

mgr inż. Justyna Klein*, dr hab. Barbara Kołwzan*,
mgr Barbara Umińska-Wasiluk*, mgr inż. Hanna Moriki**

* Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej,
Wybrzeże S. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

** MPWiK Sp. z o.o.,
ul. Na Grobli 14/16, 50-421 Wrocław

* Institute of Environment Protection Engineering Wrocław University of Technology

** Municipal Water and Wastewater Company

PRZYDATNOŚĆ TESTÓW ENZYMATYCZNYCH DO OCENY JAKOŚCI BAKTERIOLOGICZNEJ WODY

USEFULNESS OF ENZYME TESTS FOR ASSESSING BACTERIOLOGICAL WATER QUALITY

Streszczenie

Celem przedstawionych badań było określenie przydatności komercyjnych testów enzymatycznych Colitag i Colilert do oceny jakości bakteriologicznej wody przeznaczonej do celów wodociągowych. Przeprowadzono badania modelowe, w których do wody wodociągowej wprowadzono szczepy wzorcowe *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp. oraz *Pseudomonas fluorescens*. Wykrywalność *Escherichia coli* w próbkach wody wodociągowej za pomocą badanych testów była zbliżona do metody klasycznej. Test enzymatyczne okazały się przynajmniej tak dobre, jak referencyjne metody do wykrywania i ilościowego oznaczania *E. coli* w wodzie przeznaczonej do spożycia, natomiast oznaczenie liczebności bakterii z grupy coli w wodzie za pomocą obu testów dało znacznie wyższe wartości NPL w porównaniu do metody klasycznej. Dotyczy to przede wszystkim NPL bakterii z grupy coli oznaczanej w wodzie powierzchniowej, gdzie przekroczenia były stosunkowo duże.

Abstract

The aim of this study was to determine the usefulness of commercial enzyme tests Colilert and Colitag to assess the bacteriological quality of water for water supply purposes. Model studies, in which tap water was introduced to the standard strains of *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp. and *Pseudomonas fluorescens*. The detection of *Escherichia coli* in water samples tested by the tests was similar to the classic method. Enzymatic test proved to be at least as good as the reference method for the detection and quantification of *E. coli* in drinking water. However, in the water the abundance determination of coliforms using both tests gave a significantly higher value MPN compared to the traditional method. Primarily it applies to coliforms denoted in raw water, where the levels were high.

1. WSTĘP

Bakterie, wirusy i inne mikroorganizmy są szeroko rozpowszechnione w środowisku wodnym, ale tylko niektóre z nich stanowią problem zdrowotny. Źródłem drobnoustrojów chorobotwórczych przenoszonych drogą wodną są najczęściej ścieki oraz spływy powierzchniowe. Możliwość zakażenia ludzi zmusza do stałej kontroli sanitarno-higienicznej zarówno wody przeznaczonej do spożycia, jak również wody w basenach kąpielowych, a także w zbiornikach wodnych mających znaczenie rekreacyjne [12].

Mikroorganizmy chorobotwórcze występują w ściekach i w wodach powierzchniowych w znacznie mniejszych ilościach niż pozostałe drobnoustroje. Dlatego też badania rutynowe koncentrują się przede wszystkim na wykrywaniu bakterii wskazujących na kałowe zanieczyszczenie wody. W sposób klasyczny organizmy wskaźnikowe, takie jak bakterie z grupy coli i *Escherichia coli* mogą być wykrywane przy wykorzystaniu metody fermentacyjno-probówkowej oraz metodą filtracji membranowej [11, 12]. Wadą tych oznaczeń jest głównie ich czasochłonność. Alternatywnymi w stosunku do metod konwencjonalnych są testy enzymatyczne bazujące na wykrywaniu obecności dwóch konstytutywnych enzymów wytwarzanych przez te bakterie wskaźnikowe: galaktozydazy i glukuronidazy [1, 13]. Efekty działania tych enzymów wykrywane są dzięki zastosowaniu oznaczonych chromogennie lub fluorogennie substratów. Komercyjnie używanych jest kilka tego typu testów takich jak Colitag™ i Colilert (AC). Podstawową zaletą omawianych testów jest wyraźnie skrócenie czasu wykonania analiz do 18÷24 godzin ze względu na brak konieczności wykonywania potwierdzeń [8–10].

