wastewater toxicity monitoring. *Journal of Environmental Engineering*, 129: 216-221



Reteuna C., Vasseur P., Cabridenc R., Lepailleur H. 1986. Comparison of respiration and luminiscent tests in bacterial toxicity assessment. *Toxicity Assessment*, 1: 159-168

Riedel K., Kunze G., König A. 2002. Microbial sensor on a respiratory basis for wastewater monitoring. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 75: 81-118

Roš M. 2001. Biološko čiščenje odpadne vode. Ljubljana, SI, GV založba: 243 str.

Roy D., LeDuy A., Roy P.H. 1983. One year survey of ATP and dynamic behaviour of an activated sludge treatment plant. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 55: 1348-1354

Santos A., Alonso E., Riesco P. 2005. influence of cadmium on performance of an activated SBR sludge treatment. *Environmental Technology*, 26, 2: 127-134

Shoji, R., Sakoda A., Sakai Y., Suzuki M. 2000. Formulating bioassay data of chemicals and environmental water. *Water Science and Technology*, 42, 3: 115-124

Sigma. 1991. Bioluminiscent determination of ATP with luciferase-luciferin. *Technical Bulletin No. BL-100*. St. Louis, Sigma: 5 str.

Singleton P., Sainsbury D. 1996. *Dictionary of microbiology and molecular biology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley and Sons: 1019 str.

SIST EN 5663. Water quality – Determination of Kjeldahl nitrogen – Method after mineralization with selenium. 1996: 12 str.

SIST ISO 5664. Water quality – Determination of ammonium – Distillation and titration method. 1984: 3 str.

SIST ISO 5815-2. Water quality – Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD<sub>n</sub>) – Part 2: Method for undiluted samples. 2003: 13 str.

SIST ISO 5961. Water quality – Determination of cadmium by atomic absorption spectrometry. 1994: 10 str.

SIST ISO 6060. Water quality – Determination of chemical oxygen demand. 1989: 4 str.

SIST ISO 6878. Water quality – Determination of phosphorus – Ammonium molybdate spectrometric method. 1999: 21 str.

SIST ISO 8192. Water quality – Test for the inhibition of oxygen consumption by activated sludge. 1986: 9 str.

SIST ISO 8245. Water quality – Guidelines for determination of total organic carbon (TOC). 1983: 11 str.

SIST ISO 8288. Water quality – Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead – Flame atomic absorption spectrometric methods. 1986: 11 str.

SIST ISO 10523. Water quality – Determination of pH. 1994: 10 str.

SIST ISO 11348-2. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminiscent bacteria test) – Part 2: Method using liquid-dried bacteria. 1998: 13 str.

Smith N.R., Yu Z., Mohn W.W. 2003. Stability of the bacterial community in a pulp mill effluent treatment system during normal operation and system shutdown. *Water Research*, 37, 20: 4873-4884

Solymon P., Boman B., Björndal H. 1976. Continous monitoring of acute-toxic substances in wastewater. *Progress in Water Technology*, 8: 417-422

Stanley P.E. 1986. Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. *Methods in Enzymology*, 133: 14-22

Strotmann U.J., Butz B., Mias W.R. 1993. The dehidrogenase assay with resazurin: practical performance as a monitoring system and pH-dependent toxicity of phenolic compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 25, 1: 79-89

Strotmann U.J., Eglsäer H. 1994. The toxicity of substituted phenols in the nitrification inhibition test and the luminiscent bacteria test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30, 3: 269-273

Strotmann U.J., Eglsäer H., Pagga U. 1994. Development and evaluation of a growth inhibition test with sewage bacteria for assessing bacterial toxicity of chemical compounds. *Chemosphere*, 28, 4: 755-766

Takii S. 1977. Bacterial characteristics of activated sludges treating carbohydrate wastes. *Water Research*, 11, 1: 85-89

Thomulka K.W., Lange J.H. 1996. Effects of different concentrations of sodium chloride in a potting soil and water mixture on the bioluminescence of *Vibrio Harveyi*. *International Journal of Environmental Studies*, 50: 133-137

Thore A., Ansehn S., Lundin A., Bergman S.J. 1975. Detection of bacteriuria by luciferase assay of adenosine triphosphate. *Journal of Clinical Microbiology*, 1, 1:1-8

Tišler T. 1992. Ocenjevanje kronične strupenosti odpadnih in površinskih vod z vodno bolho (*Daphnia magna*). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, oddelek za biologijo: 89 str.

Toman M.J. 1992. Aerobno čiščenje odpadne vode. V: *Biotehnologija*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA: 529-538

Toprak H. 2003. Izmir, Toprak home page, Wastewater engineering. <http://web.deu.edu.tr/atiksu/toprak/ani4091.html> (september 2005): 1 str.

Tzoris A., Fearnside D., Lovell M., Hall E.A.H. 2002. Direct toxicity assessment of wastewater: baroxymeter, a portable rapid toxicity device in the industry perspective. *Environmental Toxicology*, 17: 284-290

Weiß D. Lumineszenz - Chemilumineszenz – Biolumineszenz. 2005. Jena, Friedrich Schiller Universität Jena, Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie.  
<http://www2.uni-jena.de/chemie/institute/oc/weiss/lumineszenz.htm> (avgust 2005): 1str.

WERF. 2000. A review and needs survey of upset early warning devices. Project Number: 99-WWF-2. Alexandria, U.S.A, Water Environment Research Foundation: 150 str.

Wiles S., Whiteley A.S., Philp J.C., Bailey M.J. 2003. Development of bespoke bioluminescent reporters with the potential for in situ deployment within a phenolic-remediating wastewater treatment system. *Journal of Microbiological Methods*, 55: 667-677

Whiteley A.S., Wiles S., Lilley A.K., Philp J.C., Bailey M.J. 2001. Ecological and physiological analyses of *Pseudomonad* species within a phenol remediation system. *Journal of Microbiological Methods*, 44: 79-88

Zrimec A. 2001. Uporaba modela elektrokonformacijske sklopitve pri študiju vpliva spremenljivega električnega polja na delovanje membranskih proteinov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 152 str.

## ZAHVALA

Rad bi se zahvalil vsem, ki so potrpežljivo pomagali pri nastanku tega diplomskega dela.

Še posebej bi se zahvalil:

- Mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar, ki je z svojimi nasveti pomembno pripomogla k izvedbi in kakovosti diplome.

- Somentorici dr. Tatjani Tišler, ki je z budnim očesom spremljala potek laboratorijskega dela in me vzpodbujala v črnih trenutkih.

- Recenzentu prof. dr. Francu Viktorju Nekrepu za objektivno recenzijo diplome.

- Podjetju Delta team d.o.o. za velikodušno štipendijo med študijem.

- Pomočniku direktorja za ekologijo in investicije na Farmah Ihan, dr. vet. med. Jožetu Jurkoviču in Farmam Ihan ter podjetju FI-EKO d.o.o. za potrpežljivost in razumevanje med pisanjem diplome

- Prof. dr. Milenku Rošu, vodji Laboratorija za kemijo, biologijo in tehnologijo voda, ki mi je dovolil opravljati delo pri njih.

- Staršem, Duši, sorodnikom in vsem ostalim, ki so me vzpodbujali in prenašali tekom šolanja.

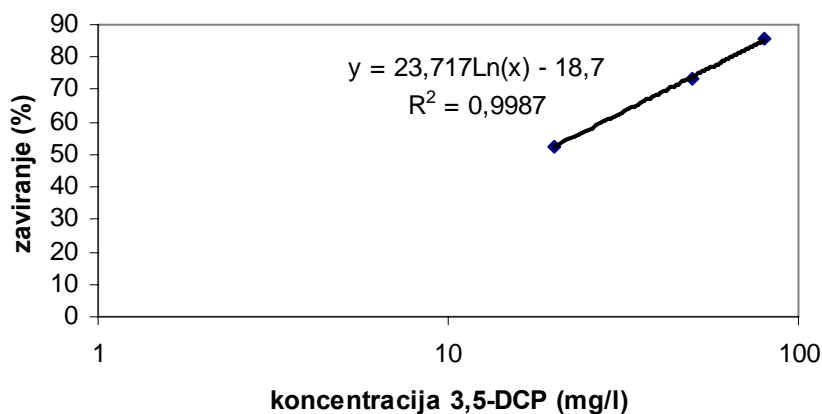
Še enkrat najlepša hvala.

## PRILOGA A

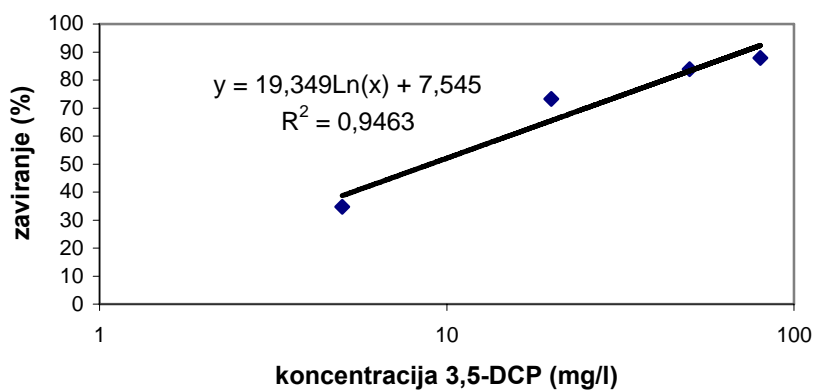
Slike premic zaviranja pridobljene z ATP testom za posamezne čase izpostavitve komercialnega biomase in aktivnega blata iz laboratorijskega modela (poglavje 4.1).

