

KRZYSZTOF CIENIEK, KATARZYNA KUBIAK, JULITTA GAJEWSKA

Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ZASTOSOWANIE METODY OPTOELEKTRONICZNEJ DO MIKROBIOLOGICZNEJ OCENY JAKOŚCI WODY PITNEJ

Streszczenie. Celem pracy było przedstawienie nowej metody ilościowego badania mikroorganizmów w zawiesinach wodnych oraz porównanie wyników ze standardowymi metodami mikrobiologicznymi. W tym celu przebadano próbki wód pitnych. Opisywana metoda optoelektroniczna dała zadowalające wyniki, wskazujące na jej użyteczność w badaniu wody pod względem cząstek zawieszonych w wodzie, w tym mikroorganizmów hodowlanych i niehodowlanych. W celu otrzymania bardziej precyzyjnych wyników należy dopracować metodykę badań oraz skupić się na wyodrębnieniu mikroorganizmów z reszty materii nieożywionej.

Słowa kluczowe: optoelektronika, jakość wody, bakterie, cząstki, *Escherichia coli*

Wstęp

Obecnie do oceny jakości wody pitnej stosuje się standardowe metody mikrobiologiczne zawarte w normach polskich, takie jak metody hodowlane oraz metody biologii molekularnej. Ocena mikroorganizmów w wodzie pitnej z użyciem optoelektroniki stanowi nowy kierunek rozwoju w badaniach wody. Metoda ta daje możliwość szybkiej (w czasie około 10 min) i skutecznej oceny zanieczyszczenia wody cząstkami stałymi, w tym mikroorganizmami. Tempo otrzymywania wyników jest elementem kluczowym: pominięty zostaje przy identyfikacji etap inkubacji. Różnica między metodą klasyczną i optoelektroniczną polega na tym, że pierwsza z nich pozwala na identyfikację taksonomiczną drobnoustrojów, natomiast druga pozwala na wychwycenie wszystkich cząstek o rozmiarach większych od 0,2 μm , w tym pojedynczych mikroorganizmów (hodowlanych i niehodowlanych), skupisk ich komórek oraz zanieczyszczeń innego pochodzenia (KAMIŃSKI 2000). W badaniach LE CHEVALIERA i NORTONA (1992) wykazano istotną zależność między zanieczyszczeniem wody cząstkami stałymi a występowaniem pasożytów z gatunku *Giardia lamblia* czy *Cryptosporidium*.

Problem mikrobiologicznego zanieczyszczenia wody organizmami należącymi do Procariota oraz prymitywnymi Eucariota, takimi jak pierwotniaki czy nicienie, wynika z trudności udowodnienia, że zatrucie bądź infekcja zostało spowodowane wypiciem wody z konkretnego źródła. Corocznie notowane są miliony takich zachorowań. Sprawa jest ciągle aktualna i systematycznie poruszana w wielu pracach (GOSTIN i IN. 2000, WRIGHT i IN. 2004). Trudności w udowodnieniu, czy choroba jest spowodowana przez wodę, którą wypito, przedstawiają DAWSON i SATORY (2000), którzy jako ich przyczyny wymieniają: problem z pobraniem wiarygodnej próbki w odpowiednim czasie, trudność hodowli niektórych mikroorganizmów, fakt ciągłego kontaktu z wodą przy codziennych czynnościach bez możliwości zbadania, w którym momencie nastąpiło zakażenie.

Przeciętny konsument, pijąc wodę, zwraca uwagę na cechy takie jak: smak, wygląd, zapach. W pracy porównano nowoczesne optoelektroniczne metody oceny jakości wody pitnej ze standardowymi metodami mikrobiologicznymi oraz przedstawiono próbę opracowania szybkiej i wiarygodnej metody identyfikacji ilościowej organizmów patogennych lub względnie patogennych.

