

JAKOŚĆ BAKTERIOLOGICZNA WODY WODOCIĄGOWEJ

Justyna Zamorska¹, Monika Zdeb², Dorota Papciak¹

¹ Zakład Oczyszczania i Ochrony Wód, Wydział Budownictwa, Inżynierii Środowiska i Architektury, Politechnika Rzeszowska, ul. Powstańców Warszawy 6, Rzeszów, e-mail: jzamor@prz.edu.pl, dpapciak@prz.edu.pl

² Zakład Oczyszczania i Ochrony Wód, Wydział Budownictwa, Inżynierii Środowiska i Architektury, Politechnika Rzeszowska, ul. Powstańców Warszawy 6, Rzeszów, e-mail: mzddeb@prz.edu.pl.

STRESZCZENIE

Najbardziej czułą metodą wykrywania skażenia wody wodociągowej jest badanie mikrobiologiczne. Bezpieczeństwo wód pod względem mikrobiologicznym jest oceniane głównie na podstawie wyników tradycyjnych badań hodowlanych, umożliwiających wzrost kolonii bakterii na podłożach odżywczych. W ostatnich latach zastosowanie w mikrobiologii znalazła nowoczesna technika cytometrii przepływowej. Diagnostyczna metoda oparta na cytometrii przepływu jest znacznie szybsza, a także bardziej wszechstronna. Badania jakości mikrobiologicznej wody wodociągowej prowadzono w rejonach powiatu rzeszowskiego, tj. w rejonie systemu wodociągowego zasilanego z ujęcia wód powierzchniowych oraz w rejonie małych systemów wodociągowych zasilanych z ujęć wód podziemnych. Zakres analizy mikrobiologicznej jakości wody wodociągowej opierał się na oznaczeniu wybranych wskaźników stanu sanitarnego wody tj; ogólnej liczby bakterii psychrofilnych i mezofilnych na agarze odżywczym (referencyjnym) zwanym Agarem A oraz dodatkowo na agarze wzbogaconym zwanym Agarem R, liczby bakterii grupy *coli* oraz paciorkowców kałowych. Oznaczenie ogólnej liczby mikroorganizmów metodą cytometrii przepływowej wykonywano z zastosowaniem dwóch barwników *Sybr Green* oraz jodku propidyny. Woda z ujęć wód podziemnych, nie będących pod stałą kontrolą mikrobiologiczną posiadała gorsze parametry mikrobiologiczne. Stosowane nowe metody oznaczeń mikrobiologicznych wykazywały większe ilości zanieczyszczeń mikrobiologicznych.

Słowa kluczowe: bakteriologia wody, woda do picia, woda wodociągowa, cytometria przepływowa

BACTERIOLOGICAL QUALITY OF TAP WATER

ABSTRACT

The most sensitive method of detecting contamination in water supply networks is microbiological testing. Microbiological water safety is evaluated mainly based on the results of traditional tests that rely on bacteria culturing on the so called bacterial growth mediums. Flow cytometry is a modern technology that has been used in microbiology only recently. The diagnostic method based on flow cytometry is much faster and more versatile. Microbiological quality testing was conducted in rzeszowski district, in the area of water network supplied by surface waters, and in the area of water network supplied by underground waters. The scope of the analysis of the microbiological quality of tap water was based on the determination of selected indicators of the sanitary condition of water ie; the total number of psychrophilic and mesophilic bacteria on nutrient agar (reference) called Agar A and additionally called agar supplemented with R, the number of coliforms and faecal streptococci. Determination of the total number of microorganisms by flow cytometry was performed using two dyes SYBR Green and iodide pyridine. Water from underground water intakes, not under the permanent control of microbial had worse microbiological parameters. Used new methods of microbiological assays showed greater amounts of microbiological contamination.

