

BADANIA PODATNOŚCI MATERIAŁÓW KONTAKTUJĄCYCH SIĘ Z WODĄ PRZEZNACZONĄ DO SPOŻYCIA NA POWSTAWANIE OBROSTÓW MIKROBIOLOGICZNYCH

INVESTIGATION OF SUSCEPTIBILITY OF MATERIALS CONTACTING WITH DRINKING WATER FOR MICROBIAL GROWTH

Maciej Szczotko, Bożena Krogulska, Adam Krogulski

Zakład Higieny Komunalnej
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

Słowa kluczowe: *biofilm, adenozyntrifosforan (ATP), woda przeznaczona do spożycia, materiały budowlane kontaktujące się z wodą do spożycia, materiały instalacyjne*

Key words: *biofilm, adenosine triphosphate (ATP), drinking water, materials contacting with drinking water, plumbing materials*

STRESZCZENIE

Celem pracy było sprawdzenie opracowanej metody badań podatności materiałów kontaktujących się z wodą na powstawanie obrostów mikrobiologicznych pod kątem możliwości uzyskania powtarzalnych wyników. Badania prowadzono na materiałach dopuszczonych do kontaktu z wodą, umieszczonych w dwóch niezależnie pracujących urządzeniach przepływowych. W ciągu 8 tygodni, co tydzień ze ściśle określonej powierzchni testowanych materiałów pobierano wymazy, z których wykonywano oznaczenia poziomu ATP. Wyniki uzyskane z powierzchni testowanych materiałów były powtarzalne i wyraźnie zbliżone do wyników uzyskanych z powierzchni kontroli negatywnej (stal nierdzewna, materiał o niskiej podatności na obrost mikrobiologiczny). Poziom ATP na powierzchni kontroli pozytywnej (parafina, materiał o dużej podatności na obrost mikrobiologiczny) był pięćdziesiąt razy wyższy niż na materiałach dopuszczonych do kontaktu z wodą. Przedstawione badania są częścią procesu walidacyjnego metody, która w niedługim czasie będzie służyć do wdrożenia systemu pełnej oceny materiałów kontaktujących się z wodą przeznaczoną do spożycia zgodnie z postanowieniami Dyrektyw Rady 89/106/EEG i 98/83/WE.

ABSTRACT

Main purpose of this paper was to confirm of results obtained by new method based on bioluminescence technique for determination of susceptibility of materials contacting with drinking water were repeatable. Investigation was conducted during 8 weeks in dynamic conditions using continuous flow reactor UPE. Every week swabbes from tested materials were collected and level of ATP was examined. The results obtained from the surface of tested materials were repeatable and clearly approximate to those obtained from the surface of negative control material (stainless steel, low susceptibility for microbial growth). The level of the ATP on the surface of positive control material (paraffin, large susceptibility for microbial growth) was fifty times higher than that observed on other materials. Presented investigation was the main part of validation process, which in short time will serve to initiate system of complete assessment for materials contacting with drinking water according to Council Directives 89/106/EEC and 98/83/EC requirements.

WSTĘP

Wszystkie żywe komórki posiadają uniwersalny związek chemiczny - ATP (adenozyntrifosforan), który pełni funkcję przenośnika energii swobodnej zużywanej do większości procesów życiowych wymagających nakładu energii. W trakcie enzymatycznego rozkładu ATP w obecności lucyferyny, wytwarzana jest energia

światlna (bioluminescencja). Jej pomiar umożliwia ocenę stężenia ATP w badanej próbce [9]. Zjawisko to stosunkowo szeroko stosuje się do kontroli procesów związanych z namnażaniem się mikroorganizmów (bioreaktory) w badaniach środowiskowych i przemysłowych (systemy HACCP), a także w diagnostyce klinicznej [4, 6, 7]. Pomiar ATP może być również wykorzystany do określenia ilości biomasy na powierzchni

Adres do korespondencji: Maciej Szczotko, Zakład Higieny Komunalnej, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, tel. 022 54 21 374, fax 022 54 21 287, e-mail: mszczotko@pzh.gov.pl

różnego rodzaju materiałów, w tym materiałów kontaktujących się z wodą przeznaczoną do spożycia przez ludzi. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 roku [8] zastosowanie materiału do dystrybucji wody wymaga uzyskania oceny higienicznej właściwego państwowego inspektora sanitarnego. Jednym z dokumentów, który stanowi podstawę do wydania przez państwowego inspektora sanitarnego zgody na stosowanie danego materiału lub wyrobu do kontaktu z wodą przeznaczoną do spożycia przez ludzi jest atest higieniczny wydany przez uprawnioną jednostkę. Od wielu lat atesty higieniczne wydawane są przez Państwowy Zakład Higieny, aktualnie Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny (NIZP-PZH).

