

Dorota Kręgiel, Anna Rygała

Występowanie heterotroficznych bakterii z rodzaju *Aeromonas* w wybranym systemie dystrybucji wody

Mikroorganizmy heterotroficzne (zarówno bakterie, jak i grzyby) wymagają do wzrostu dostępności związków organicznych, jako źródła węgla. Heterotrofy są szeroko rozpowszechnione w środowisku wodnym, gdzie zawartość substancji organicznych oraz skład chemiczny i temperatura podlegają dużym zmianom w ciągu roku. Wśród heterotrofów na szczególną uwagę zasługuje mikroflora bakteryjna, oznaczana w standardowych testach mikrobiologicznych wody i określana terminem HPC (heterotrophic plate count). Oznaczenie to obejmuje zarówno bakterie saprofityczne (niechorobotwórcze), patogenne, jak i oportunistyczne patogeny, które mogą wywoływać choroby u ludzi i zwierząt, a zwłaszcza u osobników z upośledzonym systemem odpornościowym.

W grupie bakterii heterotroficznych na szczególną uwagę zasługują gram-ujemne, ruchliwe pałeczki z rodzaju *Aeromonas* [1,2]. Są one zdolne nie tylko do przeżywania, ale i namnażania w wodzie nawet o temperaturze do 10°C. Bakterie *Aeromonas* sp. wykazują większe zdolności do wykorzystywania związków węgla niż inne bakterie gram-ujemne. Badania dotyczące izolacji bakterii z rodzaju *Aeromonas* z wody wykazały zdolność wykorzystywania przez te szczepy nie tylko węglowodanów, aminokwasów, kwasów karboksylowych, ale także kwasów tłuszczowych oraz węglowodorów nasyconych. Wzrost tych bakterii w środowisku wodnym następuje w obecności nawet niewielkiej ilości biodegradowalnych rozpuszczonych związków węgla organicznego (BRWO). Dodatkowo wzrost mikroorganizmów wykorzystujących produkty rozkładu może stymulować fotodegradacja rozpuszczonych substancji organicznych poprzez ekspozycję wody na światło słoneczne. Teoretycznie 0,1mg węgla organicznego może spowodować wzrost liczby komórek bakterii w 1 cm³ wody do rzędu 10⁸ [3]. Obecność nawet niewielkiej ilości fosforu (0,01 gP/m³) powoduje przyspieszenie wzrostu bakterii, przy czym zarówno azot, jak i fosfor stymulują wzrost drobnoustrojów i umożliwiają lepsze wykorzystanie biodegradowalnych rozpuszczonych związków węgla zawartych w wodzie [4].

Bakterie *Aeromonas* sp. należą do prekursorów adhezji i tworzenia obrostów na różnych powierzchniach – tzw. biofilmu [2, 5], powodując często wtórne zanieczyszczenie wody w sieci wodociągowej. Mogą także wytwarzać różne

czynniki wirulencji, odpowiedzialne za ich chorobotwórczość. Uważane są za najistotniejszy czynnik etiologiczny zakażeń ryb. Zarówno u ryb akwariowych, jak i ryb karpiowatych w produkcji towarowej mogą wywoływać zakaźne zapalenie skóry (*erythrodermatitis*). Dla człowieka znaczenie kliniczne mają przede wszystkim trzy gatunki, tj. *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* i *A. veronii*. Szczepy te mogą wywoływać choroby układu pokarmowego u zdrowych ludzi, bądź zakażenia u osób z osłabionym systemem odpornościowym [5,6]. Wykrywanie tych bakterii nie jest jednak uwzględniane w rutynowych badaniach mikrobiologicznych wody. Biorąc pod uwagę właściwości pałeczek *Aeromonas* sp. należy rozważyć celowość ich oznaczania, jako nowego wskaźnika mikrobiologicznego, zwłaszcza w monitoringu systemów zaopatrzenia w wodę [2, 7, 8].