Keywords: water bacteriology, drinking water, tap water, flow cytometry

WSTĘP

Obecność organizmów w sieciach wodociągowych stanowi globalny problem wszystkich krajów zaopatrzonych w system dystrybucji wody. Wynika ona z braku stabilności biologicznej i chemicznej wody. Wiązą się z tym niepokojące skutki zdrowotne dla ludzi, gdyż taka woda może zawierać bakterie chorobotwórcze, wirusy, grzyby, glony wydzielające substancje toksyczne do środowiska oraz formy inwazyjne pasożytów. Skażenie wody może nastąpić u jej źródła, w miejscu czerpania lub produkcji wody, ale również bezpośrednio w sieci wodociągowej. Epidemiom zapobiega się na ogół poprzez kontrolę jakości wody na różnych etapach jej produkcji, a także przez trwały nadzór mikrobiologiczny nad wyprodukowaną wodą, która dociera bezpośrednio do odbiorców. Obecność błony biologicznej na wewnętrznych powierzchniach elementów systemów wodociągowych jest jedną z przyczyn wtórnego zanieczyszczenia wody dostarczanej odbiorcom, zwiększa jej zapotrzebowanie na środki dezynfekcyjne, powoduje przyspieszenie niszczenia materiałów instalacyjnych (korozja mikrobiologiczna), a także stwarza problemy w eksploatacji sieci wodociągowej [Papciak i in. 2011].

Najbardziej czułą metodą wykrywania skażenia wody wodociągowej jest badanie mikrobiologiczne. Bezpieczeństwo wód pod względem mikrobiologicznym jest oceniane głównie na podstawie wyników tradycyjnych badań hodowlanych, umożliwiających wzrost kolonii bakterii na podłożach odżywczych. Tradycyjne metody są powszechnie stosowane do oceny stanu sanitarnego wód, zarówno w Polsce, jak i na świecie. Polegają one na stworzeniu dogodnych warunków do wzrostu mikroorganizmów znajdujących się w badanym materiale, następnie obserwacji i analizie rezultatów ich rozwoju. Podstawowym błędem wszystkich metod hodowlanych jest niewielka zdolność mikroorganizmów do wzrostu w sztucznych warunkach [Egli 2008].

Od niedawna zastosowanie w mikrobiologii wody znalazła nowoczesna technika cytometrii przepływowej. Diagnostyczna metoda oparta na cytometrii przepływu jest znacznie szybsza, a także bardziej wszechstronna. Umożliwia charakterystykę jakościową i ilościową badanych komórek. Cechuje się ona wysoką wydajnością, która pozwala na analizowanie różnorodnych parametrów dużej liczby komórek, w stosunkowo

krótkim czasie. Do jej zalet można zaliczyć to, że zamiast barwnika prostego możliwe jest użycie substancji – fluorochromów, które dopiero pod wpływem przeprowadzanych przez komórki procesów metabolicznych powodują ich wybarwienie. Dzięki temu można podać liczbę komórek tylko aktywnych, bądź przeprowadzających konkretne procesy biochemiczne. Niestety dość dużą wadą tej metody jest zły odczyt spowodowany błędnym odczytaniem większej liczby komórek, dlatego uzyskane wyniki mogą okazać się fałszywe [Prest 2013, Skotny 2013].

W artykule przedstawiono wyniki badań bakteriologicznych różnych wód wodociągowych wykonane metodami hodowlanymi oraz wyniki ilości komórek mikroorganizmów w wodach wodociągowych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

METODYKA BADAŃ

Badania jakości mikrobiologicznej przeprowadzono w rejonach powiatu rzeszowskiego:

- w rejonie systemu wodociągowego zasilanego z ujęcia wód powierzchniowych - 3 punkty poboru próbek na terenie miasta Rzeszowa oraz
- w rejonie systemów wodociągowych zasilanych z ujęć wód podziemnych - 4 punkty poboru próbek w miejscowościach na terenie powiatu rzeszowskiego.

Badania prowadzone były przez okres całego roku. Zakres analizy mikrobiologicznej jakości wody wodociągowej opierał się na oznaczeniu wybranych wskaźników stanu sanitarnego wody tj;

- Oznaczeniu ogólnej liczby bakterii psychrofilnych i mezofilnych metodą płytkową Kocha na agarze odżywczym (referencyjnym) zwanym Agarem A oraz dodatkowo na agarze wzbogaconym zwanym Agarem R, wg. PN-EN ISO 6222: 2004
- Oznaczeniu liczby bakterii grupy *coli* wg PN -EN ISO 9308-1:2004, oraz paciorkowców kałowych wg PN-EN ISO 7899-2: 2004 metodą filtracji membranowej,
- Oznaczeniu ilości mikroorganizmów metodą cytometrii przepływowej. Do badań wykorzystano cytometr przepływowy: *CyFlow Cube 8*. Do oznaczeń użyto barwniki *Sybr Green*, oraz jodek propidyny (PI).