Istotnym elementem wpływającym na jakość wody w systemach jej dystrybucji jest podatność materiałów z jakich wykonane są instalacje na obrost mikrobiologiczny [5]. Od 2005 roku w Zakładzie Higieny Komunalnej NIZP-PZH prowadzone są prace mające na celu opracowanie wiarygodnej metody pozwalającej na określenie podatności z jaką dany materiał stosowany w systemach wody przeznaczonej do spożycia podlega zasiedlaniu przez obecne w przepływającej wodzie organizmy. Do tego celu zastosowano pomiar poziomu ATP pochodzącego z komórek mikroorganizmów zasiedlających powierzchnię badanych materiałów, które umieszczone są w urządzeniu ze stałym przepływem wody. Na podstawie serii badań z użyciem różnego rodzaju materiałów potwierdzono przydatność stosowanej metody badawczej oraz prototypowych urządzeń przepływowych (UPE), a także wykazano korelację wyników uzyskanych metodą pomiaru ATP z wynikami tradycyjnej metody posiewu i oznaczania ogólnej liczby mikroorganizmów [10]. Wdrożenie opracowywanej metody do systemu dopuszczania materiałów instalacyjnych do kontaktu z wodą przeznaczoną do spożycia przez ludzi, musi zostać poprzedzone zoptymalizowaniem warunków badań i uściśleniem procedur postępowania, co zapewni możliwość uzyskania powtarzalnych i wiarygodnych wyników badań.

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie możliwości uzyskania powtarzalnych wyników badań poziomu ATP w wymazach z materiałów umieszczonych w dwóch urządzeniach przepływowych pracujących niezależnie w zoptymalizowanych warunkach.

MATERIAŁ I METODY

Testowane materiały

Badania prowadzono na czterech rodzajach materiałów aktualnie dopuszczonych do kontaktu z wodą przeznaczoną do spożycia. Były to próbki rur z polipropylenu (PP), polietylenu (PE-80) i polipropylenu typu

RC (PP-RC) oraz próbki rur wielowarstwowych z warstwą aluminiową (PE-X-Al). Jako kontrolę pozytywną i negatywną stosowano odpowiednio płytki szklane powleczone warstwą parafiny (SP) i stal odporną na korozję (P). Wszystkie próbki materiałów testowych badane były w dwóch powtórzeniach tj. po dwa takie same elementy z każdego materiału.

Urządzenie przepływowe

W badaniach zastosowano dwa pracujące równocześnie urządzenia przepływowe (UPE) zasilane zimną wodą z instalacji, wykonane w całości ze stali odpornej na korozję oraz uszczelniających elementów teflonowych. Schemat urządzenia przepływowego wraz ze szczegółowym opisem technicznym przedstawiono w poprzedniej publikacji [10]. Średni przepływ wody został ustawiony na ok. 1 m³/dobę.

Pomiar poziomu ATP

W celu określenia poziomu ATP w wymazach z powierzchni badanych materiałów stosowano luminometr HY-LiTE 2[®] (MERCK). W wyniku chemicznej reakcji enzymatycznej lucyferyny z ATP wyzwolona energia uwalniana była w postaci kwantów światła, których pomiar pozwalał na określenie zawartości ATP w wymazach pobieranych ze ściśle określonej powierzchni testowanego materiału.