W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące występowania bakterii heterotroficznych z rodzaju *Aeromonas* w systemie dystrybucji dostarczającym niechlorowaną wodę wodociągową oraz ocenę ich właściwości adhezyjnych, warunkujących kolonizację takich systemów.

Materiały i metody

Badania obejmowały ocenę czystości mikrobiologicznej wody z ujęć podziemnych, nie poddawanej procesowi chlorowania. Badania wody przeprowadzono systematycznie, w odstępach tygodniowych przez jeden rok. Jako metodę analityczną zastosowano filtrację membranową (objętość próbki 100 cm³) w aparacie MicrofilTM z wykorzystaniem membran o średnicy porów 0,45 μm (Millipore) oraz podłoża GSP (Merck) z penicyliną i primarycyną. Próbkę wody po filtracji inkubowano w temperaturze 22°C w czasie 72 h. Wyizolowane charakterystyczne żółte kolonie poddano dalszej identyfikacji, obejmującej wykrywanie oksydazy cytochromowej (Bactident Oxidase, Merck) oraz analizę uzdolnień biochemicznych (API 20NE, bioMérieux). Właściwości hemolizujące szczepów sprawdzono na agarze z krwią (Merck) w temperaturze 37°C po 24 h inkubacji.

Adhezyjne właściwości wyizolowanych szczepów oceniono prowadząc inkubację bakterii w 1000-krotnie rozcieńczonej zbuforowanej wodzie peptonowej (Merck) w temperaturze 22°C w czasie do 3 tygodni. Nośnik adhezyjny stanowił polichlorek winylu (PVC) – materiał powszechnie stosowany w instalacjach wodociągowych, mający atest PZH dopuszczający do kontaktu z żywnością i wodą. Płytki PVC o powierzchni 1 cm² umieszczono

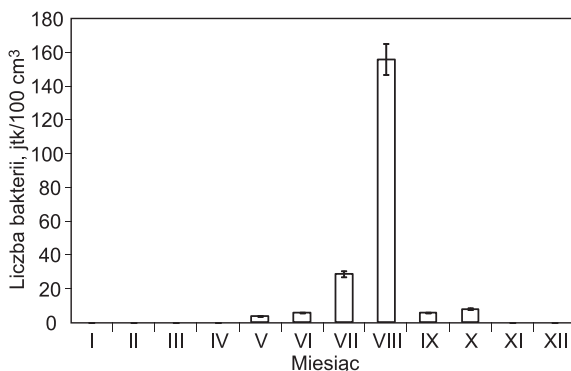
Dr inż. D. Kręgiel, mgr inż. A. Rygała: Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Zakład Mikrobiologii Technicznej, ul. Wólczańska 171/173, 90–924 Łódź

dorota.kregiel@p.lodz.pl

w naczyniu zawierającym hodowlę bakterii o gęstości 10^3 jtk/cm³. Po inkubacji nośniki poddano analizie luminometrycznej, oceniając adhezję komórek *Aeromonas* sp. we względnych jednostkach świetlnych (RLU – relative light units). Jest to metoda pozwalająca na wykrycie zawartości ATP (adenozynotrójfosforanu) w żywych komórkach mikroorganizmów, oparta na zasadzie pomiaru emitowanego światła powstającego podczas enzymatycznego rozkładu ATP. Wyemitowana energia jest proporcjonalna do zawartości ATP w danej próbce i daje się oznaczać za pomocą czułego luminometru. Biofilm bakteryjny tworzący się na powierzchniach PVC zebrano metodą wymazów, a następnie przeprowadzono reakcje enzymatyczne z wykorzystaniem tzw. piór – gotowych zestawów odczynników do prowadzenia reakcji enzymatycznych. Ilość wydzielonego światła w czasie reakcji zmierzono stosując luminometr Hy-Lite2 (Merck) [9]. Badania mikroskopowe nośników PVC wybarwionych fuksyną przeprowadzono stosując mikroskop Olympus BX41 w świetle odbitym. Próbkę kontrolną stanowiła płytka PVC inkubowana w sterylnym roztworze rozcieńczonej wody peptonowej.