### 1 AKTIVNO BLATO IZ LABORATORIJSKEGA MODELA

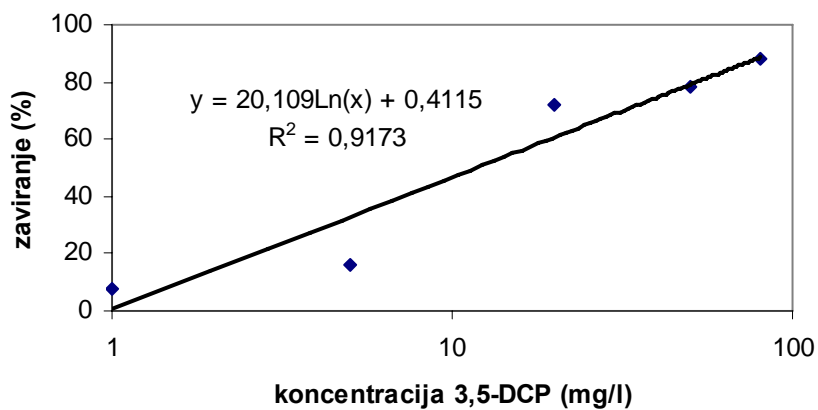
#### 1.1 Prva ponovitev



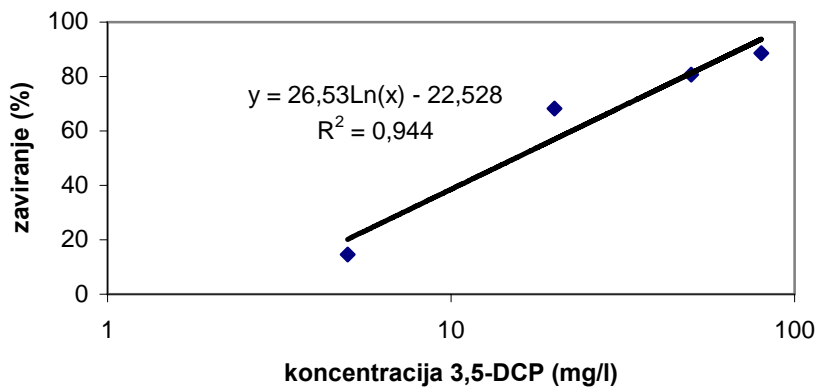
**Slika 1:** Čas izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela 3,5-diklorofenolu 30 minut



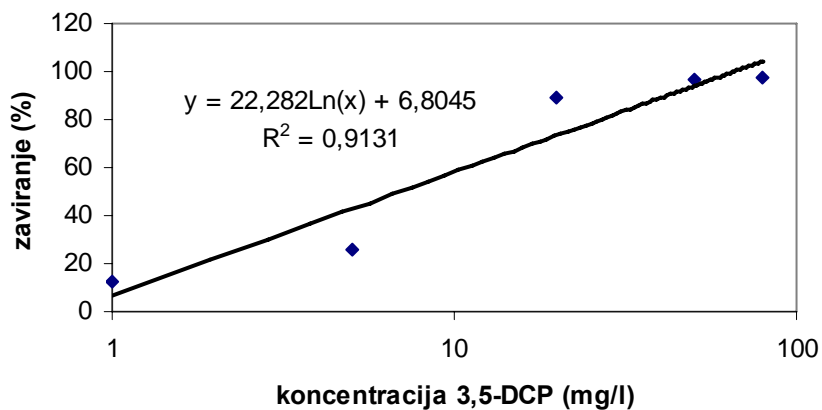
**Slika 2:** Čas izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela 3,5-diklorofenolu 60 minut



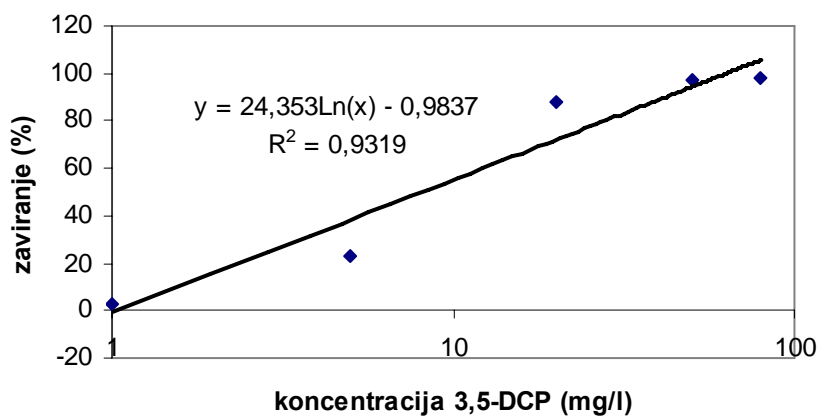
**Slika 3:** Čas izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela 3,5-diklorofenolu 90 minut



**Slika 4:** Čas izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela 3,5-diklorofenolu 120 minut



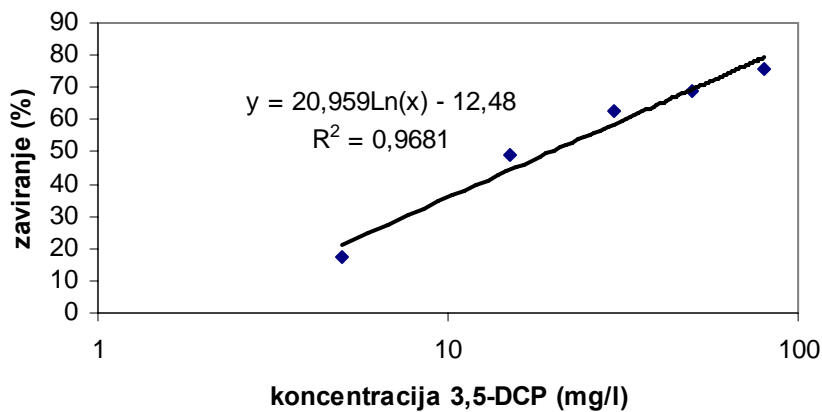
**Slika 5:** Čas izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela 3,5-diklorofenolu 150 minut



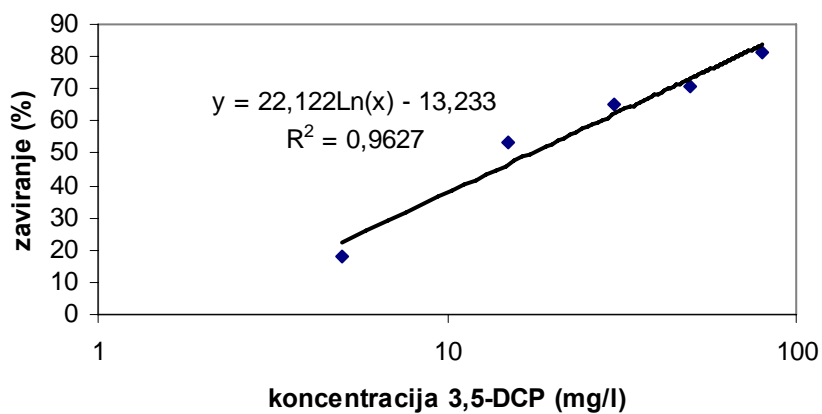
**Slika 6:** Čas izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela 3,5-diklorofenolu 180 minut



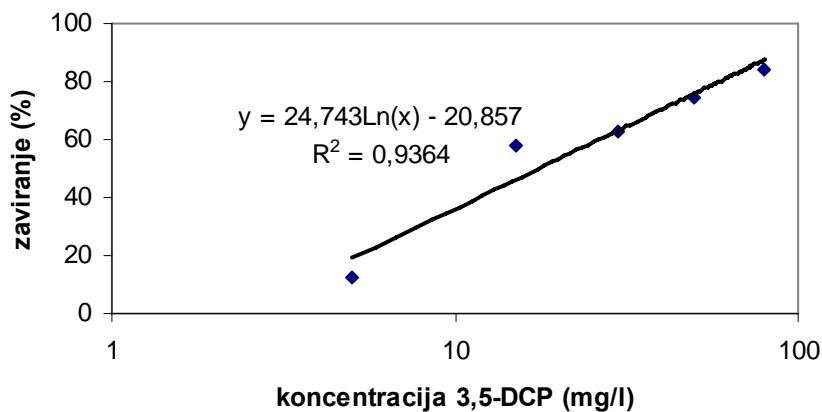
## 1.2 Druga ponovitev



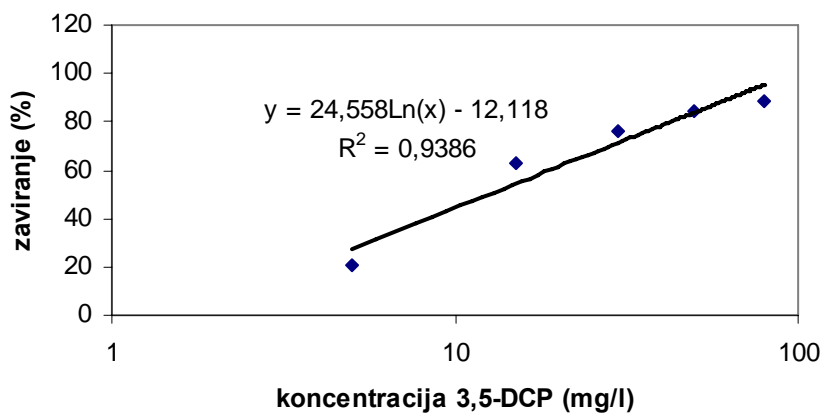
**Slika 7:** Čas izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela 3,5-diklorofenolu 30 minut



