

BADANIA NAD INNOWACYJNYMI TECHNOLOGIAMI POPRAWY SKŁADU MIKROBIOLOGICZNEGO WODY UZDATNIANEJ NA CELE WODOCIĄGOWE

Praca zbiorowa pod redakcją naukową
Krzysztofa WIERZBICKIEGO



GLIWICE 2023

MONOGRAFIA



**BADANIA NAD INNOWACYJNYMI TECHNOLOGIAMI
POPRAWY SKŁADU MIKROBIOLOGICZNEGO WODY
UZDATNIANEJ NA CELE WODOCIĄGOWE**

**Praca zbiorowa pod redakcją naukową
Krzysztofa WIERZBICKIEGO**

Autorzy

**Andrzej EYMONTT, Beata WEBER-DĄBROWSKA,
Maciej ŻACZEK, Andrzej GÓRSKI, Krzysztof WIERZBICKI,
Artur TÓRZ, Roman TURCZYN, Lidia MIZAK,
Sylvia PARASION, Magdalena KWIATEK,
Aleksandra NAKONIECZNA, Radosław KALINOWSKI,
Marcin KAŻMIERCZUK, Barbara GWOREK,
Witold Jan WARDAL, Józef WOWK, Jan GUTKOWSKI**

**WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ
GLIWICE 2023
UIW 48600**

Opiniodawcy

Prof. dr hab. inż. Janusz ŁOMOTOWSKI

Prof. dr hab. inż. Jan ŁABĘTOWICZ

Kolegium redakcyjne

REDAKTOR NACZELNY – Dr hab. inż. Barbara KULESZ, prof. PŚ

REDAKTOR DZIAŁU – Dr hab. inż. Wojciech SZCZEPANKIEWICZ, prof. PŚ

SEKRETARZ REDAKCJI – Mgr Monika MOSZCZYŃSKA-GŁOWACKA

Wydano za zgodą

Rektora Politechniki Śląskiej

Redakcja językowa

Joanna BULSKA

Redakcja techniczna

Ewa TENEROWICZ

Opracowanie edytorskie

Joanna JENCZEWSKA-PAJKA

Projekt okładki

Mgr inż. arch. Agnieszka MĘDREK



**Instytut Technologiczno-Przyrodniczy
– Państwowy Instytut Badawczy
w Falentach**

ISBN 978-83-7880-912-8

© Copyright by

Wydawnictwo Politechniki Śląskiej

Gliwice 2023

Afiliacja autorów:

***Instytut Technologiczno-Przyrodniczy w Falentach – Państwowy Instytut Badawczy,
Oddział w Warszawie***

dr hab. inż. Andrzej Eymontt, prof. ITP-PIB, prof. dr hab. inż. Krzysztof Wierzbicki

***Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Katedra Technologii
i Przedsiębiorczości w Przemysle Drzewnym***

dr inż. Witold Jan Wardal

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu
prof. dr hab. med. Andrzej Górski, dr n. biol. Beata Weber-Dąbrowska, mgr Maciej Żaczek

Politechnika Śląska, Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów, Gliwice

dr inż. Artur Tórz, dr inż. Roman Turczyn

Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Puławach

dr Lidia Mizak, dr Magdalena Kwiatek, dr Aleksandra Nakonieczna

***Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie sp. z o.o., Pracownia
Cytogenetyki i Biologii Molekularnej***

dr Sylwia Parasion

Instytut Ochrony Środowiska – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa

prof. dr hab. Barbara Gworek, dr Marcin Kaźmierczuk

RADIKAL Science Consultancy

dr inż. Radosław Kalinowski

“Energoopt” Józef Wowk, Leszno

mgr inż. Józef Wowk

Firma Gutkowski, Leszno

dr inż. Jan Gutkowski

Składam podziękowania wszystkim wyżej wymienionym Autorom za owocną współpracę, a także pani dr Renacie Wolinowskiej z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego – Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej, Centrum Badań Przedklinicznych, za pomoc w redagowaniu rozdziału drugiego. Składam również podziękowania za aktywny udział w badaniach panu dr. n. med. Romualdowi Gryko i pani mgr inż. Dorocie Olejniczak, a także za pomoc w organizowaniu badań panu tech. Michałowi Kuźniarowi i panu mgr. inż. Włodzimierzowi Puchalskiemu.

Krzysztof Wierzbicki

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	9
Spis literatury do rozdziału 1	10
2. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA	12
2.1. Wybrane zagadnienia dotyczące jakości wody przeznaczonej do spożycia.....	12
2.2. Czynniki wpływające na skład wód wodociągowych.....	14
2.3. Bezpieczeństwo mikrobiologiczne podczas eksploatacji wodociągów	47
2.4. Mechanizm powstawania biofilmów i ich znaczenie w instalacjach wodociągowych.....	56
Spis literatury do rozdziału 2	67
Spis rozporządzeń i norm.....	76
3. BADANIA PILOTAŻOWE NAD OBECNOŚCIĄ BAKTERIOFAGÓW W WODACH WODOCIĄGOWYCH I ŚCIEKACH	78
Spis literatury do rozdziału 3	87
4. CHARAKTERYSTYKA I ZAŁOŻENIA METODYCZNE PRAC BADAWCZYCH NAD BIOLOGICZNĄ STABILIZACJĄ WODY PRZEZNACZONEJ DO SPOŻYCIA (PROJEKT BADAWCZY K2/IN2/7/18/844/NCBIR/13)	88
4.1. Cel projektu badawczego	88
4.2. Krótkie studium piśmiennictwa związanego z tematyką projektu	89
4.3. Zespół badawczy	93
4.4. Zakres prac realizowanych przez ITP Warszawa	93
4.5. Metodyka badań bakterii i bakteriofagów prowadzonych przez IITD PAN	95
4.6. Metodyka wykonania i badań matryc z biopolimerów prowadzonych przez Politechnikę Śląską	96
4.7. Metodyka badań prowadzonych przez WIHE, Oddział w Puławach.....	97
4.8. Metodyka badań prowadzonych przez Instytut Ochrony Środowiska w Warszawie	99
Spis literatury do rozdziału 4	100
5. OBIEKTY DOŚWIADCZALNE	104
5.1. Stacje badawcze w Broniszach.....	104
5.2. Stacja badawcza w Grodzisku koło Pleszewa	107

6. SELEKCJA BAKTERIOFAGÓW	108
6.1. Izolacja bakteriofagów doświadczalnych.....	108
6.2. Badania właściwości biologicznych izolowanych bakteriofagów	110
6.3. Morfologia i ultrastruktura izolowanych bakteriofagów.....	115
6.4. Konkluzje	116
Spis literatury do rozdziału 6	116
7. BIODOPOLIMERY OTRZYMYWANE NA BAZIE CHITOZANU	117
7.1. Metoda otrzymywania doświadczalnych biopolimerów	117
7.2. Badania bakteriobójczych właściwości biopolimerów.....	126
7.3. Badania laboratoryjne z zastosowaniem zmodyfikowanych biopolimerów chitozanu	128
Spis literatury do rozdziału 7	131
8. BAKTERIE CHOROBTWÓRCZE I HEMOLIZUJĄCE	134
8.1. Kompendium wiedzy o bakteriach chorobotwórczych	134
8.2. Bakterie hemolizujące	140
Spis literatury do rozdziału 8	153
9. BADANIA NA OBIEKTACH DOŚWIADCZALNYCH	156
9.1. Wstępne badania nad uzdatnianiem wody na SUW w Grodzisku skażonej mikrobiologicznie oczyszczonymi ściekami komunalnymi	156
9.2. Badania nad możliwością stabilizacji składu mikrobiologicznego z wykorzystaniem procesów naturalnych	165
9.3. Badania nad usuwaniem bakterii hemolizujących.....	169
9.3.1. Metodyka badań.....	169
9.3.2. Wyniki badań pilotażowych.....	171
9.3.3. Podsumowanie wyników badań.....	175
9.4. Badania przeprowadzone w modelowej stacji uzdatniania wody w Broniszach	176
9.4.1. Badania nad samooczyszczaniem się układu doświadczalnego z zanieczyszczeń mikrobiologicznych.....	176
9.4.2. Badania z zastosowaniem fagów do poprawy składu biologicznego wody	181
9.4.3. Ocena skuteczności uzdatniania wody w modelowej stacji z zastosowaniem kolumny filtracyjnej wypełnionej chitozanem	183
9.4.4. Ocena działania układu: zbiornik reakcji, filtr piaskowy, kolumna wypełniona chitozanem	188
9.4.5. Ocena działania zintegrowanego układu dwóch filtrów z jednoczesnym zaszczepieniem bakteriami i fagami.....	189
9.4.6. Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań	190
9.5. Badania toksyczności zmodyfikowanych biopolimerów chitozanu.....	191
Spis literatury do rozdziału 9	195
10. PODSUMOWANIE	197
Streszczenie	200

TABLE OF CONTENTS

1. INTRODUCTION	9
References for Chapter 1.....	10
2. REVIEW OF THE LITERATURE	12
2.1. Selected topics in drinking water quality	12
2.2. Factors affecting the composition of tap water	14
2.3. Microbiological safety during the exploitation of water supply systems.....	47
2.4. Mechanism of biofilms formation and their significance in water supply systems	56
References for Chapter 2.....	67
List of regulations and standards.....	76
3. PILOT STUDIES ON THE PRESENCE OF BACTERIOPHAGES IN WATER SUPPLY SYSTEMS AND WASTEWATERS	78
References for Chapter 3.....	87
4. BIOLOGICAL STABILIZATION OF DRINKING WATER – PROJECT CHARACTERISTICS AND METHODOLOGICAL ASSUMPTIONS OF THE RESEARCH TASKS (NCBIR RESEARCH PROJECT NO K2/IN2/7/18/844/NCBIR/13)	88
4.1. Aim of the project.....	88
4.2. A short survey of literature related to the project	89
4.3. The research team.....	93
4.4. Scope of work carried out by ITP Warsaw	93
4.5. Methodology of bacteria and bacteriophage research carried out by IITD PAS	95
4.6. Methodology of preparation and testing of biopolymer matrices carried out by the Silesian University of Technology	96
4.7. Methodology of the research carried out by WIHE branch in Puławy	97
4.8. Methodology of the research carried out by the Institute of Environmental Protection – National Research Institute in Warsaw.....	99
References for Chapter 4.....	100
5. EXPERIMENTAL FACILITIES	104
5.1. Experimental facilities in Bronisze	104
5.2. Experimental facility in Grodzisk near Pleszew.....	107

6. BACTERIOPHAGES SELECTION	108
6.1. Isolation of experimental bacteriophages	108
6.2. Studies of biological properties of isolated bacteriophages	110
6.3. Morphology and ultrastructure of isolated bacteriophages	115
6.4. Conclusions	116
References for Chapter 6.....	116
7. PREPARATION OF CHITOSAN-BASED BIOCOMPOSITES	117
7.1. Preparation methods of experimental biopolymers	117
7.2. Investigation of bactericidal properties of biopolymers	126
7.3. Laboratory tests with the use of modified chitosan biopolymers	128
References for Chapter 7	131
8. PATHOGENIC AND HEMOLYZING BACTERIA	134
8.1. The compendium on pathogenic bacteria	134
8.2 Hemolytic bacteria.....	140
References for Chapter 8.....	153
9. TESTS CONDUCTED AT EXPERIMENTAL FACILITIES	156
9.1. Water treatment preliminary study of water microbiologically contaminated with the treated municipal wastewater at the water treatment plant SUW Grodzisk.....	156
9.2. Studies on the possible stabilization of microbiological composition of water using natural processes	165
9.3. Studies on the removal of hemolytic bacteria	169
9.3.1. Research methodology	169
9.3.2. Results of pilot studies	171
9.3.3. Conclusions from the research.....	175
9.4. Tests carried out at the model water treatment plant in Bronisze.....	176
9.4.1. The experimental set-up self-cleaning investigations from a microbiological contamination	176
9.4.2. Results of the application of phages to improve the biological composition of water	181
9.4.3. Evaluation of the water treatment efficiency in a model station using a chitosan-filled filter column.....	183
9.4.4. Performance evaluation of the reaction tank/sand filter/chitosan column system	188
9.4.5. Evaluation of the performance of two filters integrated system with coincident inoculation with bacteria and phages	189
9.4.6. Conclusions from the research.....	190
9.5. Toxicity studies of modified chitosan biopolymers.....	191
References for Chapter 9.....	195
10. SUMMARY	197
Abstract	201

1. WSTĘP

Celem monografii jest próba sformułowania podstaw nowej technologii stabilizacji składu biologicznego wód podziemnych przeznaczonych do spożycia. W pracy dokonano przeglądu zagadnień związanych z uzdatnianiem wód, ochroną zdrowia konsumentów oraz możliwością wdrożenia nowej technologii stabilizacji składu mikrobiologicznego wody wodociągowej. Prace badawcze i wdrożeniowe nad nową technologią były prowadzone od wielu lat, a ich omówienie stanowi niniejsza monografia.

Ważnym etapem działań zmierzających do wdrożenia nowej technologii stabilizacji składu biologicznego wody były badania realizowane w ramach projektu badawczego K2/IN2/7/181844/13 INNOTECH/NCBiR pt. „Biologiczna stabilizacja mikrobiologii wody przeznaczonej do spożycia”. Wyniki tych badań wykorzystano w tej pracy.

W wodzie uzdatnionej liczba organizmów wskaźnikowych powinna być mniejsza od wartości określonych w obowiązujących przepisach sanitarnych. Wodę wodociągową uważa się za stabilną, gdy w trakcie jej dystrybucji nie dochodzi do wzrostu liczby bakterii wskaźnikowych powyżej wartości dopuszczalnych.

Należy jednak pamiętać, że mamy do czynienia z tysiącami odmiennych gatunków bakterii występujących w różnych ilościach, w zależności od źródła zasilania wodociągu w wodę, a ponadto do budowy instalacji SUW są stosowane różne materiały, na których rozwijają się biofilmy o zróżnicowanym składzie mikrobiologicznym – **Lührig i in. [2015], Tomczyk i in. [2016], Schleich i in. [2019], Chan i in. [2019]**.

Wyniki badań, jak również rezultaty doświadczeń praktycznych jednoznacznie wskazują na niezaprzeczalną funkcję biofilmu w technologii uzdatniania wody. Biofilmy powstają samoistnie na wewnętrznych powierzchniach instalacji wodociągowej. Wykazano, że są one strukturami o bardzo złożonym składzie gatunkowym. W każdym systemie wodociągowym skład mikrobiologiczny charakteryzuje się quasi-stałą liczbą gatunków mikroorganizmów – **Liang i in. [2016], Pinto i in. [2014]**. Przy użyciu środków dezynfekcyjnych (np. chloru) eliminuje się ilość szkodliwych mikroorganizmów w wodzie, lecz pojawiają się problemy z ubocznymi produktami, powstającymi w wyniku niekontrolowanych przemian chemicznych – **Zibuschka [1996], Nawrocki [2010]**.

Dotychczas nierozwiązanym problemem naukowym i praktycznym jest określenie, w jaki sposób można ograniczyć powstawanie dogodnych warunków środowiskowych w instalacjach wodociągowych, które sprzyjają rozwojowi niepożądanych gatunków mikroorganizmów

i przyczyniają się do utraty stabilności mikrobiologicznej wody wodociągowej. Brak tej stabilności w wielu instalacjach wodociągowych skutkuje potrzebą stosowania różnego rodzaju środków dezynfekcyjnych, przyczyniających się z jednej strony do dezaktywacji mikroorganizmów chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórczych, a z drugiej strony – powodujących powstawanie wielu szkodliwych związków chemicznych. Może również negatywnie wpływać negatywnie na stan techniczny instalacji – **Adamski [2014], Grabińska-Łoniewska, Siński [2010]**.

Stosowane najczęściej do dezynfekcji w SUW związki chloru powodują wytwarzanie się halogenowych produktów organicznych, w tym trihalometanów (THM), które są powszechnie uważane za przyczyniające się do powstawania chorób nowotworowych.

Aby uniknąć konieczności stosowania środków dezynfekcyjnych, rozpoczęto poszukiwania innych metod, mogących przyczynić się do poprawy składu mikrobiologicznego wody – **Weber-Dąbrowska i in. [2008]**. Poszukiwania te wskazały na możliwość zastosowania bakteriofagów i chitozanu – **Kaźmierczuk, Kalisz [2008]**.

Niniejsza monografia może być pomocna przy formułowaniu tez kolejnych zadań badawczych dla osiągnięcia biologicznej stabilności wody wodociągowej.

Spis literatury do rozdziału 1

1. Adamski W., 2014. Stan i trendy w rozwoju technologii oczyszczania wody. *Technologia Wody* 2 (34), s. 14-18.
2. Chan S., Pullerits K., Keucken A., Persson K., Paul C.J., Rådström P., 2019. Bacterial release from pipe biofilm in a full-scale drinking water distribution system. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 5 (1:9).
3. Grabińska-Łoniewska A., Siński E., 2010, Mikroorganizmy chorobotwórcze i potencjalnie chorobotwórcze w ekosystemach wodnych i sieciach wodociągowych, Seidel-Przywecki Sp. z o.o., Warszawa, s. 256.
4. Kaźmierczuk M., Kalisz L., 2008. A Proposal for Extending Biological Criteria Applied in Sanitary Control of Sewage Sludge Intended for Agricultural Use. *Polish J. Environ. Stud.*, 17 (5).
5. Lührig K., Canbäck B., Paul C., Johansson T., Persson K., Rådström P., 2015. Bacterial Community Analysis of Drinking Water Biofilms in Southern Sweden. *Microbes Environ.* 30(1), 99-107.
6. Nawrocki J., 2010. *Uzdatnianie wody: procesy fizyczne, chemiczne i biologiczne*. PWN, Warszawa. T. 1, s. 422.
7. Schleich C., Chan S., Pullerits K., Besmer M., Paul C.J., Rådström P., Keucken A., 2019. Mapping Dynamics of Bacterial Communities in a Full-Scale Drinking Water Distribution System Using Flow Cytometry. *Water* 11(10), 2137.

8. Tomczyk B., Kaźmierczuk M., Kalinowski R., Paczkowski S., Rybak J., 2016. Biofilm – źródło zagrożeń mikrobiologicznych w przemyśle, *Przemysł Chem.* 95 (3), 581-586.
9. Weber-Dąbrowska B., Gworek B., Wowk J., 2008. Raport z badań pobranych próbek wody z 20 miejsc. Maszynopis.
10. Zibuschka F., 1996. Skłonność wody pitnej do zakwitania. Międzynarodowa Konferencja pt. „Zaopatrzenie w wodę miast i wsi”. PZITS, Poznań, s. 497-508.

2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

2.1. Wybrane zagadnienia dotyczące jakości wody przeznaczonej do spożycia

Opracowanie nowej technologii stabilizacji mikrobiologicznej wody wymagało wieloaspektowej analizy zmian stanu wiedzy na przestrzeni kilkunastu lat. Jednocześnie, zgodnie z założonym celem monografii, uwzględniono pozycje literatury dokumentujące działania, które zostały podjęte, aby poprawić dostarczenie konsumentom wody dobrej jakości pod względem chemicznym, fizycznym i mikrobiologicznym.

Wichrowska i in. [2007] w sposób kompleksowy odnoszą się do nowelizacji rozporządzenia ministra zdrowia z 29 marca 2007 roku, sugerując poprawę dostępu do wody o jakości zgodnej z oczekiwaniami odbiorców.

Publikacja **Wichrowskiej i in. [2010]** odwołuje się do nowelizacji rozporządzenia ministra zdrowia z dnia 20 kwietnia 2010 roku w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Nowelizacja ta została dokonana w celu pełnej i właściwej implementacji Dyrektywy 98/83/WE, zgodnie z uwagami i zaleceniami Komisji Europejskiej. W tej publikacji autorzy w sposób syntetyczny omówili poszczególne zarządzenia. Obie publikacje świadczą o konsekwentnym dążeniu do poprawy jakości wody, zgodnie z tendencjami światowymi.

Tomaszewski i in. [2011] opisali szczegółowo kolejne fazy wprowadzania Dyrektywy 98/83/WE, zmierzające do wdrożenia Planu Bezpieczeństwa Zdrowotnego Wody.

Wichrowska i in. [2011] przeanalizowali problemy z wprowadzeniem „Drinking Water Directive” (DWD), której celem jest zagwarantowanie wszystkim mieszkańcom wody bezpiecznej dla zdrowia, spełniającej równocześnie najwyższe wymagania jakościowe.

Istniejący stan braku wdrożeń dotychczasowych międzynarodowych ustaleń w sprawie wody sprowokował opracowanie publikacji **Wichrowskiej i Mulik [2013]**, opisującej zintensyfikowane działania Głównego Inspektora Sanitarnego na rzecz wdrożenia Dyrektywy 98/83/WE. Między innymi powołana została Komisja ds. Bezpieczeństwa Zdrowotnego Wody przy Radzie Sanitarno-Epidemiologicznej Głównego Inspektora Sanitarnego, w dniu 16 listopada 2012 roku. Wnioski z tego posiedzenia zostały opisane w omawianej publikacji.

Interesujące badania z zakresu bezpieczeństwa wody (DWD) przeprowadził **Mnich [2009]** i opisał plan bezpieczeństwa wodnego od ujęcia do kranu, krytykując dotychczas stosowany

(od 2009 roku) równoległy system badań, wykonywany przez inspekcje sanitarne i inne uprawnione laboratoria. Dublowanie wyników badań prowadzi do niepotrzebnego chaosu i nie poprawia jakości wody.

Sprawom prawnym poświęcona jest publikacja **Korzeniowskiego [2012]**, który stwierdza: „Cel to zdarzenie zamierzone przez kogoś, każde bowiem działanie *ex definitione* zamierza do osiągnięcia pewnego celu, czyli zamierzonego skutku. W sprawie szczególnie ważna jest odpowiedź na praktyczne pytanie, czy dane działanie w postaci uchwalenia przepisów prawa osiągnęło zamierzony przez prawodawcę cel”. W tekście publikacji omówiono poszczególne dyrektywy i rozporządzenia odnoszące się do ochrony wód powierzchniowych i podziemnych, które są również zawarte w Prawie wodnym.

W dotychczas analizowanych publikacjach wielokrotnie był poruszony aspekt ochrony wód w zlewni. Ta tematyka jest przedmiotem m.in. publikacji **Nachlik [2012]**, która omawia wdrożenie Ramowej Dyrektywy Wodnej (RDW), będącej gwarancją zapewnienia odpowiedniej jakości akwenów wykorzystywanych do poboru wód. Jest to zasadne, mając na uwadze publikację **Kowala [1996]**, który stwierdził, że ok. 50% wody do zaopatrzenia ludności w Polsce jest pobierana z ujęć powierzchniowych, tj. rzek i zbiorników zaporowych. W związku z tym problematyka ochrony wód staje się szczególnie istotna. Na ten fakt zwrócili uwagę m.in. **Eymontt i Wierzbicki [2019]**, proponując racjonalną technologię rewitalizacji ekosystemów wodnych, która zapobiega ich eutrofizacji.

Omawiając rozwój prac badawczych w kierunku biologicznej stabilizacji wody przeznaczonej do spożycia, warto wspomnieć o rozwijającym się nowym kierunku działalności, podjętym w celu zminimalizowania zanieczyszczenia środowiska. Obecnie, według **Kidy i in. [2017]**, liczba związków chemicznych znajdujących się w środowisku przekracza 65 mln, a większość z nich to substancje pochodzenia antropogenicznego, np. farmaceutyki, uboczne składniki produktów do dezynfekcji, związki zakłócające procesy hormonalne, środki ochrony roślin.

Skutecznymi sposobami usuwania tych zanieczyszczeń są zaawansowane metody chemicznego utleniania, zwane zielonymi technologiami lub zieloną chemią. Dzięki generowanym w tych procesach rodnikom hydroksylowym wiele toksycznych i trudno rozkładalnych związków ulega degradacji. Dane literaturowe wskazują, że najpopularniejszymi metodami są proces Fentona i ozonowanie. Wielu autorów bada obecnie możliwość poprawienia efektywności tych procesów.

