

MACIEJ SZCZOTKO, BOŻENA KROGULSKA, ADAM KROGULSKI

OPRACOWANIE METODY OCENY PODATNOŚCI MATERIAŁÓW
KONTAKTUJĄCYCH SIĘ Z WODĄ PRZEZNACZONĄ DO SPOŻYCIA NA
POWSTAWANIE OBROSTÓW MIKROBIOLOGICZNYCH

ELABORATION OF THE METHOD FOR ASSESSMENT OF SUSCEPTIBILITY TO
MICROBIAL GROWTH OF MATERIALS CONTACTING WITH DRINKING WATER

Zakład Higieny Komunalnej
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
e-mail: mszczotko@pzh.gov.pl
Kierownik: dr J. Świątczak

Przeprowadzono badania mające na celu sprawdzenie przydatności skonstruowanego przy udziale Politechniki Warszawskiej prototypu urządzenia przepływowego oraz metody oznaczania ogólnej liczby mikroorganizmów i poziomu ATP w wymazach do oceny podatności materiałów na tworzenie obrostów mikrobiologicznych.

Słowa kluczowe: biofilm, adenozyntrifosforan (ATP), woda przeznaczona do spożycia przez ludzi, materiały budowlane kontaktujące się z wodą przeznaczoną do spożycia
Key words: biofilm, adenosine triphosphate (ATP), drinking water, materials intended to contact with drinking water, plumbing materials

WSTĘP

Na jakość wody przeznaczonej do spożycia wpływa wiele niezależnych czynników między innymi: rodzaj ujęcia (woda głębinowa lub powierzchniowa), procesy uzdatniania i dezynfekcji, a także rodzaj materiału z jakiego wykonana jest sieć przesyłowa.

Materiały, z którymi styka się woda przeznaczona do spożycia przez ludzi, nie powinny powodować pogarszania się mikrobiologicznej jakości wody poprzez uwalnianie składników organicznych, będących dla mikroorganizmów potencjalnym źródłem substancji odżywczych, co przyczynić się może do powstawania biofilmu na ich powierzchni [1].

Zgodnie z treścią Rozporządzenia MZ z dnia 28 marca 2007 roku w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [5] zastosowanie materiału lub wyrobu używanego do uzdatniania i dystrybucji wody wymaga zgody właściwego państwowego inspektora sanitarnego. Zgoda ta wydawana jest m. in. na podstawie atestu higienicznego Państwowego Zakładu Higieny, o który stara się producent bądź dystrybutor danego wyrobu. Do tej pory

przy wydawaniu atestów higienicznych nie brano pod uwagę podatności danego materiału na obrost mikrobiologiczny, opierano się przede wszystkim na dokumentacji dostarczonej przez producenta, zawierającej informacje dotyczące składu chemicznego materiału oraz wyników badań stężeń związków chemicznych migrujących do wody.

Obecnie planuje się wprowadzenie jednolitego europejskiego systemu oceny materiałów przeznaczonych do kontaktu z wodą, którego jednym z elementów będzie określenie ich podatności na obrost mikrobiologiczny. Polska jako członek Unii Europejskiej powinna być również przygotowana do pełnego wdrożenia procedury dopuszczania materiałów do kontaktu z wodą – systemu EAS (European Acceptance Scheme). Konieczność oceny wpływu materiału dopuszczonego do kontaktu z wodą wynika z postanowień Dyrektywy Rady Unii Europejskiej nr 89/106/EEC dotyczącej wyrobów budowlanych [2] oraz Dyrektywy Rady Unii Europejskiej nr 98/83/EC dotyczącej jakości wody przeznaczonej do spożycia [3].

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie przydatności skonstruowanego, przy udziale Politechniki Warszawskiej, prototypu urządzenia przepływowego do badań podatności materiałów kontaktujących się z wodą na obrost mikrobiologiczny na podstawie oznaczania poziomu ATP pochodzącego z komórek mikroorganizmów rozwijających się na powierzchni testowanych materiałów oraz oznaczania ogólnej liczby mikroorganizmów w wymazach z ich powierzchni.