Omówienie wyników badań

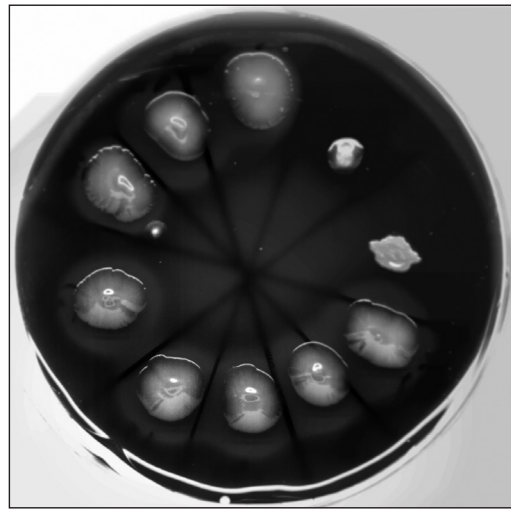
Bakterie z rodzaju *Aeromonas* były wykrywane w systemie dystrybucji wody niechlorowanej w czasie od maja do października, przy czym największy wzrost liczby bakterii wynoszący 156 jtk/100 cm³ odnotowano w sierpniu (rys. 1). Jakkolwiek bakterie te są zdolne do przeżywania w wodzie o temperaturze poniżej 10°C, to jednak ich intensywny wzrost obserwuje się w temperaturze powyżej 15°C. W takich warunkach mogą także wytwarzać czynniki wirulencji [3, 8].



Rys. 1. Występowanie bakterii *Aeromonas* sp. w systemie dystrybucji wody w ciągu roku

Fig. 1. Occurrence of *Aeromonas* sp. bacteria in the water distribution system over a one-year period

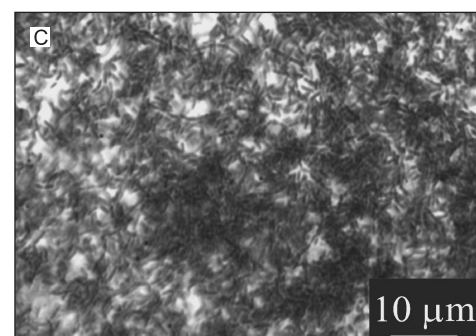
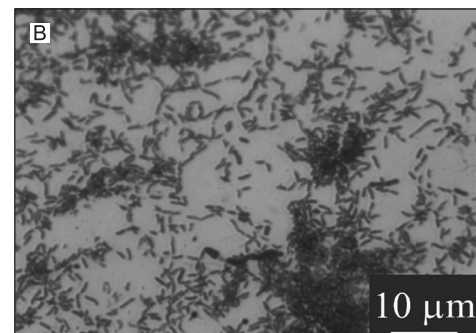
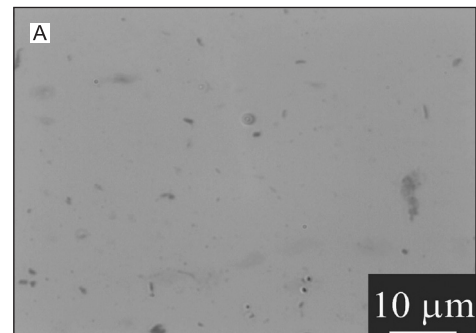
W przeprowadzonych badaniach wody większość wyizolowanych szczepów (ok. 80%) należała do *Aeromonas hydrophila* i wykazywały one β -hemolizę na agarze z krwią (rys. 2). W badaniach [6, 10] szczepy *Aeromonas* sp. wytwarzały wiele czynników – determinantów chorobowości, np. ciepłochwiejną cytotoksynę, aktywne aerolizyny/hemolizyny, lipazy zawierające GCAT, proteazę serynową oraz DNA-azy. Wykazywały one także zdolność pozyskiwania żelaza z ustroju gospodarza za pośrednictwem sideroforów – niskocząsteczkowych związków wykazujących powinowactwo do żelaza (tzw. chelatorów żelaza). Bakterie *Aeromonas hydrophila* opisywane są często jako oportunistyczne patogeny, wywołujące zakażenia u osób z tzw. grup ryzyka [7, 11].