W celu zmniejszenia zanieczyszczenia akwenów wodami pościekowymi **Withey i in. [2005]** omówili perspektywę stosowania technik fagowych w systemach oczyszczania ścieków w celu ograniczenia emisji nieczystości i osadów do środowiska. Oddziaływanie bakteriofagów na śmiertelność bakterii daje możliwość wpływania na proces oczyszczania przez kontrolę nad znaczną liczbą kluczowych grup funkcyjnych. Zabiegi fagowe umożliwiają nadzór nad problemami eksploatacyjnymi procesu oczyszczania ścieków, takimi jak: pienienie kożucha w obróbce osadu, odwadnianie i przefermentowanie osadów, obecność bakterii

chorobotwórczych (co powoduje zmniejszenie konkurencji między bakteriami uciążliwymi i funkcjonalnie ważnymi populacjami drobnoustrojów). Skuteczne zastosowanie fagów do oczyszczania ścieków jest możliwe, jednak wymaga pełniejszego zrozumienia dynamiki populacji mikroorganizmów bytujących w ściekach i ich wzajemnych interakcji. Elementem ograniczającym wykorzystanie bakteriofagów jest fakt, że wiele z nich wykazuje dużą specyfikę gatunku, a nawet szczepu gospodarza, ponadto istnieje możliwość tworzenia i selekcjonowania szczepów bakterii opornych na fagi.

Bakteriofagi mogą też zmieniać szczepy bakterii, przenosząc pomiędzy nimi geny na drodze transdukcji. Zjawiska te powinny być nadal badane, gdyż wpływają na skuteczność przyjętych strategii i są ważne ze względów bezpieczeństwa.

Także badania prowadzone w różnych ośrodkach na świecie wskazują na możliwość zastosowania bakteriofagów w procesie biologicznego oczyszczania ścieków z użyciem metody osadu czynnego, zawierającego m.in. różne grupy bakterii – **Liu i in. [2015], Jassim i in. [2016], Petrovski i in. [2011, 2022]**.

Interesująca jest publikacja **Dąbrowskiego [2017]**, dotycząca stosowania w USA technologii zmiękczenia chemicznego wody. Technologia ta pozwala uzyskać wodę czystą, niekorozyjną, przesyconą węglanem wapnia i zarazem nietworzącą kamienia kotłowego. Metoda ta ma jednak liczne wady, na przykład fakt, że zmiękczona woda zawiera znikome ilości magnezu i wapnia. Ponadto, wywołując spowolnienie korozji, przyczynia się do niekorzystnych zmian na powierzchni żeliwa. Pomimo tych ujemnych następstw, według **Stankiewicz i in. [2018]**, obniżenie wysokich i bardzo wysokich wartości twardości wody spożywanej przez ludzi jest korzystne, bo zmniejsza ryzyko zachorowania na kamice nerkową, a u dzieci – na atopowe zapalenie skóry.

2.2. Czynniki wpływające na skład wód wodociągowych

Adamski [2014], omawiając stan inwestycyjny systemów uzdatniania wody, podkreśla, że ponad połowę z ok. 550 funkcjonujących w Polsce wodociągów wybudowano w latach 1950-1980, ok. 30% przed 1939 r., a ok. 8% jeszcze w XIX wieku.

Jednocześnie daje się zauważyć spadkowy trend zużycia wody ujmowanej przez polskie wodociągi z ok. 6,4 mln m³/d w 2000 r. do ok. 5,6 mln m³/d w 2012 r., przy zanotowanym, zużyciu wód podziemnych w ww. okresie 3,9 mln m³/d, bez stwierdzenia zmian objętości do chwili obecnej.

Z zasobów wód podziemnych korzysta ok. 85% systemów wodociągowych, a technologia uzdatniania tych wód polega na napowietrzaniu, pospiesznej filtracji i dezynfekcji. Aż połowa stacji oczyszczania wód podziemnych nie stosuje dezynfekcji końcowej, a w ok. 6% ujęte wody są dostarczane do systemu dystrybucji bez żadnego uzdatniania.

Najpopularniejszymi środkami do dezynfekcji są chlor i podchloryn sodu, każdy stosowany w blisko 40% zakładów. W co czwartym zakładzie oczyszczania stosowany jest dwutlenek chloru, który – jak wskazują wyniki badań – jest bardziej agresywny w stosunku do rur z polietylenu w porównaniu z chlorem czy podchlorynem sodu. Wobec tego konieczne są badania nad optymalizacją zastosowania tego środka dezynfekcyjnego.

Jako inne technologie dezynfekcji wody **Adamski [2014]** wymienia ozon i promieniowanie UV, które stosowane są w ok. 2% zakładów uzdatniania.

Jednak wszystkie technologie dezynfekcji powodują pojawienie się w wodzie uzdatnionej ok. 500 różnych produktów ubocznych, a większość z nich (20%) stanowią trihalometany (THM) i kwasy halogenoocetowe HAA (10%).

Z wód powierzchniowych zasilanych jest ok. 11% wodociągów zbudowanych w dużych aglomeracjach, co stanowi ok. 30% wody uzdatnionej z ok. 5,6 mln m³/dobę. Technologie uzdatniania tych wód są inne niż technologie oczyszczania wód głębinowych, które opisano w przeglądzie literatury.

Z kolei **Adamski [2014]** uważa, że tendencje w rozwoju technologii oczyszczania wody wynikają z rozpoznanego negatywnego wpływu obecnych w niej zanieczyszczeń i produktów ubocznych oczyszczania na zdrowie konsumentów, przy znacznym rozwoju technik analitycznych, umożliwiających oznaczenie stężenia tych związków na bardzo niskim poziomie.

Drugim czynnikiem wpływającym na rozwój technologii jest wyeliminowanie możliwości wtórnego zanieczyszczenia wody w systemie dystrybucji przez zapewnienie jej chemicznej i biologicznej stabilności.

Trzecim czynnikiem jest wprowadzenie metod, przede wszystkim procesów membranowych, eliminujących coraz wyższy poziom zasolenia ujmowanych wód powierzchniowych.

Pierwszy i drugi z wymienionych czynników są ze sobą związane. Eliminacja prekursorów ubocznych produktów utleniania (w tym chemicznej dezynfekcji), którymi są związki organiczne, daje wodę stabilną biologicznie.

Wowk [2012] opisuje nowe rozwiązania, zastosowane w postulowanej od 1994 roku naturalnej technologii uzdatniania wód głębinowych. Te nowe rozwiązania w liczbie 16 opisów patentowych w większości uzyskały aprobatę Urzędu Patentowego w postaci przyznania świadectwa patentowego. Gdy analizuje się ww. publikację, widoczny jest rozwój myśli konstrukcyjnej Autora, zmierzający do zapewnienia pozyskiwania wód głębinowych o minimalnej zawartości części stałych, następnie wody maksymalnie natlenionej, a jednocześnie pozbawionej osadów powstających w realizowanym procesie uzdatniania.

Ponadto **Wowk [2012]** opisuje wiele układów technologicznych, umożliwiających dostarczenie użytkownikom wody dobrej jakości bez konieczności dezynfekcji i przy zminimalizowanych nakładach energetycznych. Publikacja ta stała się cennym materiałem w realizacji opisu wniosku o przyznanie projektu badawczego przez NCBiR, a następnie opracowaniu niniejszej monografii.

Stosowane metody dezynfekcji wody mogą przynieść nieoczekiwane wyniki negatywne, a taką sytuację opisują **Olko i Wójcik [2009]**, kiedy w wodociągu krakowskim zastąpiono chlor gazowy dwutlenkiem chloru. Dwutlenek chloru spowodował rozpuszczenie zgromadzonych osadów w instalacji wodociągowej, co wywołało pogorszenie jakości wody pod względem bakteriologicznym. Autorzy m.in. stwierdzili, że nawet okres powolnego przejścia z jednego środka dezynfekcyjnego na drugi, trwający ok. 12 miesięcy, był zbyt krótki. Powyższa relacja wskazuje na możliwość nieprzewidywalnych skutków zmian środka dezynfekcyjnego.

Nie ulega najmniejszej wątpliwości, że dezynfekcja jest obecnie jednym z najważniejszych etapów uzdatniania wody pitnej. Jej celem jest utworzenie bariery zapobiegającej przedostawaniu się organizmów patogennych do wody przeznaczonej do spożycia. **Chojnacki [2010]** podkreśla, że mikroorganizmy występujące w wodzie wykazują zróżnicowaną wrażliwość na działanie środków dezynfekcyjnych. W przypadku powszechnie stosowanego „chlorowania” efekt inaktywacji maleje znacząco w szeregu: bakterie – spory bakteryjne – wirusy – cysty pierwotniaków. Wśród nich występują także patogeny odporne na działanie chloru. Z tego względu – zdaniem **Chojnackiego [2010]** – uzasadnione staje się stosowanie dodatkowej metody dezynfekcji, jaką jest naświetlanie promieniami UV. Dzięki użyciu promieniowania UV uzyskuje się niezawodną barierę chroniącą przed mikroorganizmami, a wykorzystanie związków chloru sprowadza się do dozowania minimalnej dawki zabezpieczającej wodę przed wtórnym skażeniem w sieci wodociągowej. W ten sposób w znaczącym stopniu zredukowana zostaje ilość niebezpiecznych związków chloropochodnych. Działanie bakteriobójcze promieniowania UV opiera się na reakcji fotochemicznej, powodującej uszkodzenie struktur DNA i RNA mikroorganizmów, co w efekcie prowadzi do ich śmierci lub uniemożliwia dalsze rozmnażanie. Jakkolwiek według **Plujima [1998]** w Holandii od 1982 r. stosuje się naświetlanie ultrafioletem, to wiele osób ma obawy o „wtórne zakażenie” oraz ponowny wzrost organizmów, gdyż ultrafiolet nie pozostawia dodatkowego czynnika dezynfekcyjnego, który zabezpieczałby sieć wodociągową przed ponownym „zakażeniem”. Te obawy potwierdziły wyniki badań holenderskich, zgodnie z którymi, o ile w początkowej części systemu wodociągowego (według przypisów) dawka chloru powinna wynosić 0,1-0,3 ppm, to przy bardziej rozległych sieciach (200-500 km) w jego końcowych odcinkach dawka ta nie zapewniała poprawnej dezynfekcji. Zatem jej zwiększenie nie spełnia koncepcji **Chojnackiego [2010]** o zmniejszeniu dawki chloru przy jednoczesnym stosowaniu UV.

Fakt, że chlorowanie czy ozonowanie daje produkty uboczne, został opisany wielokrotnie, natomiast **Nawrocki [2006]** przytacza wyniki badań, z których wynikają relacje między dezynfekcją, zagrożeniem chemicznym a biologicznym; są one następujące:

- ryzyko śmierci spowodowanej obecnością patogenów w wodzie wodociągowej jest co najmniej od 100 do 1000 razy większe niż ryzyko nowotworu spowodowanego ubocznymi produktami dezynfekcji;

- ryzyko zachorowania związanego z obecnością patogenów w wodzie jest od 10 000 do 1 000 000 razy większe niż ryzyko zachorowania na nowotwory spowodowane obecnością ubocznych produktów dezynfekcji.

Zagrożenie mikrobiologiczne wynikające z ewentualnej obecności w wodzie organizmów patogennych jest więc znacznie istotniejsze niż zagrożenie powodowane obecnością ubocznych produktów dezynfekcji. Jakość dezynfekcji nie może być więc kompromisem między efektywnością bakteriobójczą a ubocznymi produktami dezynfekcji.

Stanowisko powyższe jest w pewnej sprzeczności z przytaczanymi wynikami innych badań, z których wynika, że chloroorganiczne uboczne produkty dezynfekcji, oprócz: kwasu bromochlorooctowego, 5 kwasów haloctowych, wodzianu chloralu, chlorocyjanu i trihalometanu (THM), zawierają znaczne związki chloroorganiczne, dotychczas niewystarczająco rozpoznawane – **Nawrocki [2006]**.

Podobnie w 63% nierozpoznany jest wpływ przyswajalnego węgla organicznego, a w wyniku ozonowania powstają także kwasy karboksylowe (26%), aldochetokwasy (7%) i aldehydy (4%). Aż 96,95% produktów ubocznych mało rozpoznanych powstaje przy dezynfekcji dwutlenkiem chloru. Pozostałe składniki to: kwasy (0,54%), aldehydy (1,58%), oraz aceton (0,93%).

Związki te będą zawsze powstawać przy dezynfekcji chlorem, chloraminą, dwutlenkiem chloru i ozonem, które to środki nie tylko są silnymi biocydami, lecz także reagują z innymi składnikami wody, powodując powstanie nowych związków chemicznych, zwanych potocznie „ubocznymi produktami dezynfekcji” (UPD). Należy sobie uświadomić, że woda ujmowana czy to ze źródeł powierzchniowych, czy z podziemnych jest zawsze roztworem substancji nieorganicznych i organicznych. Wody ujmowane w Polsce zwykle charakteryzują się obecnością materii organicznej, mierzonej ilością węgla organicznego na poziomie kilku miligramów na litr. To właśnie ta „naturalna materia organiczna” (NMO) podatna jest na reakcje ze środkami dezynfekcyjnymi, generując wspomniane UPD.

Nawrocki [2006] podkreśla, że:

- naturalna materia organiczna stanowiąca źródło UPD jest w dużej mierze niepoznana,
- nieznanne są wysokocząsteczkowe produkty chlorowania,
- większość przyswajalnego węgla organicznego powstającego po ozonowaniu (jak też po oddziaływaniu ClO_2) nie została zidentyfikowana pod względem chemicznym.

Problemowi ubocznych produktów dezynfekcji poświęcił swoją publikację **Biń [2009]**. W tym przypadku chodzi o wodę w basenach pływackich. Dokonano tu przeglądu artykułów opublikowanych w ostatnich latach, dotyczących ubocznych produktów dezynfekcji (UPD), powstających podczas oczyszczania wody basenowej: warunków ich tworzenia, możliwości ich eliminacji oraz propozycji zastosowania nowszych rozwiązań technologicznych, które zapewniłyby wysoką jakość wody w basenach, a tym samym wysokie bezpieczeństwo sanitarne użytkowników basenów, podatnych na kontakt ze szkodliwymi szczepami bakterii.

O rozwoju technologii uzdatniania wody (TUW) w ostatnim 100-leciu pisze **Sozański [2010]**. Autor podjął próbę oceny znaczenia naturalnych procesów w rozwoju technologii uzdatniania wody. Ocena ta jest pewną formą konfrontacji między wybranymi chemicznymi i naturalnymi procesami. Naturalne procesy mogą być promowane jako bardziej efektywne i kompleksowe, jak również bezpieczniejsze w porównaniu z uzupełniającymi procesami chemicznymi.

Realizacja wielu programów badawczych, prowadzących do dalszego rozwoju TUW i weryfikacji stosowanych metod oraz procesów, powoduje wzrost akceptacji procesów naturalnych w rozwiązaniach inżynierskich systemów uzdatniania wody. Równocześnie stwierdza się ograniczenia aplikacji procesów chemicznych do obszarów określonych przez warunki ich bezpiecznego stosowania.

Michalski i Łyko [2011] opisują badania wody na zawartość bromianów. W Polsce wodę przeznaczoną do spożycia pozyskuje się głównie z wód powierzchniowych i podziemnych. Ubocznymi produktami dezynfekcji wody, w zależności od stosowanej metody uzdatniania, mogą być m.in. trihalometany, chlorofenole lub związki nieorganiczne, takie jak: chlorany (III), chlorany (V) lub rakotwórcze bromiany (V). W pracy opisano badania zawartości bromianów (V) w wodzie do spożycia, przeprowadzone w dwóch stacjach uzdatniania wody powierzchniowej, należących do Górnośląskiego Przedsiębiorstwa Wodociągów S.A. w Katowicach: Dzieńkowice i Kozłowa Góra, gdzie wykorzystuje się technologię ozonowania. Badania wody na wybranych etapach jej uzdatniania wykonywano metodą chromatografii jonowej z zastosowaniem derywatywacji zakolumnowej i detekcji UV/VIS. Uzyskane granice wykrywalności na poziomie $0,4 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ są zdecydowanie lepsze niż w powszechnie wykorzystywanej metodzie zgodnej z normą PN-ISO 15061, dzięki czemu możliwe jest uchwycenie zmian zachodzących na poszczególnych etapach procesu technologicznego.

W pracy **Zimoch i Łobos [2008]** przedstawiły próbę opracowania modelu szacowania stężeń THM-ów powstających w wodzie chlorowanej. W modelu poziom stężenia THM-ów jest funkcją podstawowych czynników determinujących przebieg reakcji chemicznej substancji organicznych (NMO) z chlorem. Model statystyczny pozwala na określenie optymalnej dawki chloru w procesie dezynfekcji wody w zmiennych warunkach eksploatacyjnych, czego efektem jest produkcja wody niestanowiącej zagrożenia dla zdrowia ludzi.

Zamorska [2013], badając jakość bakteriologiczną wody w wybranych punktach sieci wodociągowej miasta Rzeszowa, przytacza listę czynników mogących mieć wpływ na występowanie zjawiska kontaminacji wody w systemie jej dystrybucji. Są nimi:

- jakość wody surowej,
- stosowana technologia uzdatniania wody, obejmująca również system dezynfekcji,
- jakość wody uzdatnionej, podawanej do sieci wodociągowej po procesie uzdatniania,
- materiały, z których wykonany jest system dystrybucji,
- aktualny stan techniczny sieci i instalacji wodociągowej (m.in. jej wiek),

- warunki eksploatacji systemu dystrybucji wody (metoda płukania sieci, prędkość przepływu wody, czas retencji, temperatura),
- ewentualne awarie systemu dystrybucji,
- remonty sieci i instalacji wodociągowej,
- ewentualne celowe działanie terrorystyczne.

Powyższa lista bardzo dobrze odzwierciedla problemy z eksploatacją sieci wodociągowej, a skutki niektórych ww. pozycji zostały potwierdzone w badaniach **Zamorskiej [2013]**, m.in. przy długotrwałej eksploatacji instalacji (ok. 40 lat) i jej złym stanie, gdzie stwierdzono złą jakość wody pod względem bakteriologicznym. Tę złą jakość **Zamorska [2013]** tłumaczy istnieniem biofilmu, z którego wyplukiwane są bakterie do wody. Usunięcie zanieczyszczeń mikrobiologicznych wody w sieciach wodociągowych, szczególnie starych i skorodowanych, jest zatem trudne. Analizując uzyskane wyniki badań, **Zamorska [2013]** potwierdza fakt, że bakterie psychrofilne i mezofilne lepiej rozwijają się na wzbogaconym agarze R w porównaniu z tradycyjnym agarem odżywczym.

Agar R stymuluje rozwój zdecydowanie większej liczby bakterii – jest on pożywką, która ma niską zawartość produktów odżywczych. Niskie stężenie ekstraktu drożdżowego, glukozy, peptonu i kazeiny hydrolizującej pozwala na rozwój szerokiego spektrum bakterii, nie tłumiąc gatunków wolno rosnących. Zawartość pirogronianu i skrobi wspiera rozwój szczególnie wymagających bakterii.

Informacja powyższa wskazuje na ścisłą zależność pomiędzy zastosowaną metodą badawczą a liczbą bakterii uzyskanych podczas badań oraz na fakt, że porównywanie wyników otrzymanych różnymi metodami może być utrudnione.

W kontekście metod hodowlanych stosowanych do analizy wody ważnym zjawiskiem jest istnienie uśpionych, niedzielących się komórek bakterii VBNC (ang. viable but nonculturable). Zjawisko to opisano po raz pierwszy w 1982 roku dla komórek *Escherichia coli* i *Vibrio cholerae*, które w warunkach stresu środowiskowego mogą tworzyć komórki VBNC – **Xu i in. [1982]**. Później wykazano, że właściwość tę ma większość bakterii, w tym bakterie chorobotwórcze, np. *Salmonella* sp. – **Ayrapetyan i in. [2018]**. Komórki w fazie VBNC zachowują żywotność, ale nie rosną na standardowych podłożach inkubowanych w typowych warunkach. Wzrost można uzyskać, stosując bogate podłoża i przedłużając inkubację nawet do kilku tygodni. Komórki VBNC można skutecznie wykryć wykorzystując zaawansowane techniki mikroskopowe, dla których alternatywą są metody molekularne.

Opisane uprzednio źródła powstawania ubocznych produktów dezynfekcji (UPD) zostały częściowo wyeliminowane, według **Rajcy [2011]**, dzięki zastosowaniu technologii MIEX DOC w połączeniu z mikro- i ultrafiltracją. Technologia ta wykorzystuje anionowymienną, makroporową, silnie zasadową żywicę MIEX o dużym stężeniu czwartorzędowych grup amoniowych w cząsteczce do usuwania naturalnych substancji organicznych. Może także służyć do eliminacji innych anionów występujących w wodach powierzchniowych, tj. siarczany, siarczki, bromki, arseniany i arseniny. Wymaga ona jednak

zintegrowanych procesów, jak koagulacje i mikro/ultrafiltracje. Dzięki temu uzyskujemy wodę oczyszczoną, którą można bezpiecznie poddawać dezynfekcji, eliminując ryzyko powstawania UPD.

Powyższy opis technologii wskazuje, jak skomplikowane muszą być procesy, aby móc bez skutków ubocznych dezynfekować wodę związkami chloru lub ozonem. Jednocześnie konieczne jest dbanie o źródła wody, gdyż proces ich oczyszczania będzie kosztował znacznie więcej niż zapobieganie przed zanieczyszczeniem (m.in. NO_3 z nawożenia pól).

Wspomnianą uprzednio potrzebę dbałości o ochronę wód przed zanieczyszczeniem potwierdza publikacja **Michałkiewicza [2013]**, w której to autor m.in. stwierdza, że postępujące zanieczyszczenie środowiska na całym świecie powoduje pogorszenie się jakości wód dostępnych człowiekowi, w wyniku czego stają się one coraz częściej bezużyteczne, gdyż zawierają liczne zanieczyszczenia, np. organiczne i nieorganiczne związki chemiczne, nawozy sztuczne, pestycydy, metale ciężkie, substancje radioaktywne, ropę naftową, bakterie i wirusy. Tak wieloaspektowe zanieczyszczenie wody spowodowało, że w USA powstała Agencja ds. Rejestracji Substancji Toksycznych i Chorób, w skrócie ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Agencja ta opracowała 250 charakterystyk obecnych w środowisku najgroźniejszych substancji zagrażających zdrowiu i życiu człowieka. Dzięki pracy ATSDR opinia publiczna oraz lekarze otrzymują wyczerpujące informacje na temat każdej ze szkodliwych substancji: jej opis, losy w organizmie, skutki zdrowotne, badanie lekarskie pozwalające wykryć narażenie, poziomy narażenia szkodliwe dla człowieka, a także środki podjęte przez władze w celu przeciwdziałania zagrożeniu. Powstanie powyższego rejestru spowodowało, że lekarzom z USA łatwiej teraz szukać przyczyn licznych chorób, szczególnie tych, które są związane z wodą.

Niestety, w Polsce i na świecie mało jest lekarzy, którzy przynajmniej w domyśle kojarzyliby nasze choroby z jakością wody. O konkretnych diagnozach w ogóle nie można mówić, ponieważ szczegółowe wyniki badań wody nie zawsze są dostępne.

W celu potwierdzenia mikrobiologicznego skażenia wody i wynikających z niego konsekwencji **Michałkiewicz [2013]** przytacza dane literaturowe wskazujące, że w ostatnich 20 latach zanotowano na świecie ponad 150 epidemii wodnopochoďnych giardiozy i kilkadziesiąt epidemii kryptosporydiozy w ponad 90 krajach. Powtarzającą się w większości doniesień przyczyną zachorowań jest spożycie wody zawierającej oocysty protistów pasożytniczych. Dotyczy to nie tylko wody wodociągowej, są również przypadki połknięcia wody na pływaniach. Pozwala to zauważyć, że współczesne metody uzdatniania wody, uznawane dotąd za wystarczająco skuteczne wobec oocyst *Cryptosporidium*, w istocie są niewystarczające – **Biń [2009]**. Co ciekawe, większość opisanych epidemii kryptosporydiozy wystąpiła mimo znakomitych parametrów jakości wody, gdyż dotyczyła krajów wysoko-rozwiniętych, jak USA, Japonia, Wielka Brytania. Okazuje się, że większość chemicznych środków stosowanych do uzdatniania i dezynfekcji wody, nie wpływa na żywotność oocyst i cyst pierwotniaków jelitowych.

Jedną z uprzednio opisanych metod jest zastosowanie promieni UV, co opisali **Chojnacki [2010]** oraz **Plujim [1998]**. Problem badań oraz uzdatniania wody w celu wyeliminowania pierwotniaków jelitowych został również podjęty w trzech kolejnych publikacjach, a mianowicie: **Siński i in. [2007]**, **Toczyłowska i Rutkiewicz [2009]**.

Toczyłowska [2011] stwierdziła m.in., że w Polsce, według oficjalnych danych epidemiologicznych, kryptosporidioza nie występuje.