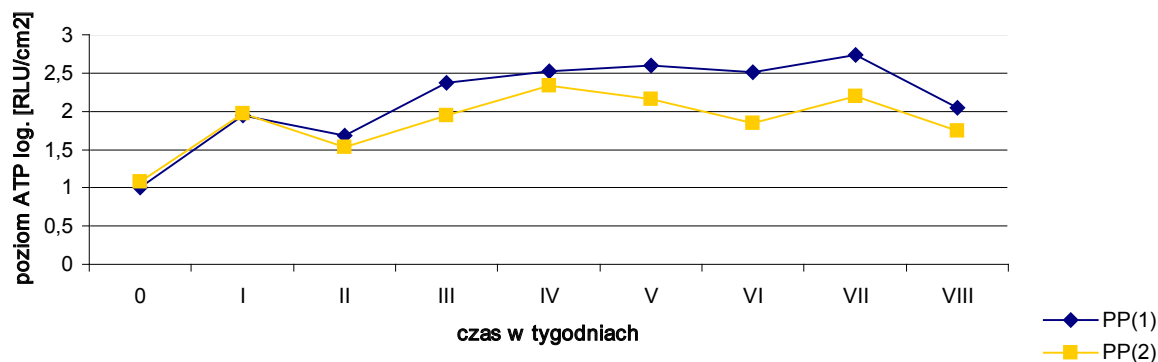
Przygotowanie próbki i metoda badania

Przed badaniem materiały o powierzchni ok. 80 cm² oczyszczono mechanicznie, wyjąłowiono za pomocą 70% alkoholu etylowego i spłukano wodą dejonizowaną, po czym pobrano wymazy kontrolne w celu określenia wyjściowego poziomu ATP. Następnie tak przygotowane materiały umieszczono wewnątrz urządzeń przepływowych. Podczas 60-dniowego doświadczenia w odstępach tygodniowych, z powierzchni 2 cm² testowanych materiałów pobierano wymazy. W pobranym materiale oznaczano poziom ATP. Przez cały okres doświadczenia monitorowano temperaturę wody wypływającej z urządzenia oraz wielkość natężenia przepływu.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wszystkie przedstawione na rycinach wyniki badań podano w skali logarytmicznej oraz w przeliczeniu na 1 cm² powierzchni materiału kontaktującego się z wodą (Ryc. 1).

Poziom ATP na powierzchni obu powtórzeń materiału z PP w trakcie trwania doświadczenia ulegał zmianom w bardzo podobny sposób. Poziom ATP oznaczony na początku (pomiar zerowy) dla PP1 i PP2 wynosił odpowiednio 10 RLU/cm² i 12 RLU/cm², po



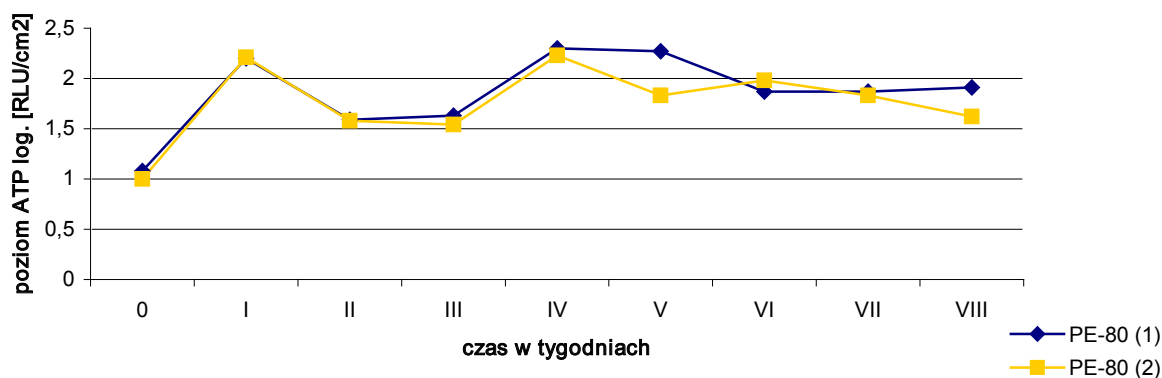
Ryc. 1. Poziom ATP oznaczony na powierzchni materiału z polipropylenu (PP)
ATP level measured on the surface of polypropylene material (PP)

pierwszym tygodniu trwania doświadczenia wzrósł w obu próbkach niemal dziesięciokrotnie. Najwyższe wartości dla PP1 zaobserwowano w siódmym tygodniu kiedy to oznaczony poziom ATP wyniósł 549 RLU/cm², natomiast w przypadku PP2 najwyższy oznaczony poziom ATP wyniósł 219 RLU/cm² w czwartym tygodniu trwania doświadczenia. W obu przypadkach stwierdzono wyraźny spadek poziomu ATP w ostatnim tygodniu pomiarów, który wyniósł 109 RLU/cm² dla PP1 i 56 RLU/cm² dla PP2.