Rys. 2. Właściwości hemolizujące szczepów *Aeromonas hydrophila* na agarze z krwią

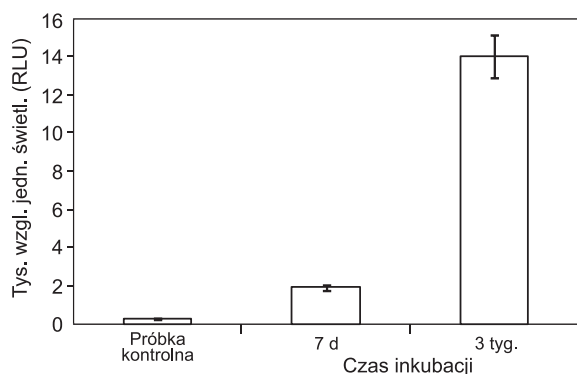
Fig. 2. Hemolysis of *Aeromonas hydrophila* strains on blood agar

Wyizolowane bakterie, w warunkach laboratoryjnych, adherowały do powierzchni PVC (rys. 3 i 4). Tworzenie biofilmu rozpoczynało się od osadzania pojedynczych



Rys. 3. Adhezja *Aeromonas hydrophila* do powierzchni PVC – obserwacje mikroskopowe (A – próbka kontrolna, B – adhezja po 7 d, C – adhezja po 3 tyg.)

Fig. 3. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* to the PVC surface: microscopic observations (A = control sample, B = adhesion after 7 days, C = adhesion after 3 weeks)



Rys. 4. Adhezja *Aeromonas hydrophila* do powierzchni PVC (metoda luminometryczna)

Fig. 4. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* to the PVC surface (luminometric method)

komórek na powierzchni stałej. Po 7 d inkubacji na powierzchni płytek PVC zaobserwowano zaadherowane liczne komórki bakterii (B), które po 3 tygodniach utworzyły mikrokolonie z dużą ilością substancji śluzowatych (C). Wyniki badań mikroskopowych, świadczące o silnych właściwościach adhezyjnych bakterii *Aeromonas* sp. do powierzchni PVC, potwierdza pomiar luminometryczny, którego wynik po 3 tygodniach inkubacji płytek zwiększył się ok. 70-krotnie, w porównaniu z próbką kontrolną.

Tworzenie biofilmu przez bakterie jest często obserwowane w środowisku wodnym, nawet ubogim w składniki odżywcze [12]. Na zjawisko adhezji ma istotny wpływ hydrofilowość/hydrofobowość powierzchni, która decyduje o kolonizacji mikroorganizmów do podłoża. Silne właściwości hydrofobowe nośnika wpływają na większy stopień adhezji komórek bakteryjnych i tworzenie biofilmu [13].

Badania podatności materiałów na obrst biologiczny metodą luminometryczną prowadzone są w wielu ośrodkach naukowych [5, 14–23]. Jako organizmy modelowe znajdują tu zastosowanie nie tylko bakterie, ale także grzyby lub komórki somatyczne. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że pomiar luminometryczny może być z powodzeniem wykorzystany do oceny podatności różnych materiałów instalacyjnych na tworzenie biofilmu.

Podsumowanie

Występowanie bakterii heterotroficznych w wodzie wymaga podejmowania kompleksowych badań, mających na celu poznanie ich fizjologii i uzdolnień biochemicznych. Pozwala to określić ich wpływ na bezpieczeństwo zdrowotne wody w sieci wodociągowej. Wyizolowane z niechlorowanej wody wodociągowej bakterie *Aeromonas hydrophila* wykazały zdolność adhezji do powierzchni PVC, materiału powszechnie stosowanego w instalacjach wodociągowych. Znaczący wpływ na rozwój i adhezję bakterii miała temperatura wody – największy wzrost pałeczek odnotowano w miesiącach letnich (w sierpniu 156 jtk/100 cm³). U wyizolowanych szczepów stwierdzono występowanie jednego z zasadniczych czynników wirulencji, tj. zdolności do hemolizy, co może świadczyć o ich chorobotwórczości.