W meldunkach PZH jednak zostały zanotowane pojedyncze zachorowania: 2008 (1), 2009 (5), 2011 (1), 2012 (2), 2013 (2), 2014 (5), 2015 (3), 2016 (6), 2017 (7), 2018 (2), 2019 (1), na tę inwazyjną chorobę pasożytniczą. Liczne badania przeprowadzone w Polsce nad występowaniem pierwotniaków jelitowych *Cryptosporidium* u różnych grup ludzi, a także zwierząt hodowlanych, zwierząt dziko żyjących i domowych oraz ptaków wykazały, że zakażenia tym pierwotniakiem są bardzo częste. Dotychczas przeprowadzone w Polsce badania potwierdziły obecność pierwotniaków jelitowych z rodzaju *Cryptosporidium* oraz *Giardia* w wodach powierzchniowych stanowiących źródło zaopatrzenia w wodę przeznaczoną do spożycia. Do oceny wody ze względu na obecność pasożytów chorobotwórczych powszechnie wykorzystywane są oocysty *Cryptosporidium*, ponieważ są one mniejsze niż cysty *Giardia* (odpowiednio 4-6 μm i 10-15 μm), więc trudniej jest usunąć je z wody, a ponadto są one odporne na działanie chloru, bromu i jodu w dawkach stosowanych w procesie uzdatniania wody.

Toczyłowska [2011] opisuje, że kilka metod oceny wody, opierając się na wybranych wskaźnikach mikrobiologicznych, liczbie i rodzaju pasożytów chorobotwórczych, parametrach określających skuteczność procesów uzdatniania wody na podstawie wskaźników fizykochemicznych wody.

Obecne badania w kierunku wykrywania pasożytów chorobotwórczych w wodzie surowej i uzdatnionej można wykonywać zgodnie z wymaganiami normy ISO 15553:2006. Badania takie powinny być włączone do zakresu monitoringu kontrolnego jakości wody przeznaczonej do spożycia. Ocena na podstawie liczby oocyst w wodzie uzdatnionej powinna być uzupełniona pełną analizą ryzyka związanego z jakością wody surowej, skutecznością stosowanych metod uzdatniania oraz możliwymi zakłóceniami w przebiegu procesów uzdatniania. Zalecane jest też ciągle monitorowanie pracy filtrów.

Dąbrowski i Dąbrowska [2012] swoją publikację poświęcili problemowi uzdatniania wody pod względem zagrożeń z tytułu obecności pierwotniaków (cyst *Giardia* i oocyst *Cryptosporidium*). Jednocześnie podali ich szczegółową charakterystykę oraz metody dezynfekcji, sedymentacji oraz filtracji. Metody te pozwalają usunąć omawiane pierwotniaki z wody. Końcowy wniosek jest zbieżny z zaleceniami Dyrektywy Wodnej, a mianowicie „Ochronę wody do spożycia przed zagrożeniem pierwotniakami należy zaczynać od właściwego zagospodarowania zlewni”.

Kowal [1996] opisał metody usuwania mikroorganizmów na drodze klarowania i filtracji, tj. technologii stosowanej w niektórych zakładach wodociągowych w Polsce. Według **Kowala [1996]** ok. 50% wody dla zaopatrzenia ludności w Polsce jest ujmowane z ujęć

powierzchniowych, tj. z rzek i zbiorników zaporowych. Z tej ilości wody kilka procent jest poddawane sztucznej infiltracji przez stawy infiltracyjne bądź przez drenażowe ujęcie ułożone pod dnem rzek (Warszawa, Poznań). Wody powierzchniowe w środkowym i dolnym biegu rzek są silnie zeutrofizowane i wykazują oznaki wtórnego zanieczyszczenia, objawiające się głównie w podwyższonej liczbie glonów i bakterii. W celu obniżenia liczebności glonów instalowane są mikrosita, które obniżają ogólną ich liczebność o ok. 80% (okrzemek ~86,2%, zielenic ~81%, sinic ~68%), oraz detrytus w okresie zimy. Po sitach woda dopływa na okulatory, do których dawki jest chlorowany siarczan żelaza (III). Chlor jest dawkiowany z nadmiarem do punktu przełamania. Następnie woda jest filtrowana na filtrach pośpiesznych oraz kolejno na filtrach ze złożem z półspiekanej dolomitu i chlorowana przed zbiornikami wody czystej. Wprowadzenie mikrosit zmniejszyło zużycie chloru i siarczanu żelazowego, częstotliwość płukania filtrów oraz ilości osadu po procesie koagulacji. Opisany sposób był stosowany w Zielonej Górze.

Kowal [1996] we wnioskach sugeruje konieczność wprowadzenia do przepisów analizy liczebności glonów – zarówno w wodzie surowej, jak i oczyszczonej – oraz okresowego badania wody na obecność pasożytów.

Grabińska-Loniewska [2006] opisuje mykobakterie jako potencjalny wskaźnik zanieczyszczenia wód wykorzystywanych do celów komunalnych. Został tu omówiony problem przenoszenia przez system dystrybucji wody mikroorganizmów oportunistycznie patogennych, które nie są uwzględniane w badaniach rutynowych wody, co ma szczególne znaczenie z uwagi na wzrastającą stale liczbę osób wykazujących zwiększoną podatność na infekcje wywołane przez te organizmy. Dotyczy to osób o silnie zaburzonej odporności, co może być skutkiem chorób (np. cukrzyca, AIDS), inwazyjnych terapii medycznych (np. wszepienia implantów) lub uzależnienia od alkoholu i narkotyków. O wadze tego problemu świadczy Dyrektywa Unii Europejskiej 98/83/EC dotycząca jakości wody stosowanej do celów konsumpcyjnych. Regulacja ta oznacza, że stacje uzdatniania wody muszą uwzględniać procedury zmierzające do usuwania tych organizmów z wody. Oportunistyczne bakterie z rodzaju *Mycobacterium*, mogące być czynnikiem etiologicznym infekcji dla użytkowników wód, to ponad 90 gatunków gramdodatnich, kwasoodpornych bakterii o kształcie wydłużonym lub w postaci pręcika (prątki), prostych lub lekko zagiętych.

Większość gatunków z rodzaju *Mycobacterium* stanowią bakterie wolno żyjące w wodzie i glebie, często występujące w ryzosferze roślin oraz w ciele zwierząt i człowieka, niepowodujące objawów chorobowych.

W dalszej treści publikacji **Grabińska-Loniewska [2006]** zestawia w 7 tabelach wyniki badań różnego rodzaju omawianych oportunistycznych patogenów. Przedłożone wyniki badań pozwalają na stwierdzenie istotnych zagrożeń zdrowotnych dla człowieka z uwagi na:

- szerokie rozprzestrzenianie w środowisku wodnym (wody podziemne, systemy dystrybucji wody ciepłej, woda w sieci wodociągowej szczególnie na odcinkach o małym rozbiorze wody);

- zdolność długiego przeżywania w środowisku ubogim w substraty pokarmowe, w wodzie, szczególnie przy niskiej temperaturze i odczynie obojętnym;
- dużą odporność na działanie środków dezynfekcyjnych;
- trudne do zidentyfikowania źródło infekcji spowodowane długim czasem wylęgania chorób, w przypadku gruźlicy nawet wiele lat;
- trudności w leczeniu infekcji spowodowanych przez NTM/MOTT (ang. *nontuberculosis mycobacteria/mycobacteria other than tuberculosis*), bakterie te cechuje bowiem duża odporność na działanie standardowych leków stosowanych w terapii mykobakterioz;
- możliwość stawiania błędnych diagnoz w leczeniu w wyniku zakażenia wody doprowadzanej do aparatury medycznej i odczynników przygotowanych na takiej wodzie oraz wzrostu tych bakterii w postaci biofilmu na wewnętrznej powierzchni urządzeń;
- nieuwzględnianie oznaczenia bakterii w procesie badawczym rosnących i wymagających obecności specjalnych substancji odżywczych w podłożach stosowanych do ich hodowli w warunkach laboratoryjnych,
- możliwość niewykrycia tych bakterii w rutynowej diagnostyce, gdyż wymagają one specjalnych bogatych podłoży i długiego czasu inkubacji.

Traczewska i Dziubek [2007] stwierdzają, że w wodach zarówno powierzchniowych, jak i podziemnych występuje wiele substancji o stwierdzonej toksyczności, dlatego konieczna jest kontrola ich stężeń w wodach ujmowanych przez zakłady wodociągowe jak i w wodach oczyszczonych przeznaczonych do spożycia. Ponadto w procesach oczyszczania, a przede wszystkim w rezultacie dezynfekcji wody, zwłaszcza dezynfektantami chlorowymi, powstawać może wiele mikrozanieczyszczeń zarówno toksycznych jak i o potencjalnej aktywności mutagennej i rakotwórczej. Dokładny obraz skutków narażenia organizmów żywych na zanieczyszczenia obecne w wodzie można uzyskać jedynie przez odpowiedni dobór metod testowych stosowanych w badaniach bioindukcyjnych. Autorzy opisują zasady przeprowadzania testów toksykologicznych wody, biomonitoringu oraz oceny potencjalnej mutagenności i genotoksyczności zanieczyszczeń.

Praktycznie w 2010 r. PWiK sp. z o.o. w Kaliszu wdrożył biomonitoring przy użyciu małży słodkowodnych (*Unio tumildus*) reagujących na nagłą zmianę chemicznych parametrów wody zamknięciem muszli, co jest notowane systemem wywołującym alarm. Jest to metoda wczesnego ostrzegania według **Chmary [2010]**. Tego typu testy są wdrożone m.in. w wodociągach warszawskich i poznańskich, również przy zastosowaniu małży.

Metody przy użyciu biotestów i biomarkerów zostały wykorzystane przez zespół badawczy **Woźnica i in. [2011]** do oceny jakości wody w zbiorniku zaporowym w Goczałkowicach. Badania te są realizacją zaleceń Ramowej Dyrektywy Wodnej (RDW) i towarzyszących jej regulacji prawnych nakładających na organy zarządzające zbiornikami retencyjnymi obowiązek uzyskania i utrzymania wysokich standardów jakości zasobów wodnych oraz stanu środowiska cieków i zbiorników wodnych.

Ponadto nowoczesne ujęcie zagadnienia jakości wód wymaga uzupełnienia o propozycję Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), dotyczącą włączenia do Dyrektywy 98/83WE obowiązku wdrażania tzw. planów bezpieczeństwa wody (Water Safety Plans). Plany te nakładają na instytucjonalnych dostawców wody obowiązek monitorowania bezpieczeństwa toksykologicznego wody od dostawcy do konsumenta. Realizacja ww. propozycji będzie wymagała modyfikacji systemu monitoringu jakości wody konsumpcyjnej, w szczególności rozwiązań technicznych umożliwiających ciągłą ocenę zagrożeń toksycznych w czasie rzeczywistym.

Łączna biomasa i bioróżnorodność mikroorganizmów bytujących w wodzie, która jest nieporównywalna z bioróżnorodnością innych grup organizmów, wskazuje na konieczność pogłębienia analiz mikrobiologicznych. Obecnie jedynym prawnie usankcjonowanym aspektem tych badań są analizy na obecność bakterii chorobotwórczych. Całkowicie pomijane są obecnie mikrobiologiczne aspekty biodegradacji i samooczyszczania wód – **Woźnica i in. [2011]**.

W publikacji **Woźnicy i in. [2011]** opisano niestandardyzowane i standardyzowane metody monitorowania jakości środowiska zbiornika wodnego, biomarkery molekularne u ryb i małży, testy ekotoksykologiczne, wykorzystanie mikroorganizmów do monitorowania stanu jakości wód z użyciem technik molekularnych.

W dotychczasowych badaniach oznaczono w sześciu próbkach około 400 tysięcy sekwencji charakterystycznych, co pozwoliło na zidentyfikowanie ponad 500 rodzajów mikroorganizmów zasiedlających Zbiornik Goczałkowicki. Uzyskane wyniki wskazują na zachowaną równowagę pomiędzy mikroorganizmami autotroficznymi (cyjanobakterie, glony) a heterotroficznymi (bakterie). W zbiorniku dominują bakterie tlenowe i względne beztlenowce. Mały udział mikroorganizmów mikroaerofilnych i beztlenowych może wskazywać na dobry stan wody w analizowanym zbiorniku. Wynik ten potwierdziły analizy ekotoksykologiczne i mikrobiologiczne, z których wynika, że w 2010 roku, mimo trzykrotnych wezbrań powodziowych, nie wystąpiły inne zagrożenia środowiskowe w Zbiorniku Goczałkowickim.

Sawiniak i in. [2012] stwierdzają, że praktyka wodociągowa dowodzi, iż nie wystarczy uzdatnić wodę do parametrów podanych w obowiązującym Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U. 2017 poz. 2294), lecz należy zapewnić stabilizację chemiczną i biologiczną wody przesyłanej rurociągami. Wybudowane przed wieloma laty stacje uzdatniania wody i zastosowane wtedy technologie oczyszczania ujmowanych wód nie zawsze mogą spełnić obecne wymagania jakościowe.

Przykładem takiej stacji jest SUW Czaniec, gdzie technologia uzdatniania nie uległa zmianie od 40 lat. Technologia ta polega na filtracji kontaktowej (koagulacja w złożu filtracyjnym siarczanem glinu) oraz dezynfekcji chlorem gazowym. Wysokość złoża piasku filtracyjnego wynosi 220 cm, podkład żwirowy 35 cm, prędkość filtracji 5 m/h. Filtry kontaktowe płukane są wodą chlorowaną z intensywnością 12 l/s·m² w czasie 8-12 min w zależności od zanieczyszczenia złoża.

Czas wpracowania złoża filtracyjnego po płukaniu wynosi 10-30 min. Długość filtrocyclu waha się w zależności od jakości wody od 8 do 72 h, średnio 32 h. Woda przefiltrowana odpływa grawitacyjnie do 4 zbiorników wody czystej o pojemności sumarycznej 10 000 m³. W zbiornikach następuje półgodzinny kontakt wody z chlorem doprowadzonym w formie wody chlorowej wytworzonej w budynku chlorowni. Woda uzdatniona o kontrolowanej zawartości chloru wpływa do rurociągu żelbetonowego o średnicy 1500 mm Kobiernice – Urbanowice, o długości 32,4 km, różnica wysokości na trasie wynosi 51 m, co umożliwia grawitacyjny przepływ wody w ilości ok. 2,5 m³/s.

Przeprowadzone badania przez **Sawiniaka i in. [2012]** miały na celu dobranie odpowiednich koagulantów (PAX XL/9F, PAX 1905, PAX XL60, Flokor 1A, Flokor ASW oraz siarczanu glinu). W wyniku tych badań stwierdzono m.in., że do uzyskania podobnych parametrów wody uzdatnionej wystarczy znacznie mniejsza dawka koagulantów zhydrolizowanych niż stosowany dotychczas siarczan glinu.

Oprócz ww. badań nad doбором koagulantów wykonano również badania na specjalnie zbudowanym stanowisku składającym się z dwóch filtrów o średnicy 200 mm i wysokości 4,4 m o złożu filtracyjnym jak na pozostałych filtrach z wprowadzeniem 75 cm warstwy węgla ROW-0,08 w miejsce piasku filtracyjnego. Celem tych badań było zwiększenie skuteczności usuwania związków organicznych (skład granulometryczny złoża i stosowane koagulanty oraz dawki chloru podano w treści publikacji).

W rezultacie przeprowadzonych badań m.in. stwierdzono, że:

- zastosowanie „wkładki” z węgla aktywnego w miejsce części złoża piaskowego dodatkowo obniża zawartość związków organicznych. Przy analizie mętności i barwy zauważono redukcję stopnia absorbancji przy długości fali 254 nm i 272 nm (niższa absorbcja UV);
- płukanie filtrów samą wodą (jak w skali technicznej) wykazało, że węgiel nie uległ wynoszeniu z filtra. Cykle filtracyjne wynosiły 32 h w filtrach zarówno doświadczalnych, jak i produkcyjnych, natomiast zmiana sposobu płukania, tzn. zamiast tylko wodą na płukanie powietrzem, powietrzem z wodą i na końcu samą wodą, znacznie wydłużyła cykl filtracyjny, nawet trzykrotnie.

W odniesieniu do modernizacji SUW Czaniec postanowiono:

- zmienić drenaż filtrów i doprowadzić powietrze do płukania,
- zastosować koagulant wstępnie zhydrolizowany,
- wprowadzić w filtrach „wkładki” z węgla aktywnego.

W kolejnej publikacji **Sozański [2010]** przedstawił w sposób syntetyczny kierunki i metody rozwoju technologii współczesnych zakładów uzdatniania wody. W treści odnosi się do:

- zakresu, zasady i celu działania technologii uzdatniania wody,
- oceny ryzyka tzw. granicznych poziomów narażenia,
- procesów sedymentacji, flotacji i filtracji,

- dezynfekcji (stwierdzając m.in., że w porównaniu z Cl₂ i ClO₂ ozon tworzy najmniejszą ilość toksycznych UPD),
- projektowania technologii zakładów uzdatniania wody.

W końcowym wniosku stwierdza, że w efekcie szerokiego spektrum prac badawczych i przepisów dokonuje się zmiany w eksploatacji zakładów wodociągowych powodujących wzrost złożoności systemów technologicznych, dążąc do optymalizacji i automatyzacji, co w konsekwencji prowadzi do ewolucji projektowania i eksploatacji systemów.

Z punktu widzenia ostatniego stwierdzenia warto zauważyć, co **Sozański [2010]** stwierdza, że im system jest bardziej skomplikowany, tym bardziej podatny jest na awarie.

Kaniowska-Katarzyńska i in. [2006] konstatują, że zgodnie z wymaganiami Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 19 listopada 2002 roku w sprawie wymagań dotyczących jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi najwyższe dopuszczalne stężenie (NDS) sumy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych WWA: benzo(b)fluorantenu, benzo(k)fluorantenu, benzo(ghi)perylenu i indeno(1,2,3-cd)pirenu, w wodzie przeznaczonej do spożycia zostało ustalone na poziomie 100 ng/l, a NDS dla benzo(a)pirenu na poziomie 10 ng/l. Oznaczanie WWA na tak niskim poziomie stężeń w wodzie przeznaczonej do spożycia możliwe jest po zateżaniu próbek techniką ekstrakcji do fazy stałej i następnie analizie chromatograficznej z detekcją fluorescencyjną. Na podstawie zwalidowanej i akredytowanej procedury badawczej oznaczono benzo(a)piren, benzo(b)fluoraten, benzo(k)fluoraten, benzo(ghi)perylene i indeno(1,2,3-cd)piren w wodzie będącej w kontakcie z węglem aktywnym matami obrotowymi i przepływowymi filtrami kranowymi zawierającymi węgiel.

Źródłami WWA w środowisku są przede wszystkim: przemysł petrochemiczny, koksowniczy i motoryzacyjny, a także ciepłownie, elektrociepłownie, urządzenia grzewcze w gospodarstwach domowych oraz gazy spalinowe emitowane z samochodów, samolotów i maszyn spalinowych.

WWA znajdujące się w wodach powierzchniowych pochodzą przede wszystkim ze ścieków przemysłowych i komunalnych oraz z awaryjnych rozlewów substancji ropopochodnych. Do rzek, jezior, wód gruntowych, a nawet głębinowych WWA przenikają również jako zanieczyszczenia wypłukiwane przez opady atmosferyczne z powietrza i ścieranych nawierzchni asfaltowych oraz opon. WWA wykazują zdolność do kumulacji w organizmach żywych i dlatego narażenie na najmniejsze nawet ich dawki może stać się przyczyną zachorowań. Aktywność nowotworowa zależy przede wszystkim od ich budowy chemicznej. WWA przedostają się do organizmu ludzkiego zarówno z pożywieniem i wodą pitną, jak i z powietrzem. Szczególnie niebezpieczne jest skażenie związkami WWA wody przeznaczonej do spożycia, do której mogą się one przedostawać w wyniku niedostatecznego oczyszczenia wody ujmowanej do uzdatnienia lub skażenia studni.

Dąbrowski i Dąbrowska [2012] stwierdzają, że główne zagrożenie mikrobiologiczne wody ujmowanej do celów spożywczych pochodzi od cyst *Giardia*, oocyst *Cryptosporidium*

oraz bakterii antybiotykoopornych. Środek ciężkości uwagi powinien być nieco inaczej umieszczony w państwach takich jak Polska, w których wodę wodociągową gotuje się przed spożyciem, a inaczej tam, gdzie pije się ją bezpośrednio z kranów i źródeł ulicznych. Wynika to z faktu, że formy przetrwalnikowe pierwotniaków giną szybko w temperaturze przekraczającej 60°C i po przegotowaniu nie zachowują zdolności do rozwoju w przewodzie pokarmowym potencjalnego żywiciela. Wody powierzchniowe uważa się za stosunkowo czyste w odniesieniu do cyst i oocyst pierwotniaków, gdy ich stężenie nie przekracza 10 na litr, natomiast zagrożenie epidemiologiczne powstaje przy stężeniach przekraczających jedną oocystę na dziesięć litrów wody do spożycia. Wydawać by się mogło, że w związku z tym wystarczy usunąć i dezaktywować środkami dezynfekcyjnymi oocysty *Cryptosporidium* z efektywnością \log^3 , wyrażając efektywność usuwania przez ujemny logarytm dziesiętny – $\log(N/N_0)$, gdzie N jest ilością oocyst w wodzie wodociągowej, a N_0 na odpływie wody surowej do zakładu uzdatniania. Uzyskanie takiego wyniku technologicznego jest całkowicie realnej i to przy skromnych środkach zainwestowanych w uzdatnianie i dezynfekcję. A jednak należy mieć na uwadze, że w wodach powierzchniowych po intensywnych opadach, a w szczególności w czasie powodzi, albo w zlewni o intensywnej hodowli bydła ilości oocyst *Cryptosporidium parvum* mogą być o dwa, a nawet trzy rzędy wyższe niż zazwyczaj. Zintensyfikowanie procesów uzdatniania wody do spożycia pozwala również chronić ją przed bakteriami antybiotykoopornymi. Chociaż w zdezynfekowanych ściekach szpitalnych jest prawie dziesięciokrotnie mniej bakterii niż w ściekach bytowo-gospodarczych, to jednak wśród tych, które trafiają do ścieków, duży odsetek stanowią bakterie chorobotwórcze, odporne nie tylko na antybiotyki, lecz także na środki dezynfekcyjne i stanowią poważny problem.

Urbanowska i Kabsch-Korbutowicz [2012] stwierdzają, że substancje organiczne w formie rozpuszczonej lub nierozpuszczonej występują w każdym rodzaju wód na kuli ziemskiej. Nawet w potocznie uważanych za czyste wodach z głębokich jezior, znajdujących się na terenach oddalonych od skupisk ludzkich, obserwuje się występowanie tych związków. W wodach niezanieczyszczonych na skutek działalności człowieka o poziomie zanieczyszczenia związkami organicznymi decydują naturalne substancje organiczne (NMO), będące produktami rozkładu organizmów roślinnych i zwierzęcych lub stanowiące wydzielinę makro- i mikroorganizmów. Ze względu na zaostrzające się wciąż przepisy dotyczące jakości wody do picia ważne jest ich usunięcie. Spośród wielu procesów pozwalających na usunięcie z wody substancji organicznych najczęściej w zakładach uzdatniania wody zastosowanie znajdują koagulacja i absorpcja na węglu aktywnym. Oprócz tego coraz większym zainteresowaniem cieszą się niskociśnieniowe procesy membranowe, tj. mikro- (MF) i ultrafiltracja (UF), które pozwalają na usunięcie z wody wielu domieszek zanieczyszczeń. Coraz częściej do usuwania naturalnych substancji organicznych stosuje się proces zintegrowany, łączący wymianę jonową i niskociśnieniową filtrację membranową. Zastosowanie tego procesu pozwala na usunięcie z wody makrocząsteczek organicznych

z wykorzystaniem dwóch mechanizmów separacji: wymiany jonowej w przypadku jonowej frakcji NMO oraz filtracji membranowej dla frakcji nieobdarzonej ładunkiem elektrycznym.

Grabińska-Łoniewska i Siński [2010] są przekonani, że rozwój cywilizacji jest nieuchronnie związany ze wzrostem stopnia zanieczyszczenia środowiska, co z kolei powoduje wzrost zachorowalności ludzi na choroby nowotworowe, układu oddechowego, układu krążenia, cukrzycę i alergię. Stosowanie lekoterapii w leczeniu chorych ludzi zwiększa ich podatność na infekcje nie tylko mikroorganizmami typowo chorobotwórczymi, lecz także gatunkami o niskiej zjadliwości, które określane są jako oportunistyczne patogeny. Do zakażenia dochodzi najczęściej drogą pokarmową przez spożywanie skażonej wody lub żywności. Naturalnym miejscem ich bytowania jest środowisko wodne, stanowiące źródło zaopatrzenia w wodę dla SUW. Do zbiorników wodnych mikroorganizmy te dostają się wraz ze ściekami komunalnymi i szpitalnymi, z odciekami ze składowisk odpadów komunalnych, jako spływy powierzchniowe ze skażonej gleby oraz w wyniku dostawania się do wód odchodów zwierząt.