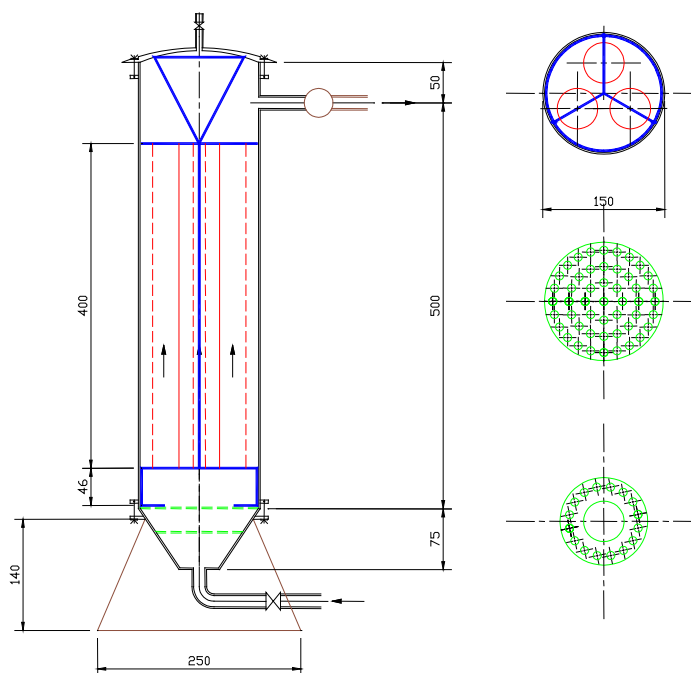
MATERIAŁ I METODY

Testowane materiały

Badania prowadzono na czterech próbkach materiałów zarówno dopuszczonych do kontaktu z wodą jak i takich, które ze względu na swój skład chemiczny są niedopuszczalne do kontaktu z wodą przeznaczoną do spożycia przez ludzi. Testowanymi materiałami użytymi jako kontrola negatywna (materiały dopuszczone) były płytki szklane (K1, K2), fragmenty rur z utwardzanego tworzywa sztucznego PE-80 (PE1, PE2) oraz stal odporna na korozję (P), z której zbudowane było urządzenie przepływowe. Jako kontrolę pozytywną (materiały niedopuszczalne) wykorzystano próbki wykładziny podłogowej WK-NBR-12 przeznaczonej dla pojazdów szynowych (X1, X2). Wszystkie próbki materiałów testowych badane były w dwóch powtórzeniach tj. po dwa takie same elementy każdego materiału.

Urządzenie przepływowe

Schemat urządzenia przepływowego opracowany przez pracowników Politechniki Warszawskiej przedstawiono na Ryc. 1. Do badań zastosowano urządzenie wykonane w całości ze stali nierdzewnej oraz uszczelniających elementów teflonowych. Urządzenie to składało się ze stalowego cylindra o wysokości 550 mm i średnicy 150 mm. Cylinder wyposażono w zdejmowalną pokrywę z króćcem odpowietrzającym. Doprowadzenie wody odbywało się przewodem teflonowym wyposażonym w zawór służący do regulacji przepływu. Dyfuzor w kształcie stożka ściętego, łączący przewód doprowadzający z cylindrem zlokalizowany był w dole urządzenia. Dyfuzor został wyposażony w dwie przegrody. Zrzut wody zlokalizowany był na bocznej ścianie cylindra ok. 50 mm poniżej górnej krawędzi. Przewód zrzutowy o średnicy równej doprowadzającemu, złożony był z króćca stalowego z zainstalowanym wodomierzem i przewodem elastycznym. Wewnątrz cylindra umieszczony został statyw na testowane próbki materiałów. Przepływ odbywał się z dołu ku górze, co umożliwiało równomierne wypełnienie wodą cylindra, odprowadzenie powietrza (przez zawór zlokalizowany w najwyższym punkcie pokrywy) i nie pozwalało na mieszanie się wody wypływającej z urządzenia. Średnia szybkość przepływu wody została ustalona na ok. 210 l/h.