Testy okazały się wielkim sukcesem, ale mają także kilka mankamentów [3–5]. Jednym z nich jest fakt, że nie wszystkie szczepy *E. coli* pochodzące z ludzkich odchodów są fluorogenne. Ponadto mikroalgi i makrofity mogą produkować β-glukuronidazę i β-galaktozydazę, które w dużych stężeniach mogą być przyczyną uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich [2]. Testy tego rodzaju mogą być używane zarówno, jako testy jakościowe (obecne/nieobecne), jak i testy ilościowe. Przy czułości 1 mikroorganizm w 100 cm³ badanej próbki testy nie wymagają przygotowywania pożywek, filtrowania próbek ani potwierdzania wyników [6–7].

Celem przedstawionych badań było określenie przydatności testów Colitag i Colilert do oceny jakości bakteriologicznej wody przeznaczonej na cele wodociągowe.

2. MATERIAŁY METODY

Materiał do badań mikrobiologicznych stanowiły próbki wody powierzchniowej i wody z sieci wodociągowej.

Analizę bakteriologiczną próbek wody wykonano za pomocą testów enzymatycznych oraz metod klasycznych. Zastosowane testy enzymatyczne Colitag™

i Colilert (AC) bazują na wykrywaniu obecności dwóch konstytutywnych enzymów wytwarzanych przez te bakterie wskaźnikowe: galaktozydazy i glukuronidazy. Testy wykonano zgodnie z procedurą podaną przez producentów. W celach porównawczych analizy wykonano metodami referencyjnymi, zgodnie z procedurą ujętą w Polskich Normach: PN-EN ISO 9308-1:2004, PN-75C-04615 ark. 05, PN-77C-04615 ark. 07.

3. WYNIKI BADAŃ

Na wstępie wykonano badania modelowe, w których do wody wodociągowej wprowadzono szczepy wzorcowe *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* oraz *Citrobacter* spp. Celem badań było określenie wykrywalności w wodzie bakterii wzorcowych za pomocą testów enzymatycznych. Próbkki badane były równolegle metodą tradycyjną i przy zastosowaniu testów enzymatycznych. Wyniki analizy bakteriologicznej wody wodociągowej przeprowadzonej testem Colitag i Colilert były zbliżone. Wykazano, że wykrywalność *Escherichia coli* w próbkach wody wodociągowej za pomocą testów enzymatycznych była tylko nieco niższa, w porównaniu do metody klasycznej (tab. 1).

Tab. 1. Porównanie wykrywalności *Escherichia coli* (szczep wzorcowy firmy IDEXX) w wodzie wodociągowej metodą filtracji membranowej oraz testami enzymatycznymi)

Nazwa próbki	Metoda	<i>E. coli</i> (szczep IDEXX) wprowadzony do wody	NPL bakterii z grupy coli w 100 cm ³	NPL <i>E. coli</i> w 100 cm ³
Woda wodociągowa sterylna	Colilert-18	+	144	144
Woda wodociągowa niesterylna	Colilert-18	+	144	144
Woda wodociągowa sterylna	Colitag	+	143	143
Woda wodociągowa niesterylna	Colitag	+	143	143
Woda wodociągowa sterylna	FM (jtk/100 cm ³)	+	184	184
Woda wodociągowa nie sterylna	FM (jtk/100 cm ³)	+	171	171

Ciekawy wydał się także problem, czy wykrywalność *Escherichia coli* może zależeć od liczby innych bakterii obecnych równocześnie w analizowanych próbkach wody. Dlatego też obok *E. coli* do wody modelowej wprowadzono bakterie typowo wodne należące do gatunku *Pseudomonas fluorescens*. Stwierdzono, że ich obecność nie miała znaczącego wpływu na wynik analizy (tab. 2).

Tab. 2. Wpływ *Pseudomonas fluorescens* na wykrywalność *Escherichia coli* testem Colilert

Data analizy	Liczba <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Średnia liczba <i>E. coli</i> w 100 cm ³
16.11.2009	0	15
	10 ³	16,5
	10 ⁴	16,5
17.11.2009	0	26,5
	10 ³	27,5
	10 ⁴	27,5