Przenoszenie mikroorganizmów chorobotwórczych przez wody powierzchniowe i podziemne oraz przez systemy dystrybucji wody pitnej i sieć ciepłowniczą stanowi stale przedmiot zainteresowania inżynierów sanitarnych i epidemiologów. Organizmy te powodują przede wszystkim choroby układu pokarmowego, przy zakażeniu drogą inhalacyjną – układu oddechowego (alergie, infekcje płucne), a gdy wrotami zakażenia jest uszkodzona błona śluzowa jamy ustnej lub innych części ciała – infekcje wieloogniskowe w różnych narządach wewnętrznych i tkankach. W ostatnim dziesięcioleciu obserwowany jest gwałtowny wzrost zachorowań na choroby przewodu pokarmowego spowodowane przez organizmy inne niż dotąd uznawane za główne czynniki etiologiczne tych infekcji (bakterie z rodzajów *Salmonella*, *Shigella* i *Vibrio*, enterowirusy i pierwotniaki).

Według **Grabińskiej-Łoniewskiej i Sińskiego [2010]** większość mikroorganizmów wywołujących te choroby zalicza się do grupy patogenów oportunistycznych, a więc niewywołujących objawów chorobowych u osobników z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym. Zakażenia tymi organizmami stanowią poważne zagrożenie zdrowotne dla ludzi z obniżoną odpornością, a szczególnie cierpiących na zespół upośledzonego wchłaniania pokarmu, choroby nowotworowe, autoimmunologiczne, zespół AIDS oraz dla osób uzależnionych od leków, narkotyków i alkoholu, a także osób z implantami. Częstość występowania tych chorób zależy zarówno od indywidualnej wrażliwości organizmu człowieka, jak i od zjadliwości patogenów i czasu ich przeżywania w wodzie. Wrażliwość organizmu człowieka z kolei determinują ogólny stan zdrowia, wiek i predyspozycje genetyczne. Mikroorganizmy te, według **Grabińskiej-Łoniewskiej i Sińskiego [2010]**, dostają się do sieci wodociągowej wraz z uzdatnioną wodą (dawki chloru stosowane do dezynfekcji nie powodują całkowitego zabicia bakterii, wirusów, grzybów i pierwotniaków) oraz jako zanieczyszczenia z gleby podczas remontów sieci i w wyniku uszkodzeń mechanicznych podczas jej eksploatacji. Substratami do ich wzrostu są związki mineralne i organiczne występujące w wodzie, produkty

korozji przewodów wodociągowych oraz tzw. zanieczyszczenia wtórne, którymi jest biomasa organizmów występujących w różnego typu obrotach i osadach wewnątrzrurowych. Zapobieganie, a także eliminacja ujemnych skutków działania mikroorganizmów na zdrowie ludzi i zwierząt spowodowała rozwój przemysłu farmaceutycznego produkującego leki.

Łebkowska i in. [2012] omówiły piśmiennictwo dotyczące występowania substancji czynnych wchodzących w skład leków, które przenikają do ścieków, wód powierzchniowych oraz przeznaczonych do konsumpcji. Zwrócono uwagę na nieskuteczność usuwania farmaceutyków w konwencjonalnych procesach oczyszczania wody. Wobec powyższego wskazane są bardziej zaawansowane techniki oczyszczania, jak np. metody odwróconej osmozy, nanofiltracji oraz wysokoefektywne sposoby utleniania.

Omówiono również badania nad ekotoksycznością wybranych leków w zakresie toksyczności ostrej i chronicznej. Aby zmniejszyć ryzyko oddziaływania farmaceutyków na organizmy wodne i na człowieka, należy dążyć do:

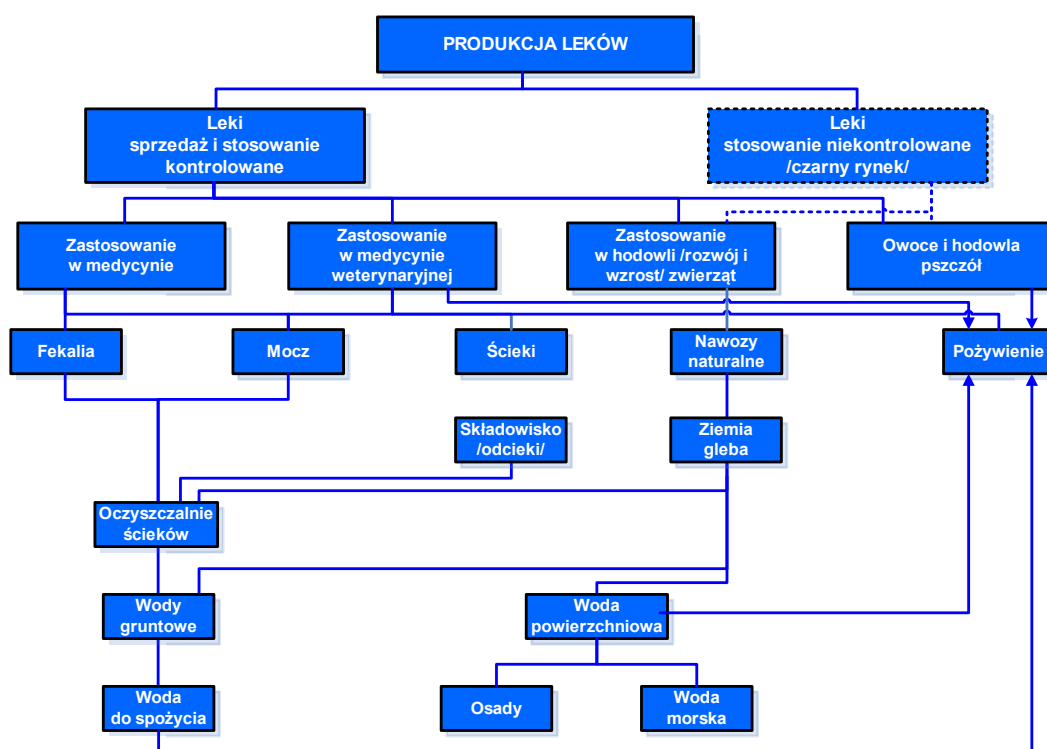
- zmniejszenia stopnia zażywania leków;
- modyfikacji procedur wykrywania niewielkich stężeń farmaceutycznych substancji aktywnych i ich metabolitów w wodzie i ściekach;
- optymalizacji procesów oczyszczania ścieków (szpitalnych i miejskich) w celu usunięcia pozostałości farmaceutyków, które na ogół wykazują znaczną refrakcyjność;
- wprowadzenia dezynfekcji ścieków ograniczającej odpływ do wód powierzchniowych i pitnych mikroorganizmów, w tym bakterii lekoopornych;
- wdrożenia do badań wód wodociągowych procedur, pozwalających kontrolować zawartość farmaceutyków, w celu określenia potencjału zagrożenia na zdrowie konsumentów oraz skuteczności ich usuwania w poszczególnych procesach oczyszczania wód;
- wprowadzenia testów ekotoksykologicznych z wykorzystaniem metod biologii molekularnej, testów chronicznych oraz badań w układach mikro- i mezokosmowych w celu pełniejszego szacowania szkodliwości farmaceutyków obecnych w środowisku wodnym.

Łebkowska, Załęska-Radziwiłł i Affek [2012] w następujący sposób scharakteryzowały leki: to substancje, które po wprowadzeniu do organizmu wywołują efekty terapeutyczne – hamują przyczyny lub objawy chorobowe. Szacuje się, że liczba leków produkowanych na świecie wynosi około 200 000, a w Polsce wytwarza się 2500 farmaceutyków – **Kot-Wasik i in. [2003]**. W Niemczech na 50 000 zarejestrowanych preparatów wykorzystywanych jest 2700, które pokrywają 90% zapotrzebowania na wszystkie leki. Zawierają one około 900 różnych substancji aktywnych, co odpowiada ich produkcji 38 000 t/rok – **Kümmerer [2008]**. Roczne zużycie poszczególnych grup farmaceutyków waha się w poszczególnych krajach od kilkudziesięciu do kilkuset ton – **Fent i in. [2006]**. Substancje aktywne leków mogą ulegać w organizmach procesom biochemicznym z wytworzeniem produktów pośrednich (metabolitów). Niektóre leki tylko częściowo zmieniają swoją strukturę

lub nie są metabolizowane. Po ich wydaleniu z organizmu mogą podlegać dalszym przemianom w środowisku na drodze transformacji, biotransformacji lub biodegradacji. Pewne leki wykazują oporność na działanie czynników abio- i biotycznych. Drogi migracji leków i produktów ich przemian przedstawiono na rys. 2.1.

Do oznaczeń zawartości farmaceutyków w roztworach wodnych i w glebie stosuje się głównie techniki chromatograficzne. Poziom ich wykrywalności waha się w zakresie od ng/l do µg/l. Niewiele wiadomo o występowaniu metabolitów preparatów leczniczych w środowisku. Występowanie farmaceutyków w ściekach, wodach powierzchniowych i w wodzie pitnej według **Łebkowskiej, Załęckiej-Radziwił i Affek [2012]** najczęściej jest wykrywane w środowisku w postaci:

- leków przeciwzapalnych i przeciwbólowych – diklofenaku, ibuprofenu, naproksenu,
- regulatorów poziomu tłuszczów – kwas kłofibrowy,
- β-blokerów – prolanodiol, metoprolol,
- hormonów steroidowych – 17β-estradiol, 17α-etynyloestradiol, estron,
- antybiotyków – penicylina G, erytromycyna, cyprofloksacyna.



Rys. 2.1. Drogi migracji leków i produktów ich przemian

Fig. 2.1. Migration routes of drugs and products of their transformations

Źródło: Kümmerer [2008]

Tabela 2.1

Wykrywane stężenia wybranych farmaceutyków w ściekach i wodach

Substancja czynna	Wykrywane stężenia [$\mu\text{g/l}$]				
	w ściekach			w wodach powierzchniowych	w wodzie pitnej
	z oczyszczalni przemysłu farmaceutycznego	surowych komunalnych	odpływających z oczyszczalni miejskich		
diklofenak		3,0	0,27-2,51	0,01-2,0	<0,0025
ibuprofen		35	0,002-85	0,34-2,7	0,077
naproksen		5,9	0,017-2,7	0,40	
kwasklofibrowy			0,044-4,45	0,030-1,1	0,27
metoprolol	800-950		0,025-2,2	0,05-2,2	
propranolol			0,076	0,005-0,007	
17 α -etynyloestradiol			0,017-0,45	0,831	0,0024
17 β -estradiol			0,0003-0,0025	0,2	0,0003
estron			0,0025-0,034	0,112	
erytromycyna			6,0	1,7	
penicylina			<0,02		
cyprofloksacyna	3-87	osad ściekowy 2,4 mg/kg	0,24-0,40	0,03	

Źródło: Łebkowska, Załęska-Radziwiłł, Affek [2012].

W środowisku występują także substancje farmaceutyczne wchodzące w skład leków przeciwnowotworowych, antyepileptycznych oraz antydepresantów – **Nikolaou i in. [2007]**. W tabeli 2.1 zestawiono dane o wykrywanych stężeniach wybranych farmaceutyków w ściekach i w wodach.

Giebułtowicz i in. [2018] wykonali kompleksowe badania wody z Wisły, poszukując antybiotyków, bakterii lekoopornych i genów oporności na antybiotyki. Próbkę pobierano przez 2 lata, 4 razy w roku, w 6 punktach, skrajne punkty poboru wody znajdowały się ok. 18 km powyżej i poniżej punktu zrzutu wody oczyszczalni ścieków Czajka w Warszawie. Poszukiwano 26 antybiotyków metodą chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) związków. Genów oporności poszukiwano metodami molekularnymi bezpośrednio w próbkach wody. Najwięcej antybiotyków wykryto w próbkach wody pobranych w odległości 10 m od punktu zrzutu wody. Najwyższe stężenia stwierdzono dla makrolidów – azytromycyny (średnio 631 ng/l), klatromycyny (442 ng/l) i erytromycyny (456 ng/l). Ponadto stwierdzono wysokie stężenia flukonazolu (418 ng/l) i sulfometaksazolu (605 ng/l). Próbkę pobierane w kolejnych miejscach, poniżej oczyszczalni, zawierały mniej

antybiotyków. Uzyskane wyniki wskazują, że głównym źródłem tych substancji są ścieki komunalne, a usuwanie antybiotyków w oczyszczalni jest nieefektywne.

W próbkach pobieranych z 18 km powyżej oczyszczalni ścieków Czajka wykryto 20 z 26 badanych antybiotyków. Istotne stężenia stwierdzono dla makrolidów – azytromycyny (1,6-77 ng/l), klatromycyny (1-15 ng /l) i erytromycyny (do 4,4 ng/l). Najwyższe wartości zanotowano jesienią 2013 roku, wynosiły one: azytromycyny (193 ng/l), klatromycyny (52 ng/l) i erytromycyny (57 ng/l). Obecność antybiotyków w tych próbkach interpretowano jako zanieczyszczenie pochodzenia rolniczego. W niemal wszystkich próbkach stwierdzono obecność genów *erm* kodujących oporność na makrolidy.

W innych badaniach **Giebultowicz i in. [2014]** poszukiwali antydepresantów w próbkach wody z Wisły i Utraty. Utrata jest małą mazowiecką rzeką, do której trafiają, po oczyszczeniu, ścieki komunalne z obszaru Pruszkowa i Tworek. W próbkach z Utraty stwierdzano wyższe stężenia leków niż w Wiśle, śladowe ilości 5 z 21 badanych leków zidentyfikowano także w wodzie pitnej. W przypadku wody z Utraty wykazano wyższe stężenia leków w wodzie pitnej niż próbkach wody z rzeki, co wskazuje na obecność leków w osadach dennych, z których są one sukcesywnie wypłukiwane. Wykazano, że antydepresanty mogą oddziaływać niekorzystnie na ekosystemy wodne także w niskich stężeniach.

Farmaceutyki dostające się do ścieków mogą ulegać biodegradacji podczas tlenowego i beztlenowego oczyszczania ścieków. Jedne, jak diklofenak, są eliminowane nawet w 70% osadem czynnym, jednak przy długim czasie zatrzymania – 8 dni. Inne, jak ibuprofen, są degradowane do hydroksy- i karboksypochodnych. Znane jest także zjawisko resyntezy substancji aktywnej leku w procesie biologicznego oczyszczania ścieków.

Powstające w procesach biodegradacji metabolity mogą wykazywać większą lub mniejszą oporność na rozkład w porównaniu z substancjami macierzystymi. Często występuje zjawisko sorpcji substancji aktywnych czy ich metabolitów, na kłaczkach osadu czynnego, co jest związane z lipofilnością, obecnością grup funkcyjnych karboksylowych, aldehydowych i aminowych. Umożliwia to przechodzenie farmaceutyków do osadów ściekowych, a przy ich rolniczym wykorzystaniu – do gleby. Oporne na biodegradację leki, jak polarny kwas klofibrowy niewykazujący powinowactwa do fazy stałej, dostają się do wód powierzchniowych ze ściekami odpływającymi z oczyszczalni – **Jørgensen i Halling-Sørensen [2000]; Nikolaou i in. [2007]**. Pewna część farmaceutyków ulega transformacji abiotycznej na drodze hydrolizy (rzadziej) i fotolizy (częściej). Liczne leki trafiają do środowiska wodno-gruntowego pośrednio i bezpośrednio wskutek wykorzystania osadów ściekowych i gnojowicy do celów rolniczych, stosowania antybiotykoterapii u chorych zwierząt lub podawania zdrowym zwierzętom antybiotyków prewencyjnie. Sprzyja to pojawianiu się farmaceutyków w wodach podziemnych.

Procesy uzdatniania wody do spożycia zmniejszają zawartość farmaceutyków, jednak nie usuwają ich całkowicie. Stwierdzono przykładowo, że stężenie kwasu klofibrynowego w wodzie pitnej sięgało 270 ng/l – **Cleuvers [2003]**.

Rowney i in. [2009], badając występowanie leków cytotoksycznych, głównie przeciwnowotworowych, w wodzie wodociągowej (ujęcie z Tamizy, Londyn) wykazali, że ich stężenia wynoszą 20 ng/l. Przy założeniu że człowiek wypija 2 litry wody dziennie, to wdychania dawkę 40 ng/dobę, tj. poniżej dopuszczalnej przez EMEA (European Medicine Agency) wynoszącej w pokarmie 1,5 µg/osobę i dobę. Autorzy podkreślili jednak, że w pracy oznaczono tylko 13 związków, a w Anglii zużywa się ich ponad 50. Stwierdzono także, że choć ryzyko w odniesieniu do zdrowia dorosłych osób jest niskie, to nieznane jest zagrożenie w stosunku do kobiet ciężarnych i noworodków karmionych mlekiem matki. Przyjmując, że woda pitna stanowi 10% substancji przyjmowanych z pokarmem, zaproponowano, aby stężenia substancji niewywołujących genotoksyczności nie przekraczały 0,1 µg/l, a genotoksycznych – 0,01 µg/l – **Schriks i in. [2010]**. Dotyczy to związków o nieuregulowanych prawnie zawartościach w wodzie do spożycia i występujących w niewielkich stężeniach, tak jak farmaceutyki.

Huerta-Fontela i in. [2011] wykryli w wodzie surowej 35 różnych farmaceutyków, w tym hormonów i ich metabolitów, w stężeniu dochodzącym do 1200 ng/l. Po procesie uzdatniania wody obejmującym wstępne chlorowanie, koagulację, filtrację, ozonowanie, filtrację w granulowanym aktywnym węglu i chlorowanie końcowe pozostało 5 preparatów leczniczych w stężeniu ok. 10 ng/l. Świadczyło to o znacznej sprawności eliminacji farmaceutyków z wody, przy czym działanie przewlekłe nieusuniętej mieszaniny leków na organizm ludzki jest nieznane. **Quintana i in. [2010]** zwrócili uwagę na zjawisko powstawania chlorowcopochodnych leków podczas chlorowania wody do spożycia, m.in. naproksenu i diklofenaku. Konwencjonalne metody uzdatniania wody, jak koagulacja i filtracja przez złoża piaskowe, nie są skuteczne do eliminacji farmaceutyków, natomiast zastosowanie granulowanych węgla aktywnych, filtracji membranowej i odwróconej osmozy pozwala na wydajne ich usuwanie z wody pitnej – **Kim i in. [2007]**.

Wichrowska [1994] zwróciła uwagę, że na skład wody wodociągowej wpływ mają materiały użyte do wykonania systemu wodociągowego i instalacji wewnętrznych. Powszechnie stosowane materiały: żeliwa, stal ocynkowana, stal odporna na korozję, miedź, mosiądz, metale lutowicze (używane przy rurach z miedzi), aluminium, beton, azbestocement, cement, tworzywa sztuczne, powłoki antykorozyjne, asfalty, farby i lakiery, mogą być źródłem różnych substancji przedostających się do kontaktującej z nimi wody wodociągowej.

Wichrowska [1994] opisała również proces powstawania biofilmu na wewnętrznych powierzchniach rur wykonanych z różnego rodzaju materiałów, np. na powierzchniach z tworzyw sztucznych nie namnażały się bakterie tworzące biofilm.

W tym miejscu warto wskazać, że późniejsze publikacje podkreślają, że właśnie na powierzchniach z tworzyw sztucznych zanotowano znaczną tendencję do namnażania się bakterii i tworzenia biofilmu.

Według podanych przez **Góreckiego [2006]** z Rozporządzenia Ministra Infrastruktury z dnia 12 kwietnia 2002 r. w sprawie warunków technicznych, jakim powinny odpowiadać budynki i ich usytuowanie (Dz.U. 2002 Nr 75, poz. 690 z późniejszymi zmianami), wynika

jednoznacznie, że „wyroby stosowane w instalacji wodociągowej powinny być tak dobrane, aby ich wzajemne oddziaływanie nie powodowało pogorszenia jakości dostarczanej wody oraz zmian skracających trwałość instalacji”. Zapis ten stawia wymagania utrzymania właściwej jakości wody do spożycia przez ludzi i niedopuszczenia do jej wtórnego zanieczyszczenia.

Szczotko i in. [2010] donoszą, że w wyniku przenikania toksycznych substancji w ilościach szkodliwych dla zdrowia człowieka z materiałów stosowanych do budowy instalacji wodociągowych może dojść do innej oceny sensorycznej wody, w tym smak, zapach, barwa, mętność, natomiast kontrola tego rodzaju wpływu w eksploatowanej instalacji jest bardzo trudna lub wręcz niemożliwa. Wobec powyższego nie należy dopuszczać do stosowania w omawianych instalacjach materiałów mogących spowodować omawiane zanieczyszczenia, co jest zgodne z przepisami przytaczanymi przez **Góreckiego [2006]**.

Dyrektywa Rady 98/83/WE z dnia 3 listopada 1998 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, zobowiązująca w art. 10 państwa członkowskie do zapewnienia, że substancje czy materiały w nowych instalacjach zastosowane przy uzdatnianiu i dystrybucji wody przeznaczonej do spożycia lub zanieczyszczenia towarzyszące takim substancjom i materiałom nie będą występowały w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi w stężeniach mogących szkodliwie oddziaływać na zdrowie.

W Polsce zgodnie z rozporządzeniem Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U. 2017 poz. 2294) zastosowanie wyrobu lub materiału do dystrybucji wody wymaga uzyskania oceny higienicznej Państwowego Inspektora Sanitarnego. Tego typu atesty wydaje Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny. Pracownicy tego zakładu, tj. **Szczotko i in. [2010]**, opisali m.in. w swojej publikacji metody badań obrostów biologicznych (biofilmu) na różnego rodzaju materiałach w Wielkiej Brytanii, Niemczech, Holandii oraz Austrii, a także zaprezentowali urządzenie polskiej konstrukcji do tego rodzaju badań, podając jednocześnie, że z dniem 1 czerwca 2010 r. wprowadzono obowiązkowe badania podatności na obrost mikrobiologiczny (biofilm) wyrobów wykonanych z tworzyw sztucznych, powłok lakierniczych i mieszanek gumowych, co odpowiada wymaganiom Dyrektywy 98/83/WE.

Szerszego omówienia ww. Dyrektywy dokonała **Szatkiewicz [2010]**, informując m.in., że od 2007 r. trwa rewizja wymienionej Dyrektywy, a w 2010 r. zaproponowano podział mierzonych parametrów na 5 grup. Propozycja ta wzbudziła wiele krytycznych uwag i wstrzymała wówczas dalsze prace uściślające przepisy omawianej Dyrektywy.

Z kolei **Szatkiewicz [2010]** opisuje szczegółowo propozycje Światowej Organizacji Zdrowia wpisane do wspomnianej Dyrektywy planu bezpieczeństwa wody (Water Safety Plans, WSP).

Tego typu plany zakładają monitoring produkcji i dystrybucji wody od ujęcia aż do kranu konsumenta. Izba Gospodarcza Wodociągi Polskie uważa, że przed decyzją o formie zapisu Dyrektywy powinna być przeprowadzona analiza kosztów i korzyści. Jednocześnie Wodociągi wskazują na konieczność realizacji zapisów Ramowej Dyrektywy Wodnej skutkującej ochroną

źródeł wody surowej, a jednocześnie przestrzegającej zdaniem **Szatkiewicz [2010]** przed stworzeniem precedensu na wodę lepiej i gorzej kontrolowaną. Ponadto powstaje pytanie, kto by miał dokonywać kontroli według ww. projektu WSP. Trudności ww. kontroli wynikają m.in. z faktu, że stwierdzenie zanieczyszczeń u odbiorcy (w kranie) będzie nie tylko kłopotliwe pomiarowo, lecz także trudne do wyeliminowania osobnym systemem doczyszczania.

To, że z sieci wodociągowej wykonanej z rur PCV są wymywane związki organiczne, zostało potwierdzone w badaniach **Kowalskiej i in. [2009]**. W publikacji tej stwierdzono, że ponad 1/5 sieci wodociągowej jest wykonana z PCV. Wpływ materiału PCV na jakość wody nie jest do końca znany. Związki, które mogą migrować z rur PCV do wody, to zazwyczaj składniki dodatkowe wprowadzane do polimeru przede wszystkim w procesie przetwórstwa. Substancje te, jak np. środki antyadhezyjne, rozdzielające, zmniejszające lepkość, są dodawane w celu poprawy właściwości przetwórczych tworzywa. Niezbędne jest także zabezpieczenie polimeru przed negatywnym wpływem podwyższonej temperatury, gdyż podczas przetwórstwa polichlorku winylu zachodzą reakcje utleniania, odszczepiania chlorowodoru, destrukcji, sieciowania.