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Wyniki badań mikrobiologicznych wody wodociągowej przeprowadzono w 4 okresach badawczych i przedstawiono w tabelach 1 oraz 2.

Zgodnie z rozporządzeniem z dnia 13 listopada 2015 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [Rozporządzenie...2015]

liczba bakterii grupy *coli* i paciorkowców kałowych powinna wynosić 0 jtk / 100 ml. Wyniki badań wody wodociągowej w Kolbuszowej i Straszylu uzyskane w przeprowadzonych badaniach wykazały występowanie zarówno bakterii grupy *coli*, jak i paciorkowców kałowych. Świadczy to o zanieczyszczeniu fekalnym wody - woda nie spełnia wymagań bakteriologicznych według aktualnego rozporządzenia. Źródłem badanych wód

Tabela 1. Jakość bakteriologiczna wody wodociągowej w Rzeszowie – woda powierzchniowa

Table 1. Bacteriological quality of tap water in Rzeszow - surface water

Miejsce poboru wody	Sezon	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych [jtk/cm ³]		Ogólna liczba bakterii mezofilnych [jtk/cm ³]		Bakterie grupy coli [100 cm ³]	Paciorkowce kałowe [100 cm ³]
		Agar A	Agar R	Agar A	Agar R		
Rzeszów 1	wiosna	0	8	2	26	0	0
	lato	2	17	1	14	0	0
	jesień	0	6	0	17	0	0
	zima	3	9	4	17	0	0
Rzeszów 2	wiosna	3	35	2	25	0	0
	lato	0	23	1	17	0	0
	jesień	18	80	0	6	0	0
	zima	50	320	3	8	0	0
Rzeszów 3	wiosna	0	49	4	68	0	3
	lato	0	28	5	30	0	0
	jesień	3	6	2	22	0	0
	zima	0	150	1	46	0	0

Tabela 2. Jakość bakteriologiczna wody wodociągowej – woda podziemna

Table 2. Bacteriological quality of tap water – water underground

Miejsce poboru wody	Sezon	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych [jtk/cm ³]		Ogólna liczba bakterii mezofilnych [jtk/cm ³]		Bakterie grupy coli [100 cm ³]	Paciorkowce kałowe [100 cm ³]
		Agar A	Agar R	Agar A	Agar R		
Glogów Młp.	wiosna	0	8	2	26	0	7
	lato	2	17	1	14	0	0
	jesień	0	6	0	17	0	25
	zima	3	9	4	17	0	0
Kolbuszowa	wiosna	3	35	2	25	0	0
	lato	0	23	1	17	0	0
	jesień	18	80	4	9	8	47
	zima	150	300	3	8	0	0
Trzebownisko	wiosna	0	49	4	68	0	0
	lato	0	28	5	30	0	0
	jesień	3	6	2	22	0	0
	zima	0	150	1	46	0	0
Straszyl	wiosna	18	52	4	69	3	8
	lato	39	78	2	120	6	15
	jesień	22	57	34	67	0	5
	zima	23	69	8	54	12	3

wodociągowych są ujęcia bez stałej kontroli jakości i poddawane tylko okresowej dezynfekcji. To mogło przyczynić się do wystąpienia bakterii w miejscach czerpalnych.

Pacorkowce kałowe zostały wykryte również w wodzie wodociągowej w jednym punkcie w mieście Rzeszów oraz w Głogowie Małopolskim. Powodem tego mógł być zły stan techniczny rurociągów doprowadzających wodę do odbiorców oraz obecność błony biologicznej. Woda ta pochodzi z magistrali wodociągowej miejskiej, która jest pod stałą kontrolą sanitarną, dlatego w kolejnych badaniach parametry mikrobiologiczne wody uległy poprawie.