Ryc. 1. Schemat urządzenia przepływowego. Projekt dr inż. A. Kodura, wyk. J. Borowski (Politechnika Warszawska, Instytut Zaopatrzenia w Wodę i Budownictwa Wodnego)
Continuous flow bioreactor scheme. Project by A. Kodura, J. Borowski. Institute of Water Supply and Water Construction, Warsaw University of Technology.

Pomiar poziomu ATP

Do pomiaru poziomu ATP na powierzchni badanych materiałów oraz w wodzie dopływającej do urządzenia przepływowego wykorzystano luminometr, którego działanie oparte jest o zjawisko bioluminescencji. Wykorzystując enzymatyczną reakcję lucyferyny z ATP, której towarzyszy emisja światła, poprzez pomiar jego natężenia określano zawartość ATP w danym materiale.

Posiew wglębny na pożywce agarowej

Do oznaczania ogólnej liczby mikroorganizmów stosowano metodę posiewu wglębnego z wykorzystaniem nieselektywnej pożywki TSA (agar tryptozowo sojowy), która ze względu na stosunkowo bogaty skład umożliwia wzrost wielu gatunkom bakterii heterotroficznych.

Metody badań

Przed badaniem materiały o powierzchni 80 cm² oczyszczono i wyjałowiono za pomocą 70% alkoholu etylowego, płukano wodą dejonizowaną następnie pobrano wymazy kontrolne w celu określenia wyjściowego poziomu ATP oraz ogólnej liczby mikroorganizmów na ich powierzchni, po czym umieszczono je wewnątrz urządzenia przepływowego. Wymazy wykonywano w sposób jednolity z powierzchni ok. 2 cm² stosując:

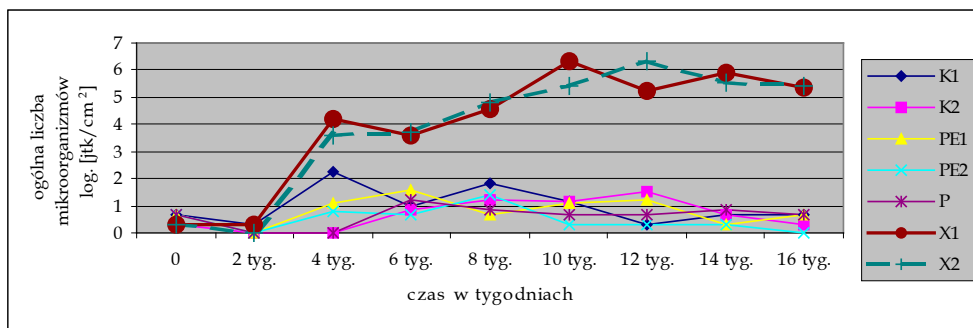
- do oznaczania ATP specjalne zestawy do wymazów („pióra” firmy Merck) wykonane z materiałów wolnych od ATP
- do oznaczania ogólnej liczby mikroorganizmów jałowe wymazówki zakończone watą bawełnianą

Podczas 120 dniowego doświadczenia w odstępach dwutygodniowych, ze ściśle określonej powierzchni testowanych materiałów pobierano wymazy, z których oznaczano poziom ATP oraz ogólną liczbę mikroorganizmów w temperaturze 37°C po 48h i w temperaturze 22°C po 72h na podłożu TSA. Te same oznaczenia wykonywano również w wodzie dopływającej do układu oraz z powierzchni wewnętrznej płaszcza urządzenia przepływowego. Dodatkowo przez cały okres doświadczenia monitorowano temperaturę wody wypływającej z urządzenia.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wszystkie wyniki przedstawione na rycinach podano po ich zlogarytmowaniu oraz przeliczeniu na 1 cm² powierzchni badanych materiałów.