Aby przeciwdziałać procesowi destrukcji PVC dodaje się stabilizatory, które wiążą chlorowódor, pełniąc również funkcję przeciwutleniacza i stabilizatorów promieniowania UV. Do grupy stabilizatorów i przeciwutleniaczy zalicza się m.in. związki cynoorganiczne, sole kadmu, wapnia, baru, strontu, magnezu i cynku oraz kwasów tłuszczowych. Substancje pochłaniające promieniowanie UV to przede wszystkim pochodne benzofenolu, benzotriazolu, kumaryny i kwasu salicylowego.

W wyniku przeprowadzonych badań przez **Kowalską i in. [2009]** stwierdzono m.in. wymywanie związków cynoorganicznych (tributylocyny i monobutylocyny), których oddziaływanie na organizm ludzki jest nieznane.

Intensywność poszczególnych procesów mikrobiologicznych oraz reakcji chemicznej zachodzących w wodzie, według **Traczewskiej i Sitarzkiej [2009]**, podczas jej przesyłu zależy nie tylko od jakości wody, lecz także od rodzaju materiału, z jakiego wykonana jest sieć oraz wieku rurociągów. Rurociągi wykonane z tworzyw sztucznych charakteryzują się znacznie mniejszą chropowatością powierzchni w stosunku do żeliwnych czy stalowych, ale to jedynie obniża ich podatność na obrosty mikrobiologiczne, a nie eliminuje całkowicie problemu.

Przeprowadzone badania przez **Traczewską i Sitarzką [2009]** na próbkach materiałów z tworzyw sztucznych (PVC, PE, PB i PP) wykazały zróżnicowaną podatność na obrosty mikrobiologiczne zarówno w stosunku do liczebności organizmów tworzących biofilm, jak i ich bioróżnorodności. Identyfikacja tych organizmów w biofilmie potwierdza dane literaturowe o obecności grzybów oraz bakterii chorobotwórczych w badanej wodzie wodociągowej. Wśród grzybów stwierdzono przede wszystkim obecność grzybów niedoskonałych *Candida*, które występują w organizmie człowieka, jednak ich zwiększona liczebność u organizmów o obniżonej odporności może wywołać infekcję skóry oraz dróg oddechowych. Wyzolowane bakterie oportunistyczne to: *Raoultella* sp., *Escherichia coli*,

Corynebacterium, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus* i *Bacillus sp.* Ponieważ penetracja środków dezynfekcyjnych w strukturach biofilmu jest ograniczona, obecność tych bakterii stanowi realne zagrożenie epidemiologiczne. Wybrane wnioski z ww. badań są następujące:

- a) tworzywa sztuczne są podatne na obrosty mikrobiologiczne,
- b) w biofilmie stwierdzono obecność zarówno bakterii jak i grzybów,
- c) w przypadku obecności dojrzałego biofilmu obserwuje się zwiększoną liczbę bakterii w wyniku ciągłego wypłukiwania ich ze struktury błonowej biofilmu, a także w wyniku zrywu obrostu po okresowo zwiększonym natężeniu przepływu,
- d) bakterie i grzyby rozwijające się na powierzchni tworzyw sztucznych w rezultacie prowadzonych procesów metabolicznych powodują korozję mikrobiologiczną.

Badania przeprowadzone przez **Kowalską i Kowalskiego [2011]** potwierdziły, że istnieje wpływ polietylenu sieciowego na jakość wody, będącej z nim w kontakcie. Na wzrost wymywania związków organicznych oddziałują przede wszystkim podwyższona temperatura oraz okresy stagnacji wody, co powoduje wzrost zawartości całkowitego węgla organicznego. Analizy chromatograficzne pozwoliły na wykazanie, że wymywane związki są zależne od przeciwutleniaczy użytych w czasie produkcji rur polietylenowych.

Stosowane w technologii wody węgle aktywne zostały opisane przez **Grzegorzuk-Nowacką [2010]**. Najczęściej usuwanymi na węglach aktywnych substancjami organicznymi są substancje humusowe oraz uboczne produkty utleniania i dezynfekcji. Należy jednak mieć na uwadze, że węgle te są produkowane z różnych surowców oraz z zastosowaniem różnych metod aktywacji. To powoduje, że charakteryzują się zróżnicowaną budową i różnymi właściwościami.

Kowalska i in. [2016] zwrócili uwagę na skutki znacznego spadku zapotrzebowania na wodę ludności i przemysłu na obszarach wiejskich. Na tych obszarach sieć wodociągowa na ogół była budowana z nieplastyfikowanego polichlorku winylu (PCV-U). W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono na jednej próbce wody przetrzymywanej w rurociągu przez 480 godzin znaczne przekroczenie barwy (20 mg Pt/dm^3) i mętności ($4,45 \text{ NTU}$), ponadto znaczny wzrost stężenia ołowiu, nawet do $23 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$ w rurze DN 90 mm oraz $12,8 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$ w rurze DN 160 mm (dopuszczalna wartość to $10 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$).

Wyniki tych badań potwierdzają inne doniesienia dotyczące wpływu materiału użytego do budowy rur wodociągowych na pogorszenie jakości wody.

Rożej, Kowalski, Kowalska [2011] przeprowadzili badania mające na celu określenie wpływu stagnacji na jakość mikrobiologiczną wody w instalacji zbudowanej z rur PVC, PE-HD oraz REX. Wyniki tych badań pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- wyższe prędkości przepływu wody w instalacji badawczej powodowały zmniejszenie zawartości bakterii w cyrkulującej wodzie,

- zmiana jakości mikrobiologicznej wody podczas stagnacji w badanej instalacji zależy od warunków hydrodynamicznych panujących podczas codziennego przepływu wody oraz od rodzaju tworzywa, z którego wykonana jest instalacja,
- najwyższy potencjał zasiedlania biofilmu i wtórnego zanieczyszczenia wody w okresie stagnacji w badanej instalacji wykazuje polietylen o dużej gęstości,
- przy większych prędkościach przepływu wody powstają biofilmy odporne na zrywanie wskutek powstających na sciankach przewodów naprężeń ścinających.

Wanot i Goczół [2018] na podstawie przeglądu 35 publikacji i doświadczeń własnych stwierdzili, że nie istnieje technologia dezynfekcji wody, która by nie tworzyła szkodliwych dla zdrowia produktów ubocznych. Również nie ma materiału, z którego zbudowane są rury wodociągowe, zapobiegające tworzeniu się na wewnętrznych powierzchniach biofilmu. Najbardziej odporne na rozwój mikroorganizmów w biofilmie są rury wykonane z miedzi a najbardziej sprzyjające są w rurach ze stali i tworzyw sztucznych.

Kłosok-Bazan i Sawiniak [2011] omówili wykorzystywanie polielektrolitów w uzdatnianiu wody do picia od strony formalnoprawnej. Oprócz niewątpliwych zalet, jakimi są skuteczność usuwania zanieczyszczeń, łatwość przygotowania i dozowania, niska dawka i co z tego wynika mniejsza ilość osadów, stosowanie polielektrolitów pociąga za sobą pewne ryzyko. Część autorów zwraca uwagę na ich toksyczność zwłaszcza w odniesieniu do polimeru pozostałego po procesie koagulacji. Wobec powyższego dozowanie polielektrolitów wymaga przeprowadzenia szczegółowych badań obejmujących dobór odpowiedniego środka, optymalnej dawki, wykluczenia ryzyka pojawienia się polimeru pozostałego w wodzie po procesie koagulacji, dobór odpowiedniego miejsca dozowania polimerów oraz analizę składu osadów i wód popłucznych pod kątem ich właściwej utylizacji.

Korez [2013] proponuje stosowanie w procesie koagulacji naturalnego koagulatu uzyskiwanego z odnawialnych upraw czarnej akacji uprawianej w Brazylii. Preparat ten jest w 100% biodegradowalny i nie powoduje wtórnego zanieczyszczenia ścieku. Jedna dawka EKOFLOKU zastępuje zwykle od 3 do 5 razy więcej PIX lub PAX w zależności od zastosowania.

Gumińska i Kłos [2010] przebadali skuteczność koagulacji w usuwaniu z wód powierzchniowych związków humusowych.

Badania **Gumińskiej [2006]** wykazały, że efektywność technologiczna koagulacji objętościowej była wysoka w całym zakresie odczynu pH 5,7÷7,0, pod warunkiem że temperatura wody surowej nie hamowała procesu flokulacji.

Zespół autorów **Konieczny i in. [2007]** dokonał porównania przydatności wybranych koagulantów do usuwania substancji organicznych w procesie hybrydowym koagulacja/mikrofiltracja. W wyniku zastosowania tej metody „in-line” uzyskano polepszenie jakości wody przez zwiększenie usuwalności substancji organicznych. Jednak wybór koagulantu ma zasadniczy wpływ na jakość wody, a ponadto może ograniczyć przepływ strumienia wody w procesie mikrofiltracji.

Sroka i in. [2011] opisali wstępne wyniki z badanego procesu filtracji ciśnieniowej do separacji zawiesiny pokoagulacyjnej w przedsiębiorstwie MPWiK m.st. Warszawy. Zastosowana metoda pozwoliła na zmniejszenie zanieczyszczeń organicznych kierowanych na dalsze etapy uzdatniania. Średni stopień usunięcia podstawowych parametrów charakteryzujących zawartość materii organicznej wynosił odpowiednio: OWO 34%, utlenialność 39%, barwy 49%, a absorbanca UV 254 nm 64%.

Bauman-Kaszubska [2009] opisała gospodarkę osadową w stacji uzdatniania wody w Płocku. Gospodarka ta stała się przedmiotem zainteresowania w związku z ustawą z 27 kwietnia 2001 r. o odpadach. Osady powstające podczas produkcji wody zalicza się do kategorii odpadów Q9, która obejmuje pozostałości z procesów usuwania zanieczyszczeń. Opisana stacja, dzięki ciągłym inwestycjom, należy do najnowocześniejszych w Europie i dostarcza wodę wysokiej jakości. Kluczowym momentem w rozwoju płockiej stacji było zastosowanie technologii ozonowo-węglowej oraz filtrów antracytowo-piaskowych. Kombinacja ozonu z filtrem GAC jest trafnym i oszczędnym rozwiązaniem w przypadku utleniania składników organicznych w uzdatnianiu wody powierzchniowej w celu uzyskania wody do picia należytej jakości. Osady powstające w procesie uzdatniania wody poddawane są mechanicznemu odwadnianiu na prasie filtracyjnej, co zmniejsza ich objętość i ułatwia transport. Osady te odbiera inna firma zajmująca się ich unieszkodliwianiem.

Piątkiewicz i Dąbrowski [2009] udokumentowali na podstawie badań laboratoryjnych, na specjalnie zbudowanym stanowisku, wpływ zaburzeń przepływu wody na mętność filtratu w filtrze pośpiesznym. Z dotychczasowych badań było wiadomo, że na początku płukania usuwane są cząstki o bardziej negatywnych właściwościach potencjału zeta i można było się spodziewać, że podobna zależność dotyczy również pogorszenia jakości filtratu w czasie gwałtownych zmian wartości natężenia przepływu. Wykonane badania potwierdziły te przypuszczenia. Graficznie przedstawione wyniki zmian mętności filtratu w czasie dobrze dokumentują przebieg opisywanych zjawisk.

Walczak [2012] potwierdził, na podstawie przeprowadzonych badań, konieczność dokonywania okresowej modyfikacji technologii uzdatniania wody powierzchniowej, które charakteryzują się dynamicznymi zmianami. Większość tych zmian zachowuje cykliczny charakter (temperatura, zawartość tlenu, mętność, utlenialność). Jednak są również zmiany niecykliczne, jak np. zawartość manganu. W rezultacie istnieje konieczność ciągłego monitorowania jakości wody i wprowadzenia szybkich zmian jej uzdatniania.

Kłós [2012] opisał implementację systemu „multibariery” jako sposobu eliminacji ryzyka skażenia bądź niewystarczającego uzdatniania wody powierzchniowej dla odbiorców komunalnych. System ten nie może być jedynie zbiorem procedur, a powinien się cechować dobrymi rozwiązaniami technicznymi i technologicznymi.

Siwiec [2011] na podstawie przeprowadzonych badań strat ciśnienia przy przepływie wody przez warstwę podtrzymującą filtrów pośpiesznych zakwestionował kilka wzorów do obliczania tych strat. Swoją konstatację udokumentował wynikami badań zilustrowanych również graficznie.

Sozański i in. [2011] opracowali metodykę badań przydatności materiału filtracyjnego do usuwania żelaza i manganu. Metodyka ta jest użytecznym narzędziem, określającym najistotniejsze z punktu widzenia zależności w badanych procesach. Charakterystyki tych procesów omówiono na przykładzie aplikowanego w technologii uzdatniania wody złoża chalcodonitowego. Uzyskane wyniki badań pozwoliły również określić nieanalizowany dotychczas wpływ zawartości manganu w wodzie surowej na czas jego usuwania oraz wysokości materiału filtracyjnego w toku jego eksploatacji.

Procesy koagulacji i filtracji w dotychczasowych technologiach uzdatniania wody są związane głównie z usuwaniem żelaza i manganu, stąd też ukazuje się wiele publikacji z tego zakresu. Na uwagę zasługuje tu praca **Webera [2012]** dotycząca usuwania z wody żelaza, manganu oraz jonu amonowego. W publikacji tej zestawiono w tabelach charakterystyki złożów filtracyjnych różnych producentów, służących do odżelaziania, odmanganiania oraz odkwaszania. W podsumowaniu Weber stwierdza, że wszystkie prezentowane urządzenia filtracyjne są skuteczne, natomiast różnic można się dopatrzeć przy analizie kosztów inwestycyjnych i eksploatacyjnych, a ten aspekt niekiedy znacząco różnicuje przyjęte rozwiązania.

Badania nad zależnością prędkości filtracji w wybranych złożach filtracyjnych przeprowadził **Nowak [2013]**. Z tych badań wynika, że spośród czterech badanych mas tylko w jednym przypadku (masa Defeman) zaobserwowano znaczące pogarszanie się efektywności procesu wraz ze wzrostem prędkości przepływu uzdatnianej wody. Złoża wypełniane masami Purolite MZ-10, G-1 oraz Birm, w granicach analizowanych prędkości filtracji (czyli do 18 m/h) i przy ściśle określonych parametrach uzdatnionej wody, „produkowały” wodę o wymaganych parametrach jakościowych.

Gumińska [2006] stwierdza, że wody powierzchniowe, a w szczególności wody płynące w terenach górskich, charakteryzują się znacznymi wahaniami jakości. Wody te często wymagają uzdatniania w procesie koagulacji, nawet w okresie zimowym, kiedy temperatura wody jest bardzo niska. Powszechnie wiadomo, że niska temperatura hamuje lub uniemożliwia proces flokulacji, tym samym proces koagulacji objętościowej jest nieskuteczny. W takich warunkach koagulacja musi być realizowana w złożu filtracyjnym, gdyż filtracja bezpośrednia pozwala na skuteczne uzdatnienie niezależnie od temperatury ujmowanej wody. Konieczność uzdatniania w warunkach niskich wartości temperatury wynika przede wszystkim z obecności rozpuszczonych związków organicznych, które podczas dezynfekcji chlorem są źródłem tworzenia się THM-ów, niezależnie od wartości podstawowych wskaźników, tzn. barwy, mętności i utlenialności, które w tym okresie przyjmują najniższe wartości w skali roku.

Papciak [2013] w artykule przedstawiła wyniki badań dotyczących oczyszczania wód podziemnych z ponadnormatywnych zawartości azotu amonowego, żelaza i manganu metodą biofiltracji na złożu chalcodonitowym. Celem badań było określenie wpływu obecności żelaza i manganu na czas wypracowania złożów nityfikacyjnych i efektywność usuwania azotu amonowego z wody metodą biofiltracji. Przeprowadzone badania świadczą o tym, że czas

formowania biofilmu (dojrzewanie złoża) zależy od składu chemicznego wody kierowanej na biofiltry. Stwierdzono, że obecność zarówno żelaza, jak i manganu wpływa na skuteczność usuwania azotu amonowego i czas wykształcenia biofilmu. Obecność manganu wyraźnie opóźniła rozpoczęcie procesu nityfikacji. Zawartość azotu amonowego została doprowadzona do wartości normatywnej w czasie trzykrotnie dłuższym niż w przypadku wody niezawierającej manganu. Nie stwierdzono II etapu nityfikacji, natomiast złoża, na które kierowana była woda zawierająca jony Fe^{2+} , osiągnęło najszybciej II fazę procesu nityfikacji. Skuteczną metodą oczyszczania wód podziemnych z ponadnormatywnej zawartości azotu amonowego z jednoczesnym odżelazianiem i odmanganianiem jest biofiltracja dwustopniowa na złożach chalcedonitowych ze wstępną aktywacją chemiczną pierwszego stopnia biofiltracji.

Jako wypełnienie filtrów zastosowano czerwono-brunatno-żółtą odmianę chalcedonitu o granulacji 1,0-2,0 mm, którą po dokładnym wypłukaniu wysuszono i wyprażono w temperaturze 550°C.

Chalcedonity stanowią surowiec mineralny, którego skład chemiczny i fazowy, a także właściwości fizyczne stwarzają perspektywy różnorodnego i wielostronnego wykorzystania. Na charakterystykę chalcedonitów wpływają formy budujących je minerałów z grupy SiO_2 , a także typ i rodzaj transformacji fazowych, zachodzących w ich obrębie pod wpływem oddziaływania wysokiej temperatury. Analiza składu chemicznego wykazała zawartość krzemionki w granicach 95,0% oraz pewnych ilości: tlenków wapnia, magnezu, glinu, żelaza, a także manganu. Chalcedonity cechuje również dość znaczna powierzchnia właściwa oraz duża objętość makroporów (nieco wyższa niż w przypadku węgla antyrcytowego).

Układy filtracyjne zasilano roztworami modelowymi, sporządzonymi na bazie wody wodociągowej, różniącymi się składem chemicznym, tj. obecnością lub brakiem podstawowych zanieczyszczeń wód podziemnych mogących wpływać w znacznym stopniu na efektywność usuwania azotu amonowego w procesie nityfikacji. Złoża chalcedonitowe było wstępnie uaktywnione 0,3% roztworem KMnO_4 .

Weber [2010] opisał metody wyznaczania długości cyklu filtracyjnego w układach odżelaziania i odmanganiania wody. Zaprezentował szczegółowo dwie metody: metodę obliczeniową oraz metodę strat ciśnienia. Autor zaznacza, że wyznaczenie długości cyklu filtracyjnego powinno być kontrolowane na podstawie jakości filtratu. W podsumowaniu zostały wymienione wady i zalety wynikające ze zbyt długiego lub krótkiego trwania cyklu filtracyjnego.

Weber i Witkowski [2013] opisał w trzech publikacjach podstawowe metody dezynfekcji wody. W części pierwszej zawarto informacje ogólne o podchlorynie sodu dozowanym w postaci roztworu za pośrednictwem specjalnych dozowników. W części drugiej skupiono się na dozowaniu podchlorynu sodu przygotowanym na miejscu z soli kuchennej. Poruszono także problem tworzenia ubocznych produktów chlorowania wody i utlenienie chlorem różnych

substancji zawartych w wodzie, co zmniejsza skuteczność biobójczą dozowanego dezynfektanta. W części trzeciej omówiono technologię dezynfekcji wody przy zastosowaniu dwutlenku chloru w zastosowaniu do sieci wodociągowej oraz zbiorników retencyjnych.

Miłaszewski i in. [2013] poświęcili swoją publikację bardzo istotnemu problemowi z punktu widzenia ekonomicznego, a mianowicie kosztom budowy i eksploatacji stacji uzdatniania wód podziemnych. Na podstawie 6 stacji zlokalizowanych w województwie podlaskim autorzy sformułowali następujące wnioski:

- Najwyższe jednostkowe koszty budowy i eksploatacji dotyczą stacji uzdatniania wód podziemnych o najbardziej zaawansowanej technologii, tj. stosujących odżelazianie, odmanganianie i dezynfekcję.
- Wraz ze wzrostem przepustowości stacji uzdatniania wód podziemnych rosną całkowite nakłady inwestycyjne i roczne koszty eksploatacji, natomiast maleją koszty jednostkowe.
- Utworzone modele matematyczne oraz wykresy jednostkowych nakładów inwestycyjnych i jednostkowych kosztów eksploatacji mogą być stosowane do prognozowania kosztów we wstępnej fazie projektowania uzdatniania wody. Zakres stosowalności wzorów ogranicza się do stacji o przepustowości zbliżonej do przepustowości stacji uzdatniania wody poddanych analizie.
- Określone wskaźniki mają charakter orientacyjny i w przypadku ich wykorzystania w kolejnych latach wymagają weryfikacji za pomocą wskaźników przeliczeniowych aktualnych cen produkcji budowlano-montażowej.

Figiel [2010] opisał pomiar on-line barwy, czyli nowoczesne rozwiązanie pozwalające na pełną kontrolę jakości wody pitnej na wylocie stacji uzdatniania oraz nadzór w procesie technologicznym redukcji tego parametru (dla wody surowej jest to dozowanie odpowiednich koagulantów). Kierunki rozwoju analitycznych metod pomiarowych oraz liczne obecnie modernizacje obiektów wodociągowych sugerują, że urządzenia tego typu z pewnością znajdują się niedługo w coraz większej liczbie aplikacji. Należy podkreślić, że wiarygodny i dokładny pomiar on-line gwarantuje szybką reakcję na ewentualne zmiany i umożliwia natychmiastowe wykrywanie nieprawidłowych wartości. Takie działania pozwalają na prawidłowe zarządzanie systemami zaopatrzenia w wodę pitną i przestrzeganie norm co do jej jakości.

Zimoch [2008] opisała ryzyko zmian jakości wody w sieci wodociągowej w funkcji generowania THM-ów (THM – chloroform, bromodichlorometan, dibromochlorometan, bromoform). Obecnie ok. 1/3 wytwarzanych związków organicznych w sektorze gospodarki narodowej trafia do środowiska naturalnego, w tym także do wód będących podstawą funkcjonowania systemów zaopatrzenia w wodę (SZW). Związki te powodują często trudności technologiczne eksploatacji stacji uzdatniania wody, w kontakcie z chlorem (powszechnie stosowanym w dezynfekcji) są bowiem przyczyną powstawania UPD, w tym wspomnianych trihalometanów.

W 1996 r. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO – *World Health Organization*) na wniosek Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC – *International Agency for Research on Cancer*) zaliczyła chloroform, będący najpowszechniejszym przedstawicielem THM, do grupy związków 2B. Do tej grupy zalicza się daną substancję wówczas, jeśli potwierdzono kancerogenność czynnika w stosunku do zwierząt oraz istnieją niewystarczające dowody występowania nowotworów wywołanych tym czynnikiem u człowieka. Wraz z poznaniem niebezpieczeństw, jakie stanowi zawartość w wodzie trihalometanów, WHO w swoich wytycznych dot. jakości wody do spożycia rekomenduje dopuszczalne wartości dla poszczególnych związków osobno przy jednoczesnym spełnieniu poniższej formuły odnoszącej się do całkowitej zawartości THM w wodzie do picia:

$$\frac{C_{\text{bromoformu}}}{G_{\text{bromoformu}}} + \frac{C_{\text{dibromochlorometanu}}}{G_{\text{dibromochlorometanu}}} + \frac{C_{\text{bromodichlorometanu}}}{G_{\text{bromodichlorometanu}}} + \frac{C_{\text{chloroformu}}}{G_{\text{chloroformu}}} \leq 1$$

gdzie:

C – stężenie danego związku w wodzie do picia [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$],

G – zalecana dopuszczalna dawka związku określona w wytycznych WHO [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$].

Przeprowadzone analizy oceny niezawodności funkcjonowania SUW odniesione do zmian stężenia chloroformu w podsystemie dystrybucji wody wykazały, że chloroform może być jednym z istotniejszych parametrów określających zmiany jakości wody w czasie jej transportu siecią wodociągową od producenta do konsumenta, tym samym wielkością pozwalającą szacować poziom ryzyka producenta.

We wrocławskim Podsystemie Dystrybucji Wody odnotowano w latach 2002-2006 prowadzonej analizy jedynie incydentalne przekroczenia stężenia chloroformu w wodzie, przypadające na letnie miesiące eksploatacji, szczególnie sierpień. Częstość tych zdarzeń i ich skutki stanowią zjawiska kontrolowane przez producenta wody.

Przedstawione metodyki i procedury oceny ryzyka zmian jakości wody w sieci wodociągowej mogą być aplikowane do analizy innych parametrów determinujących jakość dostarczanej konsumentowi wody.