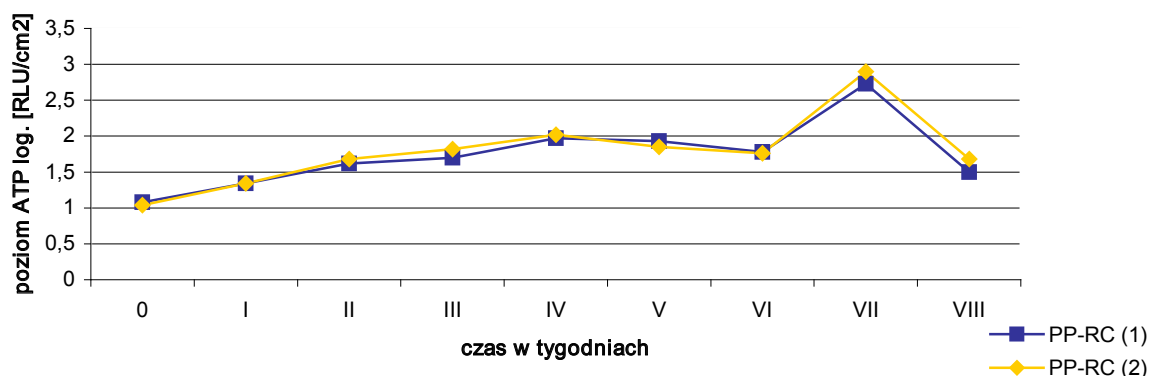
Przedstawione na rycinie nr 2 zmiany poziomu ATP na powierzchni obu testowanych próbek z polietylenu (PE) wykazywały podobną tendencję. Największy

wzrost zaobserwowano w pierwszym tygodniu doświadczenia kiedy to wartość ATP na powierzchni PE-80(1) zwiększyła się z 12 RLU/cm² do 159 RLU/cm² oraz z 10 RLU/cm² do 164 RLU/cm² na powierzchni PE-80(2). W trakcie kolejnych dwóch tygodni zaobserwowano spadek poziomu ATP do wartości 43 RLU/cm² dla PE-80(1) i 35 RLU/cm² dla PE-80(2). W kolejnych tygodniach ilość mierzonego ATP na powierzchni obu próbek ulegała nieznacznym wahaniom. Podczas ostatniego pomiaru wyniki dla PE-80(1) i PE-80(2) wyniosły odpowiednio 82 RLU/cm² i 42 RLU/cm².

Podczas całego okresu pomiarowego obserwowano stopniowy, aczkolwiek bardzo powolny wzrost wartości



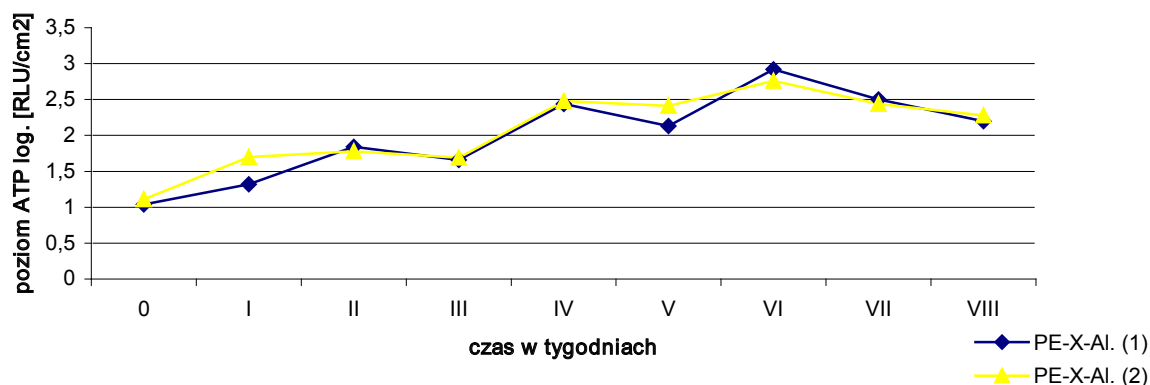
Ryc. 2. Poziom ATP oznaczony na powierzchni materiału z polietylenu (PE-80)
ATP level measured on the surface of polyethylene material (PE-80)