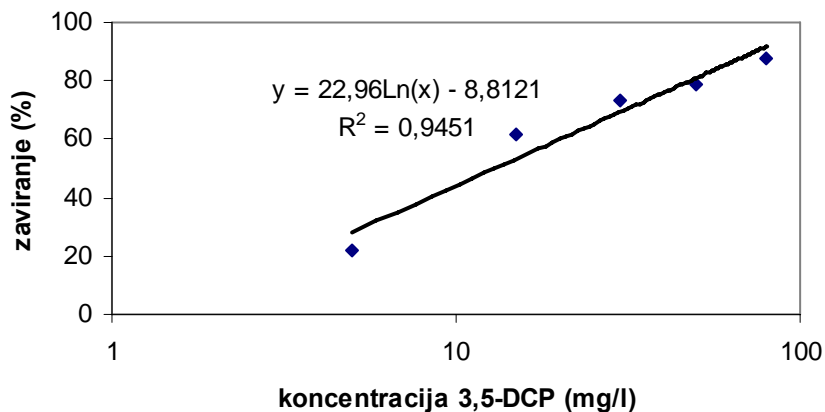
**Slika 8:** Čas izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela 3,5-diklorofenolu 60 minut



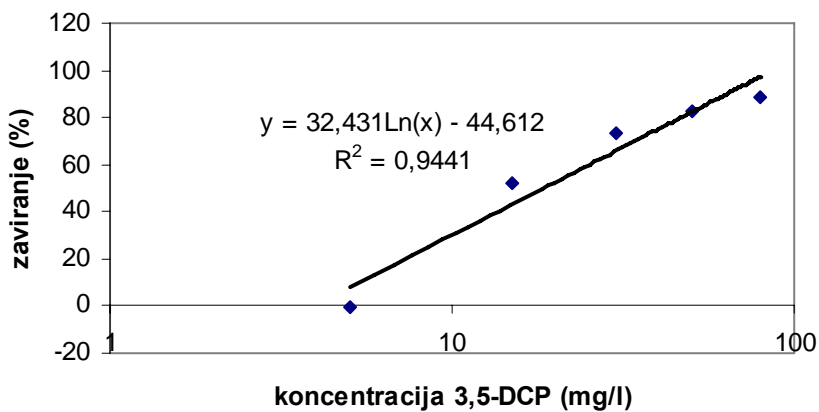
**Slika 9:** Čas izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela 3,5-diklorofenolu 90 minut



**Slika 10:** Čas izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela 3,5-diklorofenolu 120 minut



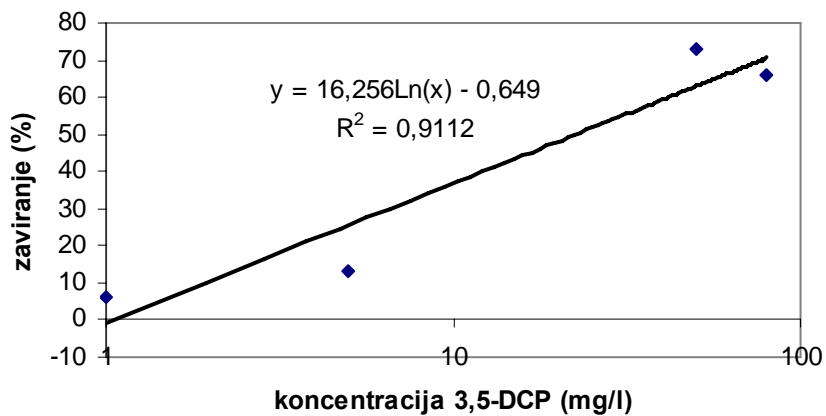
**Slika 11:** Čas izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela 3,5-diklorofenolu  
150 minut



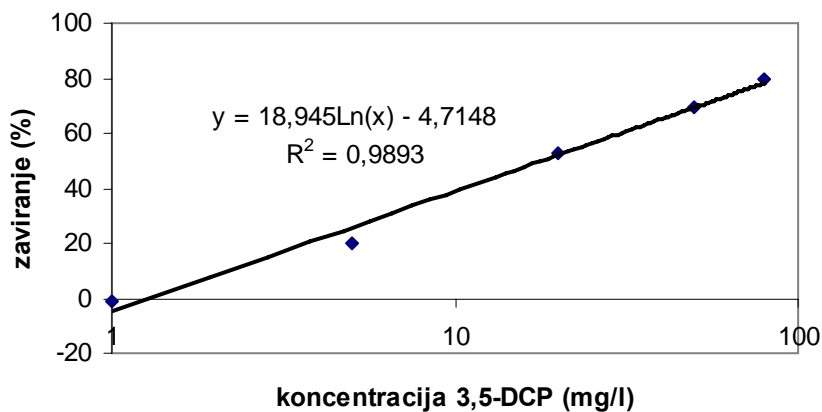
**Slika 12:** Čas izpostavitve aktivnega blata iz laboratorijskega modela 3,5-diklorofenolu  
180 minut

## 2 KOMERCIALNA BIOMASA MICROPAN COMPLEX

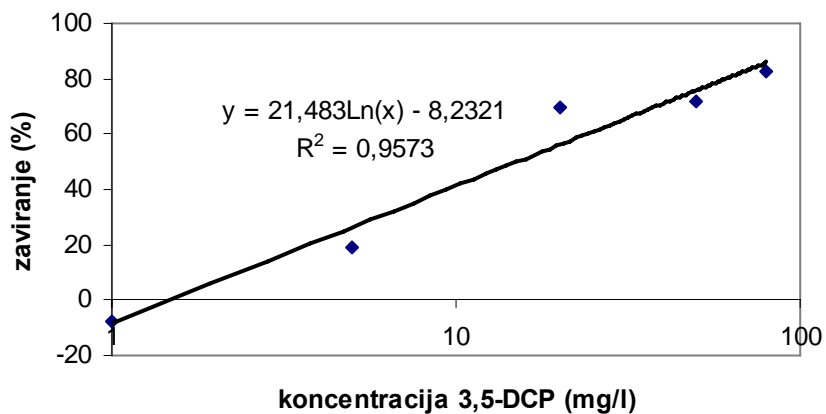
### 2.1 Prva ponovitev



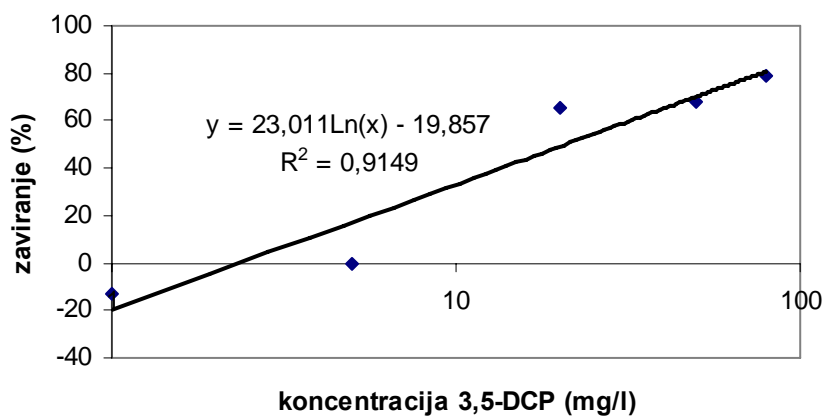
**Slika 13:** Čas izpostavitve komercialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu 30 minut



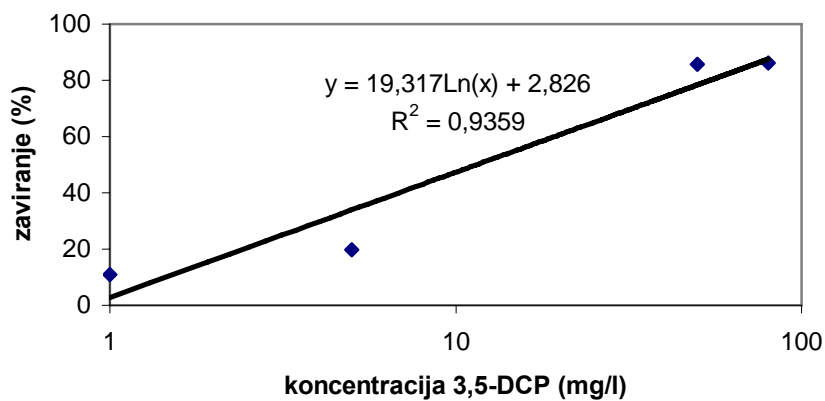
**Slika 14:** Čas izpostavitve komercialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu 60 minut