Analizując wyniki badań bakterii mezofilnych i psychrofilnych można stwierdzić, że ilość tych bakterii jest zdecydowanie wyższa na Agarze R, niż na referencyjnym Agarze A. Spowodowane jest to wzbogaconym składem tej pożywki, co w połączeniu z dłuższym czasem inkubacji może stymulować rozwój dużo większej liczby bakterii heterotroficznych i nawet odpornych na chlor. Jest pożywką o takiej zawartości produktów odżywczych (ekstraktu drożdżowego, glukozy, peptonu, kazeiny hydrolizującej), która pozwala na rozwój szerokiego spektrum bakterii, nie wykluczając bakterii wolno rosnących. Bakterie te mogą być aktywne metabolicznie lub w stanie anabiozy. Dodatkowo zawartość skrobi i pirogronianu wspomaga rozwój bakterii szczególnie wymagających [Siebel 2008].

Ilość mikroorganizmów oznaczona na cytometrze przepływowym jest zdecydowanie wyższa od liczby mikroorganizmów mierzonej metodami hodowlanymi. Przyczyną tak dużej liczebności mikroorganizmów może być fakt, iż stosowany w badaniach w barwnik *SYBR Green* podłącza się do DNA zarówno organizmów żywych, jak i martwych [Hammes 2010]. Przy określaniu ilości bakterii na cytometrze przepływowym więcej mikroorganizmów wykrywano stosując właśnie ten barwnik. Stąd wyższa ich liczebność w porównaniu z zastosowanym w badaniu drugim barwnikiem - jodkiem propidyny. W tabeli 3 przedstawiono wyniki ilości mikroorganizmów uzyskane na cytometrze przepływowym w badaniach wody wodociągowej w Rzeszowie. Wyniki ilości mikroorganizmów są zdecydowanie wyższe (niekiedy 1000-krotnie) w porównaniu z wynikami uzyskanymi metodami tradycyjnymi. Nawet biorąc pod uwagę tylko mikroorganizmy z wysoką zawartością kwasu nukleinowego HNA (głównie bakterie), to i tak różnice są ogromne.

Poniższe wykresy przedstawiają wybrane zapisy komputerowe analizy próbek wody wodociągowej wykonane na cytometrze przepływowym. Uzyskane wyniki pomiarów zostały zilustrowane za pomocą histogramu jednowymiarowego oraz wykresu kropkowego (rozproszenia). Wyniki dotyczące liczby mikroorganizmów znacznie różnią się w zależności od względnej wielkości komórek oraz ich zróżnicowania.

Tabela 3. Jakość mikrobiologiczna wody wodociągowej z Rzeszowa – cytometria przepływową
Table 3. Microbiological quality of tap water from Rzeszow – flow cytometry

Miejsce poboru wody	Sezon	Cytometria przepływową – liczebność mikroorganizmów w 1 cm ³			
		<i>SYBR Green</i>		Jodek propidyny (PI)	
		LNA*	HNA*	LNA*	HNA*
Rzeszów 1	wiosna	3530	2530	3120	1320
	lato	1160	–	300	–
	jesień	22700	10410	21310	7570
	zima	2620	2060	3320	–
Rzeszów 2	wiosna	8140	5840	3710	4870
	lato	50060	10860	25340	13580
	jesień	3280	1190	3060	890
	zima	11540	8810	6350	2150
Rzeszów 3	wiosna	25910	15430	4820	2670
	lato	4170	1150	3760	1390
	jesień	17450	1150	8440	5230
	zima	81	27	64	17

* LNA – Low Nucleic Acid, HNA – High Nucleic Acid.

Rysunek 1 objaśnia sposób przedstawiania uzyskanych wyników pomiarów na cytometrze przepływowym:

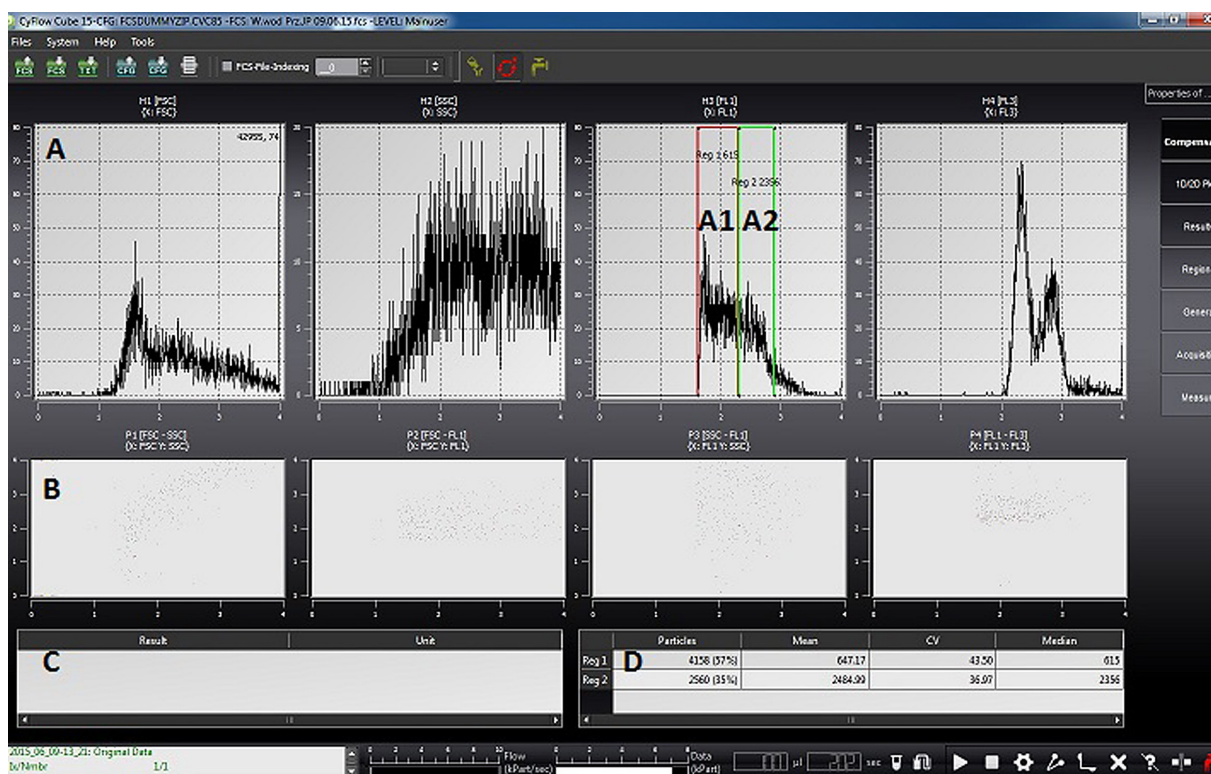
- A – jednowymiarowy histogram obrazujący stosunek wybranego parametru (oś X) do ilości badanych komórek (oś Y);
- A1 – ilość mikroorganizmów z niską zawartością kwasu nukleinowego LNA-Low Nucleic Acid;
- A2 – ilość mikroorganizmów z wysoką zawartością kwasu nukleinowego HNA-High Nucleic Acid;
- B – wykres dwuwymiarowy ukazuje komórki rozproszone z zależności od intensywności emitowanego sygnału względem dwóch wybranych parametrów;
- C – parametry takie jak np. ziarnistości komórek lub sygnał fluorescencji;
- D – liczba komórek wykrytych przez cytometr.

Najprostszy histogram to jednowymiarowe przedstawienie częstości występowania danej cechy w badanej populacji. Możemy zaobserwować występowanie grup o różnej ziarnistości, gdyż uwidoczniony jest wyraźny podział na 2 regiony – z niską (bramka czerwona) i wysoką (bramka zielona) zawartością kwasu nukleinowego (rys. 2).