Biorąc pod uwagę fakt, że testy enzymatyczne nie wymagają potwierdzeń, ustalenie możliwości ich wykorzystania jest ważne z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego, może bowiem znacznie przyspieszyć ewentualną reakcję w przypadku stwierdzenia obecności *E. coli* w wodzie, uniemożliwiając dotarcie skażonej wody do konsumentów. Wyeliminowanie etapu potwierdzeń, koniecznego w metodzie tradycyjnej, pozwala na oszczędność czasu i wyklucza potrzebę działania w oparciu o niepotwierdzone wyniki wstępne. Teoretycznie zaoszczędzony czas może być wykorzystany na dodatkowe badania lub częstsze analizy. Testy mają również jedną praktyczną zaletę mogą być stosowane do badania wody z dużą zawartością zawiesin, co ma szczególne znaczenie przy analizie bakteriologicznej wody prowadzonej metodą filtrów membranowych. Obecność zawiesin przypadkach powodowała zatykanie porów w filtrze i uniemożliwiała sączenie. W przypadku testów enzymatycznych obecność zawiesin nie ma żadnego wpływu na odczyt wyników.

Oznaczenie liczebności bakterii z grupy *coli* za pomocą obu testów dawało zawsze znacznie wyższe wartości NPL, w porównaniu do metody klasycznej (tab. 3). Dotyczy to przede wszystkim NPL bakterii z grupy *coli* w wodzie powierzchniowej, gdzie przekroczenia były stosunkowo duże. Oznacza to, że stosowanie testów enzymatycznych do wykrywania bakterii z grupy *coli* może być obarczone stosunkowo dużym błędem. Powyższe wnioski potwierdzają wyniki

Tab. 3. Porównanie wykrywalności bakterii z grupy coli (szczep wzorcowy *Citrobacter* sp.) w wodzie wodociągowej metodą filtracji membranowej oraz testami enzymatycznymi

Nazwa próbki	Metoda	<i>Citrobacter</i> wprowadzony do wody	NPL bakterii z grupy coli w 100 cm ³
Woda wodociągowa sterylna	Colilert-18	+	33
Woda wodociągowa niesterylna	Colilert-18	+	35
Woda wodociągowa sterylna	Colitag	+	21
Woda wodociągowa niesterylna	Colitag	+	23
Woda wodociągowa sterylna	FM (jtk/100 cm ³)	+	16
Woda wodociągowa nie sterylna	FM (jtk/100 cm ³)	+	16

analizy 100 próbek wody wykonanej metodą klasyczną oraz testem Colilert przez laboratorium MPWiK we Wrocławiu. Badaniom poddano wodę powierzchniową oraz wodę po różnych etapach procesu oczyszczania. W tabeli 4 podano wartości uzyskane w wodzie powierzchniowej, gdzie liczba bakterii z grupy coli oznaczana testem Colilert różniła się czasami o kilka rzędów od wyników uzyskanych metodą fermentacyjno-probówkową.

Podsumowując, prezentowane dane potwierdzają wyniki uzyskane we wcześniejszych badaniach przeprowadzanych w Szwecji, Stanach Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii [3-6]. Testy enzymatyczne okazały się przynajmniej tak dobre, jak referencyjne metody fermentacyjno-probówkowe i filtracji membranowej do wykrywania i ilościowego oznaczania bakterii grupy coli i *E. coli* w wodzie przeznaczonej do spożycia. Wyniki te wskazują, iż badane testy mogą być alternatywą dla klasycznych długotrwałych badań jakości wody na obecność bakterii grupy coli i *E. coli* w wodzie przeznaczonej do spożycia.

W oparciu o wyciągnięte z tego badania wnioski należy stwierdzić, że konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań w celu oceny przydatności obu testów enzymatycznych do badania jakości innych rodzajów wód, a w szczególności wód powierzchniowych.

Tab. 4. Porównanie wykrywalności bakterii z grupy *coli* w wodzie powierzchniowej metodą fermentacyjno-probówkową oraz testem Colilert-18