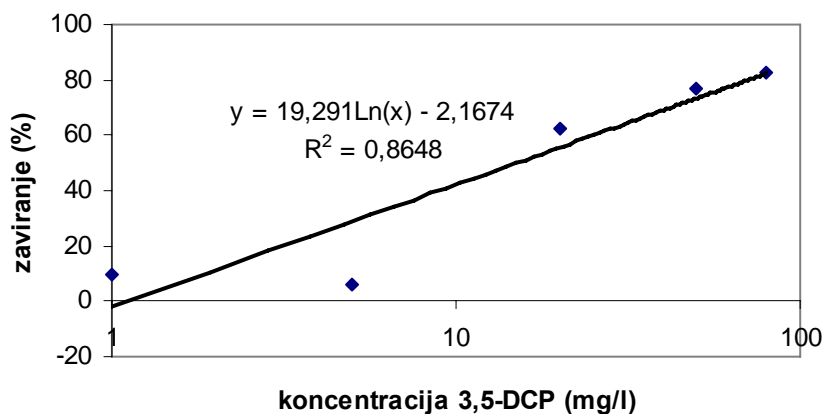
**Slika 15:** Čas izpostavitve komercialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu 90 minut



**Slika 16:** Čas izpostavitve komercialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu 120 minut

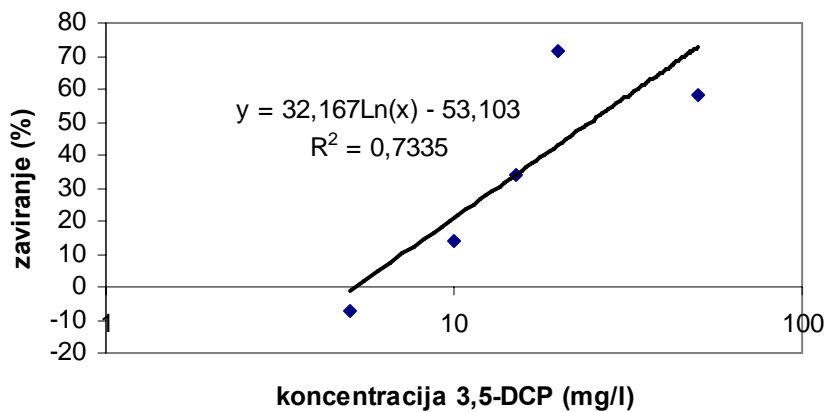


**Slika 17:** Čas izpostavitve komecialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu 150 minut

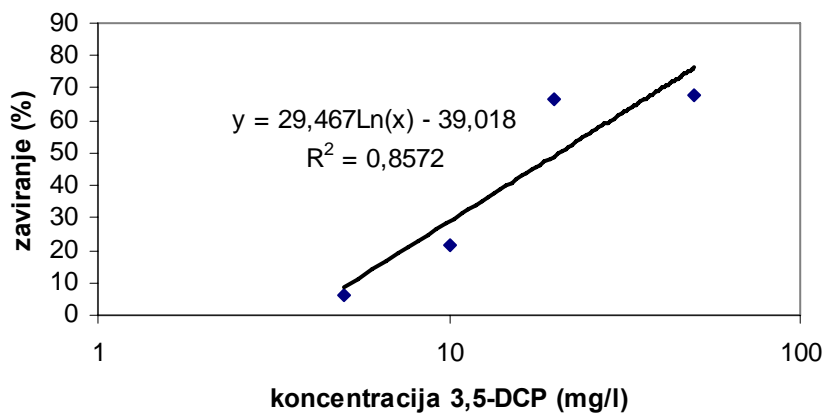


**Slika 18:** Čas izpostavitve komecialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu 180 minut

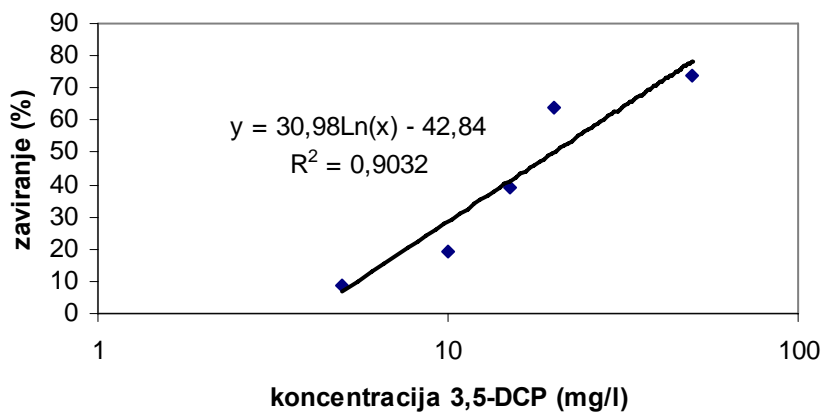
## 2.2 Druga ponovitev



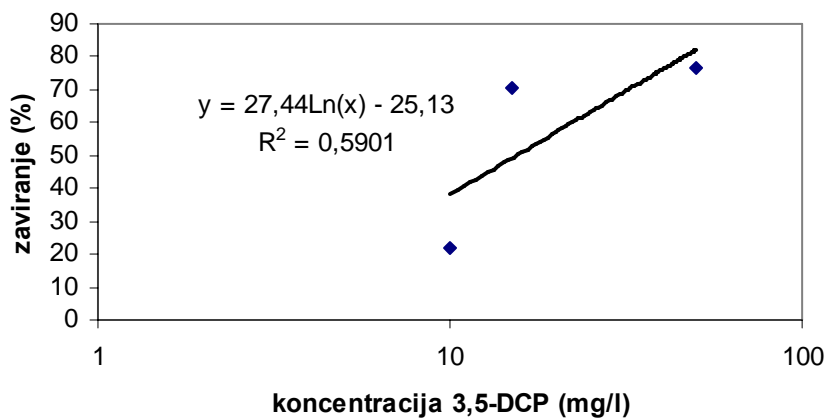
**Slika 19:** Čas izpostavitve komercialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu 30 minut