Wyniki ogólnej liczby mikroorganizmów w dwu temperaturach, oznaczanej z wymazów pobranych z powierzchni badanych materiałów umocowanych w urządzeniu przepływowym podczas 16 tygodni trwania doświadczenia przedstawiono na rycinach 2 i 3.



Ryc. 2. Wartości ogólnej liczby mikroorganizmów w 37°C/48h z wymazów pochodzących z powierzchni testowanych materiałów

Total number of microorganisms after 48 hours incubation in 37°C swabbed from surface of tested materials

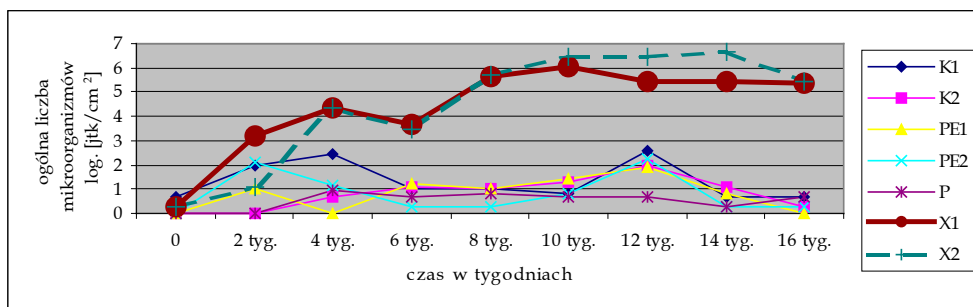
K1, K2, PE1, PE2, P – materiały dopuszczone do kontaktu z wodą (kontrola negatywna)

X1, X2 – materiały niedopuszczone do kontaktu z wodą (kontrola pozytywna)

W drugim tygodniu stwierdzono spadek liczby kolonii bakterii na wszystkich badanych materiałach zarówno stanowiących z założenia próbki negatywne jak i pozytywne, który prawdopodobnie był wynikiem wypłukiwania mikroorganizmów niezwiązanych lub bardzo słabo związanych z powierzchnią badanych materiałów. Liczba oznaczanych mikroorganizmów wzrosła pomiędzy czwartym a szóstym tygodniem doświadczenia. Kolejne oznaczenia wykazały powolny spadek wartości ogólnej liczby mikroorganizmów uzyskanej z powierzchni materiałów będących kontrolą negatywną. Wyniki uzyskane podczas ostatniego oznaczenia (po 16 tygodniach) były bardzo zbliżone do tych jakie zaobserwowano przy pierwszym posiewie i zawierały się w przedziale od 0 jtk/ cm² do 5 jtk/ cm², co świadczy o tym, że materiały te nie ulegały obrotowi biologicznemu.

W przypadku materiałów określonych jako próbki pozytywne (X1, X2) począwszy od drugiego tygodnia doświadczenia obserwowano wyraźny i stały wzrost wartości ogólnej liczby mikroorganizmów. Najwyższe wartości stwierdzono pomiędzy dziesiątym i dwunastym tygo-

dniem doświadczenia, wynosiły one $2,2 \times 10^6$ jtk/cm² (10 tydzień) dla X1 i $2,1 \times 10^6$ jtk/cm² (12 tydzień) dla X2. Kolejne pomiary wykazały niewielki spadek tych wartości, a podczas ostatniego oznaczenia ogólna liczba mikroorganizmów uzyskana z powierzchni próbek pozytywnych wyniosła odpowiednio $2,3 \times 10^5$ jtk/cm² i $2,4 \times 10^5$ jtk/cm² dla X1 i X2. Przez cały czas trwania doświadczenia wartości ogólnej liczby mikroorganizmów w 37°C/48h z wymazów pochodzących z powierzchni testowanych próbek negatywnych (dopuszczonych do kontaktu z wodą) były wielokrotnie niższe niż te same wartości uzyskane z powierzchni próbek pozytywnych, co potwierdza fakt istnienia znaczących różnic w podatności tych materiałów na obrost mikrobiologiczny w kontakcie z wodą przeznaczoną do spożycia.