Ryc. 3. Poziom ATP oznaczony na powierzchni materiału z polipropylenu - RC (PP-RC)
ATP level measured on the surface of polypropylene-RC material (PP-RC)

ATP na powierzchni obu próbek z polipropylenu RC. W czwartym tygodniu wartość ta wynosiła 94 RLU/cm² dla próbki numer 1 i 105 RLU/cm² dla próbki numer 2. W obu przypadkach zaobserwowano znaczny wzrost poziomu ATP wynoszący 535 RLU/cm² i 808 RLU/cm² odpowiednio dla próbki PP-RC(1) i PP-RC(2). W ostatnim tygodniu doświadczenia wartości ATP obniżyły się do 32 RLU/cm² na powierzchni próbki nr 1 i 48 RLU/cm² na powierzchni próbki nr 2.

ni innych, wcześniej opisanych materiałów dopuszczonych do kontaktu z wodą przeznaczoną do spożycia. Najwyższy wzrost wartości ATP stwierdzono pomiędzy pierwszym a trzecim tygodniem doświadczenia kiedy to poziom ATP wynosił 209 RLU/cm² na powierzchni próbki nr 1 i 197 RLU/cm² na powierzchni próbki nr 2. W ciągu kolejnych tygodni obserwowano jedynie nieznaczne wahania oznaczanych wartości. Podczas ostatniego oznaczenia poziom ATP na powierzchni stali



Ryc. 4. Poziom ATP oznaczany na powierzchni materiału wielowarstwowego z warstwą aluminiową (PE-X-Al)
ATP level measured on the inner surface of multilayered material with aluminium internal layer (PE-X-Al)

Zmiany poziomu ATP mierzonego w wymazach z powierzchni materiałów z warstwą aluminiową (PE-X-Al) przedstawione na rycinie nr 4 charakteryzowały się znacznym, skokowym wzrostem trwającym od pierwszego do szóstego tygodnia trwania doświadczenia, w którym wartości ATP wyniosły 838 RLU/cm² na powierzchni próbki nr 1 i 572 RLU/cm² na powierzchni próbki nr 2. Po tym czasie zaobserwowano spadek poziomu ATP do 162 RLU/cm² (próbka nr 1) i 194 RLU/cm² (próbka nr 2) w ostatnim tygodniu doświadczenia.

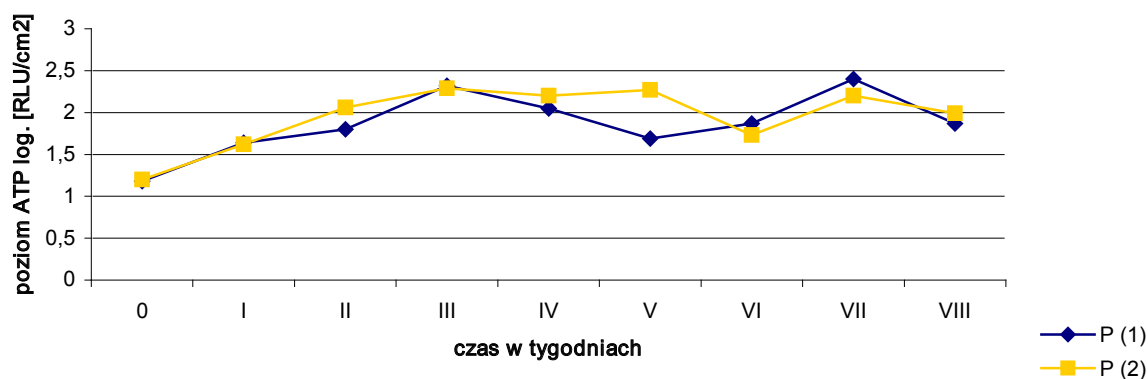
Na rycinach 5 i 6 przedstawiono odpowiednio wyniki badań uzyskane z powierzchni materiałów będących kontrolą negatywną (materiał o niskiej podatności na obrost mikrobiologiczny) i pozytywną (materiał ulegający obrostowi mikrobiologicznemu).