Dudziak [2010] opisał w swojej publikacji usuwanie ksenoestrogenów w procesach uzdatniania wody. W ostatniej dekadzie znacznie wzrosło zainteresowanie tymi substancjami, czyli związkami obcego pochodzenia wykazującymi właściwości estrogenów. Ksenoestrogeny to grupa związków chemicznych, które łącząc się z receptorami estrogenowymi, naśladują działanie naturalnych hormonów płciowych, a tym samym mogą szkodliwie oddziaływać na zdrowie człowieka. Należą do nich substancje znajdujące zastosowanie w przemyśle, rolnictwie i gospodarstwie domowym. Do ksenoestrogenów należą m.in. bifenyle, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, fenole i bisfenol A, organicznie chlorowane pestycydy, fitoestrogeny, mykoestrogeny i inne. Efektywność usuwania bisfenolu A i nonylofenolu w klasycznej oczyszczalni ścieków opartej na metodzie osadu czynnego nie przekracza odpowiednio 75% i 90%. Powoduje to, że odpływ z oczyszczalni ścieków i ścieki

nieoczyszczone wymieniane są jako główne źródła ksenoestrogenów w wodach powierzchniowych. Ksenoestrogeny w wodach występują w bardzo szerokich granicach stężeń. Obecność ksenoestrogenów w wodach z uwagi na ich aktywność estrogeniczną stwarza konieczność badań nad ich usuwaniem w procesach uzdatniania wody.

Efektywność usuwania ksenoestrogenów na przykładzie bisfenolu A i nonylofenolu w klasycznej SUW powierzchniowej, wykorzystującej procesy koagulacji i klarowania wody, filtracji i dezynfekcji, nie przekracza odpowiednio 76% i 73%. Określono również, że znaczny ładunek ksenoestrogenów zakumulowany jest w osadach powstających w trakcie uzdatniania wody. Skuteczność eliminacji związków z grupy ksenoestrogenów z wody uzależniona jest od rodzaju procesu i jego realizacji i od układu uzdatniania wody.

Stwierdzono, że:

- procesy koagulacji, flokulacji i sedymentacji umożliwiają najmniejsze usunięcie omawianych ksenoestrogenów (0,1–7%),
- sorpcja z użyciem pylistego węgla organicznego (PWA) usuwa badane związki w stopniu nieprzekraczającym 39%, a efektywność procesu uzależniona jest od dawki PWA w wodzie,
- kompletne usunięcie ksenoestrogenów możliwe jest do osiągnięcia przy wykorzystaniu granulowanego węgla aktywnego (GWA) w kolumnie sorpcyjnej.

Metody zaawansowane, tj. chemiczne utlenianie i procesy membranowe, stanowią wyraźną alternatywę w usuwaniu ksenoestrogenów w porównaniu z metodami tradycyjnymi.

Badania wykazały, że:

- nonylofenol był całkowicie usuwany z wody przy dawce chloru 6 mg/dm³ (czas kontaktu – 1 h) i przy dawce ozonu wynoszącej 4 mg/dm³ (czas kontaktu – 7 min), co potwierdza wyższą efektywność procesu ozonowania wody,
- w procesach membranowych możliwe jest usunięcie ksenoestrogenów przekraczające 85% z użyciem metody odwróconej osmozy i >66% w przypadku nanofiltracji,
- zastosowanie nanofiltracji po procesie fotokatalizy homogenicznej umożliwia usunięcie bisfenolu A w stopniu przekraczającym 95%.

Sposób zagospodarowania osadów powstających w wyniku uzdatniania wody zanieczyszczonej ksenoestrogenami z uwagi na duży ładunek zaadsorbowanych zanieczyszczeń i możliwość powstawania ubocznych produktów w procesach chemicznego utleniania stanowią zagadnienia, które powinny być rozpatrzone we współczesnej praktyce uzdatniania wody.

Rożej i Aftyka [2013] przeprowadzili badania na terenie miasta Lublina zasilanego w wodę podziemną z pokładów skał węglanowych okresu kredowego. Dotyczyły one zmian liczebności bakterii w budynkach w zależności od czasu zastoju wody wewnętrznej instalacji wodociągowej oraz objętości pobranej wody. Próbkę wody do analizy pobierane były z trzech różnych punktów czerpalnych o różnej charakterystyce rozbiórki wody. W każdym z punktów

pobierano trzy próbki wody: bezpośrednio po odkręceniu zaworu czerpalnego, po upuszczeniu 3 litrów oraz po upuszczeniu 10 litrów. Czas zatrzymania wody w instalacji wynosił 18 godzin oraz 4 doby. W badaniach wykorzystano metody: płytkową Kocha oraz pomiaru stężenia całkowitego ATP (najniższe stężenie ATP – 0,22 pg/ml, najwyższe 1,96 pg/ml). We wszystkich przebadanych punktach poboru wody wykryto bardzo wysokie stężenie bakterii heterotroficznych w wodzie w końcówkach instalacji. Najlepszą jakość wody stwierdzono w pomieszczeniu charakteryzującym się regularnym poborem wody. W pozostałych, nawet po upuszczeniu 10 litrów, utrzymywały się w wodzie wysokie stężenia bakterii mimo obecności znacznych stężeń dezynfektanta – od 0,46 do 0,5 mg/l (pH 7,2, twardość 380,0 mg CaCO₃/l). Wyniki te wskazują na obecność błony biologicznej jako źródła zanieczyszczenia mikrobiologicznego.

Tomaszewski i in. [2011] w swojej publikacji stwierdzają konieczność opracowania krajowego systemu umożliwiającego tworzenie i rozwój baz danych niezbędnych do przeprowadzania ocen i prognoz z zakresu jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego wody. Spełnienie tego rodzaju zamierzeń będzie wymagać pozyskania środków finansowych. Rozwiązaniem tego problemu może być partnerstwo publiczno-prywatne w kooperacyjnym projekcie Klaster-Narodowy Instytut Wody, w programie Innowacyjna Gospodarka. W porozumieniu kooperacyjnym pod nazwą Narodowy Instytut Wody uczestniczyłyby instytucje reprezentujące niezbędny zakres kompetencji merytorycznych i grupę producentów wody. W chwili obecnej Główny Inspektorat Sanitarny jest w trakcie prowadzenia rozmów uzgodnieniowych z Politechniką Warszawską, Politechniką Śląską, Izbą Gospodarczą „Wodociągi Polskie”, Wojskowym Instytutem Medycznym w Gdyni, dużymi przedsiębiorstwami wodociągowo-kanalizacyjnymi i Instytutem Medycyny Wsi w Lublinie. Początkowym etapem finalnych działań na rzecz utworzenia klastra będzie możliwość nowoczesnego zarządzania pozyskiwanymi z monitorowania jakości wody, obecnie rozproszonymi danymi w celu ich integracji do sprawozdań, analiz i raportów, a następnie przetwarzanie i wykorzystanie danych historycznych do ocen i prognoz z jednoczesnym uwzględnieniem szacowania ryzyka.

Badania i ocena niezawodności systemu dystrybucji wody jest zdaniem **Zimoch [2009]** zagadnieniem złożonym i trudnym oraz wymagającym rozważenia szerokiego zakresu zdarzeń jego eksploatacji. Wynika to przede wszystkim z wielofunkcyjności tego systemu. W artykule – na podstawie doświadczeń eksploatacyjnych dziewięciu brygad remontowych – przeprowadzono analizę wpływu różnorodnych czynników na wielkość czasu trwania odnowy sieci wodociągowej. Efektem tej analizy jest podjęcie próby ustalenia szacunkowych zakresów zmian wymaganego czasu przeprowadzonych czynności procedury usuwania awarii w funkcji wielkości średnicy przewodu wodociągowego.

Wpływ parametrów technologicznych na przebieg koagulacji i flotacji ciśnieniowej opisali **Kłos i in. [2010]**. Proces koagulacji jest podstawą praktycznie wszystkich systemów uzdatniania wód powierzchniowych. O efektywności działania tego procesu decyduje nie tylko

przebieg flokulacji, lecz także skuteczność separacji zawiesiny pokoagulacyjnej. W Polsce najczęściej spotykanym rozwiązaniem jest sedymentacja wraz z filtracją pospieszną. Jest to stosunkowo tani w eksploatacji i efektywny technologicznie sposób usuwania zawiesiny pokoagulacyjnej, pod warunkiem że gęstość powstających w czasie flokulacji agregatów jest znacząco wyższa od gęstości wody, co występuje, jeśli chodzi o wody o podwyższonej mętności. W przypadku, gdy uzdatnia się wody o niskiej mętności, ale z wysoką zawartością materii organicznej, bardzo często obserwuje się problemy z oddzielaniem wytworzonych w komorach flokulacji kłaczków. Spowodowane jest to małą różnicą gęstości tych agregatów i wody oraz ich tendencją do samoistnej flotacji. W artykule przedstawiono wyniki badań uzyskanych na etapie rozruchu technologicznego pierwszej w Polsce instalacji koagulacji i flotacji ciśnieniowej zastosowanej do uzdatniania wody do celów spożycia przez ludzi. System ten stanowi pierwszy stopień koagulacji ciągu technologicznego w Zakładzie Wodociągu Północnego w Wieliszewie, pracującego przy wykorzystaniu bardzo trudnej wody ujmowanej z Zalewu Zegrzyńskiego.

Ramm [2019] określa mikrozanieczyszczenia jako substancje biologicznie czynne, których obecność staje się coraz poważniejszym problemem. Do mikrozanieczyszczeń **Ramm [2019]** zalicza: farmaceutyki, pestycydy, biocydy, substancje perfluoroalkilowe (PFAS), cząstki mikroplastiku z tekstyliów, opon itp. Wpływ tych zanieczyszczeń w Polsce na stosowane technologie uzdatniania wody nie jest rozpoznany, natomiast w Unii Europejskiej wydano wiele dyrektyw i rozporządzeń, które przytacza **Ramm [2019]**. **Nocoń i in. [2018]** stwierdzają, że w Polsce problem zawartości mikroplastiku bardzo drobnej frakcji o rozmiarach 5-20 μm nie jest praktycznie rozpoznany. Szacuje się, że może on występować w ponad 90% wód butelkowanych oraz powyżej 72% próbek wód wodociągowych. Źródłem obecności ww. mikroplastiku w instalacjach wodociągowych są m.in. stosowane elementy wykonane z tworzyw sztucznych. Szczegółowe badania tego procesu i jego oddziaływania na zdrowie człowieka nie były dotychczas przeprowadzane.

Słuszne jest twierdzenie przytaczane przez **Traczewską, Sitarską, Biedroń [2014]**, że sieć wodociągową należy rozpatrywać jako reaktor, w którym zachodzą liczne procesy fizyczne, chemiczne i biochemiczne, mające istotny wpływ na parametry przesyłanej wody i są następstwem ilości oraz jakości wprowadzonej wody – **Traczewska, Sitarska, Biedroń [2014]**. A przecież to stwierdzenie odnosi się również do naturalnych „bioreaktorów” („reaktorów”), którymi są akweny wód powierzchniowych i morskich oraz warstwy wodonośne. Te naturalne reaktory od wielu lat w wyniku rozwoju cywilizacji ulegają antropopresji. W rezultacie następuje wzrost zanieczyszczenia wód, co z kolei powoduje nasilenie chorób nowotworowych, układu oddechowego, układu krążenia, cukrzycy, alergii – **Grabińska-Loniewska i Siński [2010]**. Potwierdzenie tego stanu można znaleźć w ogłoszeniu Organizacji Narodów Zjednoczonych w 2003 r., że ponad 80% współczesnych chorób ma bezpośredni związek z jakością wody pitnej – **Smyła [2005]**.

Z analizy publikacji **Adamskiego [2014]** wynika, że znaczna liczba stacji uzdatniania wód podziemnych, bo aż 50%, nie stosuje dezynfekcji końcowej, a ok. 6% ujęć tych wód jest dostarczana do systemu dystrybucji bez żadnego uzdatniania. Dla tych przypadków można przyjąć, że wody te wykazują naturalną stabilność chemiczną i biologiczną.

Grupa naukowców z Szwedzkiego Uniwersytetu w Lund podjęła wiele prac badawczych, z których wynika, że istnieją potencjalne warunki do naturalnej stabilizacji wody w systemach wodociągowych – **Lührig i in. [2015]; Schleich i in. [2019]; Chan i in. [2019]**.

Schmidtt [2012] sformułował tezę: *Technologie zbliżone do procesów naturalnych minimalizują konieczność stosowania środków technicznych wpływających na jakość wody. Są one oparte na samooczyszczaniu się wody pod wpływem siły natury. Pozyskiwanie wody do spożycia przy zastosowaniu technologii zbliżonych do procesów naturalnych pozwala oszczędzić energię i istniejące zasoby, a tym samym pozytywnie wpływa na klimat i środowisko.*

Celowe jest zatem prowadzenie badań w kierunku wdrożenia nowych technologii ograniczających utratę stabilności biologicznej i chemicznej wody w systemach wodociągowych.

Niewątpliwie rozwój wiedzy w ostatnich kilkudziesięciu latach wskazał na wiele czynników mających istotny wpływ na jakość wody wodociągowej. Do najważniejszych należy zaliczyć:

- ujemny wpływ dezynfekcji wody chlorem – **Adamski [2014], Zimoch [2008], Nawrocki [2006], Grabińska-Loniewska i Siński [2010]**. Konieczne jest prowadzenie badań dla oceny wpływu na zdrowie konsumentów procesu dezynfekcji wody. Udokumentowano wiele przykładów eksploatacji stacji uzdatniania wody (SUW) z ujęć wody głębinowej, wyposażonych w tradycyjny zespół urządzeń technologicznych, tj. napowietrzanie, filtracja, transport rurociągami do odbiorców, gdzie nie stosuje się żadnych środków dezynfekcyjnych – **Adamski [2014], Wowk [1978, 2004, 2012]**. Sporządzono również opisy tego rodzaju ujęć, gdzie woda bez ww. urządzeń technologicznych i bez stosowania środków dezynfekcyjnych jest tłoczona bezpośrednio rurociągami do odbiorców – **Adamski [2014]**;
- poszerzające się oddziaływanie farmaceutyków na jakość wody – **Fent i in. [2006], Łebkowska, Załęska-Radziwił i Affek [2012], Jorgensen i Helling-Sørensen [2000], Nikolaou i in. [2007]**;
- oddziaływanie materiałów użytych do budowy sieci wodociągowej i instalacji wodociągowych na jakość wody oraz powstawanie biofilmów – **Grabińska-Loniewska i Siński [2010], Sitarska [2010], Traczewska, Sitarska, Biedroń [2014], Biedroń [2013], Szczotko i in. [2011], Pelleïeux i in. [2012], Zibuschka [1996], Kowalska i Kowalski [2011], Rożej i Aftyka [2013], Nawrocki [2010], Adamski [2014], Nocoń i in. [2018], Ramm [2019]**;
- powstawanie nowych zagrożeń związanych z wykorzystywaniem nienaturalnych substancji stosowanych w różnych działach gospodarki, np. mikroplastiku [**Niecoń i in. 2018**] czy specyficznych związków chemicznych – **Ramm [2019]**;

- niezbędny jest postęp w ochronie ekosystemów wodnych przed ich zanieczyszczeniem ze względu na bardzo małe dyspozycyjne zasoby wody w Polsce oraz postępujące zmiany klimatyczne. Na te aspekty zwróciło uwagę wielu autorów, m.in. **Nachlik [2012]**, **Eymontt i Wierzbicki [2019]**, **Kida i in. [2017]**, **Withey i in. [2004]**, **Woźnica i in. [2011]**, **Łebkowska i in. [2012]**, **Mulik i in. [2015]**, **Michałkiewicz [2013, 2016, 2018, 2019]**, **Rak i Boryczko [2013]**, **Schmitt [2012]**. Bez podjęcia tego typu działań naprawczych zagrożone jest działanie wielu stacji wodociągowych w Polsce. Bezpośrednim efektem braku podjęcia działań w ochronie zasobów wodnych będzie wzrost cen wody dostarczonej do odbiorców.

2.3. Bezpieczeństwo mikrobiologiczne podczas eksploatacji wodociągów

Problemy bezpieczeństwa związanego z dostarczaniem dobrej jakości wody stały się w ostatnich latach tematem licznych publikacji.

Mulik i in. [2015] stwierdzają, że bezpieczeństwo zdrowotne wody przeznaczonej do spożycia związane jest z ryzykiem zarówno przenoszenia chorób wynikających z zanieczyszczeń mikrobiologicznych, jak i powstawania chorób związanych z wieloletnim spożywaniem wody zanieczyszczonej substancjami chemicznymi.

W Polsce, jak w wielu innych krajach, brak jest jednolitego systemu rozpoznawania i rejestracji chorób spowodowanych spożywaniem wody o nieodpowiedniej jakości. Dlatego też zaprezentowano przykłady zagrożeń z trzech źródeł najbardziej kompleksowego zbioru danych tworzonego w ramach amerykańskiego systemu gromadzenia danych statystycznych chorób wodopochodnych. Dane te utwierdzają o słuszności prowadzenia tego typu statystyki.

Analiza wszelkich dostępnych danych dotyczących epidemii oraz ocena potencjalnych zagrożeń zdrowotnych mogą prowadzić do większego zrozumienia epidemiologicznych i środowiskowych czynników przyczyniających się do chorób przenoszonych drogą wodną. Wobec powyższego należy stworzyć właściwie funkcjonujące prawodawstwo, bezwzględnie spełniać wymagania w projektowaniu, wykonawstwie i eksploatacji systemów zaopatrzenia w wodę, jak również systemów jakości i zarządzania oraz nadzoru. Spełnienie powyżej wymienionych postulatów może w istotny sposób zminimalizować zagrożenia oraz korzystnie wpłynąć na bezpieczeństwo dostawy wody dobrej jakości, a tym samym zdrowie publiczne.

Michałkiewicz [2018] przestrzega przed postępującym wzrostem zanieczyszczenia środowiska na całym świecie, a w konsekwencji pogarszającą się jakością wód przeznaczonych do spożycia. Ta jakość wpływa bezpośrednio na stan zdrowia społeczeństwa. Miernikiem mogą być:

- śmiertelność wśród niemowląt na 1000 urodzeń żywych,
- procent ludności mającej dostęp do wody pitnej i kanalizacji,
- liczba lekarzy przypadająca na 10 tysięcy mieszkańców,
- średnia długość życia ludności.

Według **Michałkiewicza [2018]** Polska w odniesieniu do 8 państw na świecie jest w średniej sytuacji, jeżeli rozpatrujemy jakość wody, gorsza jest w Bułgarii, Rosji, Indiach, RPA i Meksyku. Po omówieniu wielu zagrożeń zanieczyszczenia wody w Polsce Michałkiewicz (powtórnie 2013) przytacza fakt powstania w USA Agencji ds. Rejestracji Substancji Toksycznych i Chorób (ATSOR), która opracowała 250 charakterystyk obecnych w środowisku najgroźniejszych substancji zagrażających zdrowiu i życiu człowieka. Dzięki tego typu rejestrowi lekarzom łatwiej jest szukać przyczyn licznych chorób, szczególnie tych, które związane są z wodą.

Kończąc swoją diagnozę skażenia wody **Michałkiewicz [2018]**, w podobny sposób jak wielu Autorów, proponuje „aby woda dostarczona do odbiorców była naprawdę dobrej jakości, należy dbać o jakość wód powierzchniowych i podziemnych, stosować bezpieczne, skuteczne i nowoczesne metody uzdatniania i dezynfekcji, dokładnie monitorować jakość wyprodukowanej wody (np. stosując testy, biotesty, biomonitoring), a także przewidywać i prawidłowo reagować na stwierdzoną sytuację nadzwyczajną, która może pojawić się w każdym przedsiębiorstwie wodociągowym”.

Michałkiewicz [2019] przestrzega przed wyeliminowaniem w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z 13 listopada 2015 r. (w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi) potrzeby przeprowadzenia badań w szerokim zakresie obecności w wodzie bakterii psychrofilnych oraz mezofilnych.

Wprowadzie w załączniku C do kolejnego rozporządzenia ministra zdrowia w tej samej materii, „mikrobiologiczne parametry wskaźnikowe, jakim powinna odpowiadać woda” – zaleca się, żeby ogólna liczba tych mikroorganizmów nie przekraczała 100 lub 200 jtk/ml w zależności, czy jest to woda wprowadzana do sieci, czy w kranie konsumenta. Wśród ww. bakterii mezofilnych mogą znajdować się gatunki chorobotwórcze i patogeny oportunistyczne.

Według badań WHO epidemie wodnopochoodne pojawiają się na świecie co kilka lat, a pominięcie badań ogólnej liczby bakterii mezofilnych może być przyczyną epidemii.

Michałkiewicz [2016] w celu sprawdzenia powszechnego poglądu, że wody źródlane nie są zanieczyszczone pod względem bakteriologicznym, przeprowadził tego rodzaju badania na terenie Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej, łącznie pobierając próbki wody z 25 źródeł. Przeprowadzona analiza bakteriologiczna wody nie wskazała żadnej prawidłowości pod kątem typu źródła, natomiast woda ze źródła o małej czy też dużej wydajności nie nadaje się do picia. Stwierdzono bowiem stałe lub okresowo występujące skażenie wody spowodowane ściekami fekalnymi.

Rak [2014] stwierdza na podstawie literatury, że stan bezpieczeństwa systemu zaopatrzenia w wodę (SZW) związany jest z komfortem konsumenta. Kierunek rozwoju teorii bezpieczeństwa w Stanach Zjednoczonych, Wielkiej Brytanii, we Francji, a także w Polsce skupia się na rozwiązaniu sprzeczności między komplikacją struktury systemów technicznych a potrzebą ich bezpiecznego i niezawodnego funkcjonowania. Rozwiązanie tej sprzeczności decyduje o bezpieczeństwie zaopatrzenia w wodę do spożycia. Analizy istniejących systemów

bezpieczeństwa (SZW) wskazują na ich zróżnicowanie w zależności od wielkości produkcji wody. Poszukiwanie nowych rozwiązań dla poprawy skuteczności zarządzania bezpieczeństwem wskazuje na duże możliwości wynikające z działań integracyjnych poszczególnych podsystemów tworzących SZW. Zadania w tym względzie powinny skupić się na kilku priorytetowych obszarach, takich jak:

- działania instytucjonalno-prawne, ze szczególnym uwzględnieniem zintegrowania systemów bezpieczeństwa, np. w danej zlewni rzeki,
- wypracowanie metod analizy i oceny ryzyka w SZW – definicje, modele predykcji ryzyka, identyfikacja podstawowych scenariuszy awaryjnych,
- stworzenie systemowego reagowania na zagrożenia (monitoring on-line, metody usuwania skażeń, formułowanie rekomendacji po poważnych awariach).

W dalszej treści autorzy opisują poszczególne działania, a są to:

- klaster wodny – terytorium czystej wody,
- kierunki badań nad bezpieczeństwem.

Ponadto wskazuje się na mechanizmy powstawania zdarzeń niepożądanych, a w tym:

- koincydencja niezależnych czynników,
- niewłaściwe współdziałanie obiektów,
- przemieszczenie zagrożenia,
- strategia konfliktu,
- emergencja destruktywnych cech,
- mapy ryzyka,
- wybrane zagadnienia z eksploatacji,
- metoda oceny ryzyka SZW,
- pojęcie kanibalizmu technicznego (tj. odzysk elementów nadających się do ponownego wykorzystania).

W artykule dotyczącym również bezpieczeństwa SZW **Rak i Studziński [2011]** wiążą ryzyko eksploatacji sieci wodociągowej z wartością majątku trwałego przedsiębiorstwa wynoszącą od 50% do 80%. Zakładając, że okres amortyzacji przewodów wodociągowych wynosi od 50 do 125 lat, należy przyjmować strategię odbudowy stanu tych przewodów od 0,8% do 2,0% rocznie.

Następnie autorzy podają definicję według normy PN-EN805, definicje niezawodnościowe, oraz omawiają czynniki określające celowość odnowy sieci wodociągowej, składowe koszty usuwania awarii, czynniki ryzyka, wskaźnik korozji, wskaźnik błędu – Wb (chodzi o popełniane błędy ludzkie przy projektowaniu, budowie i eksploatacji), wskaźnik diagnostyki eksploatacyjnej – Wd, zakres przeglądów okresowych, formy zarządzania bezpieczeństwem rurociągów, wyniki ankiety w zakresie możliwości zarządzania ryzykiem. W podsumowaniu autorzy stwierdzają, że przedsiębiorstwo wodociągowe powinno opracować procedury PZA w ramach WSP. Stosowne zapisy powinny być możliwe do zidentyfikowania

i przechowywania, tak aby były dostępne dla upoważnionych osób. Procedury powinny być katalogowane, datowane, zbierane i archiwizowane oraz powinny mieć tytuł lub notę tematyczną.