Ryc. 3. Wartości ogólnej liczby mikroorganizmów w 22°C/72h wymazów pochodzących z powierzchni testowanych materiałów

Total number of microorganisms after 72 hours incubation in 22°C swabbed from surface of tested materials

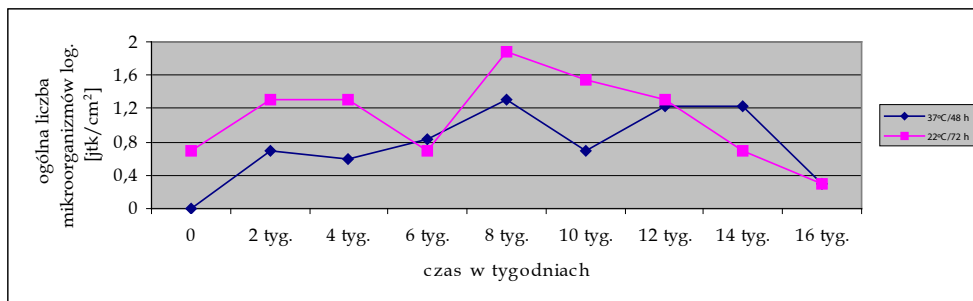
K1, K2, PE1, PE2, P – materiały dopuszczone do kontaktu z wodą (kontrola negatywna)

X1, X2 – materiały niedopuszczone do kontaktu z wodą (kontrola pozytywna)

Podobnie jak miało to miejsce w przypadku oznaczeń ogólnej liczby mikroorganizmów w 37°C (Ryc. 2.) wyniki ogólnej liczby mikroorganizmów w 22°C (Ryc. 3.) oznaczanej z wymazów z powierzchni materiałów określonych jako próbki negatywne (K, PE, P) ulegały pewnym wahaniom podczas trwania doświadczenia, ale zawsze były niższe od wartości oznaczonych z wymazów pochodzących z próbek pozytywnych (X1, X2). Najwyższe wartości ogólnej liczby mikroorganizmów oznaczonych w wymazach z próbek negatywnych zaobserwowano w dwunastym tygodniu trwania doświadczenia zawierały się one w przedziale od 74 jtk/cm² dla wymazów z powierzchni polietylenu do $3,7 \times 10^2$ jtk/cm² dla wymazów z płytek szklanych. Podobnie jak miało to miejsce w przypadku oznaczeń ogólnej liczby mikroorganizmów w 37°C, wyniki uzyskane podczas ostatniego pomiaru (po 16 tygodniach) były tylko nieznacznie wyższe od wartości uzyskanych na początku doświadczenia i wynosiły od 0 jtk/cm² do 5 jtk/cm².

W wymazach z płytek będących z założenia kontrolą pozytywną (materiały niedopuszczone do kontaktu z wodą) wzrost liczby bakterii był bardzo dynamiczny aż do dziesiątego tygodnia przebiegu badań, kiedy to uzyskano wartości $1,2 \times 10^6$ jtk/cm² dla X1 i $2,7 \times 10^6$ jtk/cm² dla X2. W kolejnych pomiarach liczba mikroorganizmów była tylko nieco niższa i ostatecznie po 16 tygodniach wyniosła odpowiednio $2,4 \times 10^5$ jtk/cm² i $2,6 \times 10^5$ jtk/cm² dla X1 i X2.