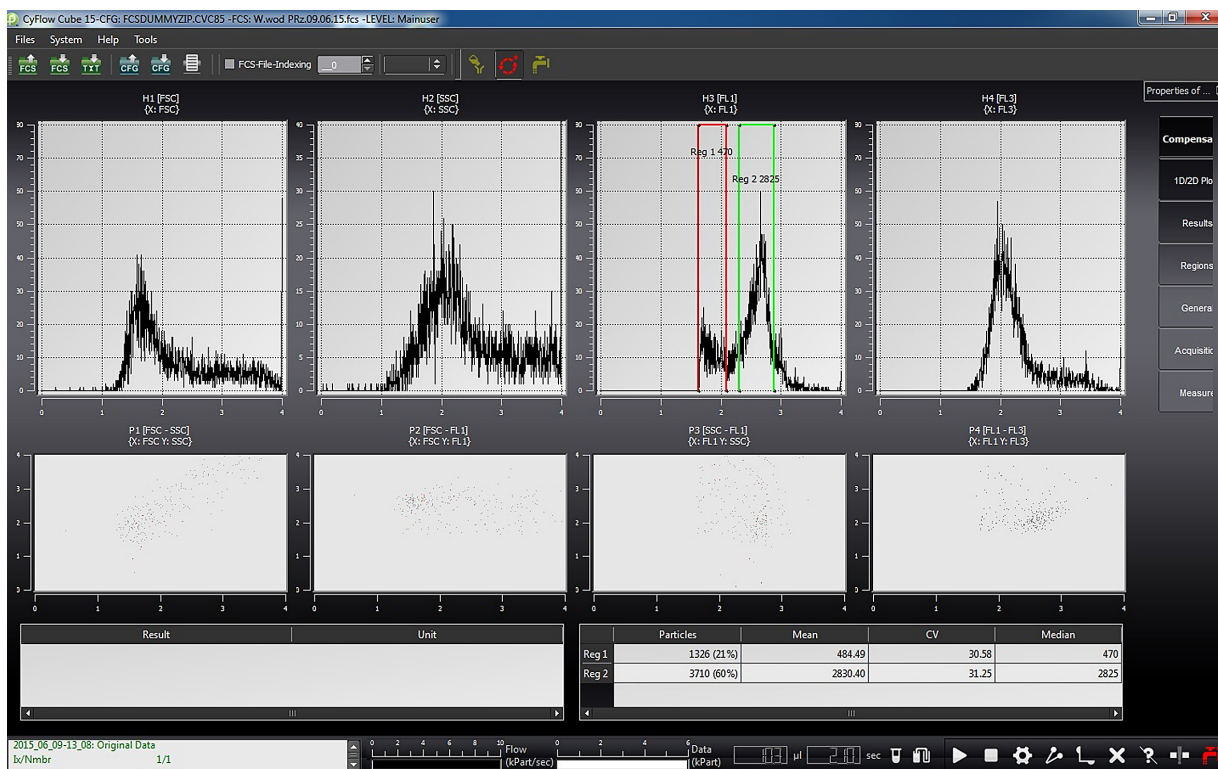
Jednak na wykresie jednowymiarowym poszczególne grupy komórek mogą nakładać się na siebie i w rezultacie pozostawać nieodróżnialne rozłożenie, co uniemożliwia utworzenie drugiego regionu (rys. 3). Pomimo wizualnego zróżnicowania ilości badanych komórek, wykonalne było utworzenie tylko jednego regionu.

Najniższą ilość mikroorganizmów metodą cytometrii przepływowej odnotowano w punkcie poboru wody w Rzeszowie w okresie zimowym (rys. 4). Jednak i tak ilość mikroorganizmów była kilkukrotnie wyższa w porównaniu z ilością uzyskaną metodą hodowlaną (tab. 1). Powodem tak małej ilości mikroorganizmów wykrytych przez cytometr była dezynfekcja sieci wodociągowej przeprowadzona 2 dni przed poborem prób wody do badania.