Materiały i metody

Celem zbadania skuteczności metody optoelektronicznej przebadano zawiesinę bakterii *Escherichia coli* o znanym stężeniu. Następnie porównano wyniki ilościowe uzyskane metodami: optoelektroniczną – w analizatorze IPSL produkcji polskiej firmy Kamika Instruments (rys. 1) oraz mikrobiologicznymi, stosowanymi w tradycyjnym laboratorium (zgodnie z PN-EN ISO 6222:2002, PN-EN ISO 6222:2004, PN-EN ISO 8199:2007). Badano zawartość cząstek stałych wraz z bakteriami w 1 ml zawiesiny rozcieńczonej w objętości 100 ml w analizatorze IPSL mierzącym optoelektronicznie, oraz 1 ml zawiesiny *E. coli* standardowymi metodami mikrobiologicznymi. W badaniach wykorzystano również próbki wody pitnej wodociągowej i oligoceńskiej z Warszawy oraz butelkowej niegazowanej.



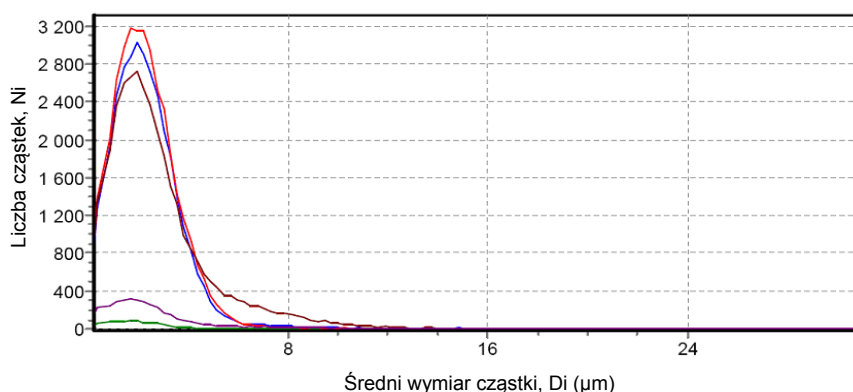
Rys. 1. Analizator IPSL – przyrząd do pomiaru cząstek w zawiesinach wodnych

Fig. 1. IPSL analyser – an instrument for particles measurement in fluids

Przed każdą serią pomiarów w analizatorze IPSL wykonano tło, czyli ocenę zanieczyszczenia wewnętrznego układu pomiarowego.

Wyniki i dyskusja

W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano następujące dane ilościowe: w przygotowanej zawieszynie *E. coli* pomiar OD przy długości fali 600 nm wynosił 0,256, co było równoznaczne z wynikiem $7,5 \times 10^7$ jtk/ml. Na podstawie tej orientacyjnej metody wykonano dalsze, bardziej precyzyjne pomiary z użyciem metod mikrobiologicznych. W przypadku badań metodą NPL uzyskano charakterystyczną liczbę 330, co według tablic McCredy'ego daje wynik $2,5 \times 10^7$ jtk/ml. Wyniki metody zalewowej (KOWAL 2000) wskazują na zawartość $3,2 \times 10^7$ jtk/ml, a wyniki badanej metody optoelektronicznej wykazują zawartość $2,9 \times 10^7$ cząstek w 1 ml, w tym mikroorganizmów. Uzyskane w analizatorze IPSL wyniki przedstawiono na rysunku 2. Pomiary wykonano w trzech próbach z zaznaczeniem poziomu tła (linia zielona) i zanieczyszczeń roztworu RF (linia fioletowa), w którym umieszczono mikroorganizmy.