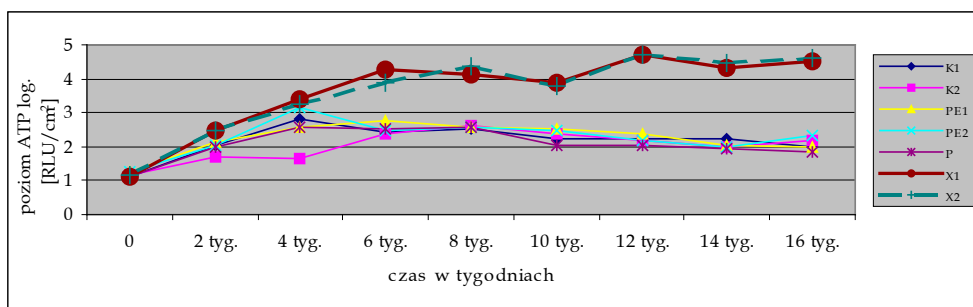
Równoległe z oznaczeniami ogólnej liczby mikroorganizmów na powierzchni testowanych materiałów kontaktujących się z wodą przeznaczoną do spożycia, badano również ogólną liczbę mikroorganizmów w 22°C i 37°C obecnych w wodzie dopływającej do urządzenia przepływowego [Ryc. 4.].



Ryc. 4. Wartości ogólnej liczby mikroorganizmów w 37°C/48h i 22°C/72h w wodzie dopływającej do urządzenia przepływowego
Total number of microorganisms after 48 hours incubation in 37°C and 72 hours incubation in 22°C from water inlet into the continuous flow reactor

Wartości uzyskane w obu temperaturach różniły się od siebie nieznacznie, przy czym wyższe wartości zaobserwowano w przypadku posiewów inkubowanych w temperaturze 22°C. Wyniki ogólnej liczby mikroorganizmów uzyskane z wody dopływającej do urządzenia przepływowego były zbliżone do końcowych wyników oznaczeń ogólnej liczby mikroorganizmów izolowanych z powierzchni materiałów dopuszczonych do kontaktu z wodą przeznaczoną do spożycia.

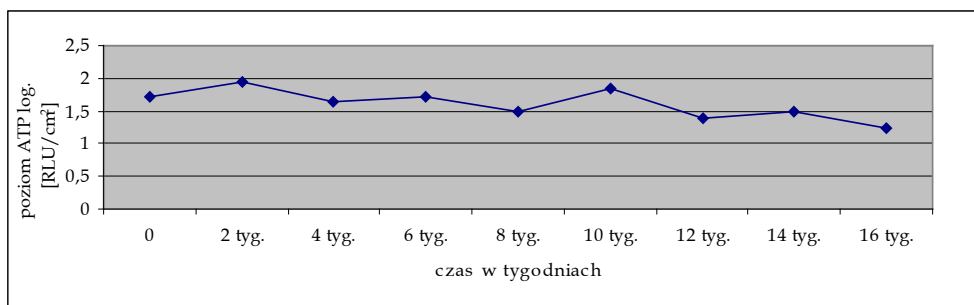
Poziom ATP mierzony przy użyciu luminometru wyrażony jako log RLU/cm² na powierzchni materiałów umieszczonych wewnątrz urządzenia przepływowego podczas 16 tygodni trwania doświadczenia przedstawiono na rycinie 5.



Ryc. 5. Poziom ATP oznaczany na powierzchni testowanych materiałów
ATP level measured on the surface of tested materials
K1, K2, PE1, PE2, P – materiały dopuszczone do kontaktu z wodą (kontrola negatywna)
X1, X2 – materiały niedopuszczone do kontaktu z wodą (kontrola pozytywna)

W przypadku wszystkich badanych materiałów będących kontrolą negatywną zaobserwowano podobne tendencje w zmianach wartości ATP oznaczanego na ich powierzchni. Poziom ATP, który wynosił początkowo od 13 do 19 RLU/cm² wzrósł kilkukrotnie już w pierwszych dwóch tygodniach doświadczenia i wynosił od 50 RLU/cm² do 133 log RLU/cm². Nieznaczny wzrost wartości ATP następował aż do 8 tygodnia badania, po czym wyniki kolejnych pomiarów były niższe, a w ostatnim, szesnastym tygodniu doświadczenia wyniosły od 68 RLU/cm² dla powierzchni stali nie ulegającej korozji (P) do ok. 160 RLU/cm² dla powierzchni polietylenu (PE).