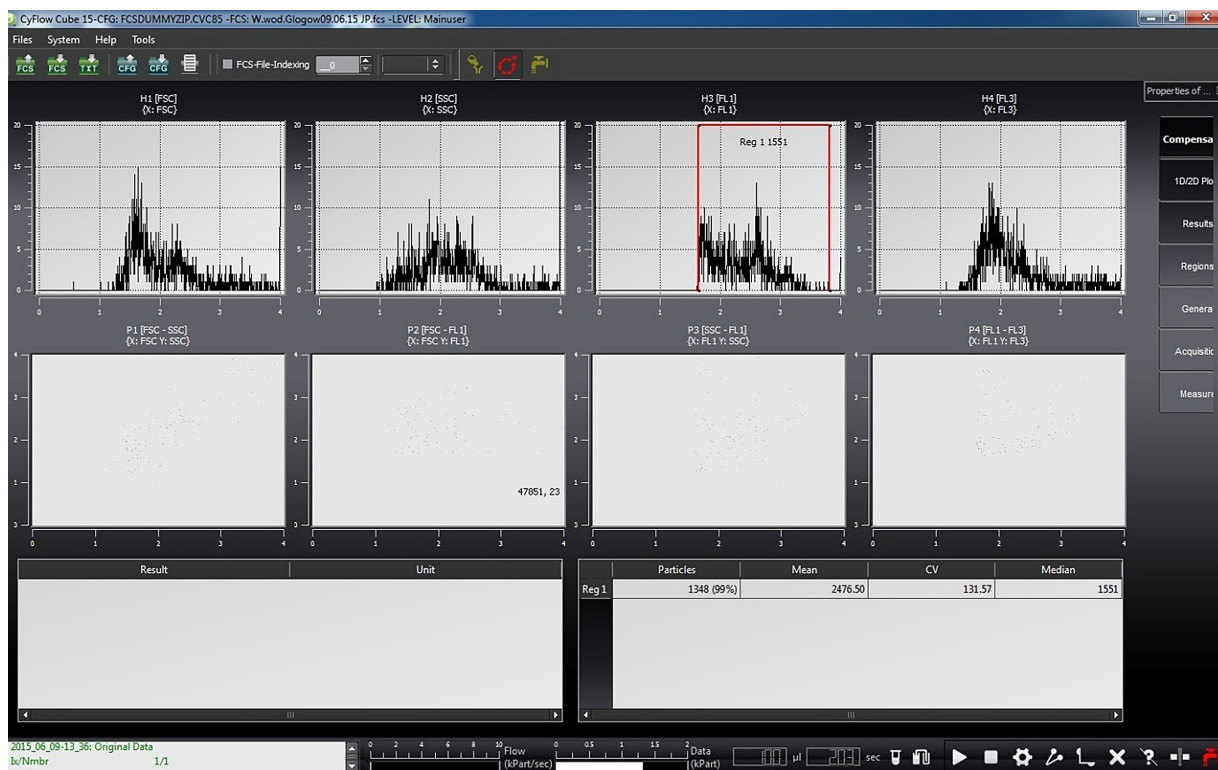
Cytometria przepływowa umożliwia analizę kilku parametrów każdej komórki, co jest jej wielką zaletą i dzięki temu możliwe jest analizowanie mieszanych populacji, czyli takich jakie występują w wodzie. Natomiast rozbieżności jakie pojawiają w wynikach pomiarów wynikają z właściwości stosowanych fluorochromów [Hammes 2008].



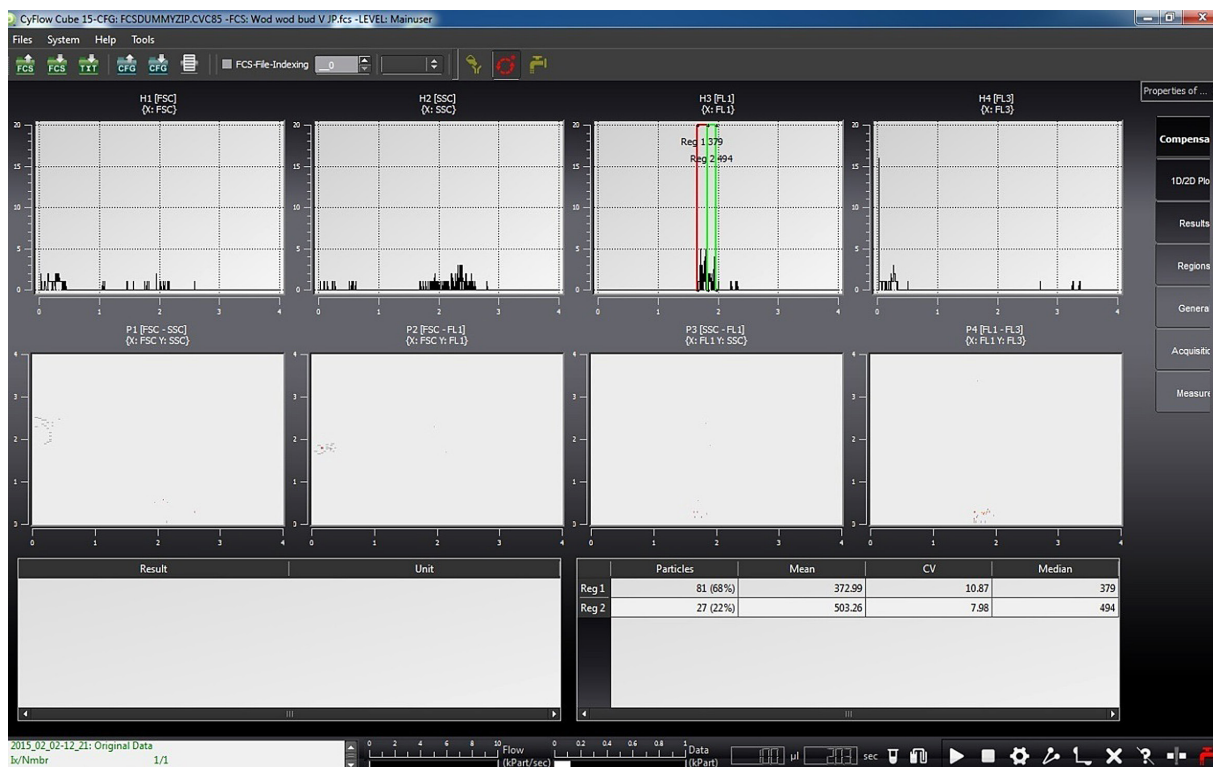
Rys. 1. Analiza próbki wody wodociągowej z Rzeszowa (wiosna) z jodkiem propidyny
Fig. 1. Analysis of samples of tap water from Rzeszow (spring) with propidium iodide