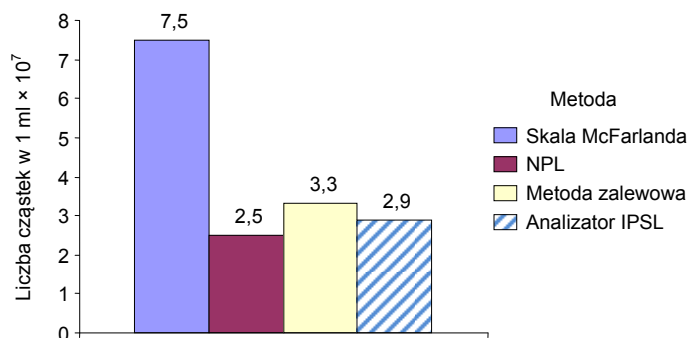


Rys. 2. Rozkład różniczkowy cząstek zawieszonych w RF w rozcieńczeniu 10^{-3} badanej zawieszyny *Escherichia coli*

Fig. 2. Differential distribution of particles in RF with *Escherichia coli* suspension 10^{-3} diluted

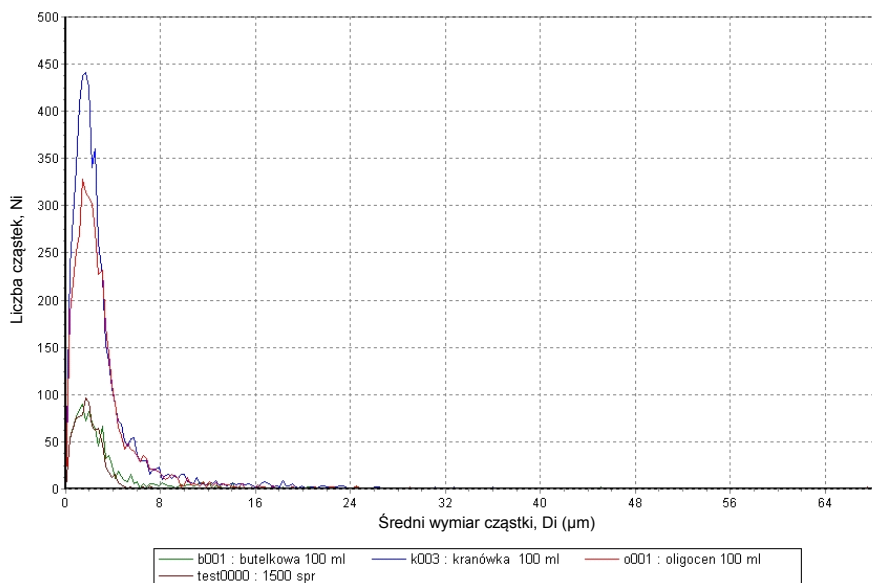
Jak pokazano na rysunku 3, wyniki standardowych metod mikrobiologicznych i szybkiej metody optoelektronicznej nie różnią się znacząco. Wyniki ilościowe są porównywalne (należy pamiętać, iż wykorzystanie analizatora IPSL powoduje zliczenie także cząstek stałych nie będących mikroorganizmami). Metoda, według której mierzy analizator IPSL, jest czuła i dokładna, liczone są wszystkie cząstki przechodzące przez przestrzeń pomiarową – mogą to być także bakterie niehodowlane oraz duże pierwotniaki pasożytnicze.

Następnym krokiem było przebadanie wody pitnej obiema metodami. Uzyskano następujące wyniki. W wodzie wodociągowej pobranej w Warszawie stwierdzono za pomocą posiewu metodą zalewową zawartość 18 jtk/ml i z użyciem analizatora IPSL –

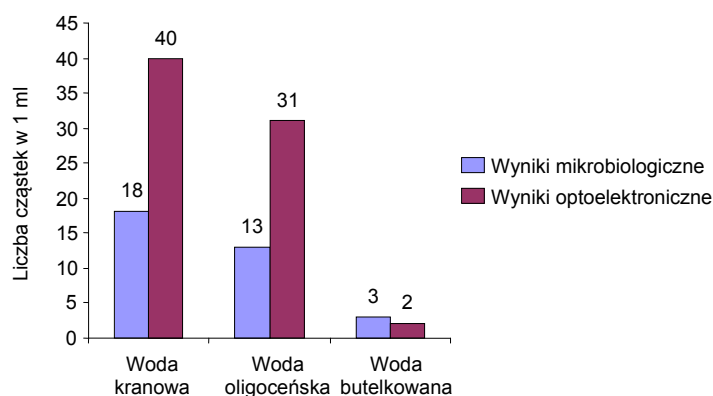


Rys. 3. Wynik analizy porównawczej metod mikrobiologicznych i badanej metody optoelektronicznej
 Fig. 3. Result of comparison analysis of microbiological methods and investigated optoelectronic method