Wyniki uzyskane z powierzchni materiałów będących kontrolą pozytywną (materiały nie dopuszczone do kontaktu z wodą) już od 2 tygodnia trwania doświadczenia były znacznie wyższe od wyników uzyskanych z powierzchni materiałów stanowiących kontrolę negatywną. Wzrost wartości ATP oznaczanego z tych materiałów obserwowano przez cały okres trwania doświadczenia. Najwyższe wartości równe 50.000 RLU/cm² zaobserwowano w 12 tygodniu.



Ryc. 6. Wartości poziomu ATP oznaczanego w wodzie dopływającej do urządzenia przepływowego wyrażony w log RLU/ cm²
ATP level measured in water inlet into the continuous flow reactor

Poziom ATP w wodzie dopływającej do urządzenia przepływowego w trakcie trwania doświadczenia był stosunkowo stabilny i wahał się w wodzie jedynie w przedziale od 18 RLU/ cm² do 87 log RLU/ cm².

Mierzona temperatura wody dopływającej do urządzenia przepływowego podczas 16 tygodni trwania doświadczenia była stabilna i wynosiła średnio 21°C.

Wyniki oznaczeń ogólnej liczby mikroorganizmów oraz poziomu ATP uzyskane z powierzchni testowanych materiałów kontaktujących się z wodą wykazują wyraźną korelację. Można je też odnieść do wyników uzyskanych w innych krajach, w których również trwają badania nad opracowaniem metody oceny bezpieczeństwa mikrobiologicznego materiałów wykorzystywanych w różnego rodzaju urządzeniach i instalacjach przesyłowych dostarczających wodę przeznaczoną do spożycia. W Austrii np. pięciokrotnie wyższy poziom ATP na powierzchni badanego materiału w stosunku do kontroli negatywnej (szkło) uznawany jest za zbyt wysoki i materiał taki nie jest dopuszczany do kontaktu z wodą przeznaczoną do spożycia [4]. W naszych badaniach w przypadku materiałów niedopuszczonych do kontaktu z wodą wykazana metodą oznaczania ATP podatność na obrost mikrobiologiczny była od 100 do 500 razy wyższa od wartości oznaczonej na powierzchni materiałów dopuszczonych. Wy-

sokie wartości ATP oznaczane na powierzchni wykładziny podłogowej stanowiącej próbkę pozytywną utrzymywały się przez cały okres trwania doświadczenia.

Również w przypadku oznaczania ogólnej liczby mikroorganizmów z powierzchni materiałów, normy austriackie podają iż pięciokrotnie wyższa wartość oznaczana na powierzchni materiału badanego w stosunku od wartości uzyskanej na powierzchni materiału kontrolnego (szkło) dyskwalifikuje taki materiał jeżeli chodzi o zastosowanie go do kontaktu się z wodą przeznaczoną do spożycia. W naszych badaniach prowadzonych z zastosowaniem prototypowego urządzenia przepływowego, można było stwierdzić kilkusetkrotnie wyższą podatność na obrost mikrobiologiczny powierzchni materiałów stosowanych jako kontrola pozytywna w stosunku do materiałów stosowanych jako kontrola negatywna.

WNIOSKI

1. Stwierdzono kilkusetkrotne różnice w wartościach ATP i ogólnej liczby mikroorganizmów w wymazach z powierzchni materiałów dopuszczonych i niedopuszczonych do kontaktu z wodą.
2. Stwierdzono wyraźną korelację wyników oznaczania ogólnej liczby mikroorganizmów i poziomu ATP w wymazach pochodzących z powierzchni materiałów umieszczonych wewnątrz urządzenia przepływowego.
3. Badania wykazały przydatność skonstruowanego prototypu urządzenia przepływowego do badań podatności materiałów kontaktujących się z wodą na obrasty mikrobiologiczne.