**Slika 20:** Čas izpostavitve komercialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu 60 minut

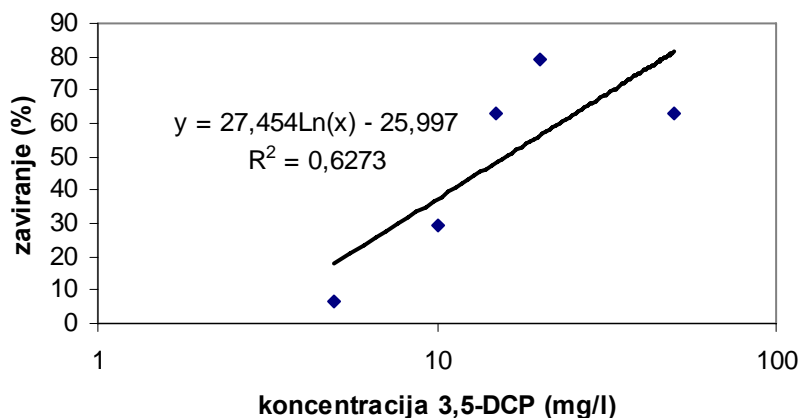


**Slika 21:** Čas izpostavitve komercialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu 90 minut

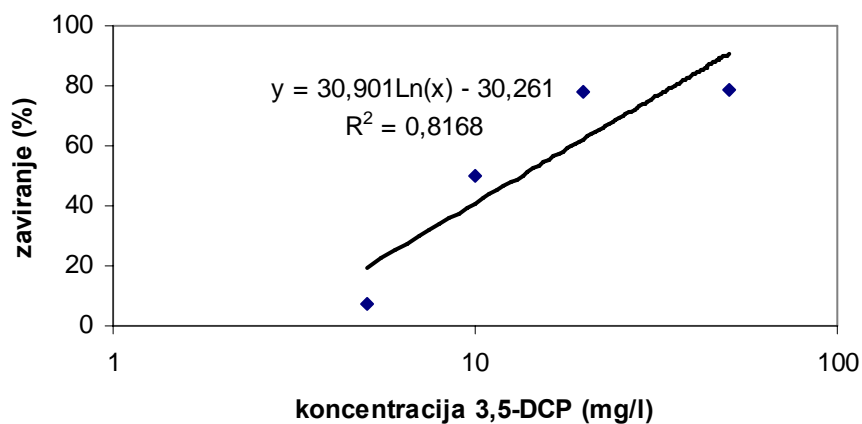


**Slika 22:** Čas izpostavitve komercialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu 120 minut





**Slika 23:** Čas izpostavitve komercialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu 150 minut

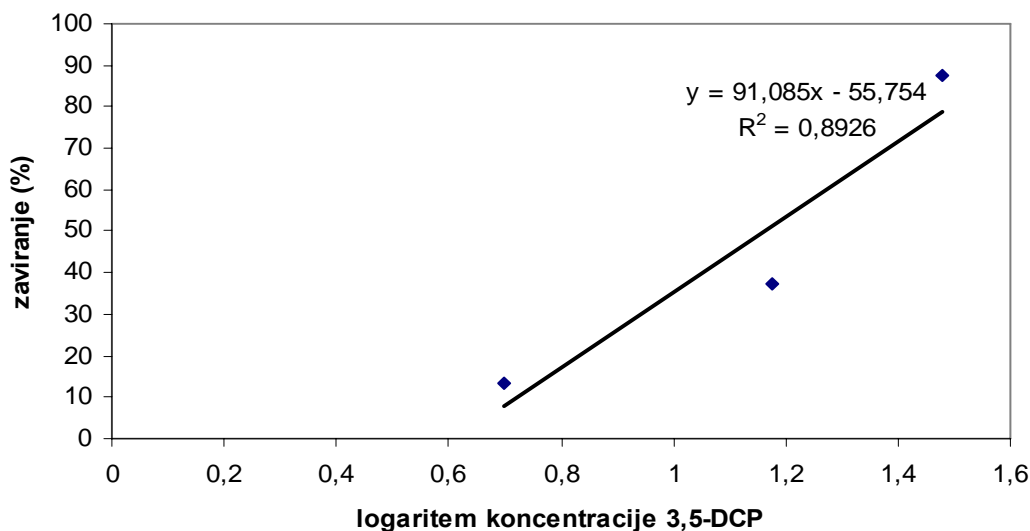


**Slika 24:** Čas izpostavitve komercialne biomase Micropan Complex 3,5-diklorofenolu 180 minut

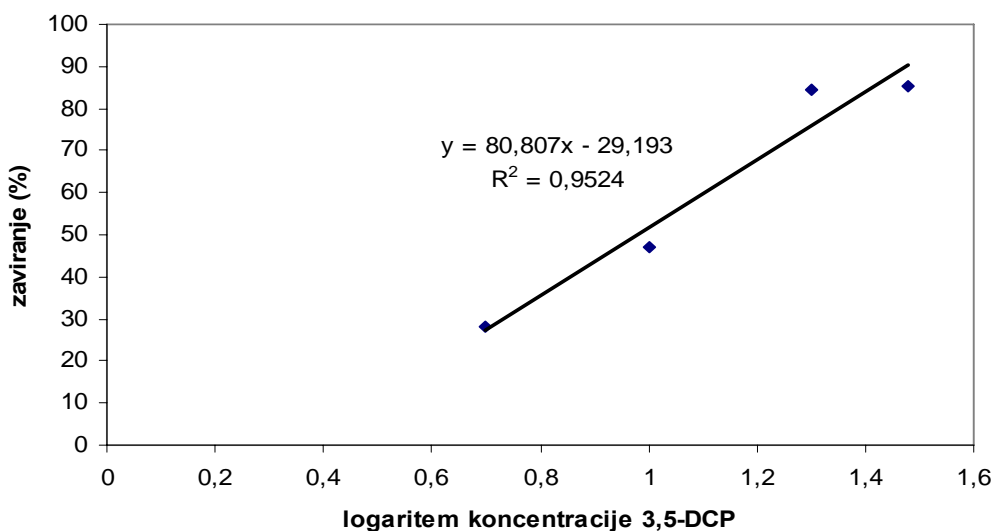
## PRILOGA B

Primernost različnih virov biomase za preverjanje strupenosti (poglavje 4.1.2).

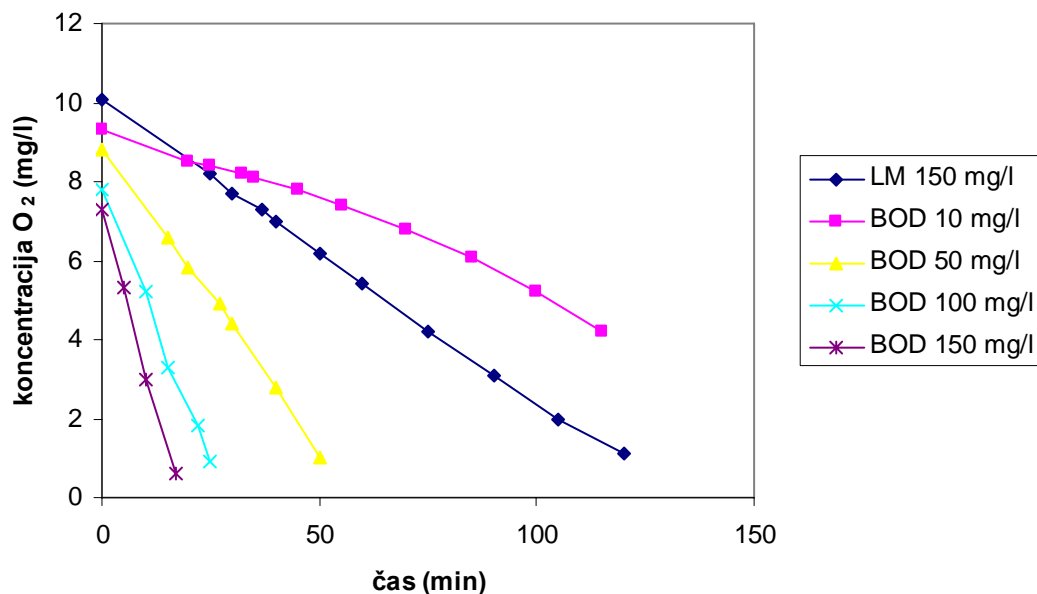
### 1 KOMERCIALNA BIOMASA BODseed



**Slika 1:** Prvo preverjanje občutljivosti komercialne biomase BODseed na 3,5-diklorofenol s testom zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda A)

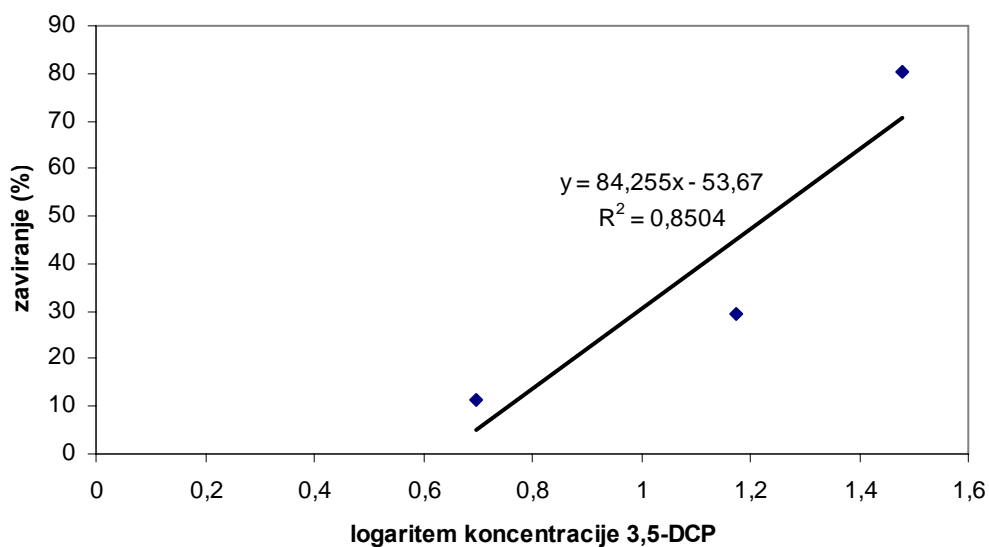


**Slika 2:** Drugo preverjanje občutljivosti komercialne biomase BODseed na 3,5-diklorofenol s testom zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda A)

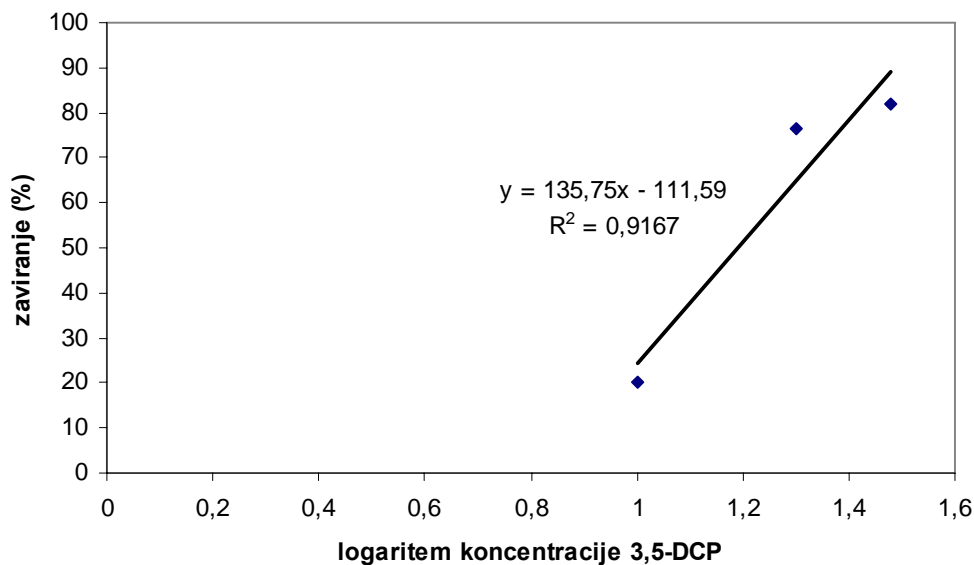


**Slika 3:** Preverjanje primerljive aktivnosti komercialne biomase BODseed z aktivno biomaso iz laboratorijskega modela s testom zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda A)

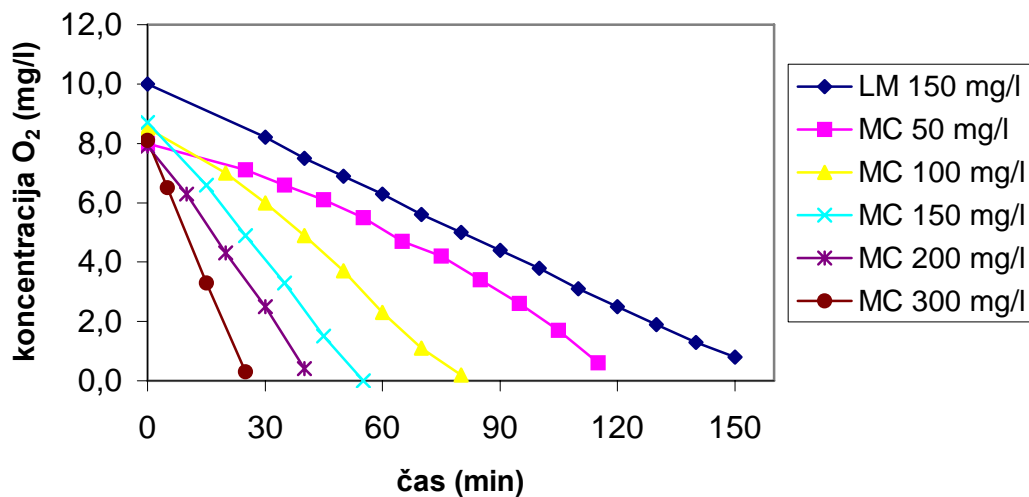
## 2 KOMERCIALNA BIOMASA MICROPAN COMPLEX