40 cząstek w 1 ml. W przypadku wody oligoceńskiej uzyskano odpowiednio 13 jtk/ml i 31 cząstek w 1 ml, a w przypadku niegazowanej wody w butelce – 3 jtk/ml i 4 cząstki w 1 ml. Wyniki wszystkich pomiarów wykonanych w analizatorze IPSL przedstawia rysunek 4. Sumaryczne zestawienie wyników i porównanie metod zawiera rysunek 5.



Rys. 4. Rozkład różniczkowy wód pitnych z użyciem analizatora IPSL
 Fig. 4. Differential distribution of drinking waters with the IPSL analyser use



Rys. 5. Porównanie wyników badań wszystkich prób wody różnymi metodami

Fig. 5. Summary results with comparison of test methods

Badania wód pitnych za pomocą metody optoelektronicznej pozwalają określić stopień ich zanieczyszczenia oraz przyporządkować próbki do odpowiednich norm. Uzyskane w eksperymencie wyniki świadczą, że najbardziej zanieczyszczona jest woda wodociągowa, a najmniej – woda butelkowana. Żadna z wód nie przekraczała dopuszczalnych norm czystości. Wyniki metody optoelektronicznej są zawyżone w stosunku do metody płytkowej, co jest zrozumiałe, ponieważ czujnik optyczny rejestruje każdą cząsteczkę przebiegającą przez przestrzeń pomiarową, łącznie z zanieczyszczeniami nieożywionymi.

Ważnym elementem kontroli jakości wody jest ocena liczebności cząstek stałych. Powołując się na TOCZYŁOWSKĄ i RUTKIEWICZA (2002), przedstawiono metodę optoelektroniczną przystosowaną do pomiarów i klasyfikowania zarówno cząstek dużych, jak i małych. Według KAMIŃSKIEGO (2010) badania wykazują większą dokładność niż liczniki laserowe.

Możliwości zastosowania opisywanej metody są szerokie. Według MAZIARKI (1994) to zanieczyszczenia mikrobiologiczne są najczęstszą przyczyną negatywnej oceny wody pitnej, jednak w proponowanych badaniach można połączyć wszystkie aspekty dotyczące jakości wody. Problemem jest ustalenie odpowiedniej metodyki.

Obecnie dostępne są w handlu inne analizatory oparte na pomiarze ilości ATP, jak np. DeltaTox, jednak badania wykonywane z ich pomocą są mało czułe, ponieważ wykrywają jednostki dopiero od 100 jtk/ml (DELTA TOX...). Opisywana nowa metoda nie ma takich ograniczeń, bowiem wychwytuje każdą pojedynczą komórkę.

Planuje się kontynuację prac dotyczących wykrywania mikroorganizmów metodą optoelektroniczną, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości odróżnienia komórek mikroorganizmów żywych od elementów martwych. Problem stanowią agregaty komórek, które fałszują wyniki.

Opisywana metoda jest szybka i prosta, pozwala już teraz w stopniu zadowalającym ocenić liczbę cząstek, w tym mikroorganizmów, znajdujących się w roztworach wodnych.

Pomimo już widocznych wielu zalet metoda wymaga jeszcze mnóstwa pracy nad opracowaniem odpowiedniej metodyki; jej nowatorskie cechy dają jednak pozytywne perspektywy na opracowanie szybkiej analizy bez czasochłonnych badań. Uwagę należy zwrócić na fakt, że daje to możliwość wychwycenia komórek bakterii niehodowlanych w warunkach laboratoryjnych.