Biorąc pod uwagę zarówno silne właściwości adhezyjne *Aeromonas* sp., które stymulują tworzenie biofilmu, jak i możliwość występowania różnych czynników wirulencji warunkujących ich patogenność, należy rozważyć włączenie pałeczek z rodzaju *Aeromonas* do rutynowych badań mikrobiologicznych wody, a zwłaszcza do monitoringu funkcjonowania sieci i urządzeń wodociągowych.

LITERATURA

- Guidelines for Drinking Water Quality. Addendum Microbiological Agents in Drinking-water. World Health Organization (WHO), Geneva 2004.
- D. KRĘGIEL, A. RYGAŁA: Ryzyko występowania w wodzie do picia bakterii z rodzajów *Pseudomonas* i *Aeromonas*. *Przemysł Spożywczy* 2006, vol. 60, nr 4, ss. 46–49.
- N.F. LIGHTFOOT: Bacteria of potential health concern. World Health Organization (WHO) Heterotrophic Plate Counts and Drinking-Water Safety. IWA Publishing, London 2003, pp. 61–79.
- I.T. MIETTINEN, T. VARTIAINEN, P.J. MARTIKAINEN: Phosphorus and bacterial growth in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, Vol. 63, No. 8, pp. 3242–3245.
- M. ŚWIDERSKA-BRÓŻ: Czynniki współdecydujące o potencjalne powstawanie i rozwoju biofilmu w systemach dystrybucji wody. *Ochrona Środowiska* 2010, vol. 32, nr 3, ss. 7–13.
- S.V. ALAVANDI, S. ANANTHAN: Biochemical characteristics, serogroups, and virulence factors of *Aeromonas* species isolated from cases of diarrhoea and domestic water samples in Chennai. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2003, Vol. 21, No 4, pp. 233–238.
- EPA Office of Water. *Aeromonas*: Human Health Criteria Document 2006. <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/humanhealth/microbial/aeromonas-200603.pdf>.
- D. KRĘGIEL, A. RYGAŁA: Bakterie *Aeromonas* sp. – nowy wskaźnik mikrobiologiczny? *Przemysł Spożywczy* 2008, vol. 62, nr 11, ss. 46–47.
- D. CAIS-SOKOLIŃSKA J. PIKUL: Evaluation of steel surface cleanliness level in dairies using the bioluminescence method. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2008, Vol. 52, pp. 625–629.
- J.A. SANTOS, C.J. GONZALES, A. OTERO, M.L. GARCIA-LOPEZ: Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, Vol. 65, No. 12, pp. 5612–5614.
- S. KRZYMIŃSKA, A. KAZNOWSKI, M. CHODYSZ: Apoptosis of macrophages cell line induced by *Aeromonas* sp. strains. The 1st Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection MIKROBIOT 2008, p. 55.
- M. PIERŚCIENIAK, N. TRZCIŃSKA, T. SŁOMCZYŃSKI, J. WĄSOWSKI: Problem wtórnego zanieczyszczenia wody wodociągowej. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 2009, nr 39, ss. 28–39.
- C.P. MCCOY, J.F. COWLEY, S.P. GORMAN, G.P. ANDREWS, D.S. JONES: Reduction of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* colonisation on PVC through covalent surface attachment of fluorinated thiols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2009, Vol. 61, No. 9, pp. 1163–1169.
- M. ŁEBKOWSKA: Występowanie bakterii antybiotykoopornych w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Ochrona Środowiska* 2009, vol. 31, nr 2, ss. 11–15.
- A. SOKOŁOWSKA, K. OLAŃCZUK-NEYMAN: Badania zmian jakości mikrobiologicznej wody w sieci wodociągowej aglomeracji trójmiejskiej. *Ochrona Środowiska* 2009, vol. 31, nr 4, ss. 15–19.
- M. SZCZOTKO, B. KROGULSKA, A. KROGULSKI: Opracowanie metody oceny podatności materiałów kontaktujących się z wodą przeznaczoną do spożycia na powstawanie obrstów mikrobiologicznych. *Roczniki PZH* 2008, vol. 59, nr 1, s. 103.
- A.M. OLEJNIK, K. CZACZYK, R. MARECIK, W. GRAJEK, T. JANKOWSKI: Monitoring the progress of infection and recombinant protein production in insect cell cultures using intracellular ATP measurement. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, Vol. 65, No. 1, pp. 18–24.