Miejsce i data poboru próbki		Colilert-18		Metoda fermentacyjno-probówkowa	
		NPL grupy <i>coli</i> w 100 cm ³	NPL <i>E. coli</i> w 100 cm ³	NPL bakterii grupy <i>coli</i> (PN-75C-04615 ark. 05)	NPL bakterii grupy <i>coli</i> typu fekalnego (PN-77C-04615 ark. 07)
Odra	07.05.2008	440	30	280	23
	01.07.2008	24196	20	140	23
	07.10.2008	1918	144	790	230
Oława	07.05.2008	1987	147	1300	230
	11.06.2008	4106	6131	490	490
	02.07.2008	6131	487	790	230
	10.09.2008	2603	323	330	330
	15.10.2008	934	171	170	170
Nysa Kłodzka (Pompownia Michałów)	11.06.2008	6131	218	350	31
	02.07.2008	2359	41	220	130
	05.08.2008	2420	152	790	230
	15.10.2008	933	134	330	170
Oława (Pompownia Czechnica)	16.06.2008	40	4	17	8
	30.06.2008	88	6	8	8
	07.07.2008	291	2	23	13
	14.07.2008	172	2	14	2
	28.07.2008	88	6	2	2
	15.09.2008	214	4	17	17
	20.10.2008	248	4	8	8

4. WNIOSKI

1. Badania wykazały, że wykrywalność bakterii z grupy *coli* i *Escherichia coli* metodami klasycznymi i enzymatycznymi była zbliżona rzędem wielkości.
2. Testy Colitag i Colilert wykazały kilka zalet w porównaniu do metody tradycyjnej, takich jak skrócenie czasu analizy i wyeliminowanie etapu potwierdzeń.

3. Test enzymatyczne okazały się przynajmniej tak dobre, jak referencyjne metody fermentacyjno-probówkowe i filtracji membranowej do wykrywania i ilościowego oznaczania bakterii grupy coli i *E. coli* w wodzie przeznaczonej do spożycia. Stwierdzono także, że obecność innych bakterii, w tym *Pseudomonas fluorescens* nie miała wpływu na wynik analizy.
4. Oznaczenie liczebności bakterii z grupy coli za pomocą obu testów dawało wyższe wartości NPL w porównaniu do metody klasycznej i ich stosowanie w przypadku wód silnie zanieczyszczonych mikroorganizmami może być problematyczne.

Publikację wyników badań sfinansowano w ramach projektu „Badania służące rozwojowi naukowemu kadry oraz badania służące kształtowaniu specjalizacji naukowej” Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej” nr 33-223-9.

PISMIENNICTWO

- [1] Cowburn J.K., Goodall T., Fricker E. J., Walter K.S., Fricker C.R.: A preliminary study of the use of colilert for water quality monitoring. Lett. Appl. Microbiol. 1994, 19:50-52.
- [2] Davies, C.M., Apte S.C., Peterson S.M., Stauber J.L.: Plant and algal interference in bacterial 3-D-galactosidase and 3-D-glucuronidase assays. Appl. Environ. Microbiol. 1994, 60:3959-3964.
- [3] Eckner K.F.: Comparison of Membrane Filtration and Multiple-Tube Fermentation by the Colilert and Enterolert Methods for Detection of Waterborne Coliform Bacteria, Escherichia coli, and Enterococci Used in Drinking and bathing Water Quality Monitoring in Southern Sweden, Applied and Environmental Microbiology, Aug. 1998, 64, 8: 3079–3083.
- [4] Edberg S.C., Allen M.J., Smith D.B.: The National Collaborative Study: National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and Escherichia coli from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. Appl. Environ. Microbiol. 1988, 54:1595-1601.
- [5] Fricker C.R., Fricker E.J., Goodall T., Cowburn J.: Qualitative procedures for the detection of E. coli, coliforms and enterococci in water using QuantiTray and Enterolert. In Proceedings of the Water Quality Technology Conference, New Orleans. American Water Works Association, Denver, Colo., 1995, 2031–2036.
- [6] Fricker E.J., Fricker C.R.: Use of two presence/absence systems for the detection of E. coli and coliforms from water. Water Res. 1996, 30:2226–2228.
- [7] http://www.wioa.org.au/conference_papers/2000/pdf/paper14.pdf, Hanko E.: Colilert - what's all the fuss about?
- [8] <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/water/pdf/w18.pdf>
- [9] <http://www.idexx.com/water>
- [10] <http://www.tigret.pl>
- [11] Kołwzan B.: Zastosowanie czujników biologicznych (biosensorów) do oceny jakości wody. Ochrona Środowiska 2009, 4: 3–14.
- [12] Kołwzan B., Adamiak W., Grabas K., Pawełczyk A.: Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska (dokument elektroniczny): Oficyna Wydaw. PWr, Wrocław 2005.
- [13] Trepeta R.W., Edberg S.C.: Methylumbelliferyl-3-D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 1984, 19:172-174.