Literatura

- DAWSON D.J., SATORY D.P., 2000. Microbial safety of water. *Br. Med. Bull.* 56, 1: 74-83.
- DELTA TOX – Instrument szybkiej oceny jakości wody pitnej. Niezastąpiony w sytuacjach zagrożenia. Tigret Sp. z o.o., Warszawa. [<http://www.tigret.pl/files/DeltaTox.pdf>].
- GOSTIN L.O., LAZZARINI Z., NESLUND V.S., OSTREHOLM M.T., 2000. Water quality laws and waterborne diseases: *Cryptosporidium* and other emerging pathogens. *Am. J. Public Health* 90, 6: 847-853.
- KAMIŃSKI S., 2000. Analizator IPSL-CW – urządzenie do określania czystości wody. [<http://www.kamika.pl/publikacje/publikacja.13.0.html>].
- KAMIŃSKI S., 2010. Porównanie metod pomiarowych. [<http://www.kamika.pl/strony.strona.59.0.html>].
- KOWAL K., 2000. Mikrobiologia techniczna. Wyd. PŁ, Łódź.
- LE CHEVALIER M.W., NORTON W.D., 1992. Examining relationships between particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium*, and turbidity. *J. Am. Water Works Assoc.* 10: 54-60.
- MAZIARKA S., 1994. Jakość wody do picia: wymagania zdrowotne i konsumenckie. *Ochr. Środ.* 52, 1: 7-8.
- PN-EN ISO 6222:2002. Jakość wody. Oznaczanie żywych organizmów. Określanie ogólnej liczby kolonii na agarze odżywcym metodą posiewu powierzchniowego lub wgłębnego. PKN, Warszawa.
- PN-EN ISO 6222:2004. Jakość wody. Oznaczanie ilościowe mikroorganizmów zdolnych do wzrostu. Określanie ogólnej liczby kolonii metodą posiewu na agarze odżywcym. PKN, Warszawa.
- PN-EN ISO 8199:2007. Jakość wody. Ogólne wytyczne oznaczania liczby bakterii metodą hodowli. PKN, Warszawa.
- TOCZYŁOWSKA B., RUTKIEWICZ A., 2002. Zastosowanie licznika cząstek do oceny wtórnego zanieczyszczenia wody produktami korozji przewodów wodociągowych. *Ochr. Środ.* 84, 1: 21-26.
- WRIGHT J., GUNDRY S., CONROY R., 2004. Household drinking water in developing countries: a systematic review of microbiological contamination between source and point-of-use. *Trop. Med. Int. Health* 1: 106-117.

OPTOELECTRONIC METHOD UTILIZATION TO MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF DRINKING WATER QUALITY

Summary. The aim of the research was to present and compare a new quantitative method of counting microorganisms in water and water solutions to older standard methods. In order to carry out the comparison, prepared samples of water solutions from different sources were examined. Optoelectronic method described in this paper gave satisfying results, showing its usefulness in

Cieniek K., Kubiak K., Gajewska J., 2010. Zastosowanie metody optoelektronicznej do mikrobiologicznej oceny jakości wody pitnej. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #73.

analysis of the water suspended particles, i.e. cultivatable and uncultivable bacteria. In order to receive more valuable results, both methodology should be improved and the process of separating microorganisms from the rest of abiotic matter ought to be focused on.

Key words: optoelectronic, water quality, bacteria, particles, *Escherichia coli*

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Krzysztof Cieniek, Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 156, 02-776 Warszawa, Poland, e-mail: cieniek@gmail.com

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

18.10.2010

Do cytowania – For citation:

Cieniek K., Kubiak K., Gajewska J., 2010. Zastosowanie metody optoelektronicznej do mikrobiologicznej oceny jakości wody pitnej. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #73.