18. E.P. IVANOVA, Y.V. ALEXEEVA, D.K. PHAM, J.P. WRIGHGT, D.V. NICOLAU: ATP level variations in heterotrophic bacteria during attachment on hydrophilic surfaces. *International Microbiology* 2006, Vol. 9, No. 1, pp. 37–46.
19. D. KRĘGIEL, A. RYGAŁA, W. AMBROZIAK, U. MIZERSKA, W. FORTUNIAK, J. CHOJNOWSKI: Investigation of the adhesion capabilities of *Aeromonas hydrophila* to different polysiloxane carriers. *Biotechnology. Proc. of the Int. Symp. on New Researches in Biotechnology*, 2008, Serie F., Special Volume, pp. 498–502.
20. D. KRĘGIEL, A. RYGAŁA, U. MIZERSKA, W. FORTUNIAK, W. AMBROZIAK, J. CHOJNOWSKI: Adhesion of *Aeromonas hydrophila* on polysiloxane carriers. *I Ogólnopolskie Warsztaty „Mikrobiologia w ochronie zdrowia i środowiska” MIKROBIOT*, Łódź 2008, s. 54.
21. D. KRĘGIEL, A. RYGAŁA, U. MIZERSKA, W. FORTUNIAK, J. CHOJNOWSKI, W. AMBROZIAK: In search for new anti-adhesive materials. *I International Conference INOPTEP, Divcibare* 2009, p. 49.
22. W. FORTUNIAK, U. MIZERSKA, J. CHOJNOWSKI, D. KRĘGIEL, A. RYGAŁA, W. AMBROZIAK: Nowe zastosowania związków krzemooorganicznych jako modyfikatorów powierzchni w celu uzyskania powłok antyadhezyjnych dla mikroorganizmów. *Mat. konf. „Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych”*, Łódź 2009, s. 140.
23. P.D. COSTA, N.J. ANDRADE, S.C.C. BRANDAO, F.J.V. PASSOS, N.F.F. SOARES: ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology* 2006, Vol. 37, No. 3, pp. 345–349.

Kręgiel, D., Rygała, A. Occurrence of Heterotrophic Bacteria of the Genus *Aeromonas* in a Water Distribution System: A Case Study. *Ochrona Środowiska* 2010, Vol. 32, No. 4, pp. 47–50.

Abstract: Heterotrophic strains of *Aeromonas* sp. are ubiquitous in aquatic environments, but some of them have a pathogenic impact on humans and fish. Samples were taken regularly over a one-year period from a system distributing unchlorinated groundwater, which was analyzed for the presence of *Aeromonas hydrophila*. Bacteria of the genus *Aeromonas* were detected in tap water samples collected from May to October, the largest increase in the number of these bacteria (156 cfu/100 cm³) being observed in August. Approximately 80% of the isolated strains, with a capacity

for β -hemolysis, were identified as *Aeromonas hydrophila*. The bacteria showed the ability to adhere to the surface of PVC, a material widely used in water-supply systems. Taking into account, on the one hand, the strong adhesion properties of *Aeromonas* sp., which stimulate biofilm formation, and considering, on the other hand, the occurrence of various virulence factors that underlie the pathogenicity of *Aeromonas* sp., it seems recommendable to include rods of the genus *Aeromonas* not only into routine microbiological analysis of tap water, but also into the monitoring of the functioning of water distribution systems.

Keywords: Tap water, *Aeromonas* sp., biofilm, adhesion, luminometry.