Również publikacja **Raka [2013]** jest ściśle związana z dotychczas omawianą problematyką bezpieczeństwa. Podaje on krótką charakterystykę zagrożeń, a następnie, wybrane definicje, szacowanie jakościowe ryzyka, oszacowanie prawdopodobieństwa z wykorzystaniem czasu do wystąpienia zdarzenia niepożądanego, wartościowanie ryzyka, politykę bezpieczeństwa informacji. Treść omawianego artykułu poparta jest przekładem wyliczenia prawdopodobieństwa zdarzeń i podaniem odchyłeń standardowych. W podsumowaniu autor podkreśla, że słabą stroną polskich badań jest brak skutecznej koordynacji realizowanych przedsięwzięć w odniesieniu do prac pilotażowych. Wypracowane w ośrodkach naukowych algorytmy postępowania w sytuacjach kryzysowych nie znajdują należytego zrozumienia w przedsiębiorstwach wodociągowych.

Być może pesymistyczne podsumowanie **Raka [2013]** związane jest w sposób logiczny z artykułem **Tchórzewskiej-Cieślak [2013]**, w którym autorka analizuje akceptację kosztów redukcji ryzyka awarii systemów zbiorowego zaopatrzenia w wodę. Prowadzone badania ankietowe wśród konsumentów wody wskazują na tolerowanie podnoszenia kosztów dostawy wody w związku z wykonaną modernizacją oraz remontami systemu wodociągowego w celu zmniejszenia ryzyka awarii. Z treści tego artykułu wynika, że brak akceptacji przez przedsiębiorstwa wodociągowe metod oceny ryzyka nie wynika z braku możliwości finansowania tego typu przedsięwzięć.

Podniesienie kosztu sprzedaży wody wiąże się najczęściej ze zmniejszeniem jej zapotrzebowania, co pogarsza wynik ekonomiczny przedsiębiorstwa, a ponadto skutkuje negatywnie przy wyborach samorządowych w gminie. Zatem kumulują się tu dwa czynniki: ekonomiczny i polityczny.

Nieco inne aspekty bezpieczeństwa prezentowali w swojej publikacji **Tchórzewska-Cieślak i Rak [2007]**, a chodzi tu o bezpieczeństwo informatyczne firmy wodociągowej. Zarządzanie ryzykiem informatycznym związanym z bezpieczeństwem informacji uregulowane jest normą ISO/IEC 27005. W 2006 r. Komisja Wspólnot Europejskich złożyła projekt Dyrektywy Rady, gdzie do infrastruktury krytycznej zaliczono m.in. systemy zaopatrzenia w wodę do spożycia, kontrolę jakości wody, monitorowanie i ilościową kontrolę zasobów wodnych. Ta infrastruktura krytyczna jest pod specjalną ochroną. Operator infrastruktury krytycznej ma obowiązek sporządzić program bezpieczeństwa zawierający szereg punktów. Jednocześnie wprowadzono pojęcie bezpieczeństwa informatycznego obejmujące informację przetwarzaną, przechowywaną i przesyłaną za pomocą systemów informatycznych, chronioną przed przypadkowym lub świadomym (niepożądanym) ujawnieniem, modyfikacją, zniszczeniem lub uniemożliwieniem jej przetwarzania. Autorzy stwierdzają w podsumowaniu, że nie ma dzisiaj systemu technicznego, dla którego bezpieczeństwo nie miałoby kluczowego znaczenia. Systemy informatyczne należą do infrastruktury krytycznej, w związku z tym powinny podlegać szczególnej ochronie pod

względem bezpieczeństwa funkcjonowania. Praca ta wskazuje na konieczność zachowania specjalnej troski w publikowaniu informacji dotyczących nowych technologii. W pewnym sensie podjęta ochrona prawna zapowiada założenie, być może, cenzury na publikacje techniczne, które często zawierają wiele danych mogących posłużyć do ich wykorzystania w różnych celach np. handlowych, terrorystycznych itp.

Aspekty bezpieczeństwa omówione są w kolejnej publikacji autorstwa, **Wichrowskiej i in. [2012]**. Nowoczesny system zarządzania bezpieczeństwem zdrowotnym wody powinien opierać się na dwóch podstawowych zasadach: na indywidualnym podejściu do każdego systemu zaopatrzenia w wodę, jego ocenie, znalezieniu punktów krytycznych i oszacowaniu ryzyka oraz na ścisłym przestrzeganiu zasady trzech barier minimalizujących ryzyko i gwarantujących, że woda dostarczona konsumentowi będzie najwyższej jakości przez:

- spójną ochronę zasobów i ujęć wody,
- właściwe projektowanie, budowanie i eksploatację systemu zaopatrzenia w wodę,
- profesjonalne zaplanowanie, montaż przez wykwalifikowanych hydraulików i właściwą eksploatację instalacji wewnętrznych zgodnie ze standardami technicznymi.

Wielokrotne bariery między ujęciem wody a odbiorcą – konsumentem oraz kilkustopniowy system kontroli zmniejszają ryzyko zagrożeń zdrowotnych w większym stopniu niż system, którego podstawą jest wyłącznie kontrola jakości produktu końcowego.

W omawianej publikacji zebrano i omówiono szereg regulacji prawnych związanych z dystrybucją wody, a także instalacjami wewnątrz budynku. W tym zakresie umieszczono tabelę informującą o zarządzaniu problemami i nagłymi wypadkami na podstawie prezentacji pracy pt. „Bezpieczeństwo wody w budynkach użyteczności publicznej”.

Problem identyfikacji zagrożeń dla bezpieczeństwa zdrowotnego wody podczas zdarzeń wyjątkowych został opisany przez **Pisteloka i in. [2012]**. Autorzy proponują zastosowanie pomiarów ATP do oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego wody oraz oceny rozwoju biomasy drobnoustrojów w sieciach wodociągowych, instalacjach budynków, studniach i zbiornikach retencyjnych. W pomiarach ATP oznacza się adenozynotrójfosforan; jest to substancja stanowiąca składnik każdej żywej komórki. Składnik ten, występujący w wodzie, można podzielić na cATP (adenozynotrójfosforan wewnątrzkomórkowy) oraz dATP (adenozynotrójfosforan rozpuszczony, pochodzący głównie z obumarłych komórek bakteryjnych). Oznaczenia wykonywane są metodą bioluminescencji, która polega na wykrywaniu fotonów światła wytwarzanego podczas enzymatycznej reakcji przekształcania ATP w AMP (adenozynomonofosforan w obecności kompleksu lucyferyna-lucyferaza, tj. enzymów wytwarzanych przez świetlika świętojańskiego czy bakterie luminescencyjne).

Do głównych zalet oznaczenia obecności ATP w wodzie należy zaliczyć łatwość wykonania testu, możliwość uzyskania wyników w ciągu kilku minut po pobraniu próbki oraz możliwość przedstawienia aktualnego stanu zanieczyszczenia wody w sieci wodociągowej w układzie przestrzennym, np. w postaci mapy sieci, a wyniki są porównywalne i uzyskiwane w krótkim czasie. Pozwala to na ogólną, sumaryczną ocenę zagrożenia mikrobiologicznego związanego z wodą do spożycia. Metoda ta może być z powodzeniem wykorzystywana do prac

związanych z optymalizacją działania stacji uzdatniania wody, szczególnie w przypadku uzdatniania wód podziemnych. Uzyskane wyniki mogą być podstawą do podjęcia działań w zakresie stałej lub okresowej dezynfekcji wody.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że celowe jest przeanalizowanie progu cATP dla wody uznawanej za bezpieczną pod względem mikrobiologicznym. Zgodnie z sugestią producenta odczynników wartość ta wynosi 0,5 pg cATP/ml. Dopuszcza on jednak możliwość stosowania innych wartości. W przypadku prowadzenia systematycznych badań w danym punkcie można tę wartość wyznaczyć doświadczalnie. Odpowiada ona stężeniu, przy którym nie stwierdza się podwyższenia wartości pozostałych wskaźników mikrobiologicznych. W wykonanym przez autorów doświadczeniu sytuacja taka wystąpiła dla 1,0 pg cATP/ml.

Rak [2013] w swojej publikacji „Przegląd alternatywnych metod oczyszczania wody w sytuacjach kryzysowych” dokonał analizy możliwych do stosowania, prostych, szybkich i skutecznych metod oczyszczania wody w sytuacjach kryzysowych. Metody te mogą być wykorzystane podczas badań instalacji doświadczalnych.

Rak i Boryczko [2013] opisali metodę oceny potencjalnych zagrożeń jakości wód podziemnych opracowaną przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (USEPA). Jednocześnie przedstawili propozycję metody oceny zagrożenia ujęć wód podziemnych, uwzględniającą 8 czynników mających decydujący wpływ na przedostanie się zanieczyszczeń z powierzchni terenu do wód podziemnych.

Prawne problemy związane z bezpieczeństwem dostawy wody zostały omówione przez **Wolborską i in. [2009]**. W sposób dość lapidarny sformułowano działanie systemu wodociągowego: „Na działanie systemu wpływają przede wszystkim elementy skrajne: pobór wody i końcowy produkt jej uzdatniania. Jeżeli zostają one obwarowane określonymi wymaganiami, pozostałe elementy systemu (m.in. transport i magazynowanie wody, technologia uzdatniania, instalacje) muszą zostać im podporządkowane”.

Podany powyżej opis istotnie zawiera najkrótszą ze znanych definicji funkcjonowania instalacji wodociągowej. Kierując się tym uproszczonym opisem, autorzy opisują wymagania prawne dla podstawowych węzłów instalacji wodociągowej.

Problematyka bezpieczeństwa dostawy wody wiąże się z zarządzaniem i jej dystrybucją. Tę problematykę omówili **Kwietniewski i in. [2012]**, opisując kolejno:

- potrzeby racjonalnego zarządzania jakością wody w systemach dystrybucji,
- czynniki istotnie wpływające na jakość wody w sieciach wodociągowych,
- elementy dotychczasowego podejścia do zarządzania jakością wody w systemach dystrybucji,
- istota zarządzania jakością wody w systemach dystrybucji.

W podsumowaniu autorzy stwierdzają, że zarządzanie jakością wody to proces ciągły. Wszystkie jego elementy podlegają ewolucji, związanej z rozwojem systemów wodociągowych, ze zmieniającymi się warunkami poboru i dostawy wody oraz z pracą samych systemów dystrybucyjnych. Jednakże punktem wyjścia i podstawą metodologii zarządzania jakością wody w sieciach wodociągowych jest właściwie zaplanowany i wdrożony system

monitoringu sieci. Warto zwrócić uwagę na fakt, ciągły monitoring i dokonywana na jego podstawie ocena jakości wody w sieci wodociągowej umożliwiają zarówno określenie jej rejonów podwyższonego ryzyka, jej pogorszenia, jak i przewidywania miejsc tego pogorszenia. Powinno to skutkować wprowadzeniem jeszcze jednego elementu systemu zarządzania, a mianowicie rozmieszczenia baz przedsiębiorstwa. Właściwa ich lokalizacja i wyposażenie pozwalają na skrócenie czasu związanego z wymaganą poprawą jakości wody, jak również prowadzą do obniżenia kosztów eksploatacji całego systemu.

Ważnym narzędziem niezbędnym do zarządzania jakością wody w sieciach wodociągowych jest system modelowania sieci wodociągowych współpracujący z monitoringiem i komputerową bazą danych typu GIS. Ten trójelementowy system doskonale wspomaga rozwiązywanie wszystkich problemów cząstkowych w procesie zarządzania jakością wody w sieciach. Główną zaletą tego systemu jest możliwość transferu danych opisujących strukturę sieci (danych przestrzennych i atrybutów opisowych) z bazy GIS oraz rozbiórów wody ze specjalnie w tym celu opracowanego i oprogramowanego algorytmu. Ponadto algorytm określania zbiorów wody opiera się na zbiorach najprostszych danych źródłowych, łatwo dostępnych w przedsiębiorstwie, jakimi są odczyty z wodomierzy zainstalowanych u poszczególnych odbiorców. Transfer danych z GIS i innych aplikacji informatycznych do modelu sieci powinien zapewnić możliwość systematycznej aktualizacji modelu, co jest niezbędne w bieżącym zarządzaniu jakością w sieciach wodociągowych.

W sposób najbardziej kompleksowy do problemów zagrożeń i ryzyka w łańcuchu wodociągowym podeszli **Rak i Tchórzewska-Cieślak [2013]** w swojej publikacji. W sposób metodycznie uporządkowany przedstawili:

- definicje terminów stosowanych w procesie analizy zagrożeń i oceny ryzyka,
- metodykę ochrony odbiorców wody przed zanieczyszczeniami incydentalnymi,
- procedury ustalania krytycznych punktów kontroli,
- matrycę jakościowo-ilościową ryzyka.

Proponowaną przez autorów procedurę oceny ryzyka i zagrożeń preferuje Europejska Federacja Krajowych Organizacji Usług Wodno-Kanalizacyjnych. Ponadto problematyka bezpieczeństwa łańcucha wodociągowego zawarta jest w materiałach organizacji międzynarodowych WHO i IWA.

Rak i Zamorska [2013] stwierdzają, że prognozowanie mikrobiologiczne (mikrobiologia prognostyczna) jest obecnie dominującym trendem w ocenie jakości zdrowotnej wody. Matematyczne modele mogą służyć do przewidywania liczby mikroorganizmów na każdym etapie procesu produkcji wody. W celu ochrony zdrowia konsumenta coraz częściej na świecie ustanawia się odpowiedni poziom ochrony (ALOP), wyrażony w liczbie zachorowań populacji rocznie. Dlatego wśród kierunków prognozowania mikrobiologicznego na plan pierwszy wysuwana jest ocena ryzyka zdrowotnego konsumenta. Do oceny tego ryzyka służą metody modelowania bezpieczeństwa mikrobiologicznego wody, a także odpowiednie modele.

W sprawie bezpieczeństwa eksploatacji wodociągów ciekawe stanowisko zajęła **Castell-Exner [2012]** w imieniu Europejskiej Federacji Krajowych Organizacji Usług Wodno-

-Kanalizacyjnych EUREAU. Organizacja ta zrzesza 10 000 przedsiębiorstw użyteczności publicznej i podmiotów gospodarczych działających w sektorze wod.-kan. z całej Europy, które zapewniają dostawę wody dla 405 milionów obywateli państw europejskich. Stanowisko to dotyczy podejścia do Planu Bezpieczeństwa Wodnego. Zostało ono zawarte w wielu punktach, do których dołączono ocenę Niemiec.

Generalnie publikacja dotyczy toczącej się dyskusji w 2011 r. na temat europejskiej Dyrektywy w sprawie wody do spożycia oraz podejścia opartego na Planie Bezpieczeństwa Wodnego WHO, którego realizacja budziła dyskusje do 2013 r.

Równie interesująca jest publikacja **Schmitta [2012]**, zawierająca memorandum IAWR (International Association of Waterworks in the Rhine Basin) w codziennej działalności firmy RheinEnergie działającej od ponad 135 lat, zaopatrującej w wodę ponad 1,4 mln klientów Kolonii. Firma ta dysponuje 9 zakładami wodociągowymi, 20 stacjami podwyższenia ciśnienia, 10 zbiornikami, 3000 km przewodów wodociągowych oraz 1900 km połączeń indywidualnych (domowych). Niezmiernie ciekawe w omawianej publikacji jest stwierdzenie: *Technologie zbliżone do procesów naturalnych minimalizują konieczność stosowania środków technicznych wpływających na jakość wody. Są one oparte na samooczyszczaniu się wody pod wpływem siły natury i pozwalają na zachowanie naturalnego charakteru wody. Jako przykład tego rodzaju działań można wymienić: odnawianie, wzbogacanie zasobów wód podziemnych, a także filtrację brzegową i piaskową. Pozyskiwanie wody do spożycia przy zastosowaniu technologii zbliżonych do procesów naturalnych pozwala oszczędzać energię i istniejące zasoby, a tym samym pozytywnie wpływa na klimat i środowisko.* Warto wspomnieć, że woda dla Kolonii pochodzi ze 191 ujęć za pomocą studni wierconych z filtrami, które pobierają wodę głównie z zasobów umiejscowionych w przypowierzchniowej pierwszej warstwie wód podziemnych występujących na głębokości do ok. 25 m. Aby zabezpieczyć te ujęcia, dodatkowo nawiązano współpracę ze 130 zakładami rolniczymi na powierzchni 10 000 ha, które optymalizują użycie nawozów i stosowane metody upraw w taki sposób, by chronić wody podziemne i jednocześnie uwzględniać oczekiwania środowisk rolniczych. Dzięki temu udało się powstrzymać wzrost zawartości azotanów w wodach podziemnych, a w niektórych rejonach nawet znacznie go obniżyć.

Wyszczególnienie licznych korzyści wynikających z Memorandum IAWR w odniesieniu do działalności spółki RheinEnergie przekonuje czytelnika o skuteczności tego rodzaju działalności.

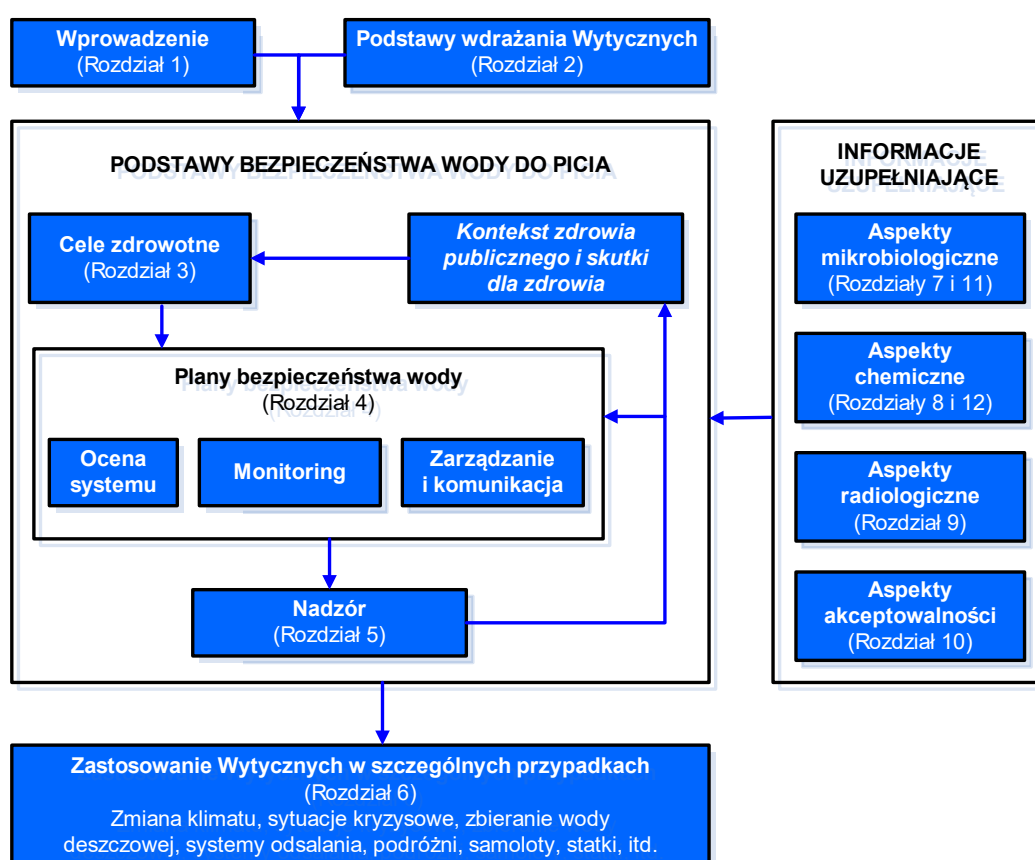
Również problem bezpieczeństwa dostawy wody jest przedmiotem publikacji **Harmelina [2012]**, opisującej sposoby zarządzania kryzysowego w przedsiębiorstwach wodociągowych Izraela. W tym przypadku oparto się na dokumentach ISO/PAS 22399 – wytycznych do operacyjnego przygotowania i zarządzania ciągłością działania organizacji w sytuacjach kryzysowych (IPOCM). Komitet Techniczny ISO/TC 224/WG7 (*Technical Committees ISO/TC 224 – Service activities relating to drinking water supply, wastewater and stormwater systems, Working Group 7*) opracowuje normy wzorowane na PAS. Istotą tej normy będzie system IPOCM dostosowany do konkretnych wymagań danego przedsiębiorstwa

wodociągowego. Skutki zarządzania kryzysowego ujawniają się w znacznym skróceniu czasu potrzebnego do przywrócenia 100% funkcjonowania wodociągu.

W zakresie problematyki bezpieczeństwa eksploatacji wodociągów fundamentalną publikację stanowi „Guidelines for Drinking-water” (wyd. 4), opublikowana przez Światową Organizację Zdrowia w 2011. Publikacja ta została przetłumaczona na język polski i wydana pod tytułem „Wytyczne dotyczące jakości wody do picia” – **Kwietniewski i in. [2014]**.

Głównym przesłaniem omawianej pracy jest zapewnienie dostępu do bezpiecznej wody do picia, co jest niezbędnym warunkiem zdrowia, a jednocześnie stanowi podstawowe prawo człowieka i element efektywnej polityki ochrony zdrowia.

Zamieszczony schemat na rys. 2.2 ilustruje podział treści ww. publikacji na poszczególne rozdziały.



Rys. 2.2. Schemat podziału treści wytycznych dotyczących jakości wody do picia
 Fig. 2.2. Division diagram of the content of guidelines for drinking water quality
 Źródło: Kwietniewski i in. [2014].

W publikacji tej szczególną uwagę zwrócono na zagrożenie dla zdrowia ludzi wywoływane przez drobnoustroje obecne w wodzie, związane z konsumpcją wody do picia zanieczyszczonej odchodami ludzkimi i zwierzęcymi, chociaż znaczące mogą być inne źródła i drogi zarażenia. Udokumentowano zatem występowanie zachorowań na skutek spożywania wody, wdychania aerozolu wodnego lub kontaktu skóry z wodą do picia.

2.4. Mechanizm powstawania biofilmów i ich znaczenie w instalacjach wodociągowych

Problematyka związana z budową i powstawaniem biofilmu stała się w ostatnich kilku latach jedną z dominujących przy omawianiu badań związanych z mikrobiologicznym zanieczyszczeniem wody i korozją mikrobiologiczną materiału. Warto podkreślić, że pojęcie biofilmu, jego powstanie i oddziaływanie na proces uzdatniania wody do picia pojawia się w analizowanej literaturze po 1994 r. W niektórych bardzo wartościowych publikacjach, np. **Kowal, Świdarska-Bróz [2005]**, problem biofilmu jest pominięty.

Jednocześnie zarówno w zrealizowanym w latach 2013-2016 projekcie badawczym „Biologiczna stabilizacja mikrobiologii wody przeznaczonej do spożycia”, jak i rozwijającej to zagadnienie niniejszej monografii, problem biofilmu ma zasadnicze znaczenie.

Gdy analizuje się publikacje z ww. zakresu problematyki, jest rzeczą nieuniknioną, że przytoczone treści różnych autorów będą zbliżone generalnym zakresem do dotychczas analizowanych.

Grabińska-Łoniewska i Siński [2010] stwierdzają, na podstawie przeprowadzonych badań, że w wodzie znajdującej się w przewodach wodociągowych mikroorganizmy występują w formie pojedynczych komórek lub konsorcjum bakterii biomasy „zawieszony” w toni. Ilość bakterii wzrasta wraz z odległością od SUW.

Na dowód ww. stwierdzenia Autorzy przytaczają wyniki badań, które wskazują, że w odległości 4,2-4,3 km od SUW nastąpił 6-7-krotny wzrost w toni wodnej heterotroficznych bakterii psychrofilnych, w tym bakterii pigmentowych oraz bakterii z rodzaju *Pseudomonas* rosnących w temperaturze 30°C. Wzrost ten zaznaczył się bardziej wyraźnie przy kontroli próbek wody pobranych z odległości 10,3 km. Inne wyniki badań, na które powołują się ww. Autorzy, wskazują, że przyrost liczby bakterii w systemie wodociągowym nastąpił w odległości od SUW odpowiadającej 30-40 godzinom zatrzymania wody w sieci, a po przekroczeniu tej odległości pozostawał niezmienny. Wraz z odległością od SUW wzrastała również bioróżnorodność gatunków bakterii.

Mykoflora w toni wodnej sieci wodociągowej składa się z gatunków będących patogenami oportunistycznymi dla człowieka i zwierząt stałocieplnych.