Zmiany poziomu ATP na powierzchni stali odpornej na korozję zachodzące w trakcie trwania doświadczenia były podobne do tych jakie obserwowano na powierzch-

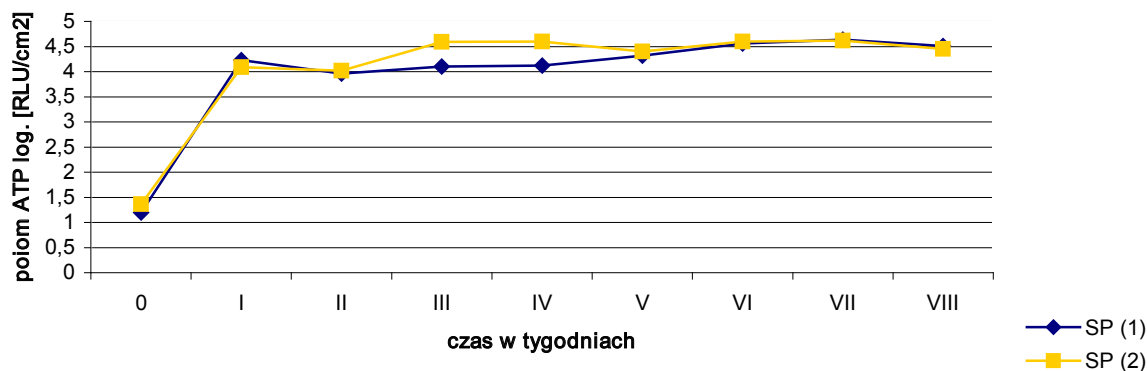
odpornej na korozję wyniósł odpowiednio 75 RLU/cm² i 97 RLU/cm².

W przypadku płytek szklanych pokrytych parafiną (kontrola pozytywna), już w trakcie pierwszego tygodnia trwania doświadczenia na powierzchni obu próbek stwierdzono bardzo wysoki wzrost poziomu ATP. Wynosił on odpowiednio 16830 RLU/cm² i 12330 RLU/cm² dla próbek nr 1 i 2. W trakcie dalszych oznaczeń obserwowano dalszy wzrost poziomu ATP jednak był on znacznie mniej dynamiczny. W ostatnim tygodniu doświadczenia oznaczone wartości wynosiły 32500 RLU/cm² dla próbki nr 1 i 28250 RLU/cm² dla próbki nr 2. Temperatura wody przepływającej przez urządzenia (UPE) w trakcie 8 tygodni trwania doświadczenia była stosunkowo stabilna i wynosiła średnio 21,6°C.

Wyniki poziomu ATP uzyskane z powierzchni materiału będącego kontrolą negatywną (P) były wyraźnie zbliżone do tych, które obserwowano na powierzchni



Ryc. 5. Poziom ATP oznaczany na powierzchni stali odpornej na korozję (P)
ATP level measured on the surface of stainless steel (P)



Ryc. 6. Poziom ATP oznaczany na powierzchni płytek szklanych powleczonej warstwą parafiny (SP)
ATP level measured on the surface of glass covered with paraffin layer (SP)

wszystkich testowanych materiałów dopuszczonych do obrotu. Poziom ATP uzyskany na stali odpornej na korozję najbliższy był temu uzyskanemu na materiale z polietylenu (PE-80) co sugeruje, że jest to materiał najbardziej odpowiedni do kontaktu z wodą przeznaczoną do spożycia. Również wyniki badań pozostałych materiałów dopuszczonych do kontaktu z wodą, w porównaniu z płytkami pokrytymi warstwą parafiny świadczą o ich niskiej podatności na powstawanie obrotu mikrobiologicznego. Wyniki uzyskane z powierzchni kontroli pozytywnej były nawet pięćdziesięciokrotnie wyższe niż najwyższe wyniki uzyskiwane na powierzchni testowanych materiałów dopuszczonych do obrotu i kontroli negatywnej. Doświadczenia przeprowadzone podczas pierwszego etapu opracowywania metody [10] jak i przedstawione w tej publikacji wykazały, że ośmiotygodniowy okres pomiarowy jest wystarczający aby wykazać wyraźne różnice pomiędzy podatnością na obrost mikrobiologiczny różnych materiałów kontaktujących się z wodą przeznaczoną do spożycia. Stosunkowo krótki czas potrzebny do wykonania badania wynika dodatkowo z wysokiej czułości pomiaru bioluminescencji, dzięki temu możliwe jest monitorowanie szybkości wzrostu biofilmu bakteryjnego już od pierwszego tygodnia jego powstawania na testowanej powierzchni [1]. Dzięki opracowaniu i wdrożeniu metody oznaczania podatności różnego rodzaju materiałów kontaktujących się z wodą na obrost mikrobiologiczny, Polska będzie mogła w pełni uczestniczyć w systemie oceny tego rodzaju materiałów zgodnie z postanowieniami Dyrektywy Rady nr 89/106/EEG dotyczącej wyrobów budowlanych [2] oraz Dyrektywy Rady nr 98/83/WE dotyczącej jakości wody przeznaczonej do spożycia [3].