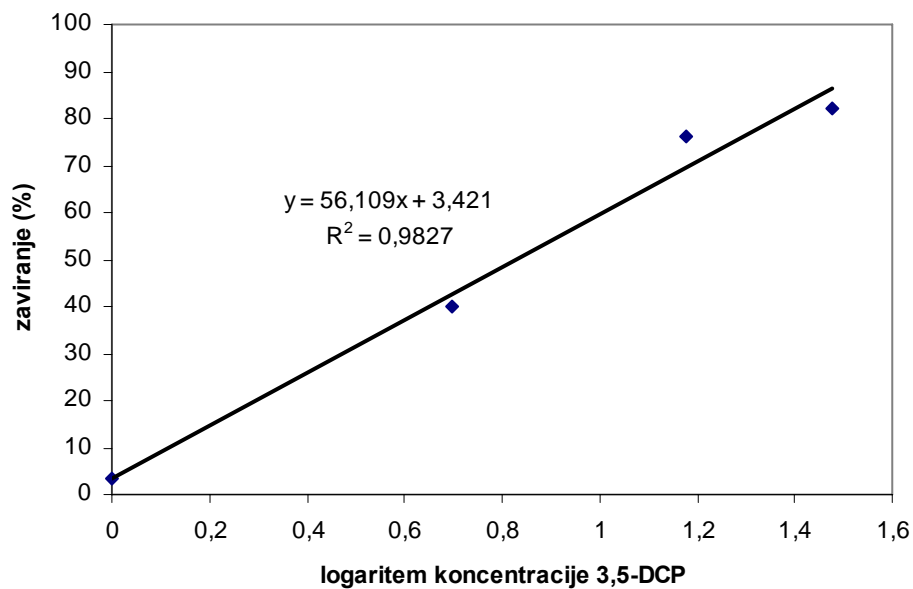
**Slika 4:** Prvo preverjanje občutljivosti komercialne biomase Micropan Complex na 3,5-diklorofenol s testom zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda A)



**Slika 5:** Drugo preverjanje občutljivosti komercialne biomase Micropan Complex na 3,5-diklorofenol s testom zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda A)



**Slika 6:** Preverjanje primerljive aktivnosti komercialne biomase Micropan Complex z aktivno biomaso iz laboratorijskega modela s testom zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda A)



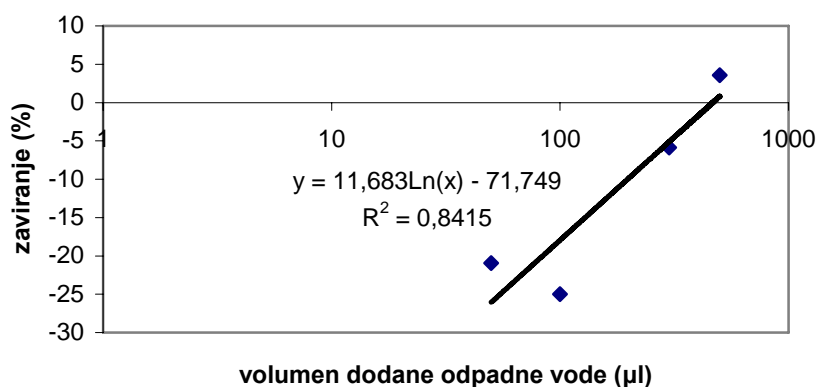
**Slika 7:** Preverjanje občutljivosti aktivne biomase iz laboratorijskega modela na 3,5-diklorofenol s testom zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda A)

## PRILOGA C

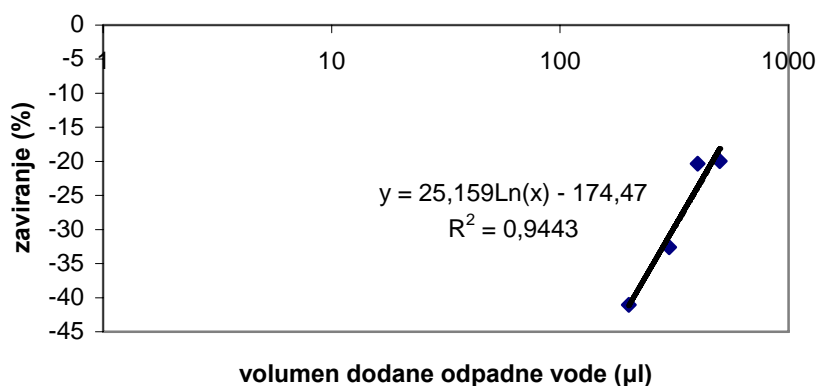
Slike in enačbe premic opravljenih testov pri preverjanju strupenosti odpadnih vod (poglavje 4.2.2).

### 1 ODPADNA VODA A IZ FARMACEVTSKE INDUSTRIJE

#### 1.1 Metoda merjenja koncentracije mikrobnega ATP

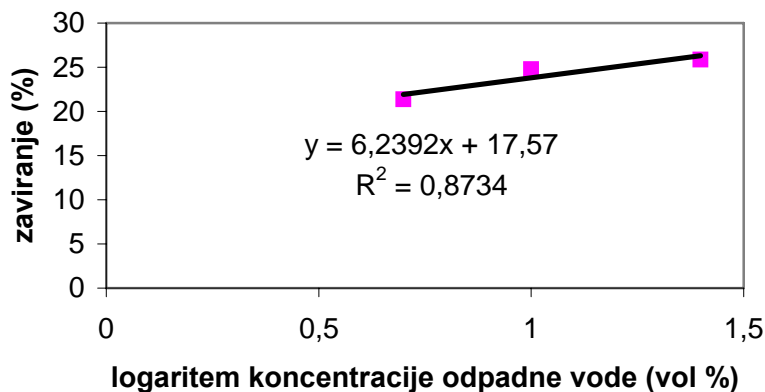


Slika 1: Prvi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode A

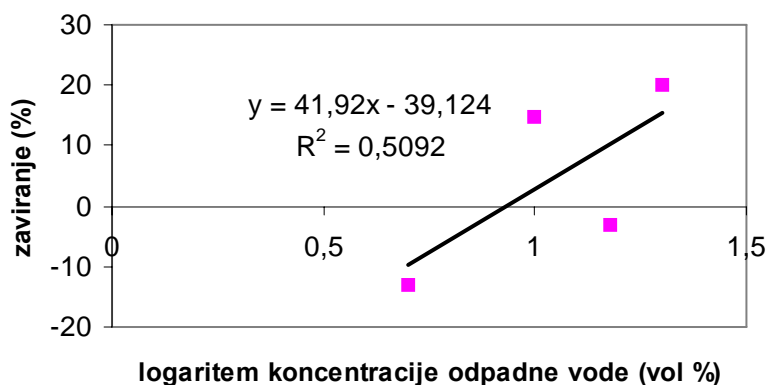


Slika 2: Drugi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode A

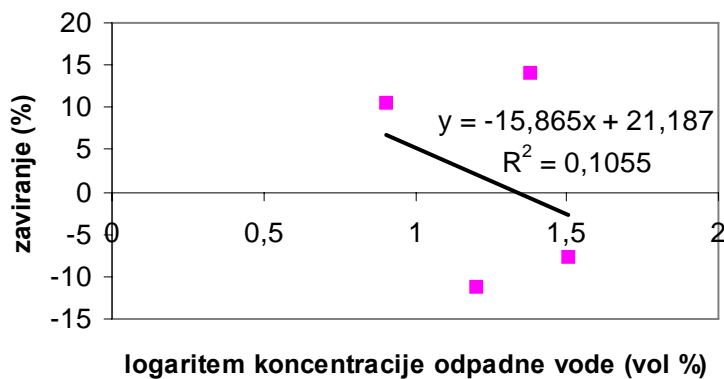
## 1.2 Test zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda B)