Rys. 2. Analiza próbki wody wodociągowej z Rzeszowa (zima) z jodkiem propidyny
 Fig. 2. Analysis of samples of tap water from Rzeszow (winter) with propidium iodide



Rys. 3. Analiza próbki wody wodociągowej z Głogowa Młp. (wiosna) z jodkiem propidyny
 Fig. 3. Analysis of samples of tap water from Głogów Młp. (spring) with propidium iodide



Rys. 4. Analiza próbki wody wodociągowej z Rzeszowa (zima) z Sybr Green
 Fig. 4. Analysis of samples of tap water from Rzeszow (winter) with Sybr Green

WNIOSKI

1. Woda wodociągowa w Rzeszowie ma dobrą jakość bakteriologiczną. Tylko jeden raz wykryto w badanej wodzie paciorkowce kałowe.
2. Bakterie będące wskaźnikami fekalnego zanieczyszczenia wody były wykrywane w wodach wodociągowych zasilanych wodą podziemną.
3. Agar „R” stymuluje większy rozwój zarówno bakterii psychrofilnych, jak i mezofilnych.
4. Ilość mikroorganizmów oznaczona na cytometrze przepływowym jest zdecydowanie wyższa od ilości mikroorganizmów mierzonej metodami hodowlanymi. Przyczyną wykrywania tak dużej ilości mikroorganizmów może być fakt, iż stosowany w badaniach barwnik podłącza się do materiału genetycznego zarówno organizmów żywych, jak i martwych.
5. Sezonowość wykonywania pomiarów nie ma wpływu na wyniki badań jakości bakteriologicznej wody wodociągowej.
6. Należy doskonalić metodykę oznaczeń bakteriologicznych z zastosowaniem cytometru przepływowego. Stosowane fluorochromy dają wyniki bardzo odbiegające od wyników uzyskiwanych metodami tradycyjnymi.

LITERATURA

1. Egli T. 2008. New methods for assessing the safety of drinking water. *Eawag News*, nr 65e, 20–22.
2. Hammes F, Berney M, Wang Y, Vital M, Köster O, Egli T. 2008. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res.*, 42, 269–277.
3. Hammes F., Egli T. 2010. Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages pitfalls and application. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 1083–1095.
4. Papiak D., Zamorska J., Kiedryńska L. 2011. *Mikrobiologia i biotechnologia w procesach oczyszczania wody*. Wyd. Politechniki Rzeszowskiej.
5. Prest E.I., Hammes F., Kotsch S., M.C.M. van Loosdrecht, Vrouwenvelder J.S. 2013. Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. *Water Research*, 47, 7131–7134.
6. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2015 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia, *Dz.U.* 2015, poz. 1989.
7. Siebel E., Wang Y., Egli T., Hammes F. 2008. Correlation between total cell concentration, total adenosine tri-phosphate concentration and heterotrophic plate counts during microbial of drinking water, *Drinking Water Engineering and Science*, 1, 1–6.
8. Skotny A., Pucińska J. 2013. Modern flow cytometry. *Biomedical Engineering*, 1, 4–8.