WNIOSKI

1. Ustalenie ścisłych parametrów prowadzenia badań oraz uzyskana powtarzalność wyników oznaczania poziomu ATP w wymazach z materiałów umiesz-

czonych w urządzeniu przepływowym, pozwala na wdrożenie opracowanej metody do systemu dopuszczania materiałów (ich atestacji) do kontaktu z wodą przeznaczoną do spożycia przez ludzi.

PIŚMIENNICTWO

1. Blackburn C.W., Gibbs P.A., Roller S.D., Johal S.: Use of ATP in Microbial Adhesion. *Studies J. Bacteriol.* 1989, 181, 4725 - 4733.
2. Council Directive (89/106/EEC) of 21 December 1988 on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions of the Member States Relating to Constructions Product.
3. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water indented for human consumption.
4. Czaczyk K.: Pomiar stężenia ATP jako szybki test skażenia mikrobiologicznego. *Biotechnologia* 1999, 47, 187-198.
5. DVGW - Arbeitsblatt W 270, Technische Regeln, Vermehrung von Mikroorganismen auf Materialien für den Trinkwasserbereich - Prüfung und Bewertung. Bonn 1990.
6. Hawronskij J.M., Holah J.: ATP: a universal hygiene monitor. *Trends in Food Science & Technology* 1997, 8, 79-84.
7. Michalski M.: Zastosowanie HY-LiTE® w monitoringu w ramach systemu HACCP. *Przem. Spoż.* 1999, 06, 23-24.
8. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Dz. U.* nr 61, poz. 417.
9. Stryer L.: *Biochemia*. PWN, Warszawa 1997, 475-481.
10. Szczotko M., Krogulska B., Krogulski A.: Opracowanie metody oceny podatności materiałów kontaktujących się z wodą przeznaczoną do spożycia na powstawanie obrotów mikrobiologicznych. *Roczn. PZH* 2008, 59(1), 103-111.

Otrzymano: 13.11.2008

Zaakceptowano do druku: 04.05.2009

Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
serdecznie zaprasza w dniach 7-9 września 2009 r. na

V MIĘDZYNARODOWĄ KONFERENCJĘ NAUKOWĄ

Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych

W programie przewidziane są:

referaty plenarne zaproszonych wybitnych specjalistów (w tym gości zagranicznych), sesja posterowa, wystawy i prezentacje firm oraz 5 sesji referatowych:

- 1. Rozkład mikrobiologiczny i korozja wzbudzona przez mikroorganizmy materiałów technicznych,**
- 2. Mikrobiologia zbiorów muzealnych i wyrobów artystycznych,**
- 3. Mikrobiologia a jakość życia,**
- 4. Ochrona materiałów technicznych przed rozkładem i korozją wzbudzoną przez mikroorganizmy,**
- 5. Metody badań procesu biodeterioracji materiałów**

**Oplata za udział w konferencji wynosi: 800 zł - dla pracowników wyższych uczelni, instytucji naukowo-badawczych oraz pracowników przemysłu; 1500 zł - dla firm.
Doktoranci i studenci 400 zł.**

Szersze informacje na temat konferencji na stronie: [http:// korozja.p.lodz.pl](http://korozja.p.lodz.pl)

Kontakt:

Dr inż. Anna Koziróg

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka

90-924 Łódź, ul. Wólczańska 171/173, tel.: (042) 631-34-70,

fax: (042) 636-59-76, e-mail: anna.kozirog@p.lodz.pl