Slika 3: Prvi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode A



Slika 4: Drugi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode A



Slika 5: Definitivni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode A

### 1.3 Test z bakterijami *Vibrio fischeri* z merjenjem luminiscence

Enačba premice zaviranja za prvi preliminarni test z odpadno vodo A

$$y = 0,915 x - 0,807$$

Enačba premice zaviranja za drugi preliminarni test z odpadno vodo A

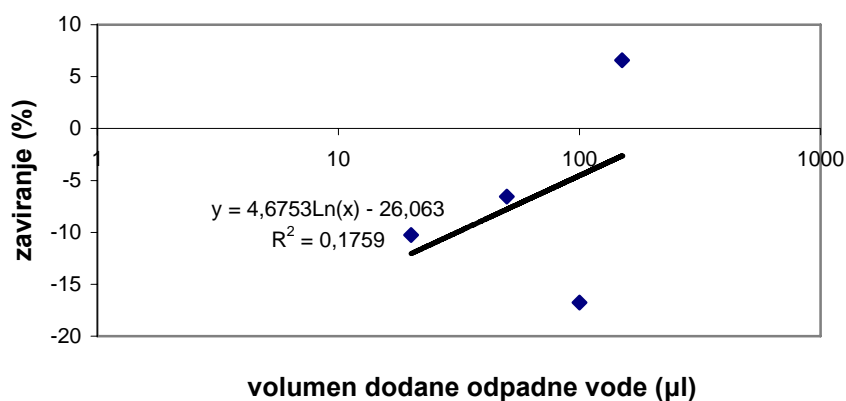
$$y = 0,937 x - 0,699$$

Enačba premice zaviranja za definitivni test z odpadno vodo A

$$y = 1,215 x - 0,991$$

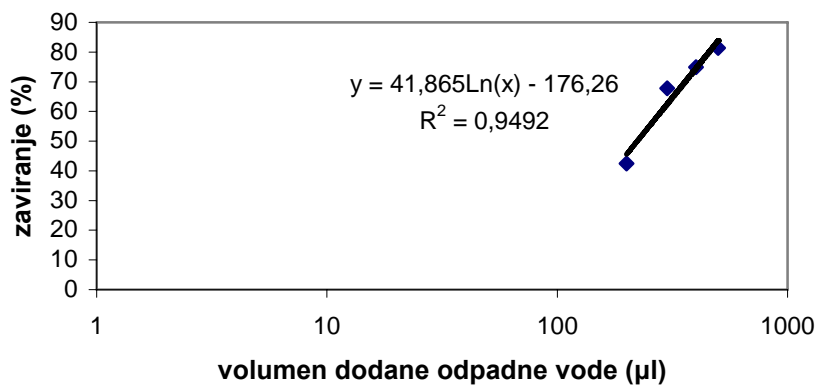
## 2 ODPADNA VODA B IZ KOVINARSKE INDUSTRIJE

### 2.1 Metoda merjenja koncentracije mikrobnega ATP

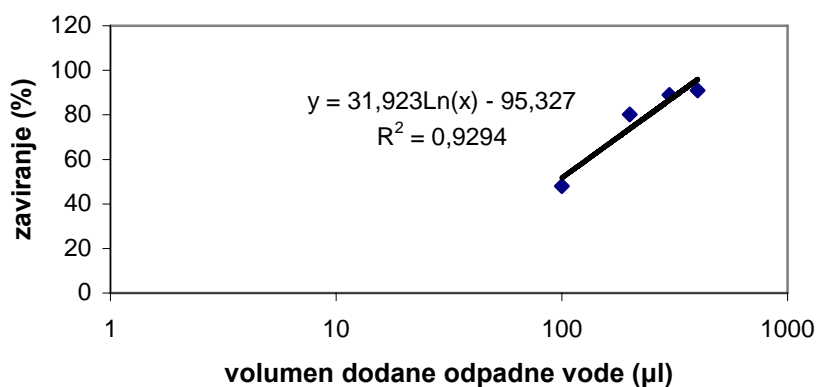


Slika 6: Prvi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode B



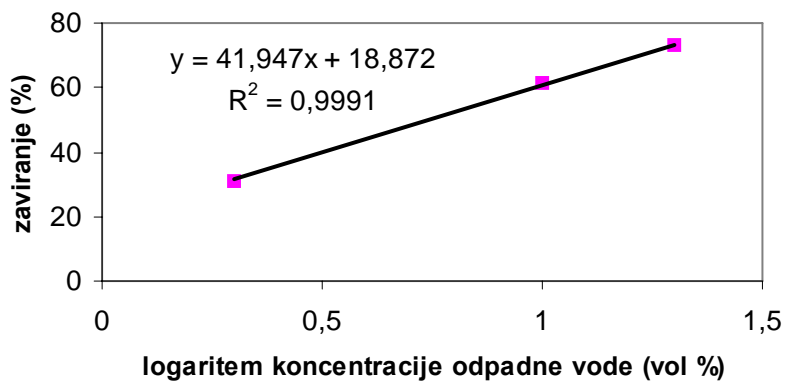


Slika 7: Drugi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode B

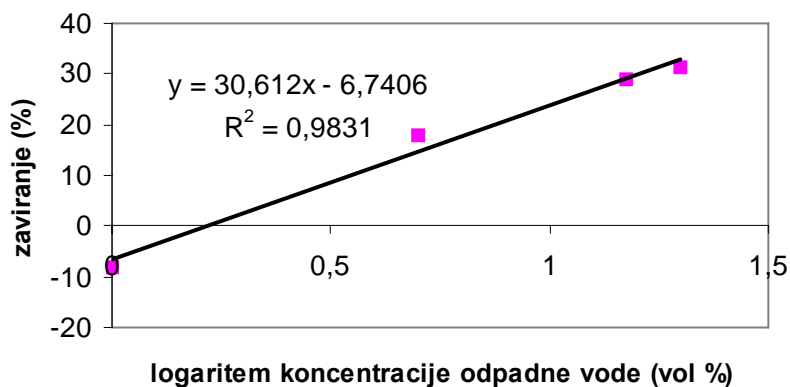


Slika 8: Definitivni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode B

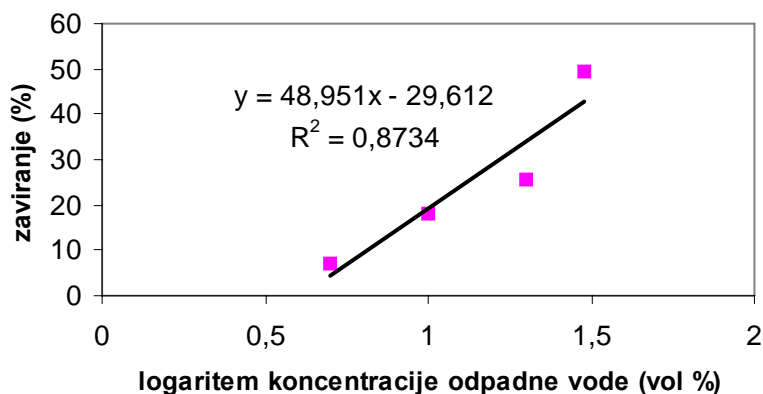
## 2.2 Test zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda B)



Slika 9: Prvi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode B



Slika 10: Drugi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode B



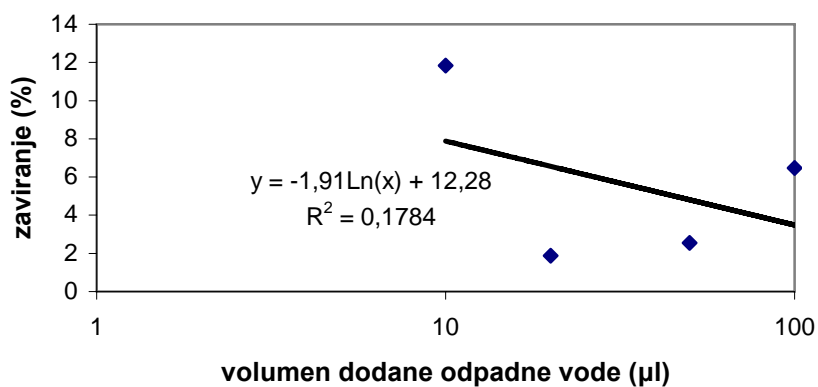
Slika 11: Definitivni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode B

### 2.3 Test z bakterijami *Vibrio fischeri* z merjenjem luminiscence

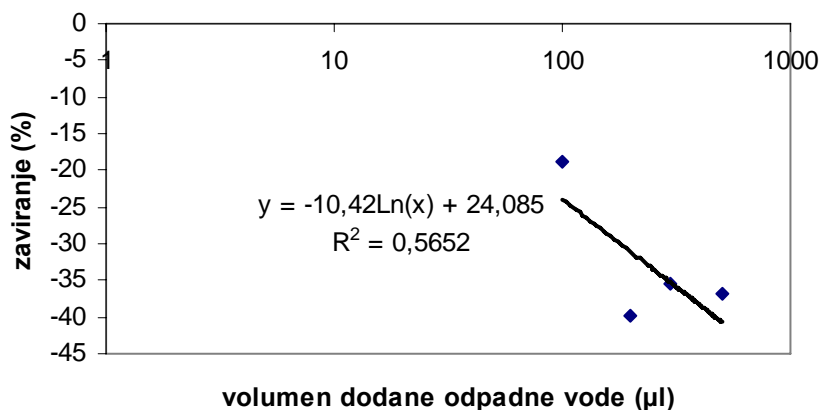
Za odpadno vodo B enačb premic ni bilo možno izračunati, ker koncentracije odpadne vode, ki bi povzročila zaviranje v test ni mogoče dodati