M. Szczotko, B. Krogulska, A. Krogulski

OPRACOWANIE METODY OCENY PODATNOŚCI MATERIAŁÓW KONTAKTUJĄCYCH SIĘ Z WODĄ PRZEZNACZONĄ DO SPOŻYCIA NA OBROST MIKROBIOLOGICZNY

Streszczenie

Celem badań było sprawdzenie przydatności prototypowego urządzenia przepływowego do badań podatności na obrasty mikrobiologiczne materiałów kontaktujących się z wodą. Badania podatności materiałów na obrost mikrobiologiczny prowadzono metodą oznaczania ogólnej liczby mikroorganizmów oraz oznaczania poziomu ATP w wymazach z powierzchni materiałów umocowanych w aparacie przepływowym. Badania prowadzone były przez 16 tygodni, co 2 tygodnie z powierzchni materiałów pobierano wymazy, z których wykonywano odpowiednie oznaczenia. Zarówno w przypadku oznaczeń ogólnej liczby mikroorganizmów jak i oznaczeń poziomu ATP wykazano wyraźne różnice podatności na obrost mikrobiologiczny pomiędzy materiałami dopuszczonymi (kontrola negatywna) i niedopuszczonymi (kontrola pozytywna) do kontaktu z wodą przeznaczoną do spożycia. Wartości ogólnej liczby mikroorganizmów i poziomu ATP w kontroli negatywnej były znacznie niższe niż w kontroli pozytywnej. Wykazano też wyraźną korelację wartości ogólnej liczby mikroorganizmów i poziomu ATP oznaczanego na powierzchni tych samych materiałów. Tym samym potwierdzono przydatność prototypowego urządzenia przepływowego do prowadzenia badań, w kierunku podatności materiałów na obrost mikrobiologiczny.

M. Szczotko, B. Krogulska, A. Krogulski

ELABORATION OF THE METHOD FOR ASSESSMENT OF SUSCEPTIBILITY TO MICROBIAL GROWTH OF MATERIALS CONTACTING WITH DRINKING WATER

Summary

Initial methodological study was conducted to determine the susceptibility to microbial growth of different materials applied in contact with drinking water. The purpose of this assay was to elaborate the method for determining the ability of different materials contacting with drinking water to promote microbial growth and to determine possible correlation of results obtained by two analytic methods: inoculation of microorganisms swabbed from materials surface into a medium and ATP level examination. The assay was conducted during 16 weeks in dynamic conditions using continuous flow reactor. Every two weeks swabbes from examined materials were collected and the total number of microorganisms was determined after incubation in 22°C for 72 hours and in 37°C for 48 hours respectively. Determination of microorganisms number and ATP level were both examined in water inlet. Difference in susceptibility to microbial growth of different materials used in contact with drinking water was observed. This was confirmed by both analytic methods. Microbial growth on the surface of negative control materials (glass, polyethylene and stainless steel) was several time less intensive than on positive control material (floor finish not destined for contact with drinking water). Correlation between the quantity of microorganisms and ATP level on the surface of the same kind of materials was confirmed. Usefulness of continous flow reactor was confirmed.

PIŚMIENNICTWO

1. *Corfitzen C.B., Albrechtsen H.-J., Arvin E., Jørgensen C.*: Release of organic compounds from polymeric materials – microbial growth *In Danish*, Report to the Danish EPA, 87 pages and appendixes (Miljøproject nr 718, Miljøstyrelsen). 2002.
2. Council Directive (89/106/ECC) of 21 December 1988 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member states relating to constructions products. OJ L40, 11.2.1989, p. 12
3. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. OJ L330, 5.12.1998, p. 32-54
4. Önorm B 5018-1, 2 Prüfung der Verkeimungseigung Trinkwasserrohren, Teil1: Prüfverfahren, Teil 2: Bewertung. Österreichisches Normungsinstitut, 1020 Wien. 2002
5. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Dz. U. Nr 61, poz. 417

Otrzymano: 17.10.2007