## 3 ODPADNA VODA C IZ FARMACEVTSKE INDUSTRIJE

### 3.1 Metoda merjenja koncentracije mikrobnega ATP

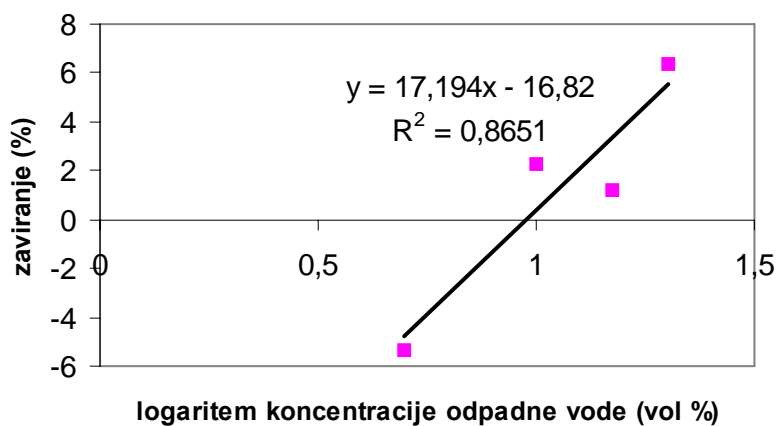


Slika 12: Prvi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode C



Slika 13: Drugi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode C

### 3.2 Test zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda B)



Slika 14: Prvi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode C

### 3.3 Test z bakterijami *Vibrio fischeri* z merjenjem luminiscence

Enačba premice zaviranja za prvi preliminarni test z odpadno vodo C

$$y = 0,618x - 0,824$$

Enačba premice zaviranja za drugi preliminarni test z odpadno vodo C

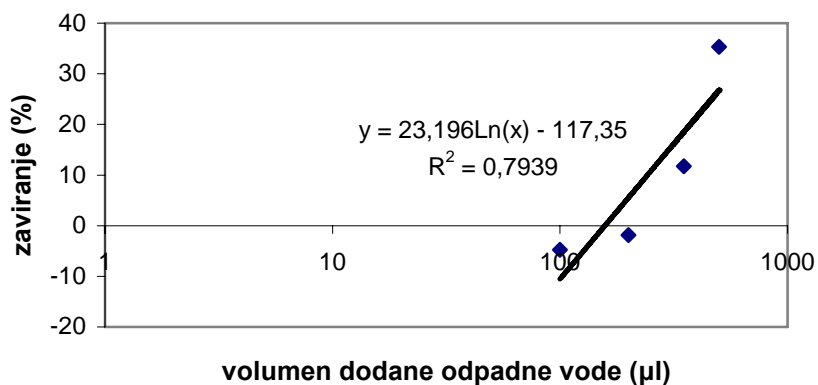
$$y = 0,611 x - 0,819$$

Enačba premice zaviranja za definitivni test z odpadno vodo C

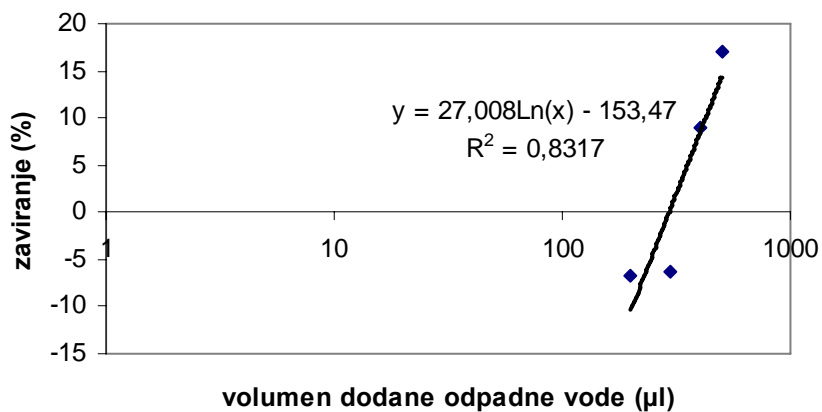
$$y = 0,602 x - 0,75$$

#### 4 ODPADNA VODA D IZ USNJARSKE DEPONIJE

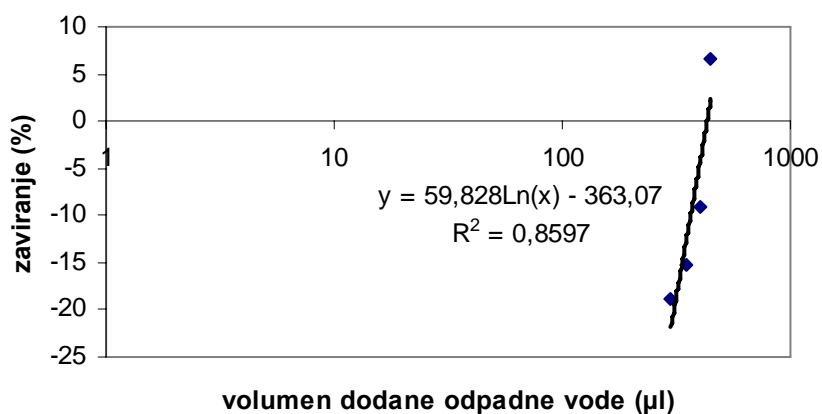
##### 4.1 Metoda merjenja koncentracije mikrobnega ATP



**Slika 15:** Prvi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode D

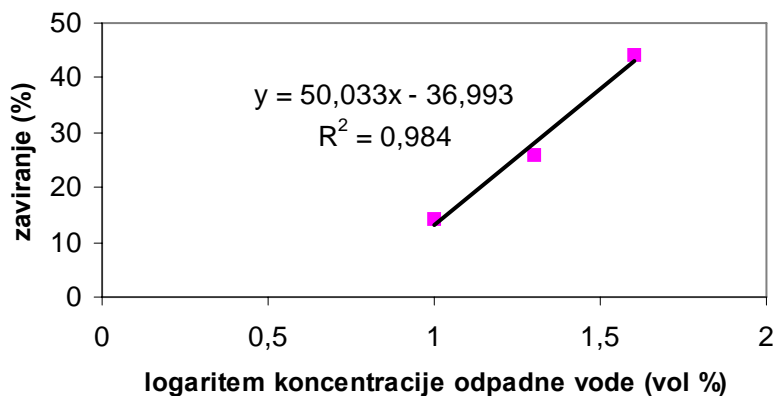


**Slika 16:** Drugi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode D

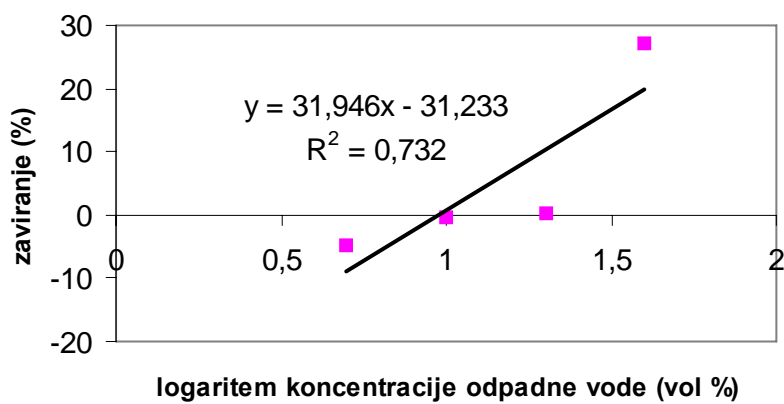


**Slika 17:** Definitivni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode D

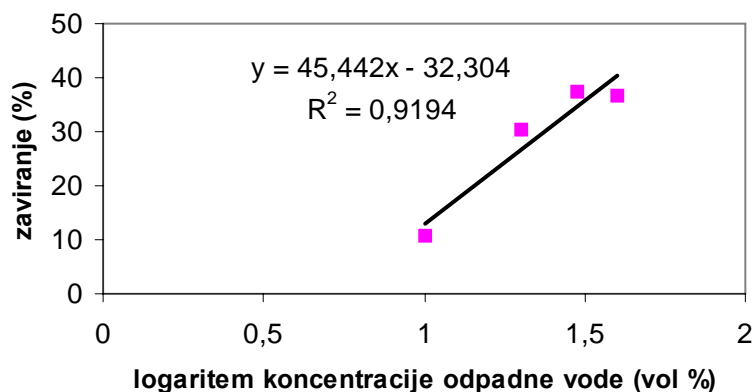
## 4.2 Test zaviranja hitrosti porabe kisika (metoda B)



Slika 18: Prvi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode D



Slika 19: Drugi preliminarni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode D



**Slika 20:** Definitivni test odvisnosti zaviranja od količine dodane odpadne vode D

#### 4.3 Test z bakterijami *Vibrio fischeri* z merjenjem luminiscence

Enačba premice zaviranja za prvi preliminarni test z odpadno vodo D

$$y = 1,322 x - 0,323$$

Enačba premice zaviranja za drugi preliminarni test z odpadno vodo D

$$y = 1,002 x - 0,28$$

Enačba premice zaviranja za definitivni test z odpadno vodo D

$$y = 0,961 x - 0,213$$



## PRILOGA D

Slike in enačbe premic opravljenih testov pri preverjanju strupenosti 3,5-diklorofenola (poglavje 4.2.1).

### 1 METODA MERJENJA KONCENTRACIJE MIKROBNEGA ATP

Glej prilogo A, Slika 16 in Slika 22

### 2 TEST ZAVIRANJA HITROSTI PORABE KISIKA (METODA A)

Glej prilogo B, Slika 4 in Slika 5

### 3 TEST Z BAKTERIJAMI *Vibrio fischeri* Z MERJENJEM LUNINISCENCE

Enačbi premic zaviranja za test z bakterijami *Vibrio fischeri* z merjenjem luminiscence z 3,5-diklorofenolom

Prvič:

$$y = 2,504 x - 1,643$$

Drugič:

$$y = 2,497 x - 1,432$$