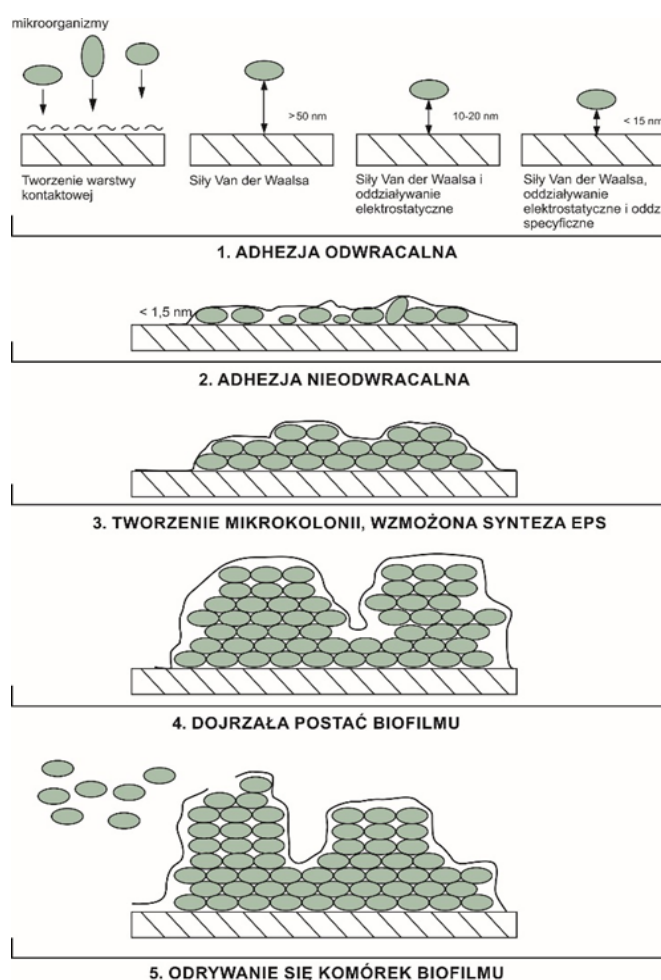
Generalnie stwierdza się, że stopień mikrobiologicznego zanieczyszczenia sieci wodociągowej określa nie tylko liczebność mikroorganizmów w wodzie wodociągowej, która jest monitorowana w rutynowych badaniach kontrolnych, lecz także niemonitorowana do tej pory ich liczba w biomasie wchodzącej w skład biofilmów i obrostów znajdujących się na wewnętrznej powierzchni przewodów wodociągowych.

Dużym skupiskiem mikroorganizmów w sieci wodociągowej jest błona biologiczna zwana biofilmem. Terminem błona biologiczna określa się błonę lipidowo-białkową otaczającą komórki i tworzącą organella w komórkach eukariotycznych. W niniejszym opracowaniu

termin ten jest używany na określenie warstwy biofilmu tworzącej się na podłożu abiotycznym. Biofilm jest głównym miejscem występowania i namnażania mikroorganizmów stanowiących zagrożenie sanitarne dla konsumentów wody.

Biofilm stanowi zespół komórek związanych nieodwracalnie (tzn. nieusuwany wraz z prądem wody) z abiotyczną lub biotyczną powierzchnią stałą, otoczoną substancjami o charakterze polimerów. Tworzy się on zarówno na wewnętrznej powierzchni przewodów wodociągowych, jak i na granicy faz, np. woda-powietrze.

W powstawaniu biofilmu wyróżnia się dwa następujące po sobie okresy: adhezję komórek bakteryjnych do powierzchni fazy stałej lub interfazy oraz ich kolonizację (rys. 2.3).



Rys. 2.3. Mechanizmy i etapy powstawania biofilmu

Fig. 2.3. Mechanisms and phases of biofilm formation

Źródło: Tomczyk i in. [2016].

Adhezję ułatwia chropowatość powierzchni przewodów oraz hydrofobowy charakter ściany komórkowej niektórych mikroorganizmów. Intensywność tego procesu zależy od oddziaływania sił elektrostatycznych i hydrofobowych, sił van der Waalsa, temperatury i ruchliwości bakterii. Kolonizacji sprzyja zlepianie komórek zewnątrzkomórkowymi substancjami polimerycznymi wytwarzanymi przez mikroorganizmy, będących hydrożelami

(95-98% wody) złożonymi z wielocukrów, białek, tłuszczów, glikolipidów i kwasów nukleinowych. Warunki środowiskowe (różny dostęp do substratów pokarmowych i tlenu) powodują, że mikroorganizmy tworzące biofilm mają zróżnicowane wymagania pokarmowe i środowiskowe.

Pierwszymi mikroorganizmami uczestniczącymi w powstawaniu biofilmu są bakterie chemoautotroficzne, których wzrost zabezpieczają niewielkie ilości związków mineralnych (bakterie utleniające żelazo i mangan – *Gallionella ferruginea*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, rodzaje *Leptotrix*, *Crenotrix*, bakterie z rodziny *Siderocapsaceae*, oraz siarkę – *Beggiatoa* sp., *Acidithiobacillus* sp.). Ich zautolizowane komórki są źródłem związków węgla, azotu i fosforu wraz z wodą dystrybuowaną siecią wodociągową. Wśród tych mikroorganizmów wykrywane są w biofilmie bakterie redukujące siarczany (*Desulfovibrio* sp.), *Clostridium perfringens*, bakterie nitryfikacyjne i denitryfikacyjne, liczne bakterie patogenne i oportunistycznie patogenne (rodzaje *Salmonella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*) oraz oportunistyczne patogenne grzyby (*Acremonium* sp., *Cladosporinium* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Soprocycbe* sp.), a także wirusy oraz pierwotniaki pasożytnicze. Duża różnorodność mikroorganizmów chorobotwórczych występujących w biofilmie spowodowana jest faktem, że większość z nich (ponad 80%) cechuje zdolność do tworzenia skupisk komórek.

Dojrzewanie i rozwój biofilmu zależą od dostępności substancji odżywczych, tlenu rozpuszczonego w wodzie, pH, temperatury, rodzaju i stężenia dezynfektora, prędkości przepływu wody, średnicy przewodu oraz materiału, z którego wykonano sieć wodociągową. Intensywność rozwoju biofilmu jest wprost proporcjonalna do stężenia substratów pokarmowych w wodzie i jej temperatury, a odwrotnie proporcjonalna do stężenia dezynfektorów, prędkości przepływu wody i średnicy rurociągu.

Traczewska, Sitarska, Biedroń [2014] uważają, że procesy technologiczne oczyszczania i uzdatniania wód przeznaczonych do spożycia pozwalają na uzyskanie produktu bezpiecznego pod względem zarówno składu chemicznego, jak i jakości sanitarnej. Problemem jest utrzymanie stabilności chemicznej i mikrobiologicznej wody podczas jej przesyłu do odbiorców. Przyczyną tego zjawiska jest fakt, że zarówno sieć, jak i przyłącza wodociągowe stanowią swoisty bioreaktor, w którym warunki do życia znajdują mikroorganizmy występujące w niewielkim procencie jako swobodnie pływające, a głównie w postaci warstwy biofilmu. Dla skutecznego zapobiegania negatywnym skutkom tego zjawiska niezwykle ważna jest wiedza dotycząca jego technicznych, technologicznych i biologicznych uwarunkowań. Z tego też powodu wiele uwagi poświęcono procesom biokorozji, zwłaszcza polimerów syntetycznych, do niedawna uważanych za niepodatne na obrosty biologiczne. Z kolei w wyniku przeprowadzonych badań najmniej podatnym materiałem syntetycznym stosowanym w instalacjach wodociągowych okazał się polichlorek winylu. Jednak monomer, z którego jest

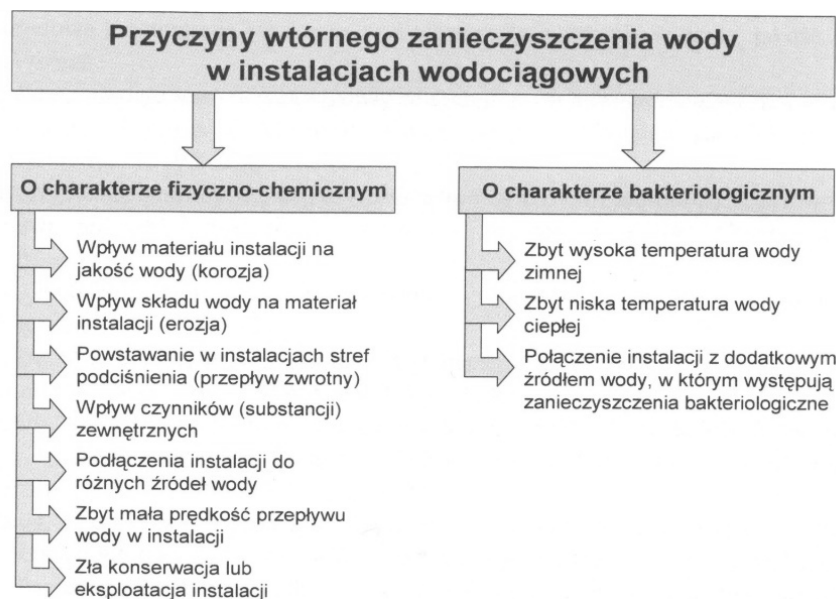
on zbudowany, ma udowodnione działanie rakotwórcze dla ludzi. Stąd też należałoby uwzględnić i oszacować koszty środowiskowe zarówno z tytułu produkcji, jak i utylizacji rur z PCV, a także rozważyć zastąpienie tego powszechnie stosowanego tworzywa alternatywnymi bezpiecznymi materiałami.

Zgodnie z dzisiejszą wiedzą przy zachowaniu stabilności chemicznej i mikrobiologicznej wody, podstawowym zabiegiem pozwalającym na utrzymanie sieci wodociągowej w stanie nie stanowiącym problemów z obrostami biologicznymi jest regularne jej płukanie. Jego skuteczność jest uzależniona od fazy rozwoju biofilmu, tzn. powinno się ono odbywać w fazie adhezji odwracalnej i dotyczyć jedynie powierzchni niezasiedlonej wcześniej przez drobnoustroje i bez złogów mineralnych. Zapobieganie obrostom mikrobiologicznym jest możliwe w nowych lub skutecznie oczyszczonych sieciach wodociągowych przy zachowaniu właściwych warunków hydraulicznych oraz efektywnych metod oczyszczania i uzdatniania wody, a także stosowaniu do końcowej dezynfekcji ditlenku chloru. Niezbędna jest również stała kontrola nie tylko liczebności bakterii zawieszonych w wodzie, lecz także ich potencjału do tworzenia obrostów na powierzchniach materiału metodami sensorycznymi w miejscach newralgicznych szczególnie narażonych powstaniem biofilmu. W analizowanej publikacji zamieszczono m.in. dwa interesujące schematy (rys. 2.4, 2.5) dotyczące przyczyn pogorszenia się jakości wody, które w sposób syntetyczny ilustrują omawianą problematykę.



Rys. 2.4. Schemat blokowy głównych przyczyn pogorszenia jakości wody w systemach wodociągowych

Fig. 2.4. Block diagram of the main reasons of water quality deterioration in the water supply systems
 Źródło: Traczewska, Sitarska, Biedroń [2014].



Rys. 2.5. Schemat blokowy wtórnych przyczyn pogorszenia jakości wody w systemie wodociągowym
 Fig. 2.5. Flowchart of the secondary reasons of water quality deterioration in the water supply systems
 Źródło: Traczewska, Sitarska, Biedroń [2014].

Biedroń i in. [2013] stwierdzają, że około 99% mikroorganizmów będących w sieciach wodociągowych jest obecne przede wszystkim w postaci heterogenicznego biofilmu (błony biologicznej). Stanowi on środowisko dla organizmów o różnych preferencjach pokarmowych i tlenowych, których obecność może spowodować gradienty pH, tlenu rozpuszczonego, chlorków i siarczanów na granicy faz biofilm – powierzchnia rury. Dojrzały biofilm składa się z wielu gatunków drobnoustrojów otoczonych warstwą zewnątrzkomórkowych substancji (EPS), która jest mieszaniną białek, polisacharydów, kwasów lipidowych i kwasów nukleidowych. Złożoność tej struktury zapewnia ochronę przed stosowanymi środkami dezynfekującymi oraz stanowi potencjalne źródło czynników chorobotwórczych, wpływa na integralność biofilmu zarówno pod względem fizjologicznym, jak i strukturalnym oraz bezpośrednio wpływa na właściwości fizyczno-chemiczne i biologiczne błony biologicznej. Powszechnie stosowana dezynfekcja chlorem w dużej mierze eliminuje patogeny znajdujące się w wodzie, jednak mimo tego proces rejestruje się ich obecność w strukturze biofilmu (m.in. *Legionella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* sp.). W składzie gatunkowym błon biologicznych wyróżnia się określone podklasy *Proteobacteria*, których obecność uzależniona jest od materiału, z jakiego wykonana jest sieć wodociągowa, wieku biofilmu oraz stosowanych metod dezynfekcji. Obecność błony biologicznej w systemie dystrybucji wody i na innych powierzchniach mających stały kontakt z wodą skutkuje m.in. intensyfikacją korozji oraz pogorszeniem jakości wody. Mikroorganizmy swobodnie zawieszane w wodzie pojawiają się w przypadku miejscowych nieszczelności sieci wodociągowej lub znacznie częściej jako zryw istniejącego obrotu biologicznego.

Obecność biofilmu w sieci wodociągowej obecnie nie jest monitorowana. Biofilmy to kluczowy czynnik wtórnego zanieczyszczenia wody wodociągowej mikroorganizmami oraz wywołujący straty finansowe wywołane biokorozją.

Klasyczna, normowana metoda kontroli jakości mikrobiologicznej wody określa tylko liczbę mikroorganizmów swobodnie pływających, które wyrastają na podłożach hodowlanych w warunkach laboratoryjnych. Stosowane metody molekularne pozwalają wprawdzie poznać pełną florę mikroorganizmów w wodach uzdatnionych, jednakże nie są one powszechnie stosowane oraz nie uwzględniają kontroli rozwoju obrotu biologicznego w sieciach wodociągowych.

Istnieją jednak zróżnicowane poglądy dotyczące materiałów, na których biofilm rozwija się intensywniej. Na przykład **Pistelok i in. [2012]** stwierdzają, że w wyniku badań szczególnie korzystne warunki rozwoju biofilmu występują w przewodach stalowych i stalowych ocynkowanych. Korzystniejsze pod tym względem są ciągi wykonane z PCV i PEHD, natomiast większość pozostałych publikacji wskazuje na większy rozwój biofilmu w rurach z tworzyw sztucznych.

W zakresie metod badania biofilmu należy wskazać dość skomplikowany pomiar impedancji zaproponowany przez **Biedronia i in. [2013]** oraz prostszy pomiar ATP proponowany przez **Pisteloka i in. [2012]**. Występowanie w przewodach struktur w postaci biofilmu wiąże się ze zwiększonym ryzykiem przekroczenia parametrów mikrobiologicznych.

Wysokie wartości ATP są traktowane jako syntetyczny wskaźnik zagrożeń mikrobiologicznych, a więc również istnienia biofilmu.

Podobnie jak w innych publikacjach **Szczotko i in. [2011]** stwierdzają, że biofilm jest błoną biologiczną powstającą na wewnętrznych powierzchniach rur stalowych, żeliwnych, w przewodach z tworzyw sztucznych, a nawet instalacjach wykonanych z miedzi. Biofilm składa się głównie z organizmów żywych oraz wytwarzanych przez nie substancji organicznych i substancji nieorganicznych pochodzących z wody i bezpośrednio z materiałów kontaktujących się z wodą. Czas rozwoju błony biologicznej od powstania pierwszych form adhezyjnych do osiągnięcia jej funkcjonalnej równowagi jest różny i wynosi od kilku godzin do kilku tygodni, a nawet miesięcy, zależnie od rodzaju materiału stykającego się z wodą oraz zawartości substancji odżywczych w wodzie, szczególnie organicznych związków węglowych. Największy udział w utworzonym biofilmie mają bakterie Gramujemne, spośród których najczęściej izolowano bakterie z rodzajów *Pseudomonas*, *Flavobacterium* i *Acinetobacter*. Instalacje i zbiorniki wody ciepłej bardzo często są też zasiedlane przez bakterie rodzaju *Legionella*, które mogą stanowić nawet do 35% wszystkich innych gatunków bakterii wchodzących w skład biofilmu.

Do badania struktury i tempa wzrostu biofilmu zastosowano pomiar poziomu ATP pochodzącego z komórek mikroorganizmów zasiedlających powierzchnie badanych materiałów, umieszczonych wewnątrz urządzenia ze stałym przepływem wody. Na podstawie

serii badań z użyciem różnego rodzaju materiałów autorska metoda badawcza została zwalidowana, potwierdzono też przydatność prototypowych urządzeń przepływowych (UPE).

Do badań wykorzystano fragmenty rur wykonanych z polietylenu (PE). Jako kontrolę pozytywną i negatywną stosowano odpowiednio płytki szklane powleczone warstwą parafiny (SP) i stal odporną na korozję (S). Wszystkie próbki materiałów testowych badane były w trzech powtórzeniach, tj. po trzy takie same elementy z każdego materiału.

Sposób przygotowania materiału, a także użytą aparaturę pomiarową do bioluminescencji (HY-LiTE2, MERCK) oraz elektronowy mikroskop skaningowy (FEI QUANTA 200) z możliwością powiększenia 150 000 x opisano szczegółowo w publikacji.

Wiele zamieszczonych w pracy fotografii ilustruje zachodzące zmiany na powierzchni badanych materiałów.

Sformułowane wnioski potwierdzają skuteczność zastosowanej metody, a użycie techniki skaningowej mikroskopii elektronowej doskonale rozszerza i uzupełnia uzyskane oznaczenia poziomu ATP, natomiast klasyczna metoda posiewu mikrobiologicznego oznaczająca ogólną liczbę bakterii i grzybów z powierzchni badanych materiałów jest nieprzydatna.

Pelleïeux i in. [2012] przebadali i opisali akumulację jelitowych wirusów na powierzchniach rurociągów w ramach systemu dystrybucji wody pitnej, w specjalnie zbudowanym na potrzebę tych badań reaktorze, za pomocą trzech F-specyficznych RNA bakteriofagów (MS2, GA i Q β), które posłużyły jako modele ludzkich wirusów chorobotwórczych. Aby ocenić akumulację wirusa na tych powierzchniach, poddano analizie wpływ warunków hydrodynamicznych w porównaniu z hydrostatycznymi oraz skutki kolonizacji powierzchni HDPE biofilmem przez okres dwóch miesięcy. W celu pracy w kontrolowanych warunkach laminarnych i badania równocześnie różnych naprężeń ścinających na ścianki został zaprojektowany nowy obrotowy reaktor dyskowo-płytkowy. Wśród zadawanych wartości szybkości ścinania ścianek zastosowanych w reaktorze (od 450 s⁻¹ do 1640 s⁻¹) nie stwierdzono istotnych różnic dotyczących całkowitej liczby bakterii, którą ustalono na ok. 1,7x10⁷ komórek/cm², a liczba cząstek wirusa na powierzchni wynosiła odpowiednio ok. 3x10⁴, 5x10⁵ i 3x10⁵ eqPFU/cm² dla fagów MS2, GA i Q β . Porównanie warunków statycznych z dynamicznymi wykazało, że zarówno dyfuzja Browna, jak i konwekcja dyfuzji były zaangażowane w transporcie tych delikatnych cząstek koloidalnych oraz że pojawił się wzrost koncentracji wirusa do ok. log1 mierzony na powierzchni, gdy były stosowane warunki hydrodynamiczne. Wyniki wykazały również wpływ kolonizacji dwumiesięcznych biofilmów w wodzie pitnej, które doprowadziły do zmian w poziomie przyczepności wirusów. Z następstw fizykochemicznych należy również podkreślić, że różne profile adhezji otrzymano dla dwóch bakteriofagów i faga MS2, który jako jedyny okazał się w mniejszym stopniu przylegający niezależnie od warunków stosowania.

Donlan [2009] opisał w swojej publikacji sposoby zapobiegania tworzeniu się organizmów chorobotwórczych w biofilmach za pomocą bakteriofagów. Po latach zapomnienia powrócono do koncepcji zastosowania bakteriofagów w zwalczaniu lekoopornych zakażeń u ludzi, jest

również zainteresowanie w zastosowaniu fagów do kontroli biofilmów. Fagi są zdolne do lizy (zabicia) komórek bakterii, poza tym wiele fagów produkuje depolimerazy, które powodują hydrolizę zewnątrzkomórkowych polimerów biofilmu. Wady fagów, które trzeba wziąć pod uwagę, to ich wysoka specyficzność względem określonych gatunków, a nawet szczepów bakterii i możliwość przeniesienia przez fagi genów warunkujących patogenność bakterii z jednych szczepów na drugie. Należy uwzględnić też fakt, że bakterie dysponują mechanizmami inaktywującymi fagi i istnieje możliwość powstania oporności bakterii w stosunku do fagów. Mieszanki fagów, tzw. koktajle fagowe, lub poddane modyfikacji fagi mogą zapewnić skuteczną strategię do pokonania tych przeszkód. Lityczne bakteriofagi mogą stać się nową klasą leków utrudniających powstawanie biofilmu.

Mikrobiologiczna adhezja do powierzchni i wynikające z tego formowanie biofilmu zostały udokumentowane w wielu różnych środowiskach. **Simões i in. [2009]** dokonali przeglądu strategii kontroli biofilmu. Biofilmy tworzą tryb chroniony wzrostu, który umożliwia mikroorganizmom przetrwanie w trudnych warunkach, gdyż ich fizjologia i zachowanie znacznie różnią się od ich odpowiedników planktonowych. W przemyśle mleczarskim biofilm może być źródłem trudnych do usunięcia zanieczyszczeń, powodując psucie się żywności oraz jest możliwym źródłem problemów zdrowia publicznego, takich jak pokarmowe patogeny. Biofilmy są trudne do zwalczania ze względu na ich oporność na działanie czynników środowiska. Konwencjonalne systemy czyszczenia i dezynfekcji mogą również przyczynić się do nieefektywnej kontroli biofilmu i zwiększenia jego oporności. W konsekwencji pojawiają się ciągle nowe strategie kontroli przy wprowadzaniu biorozwiązań (enzymów, fagów, międzygatunkowej interakcji i cząsteczek antybiotyków pochodzenia bakteryjnego). Dokonany w publikacji przegląd literatury skupia się na opisie procesów zaangażowanych w tworzenie i zachowanie się biofilmu oraz szkodliwych skutkach związanych z jego obecnością. Ponadto opisano w niej wiele wykorzystywanych obecnie strategii kontroli wzrostu biofilmu, jak również rozwiązań będących na etapie wdrażania, ze szczególnym uwzględnieniem przemysłu spożywczego.

Munöz-Berbel i in. [2008] opisują impedymetryczną metodę monitorowania powstawania biofilmów bakteryjnych na powierzchni elektrod z platyny i złota oraz ich zastosowanie do pośredniego wykrywania bakteriofagów. Spektroskopowe pomiary impedancji wykazały, że C_{biofilm} – pojemność biofilmu, parametr obwodu elektrycznego, który modelował wzrost biofilmu, był wrażliwy zarówno na wzrost biofilmu, jak na jego degradację jako rezultat zakażenia bakteriofagiem. Wyniki pomiaru impedancji porównano z wynikami badań mikroskopowych (optycznych i konfokalnych), wykazując dobrą korelację. Wyniki te dają możliwość prowadzenia dalszych prac w tej dziedzinie w celu rozwoju przenośnych urządzeń do wykrywania bakteriofagów.

Sitarska [2010] w swojej pracy doktorskiej pt. „Biofilm w sieci wodociągowej – podatność wybranych wewnętrznych powierzchni rur na obrosty mikrobiologiczne” omówiła bardzo szczegółowo stosowane technologie uzdatniania wody i materiały stosowane do budowy sieci wodociągowych, a także zmiany właściwości wody w systemach dystrybucji. W dalszej części

Sitarska [2010] opisała mechanizm powstawania błony biologicznej oraz opisała metody badawcze i uzyskane wyniki badań.

Szczotko i in. [2011] przeprowadzili badania porównawcze struktury i tempa wzrostu biofilmów powstających na powierzchni materiałów budowlanych kontaktujących się z wodą przeznaczoną do spożycia. Jako podstawową technikę analityczną zastosowano pomiar poziomu ATP pochodzącego z komórek mikroorganizmów zasiedlających powierzchnie badanych materiałów umieszczonych wewnątrz urządzenia ze stałym przepływem wody. Na podstawie serii badań z użyciem różnego rodzaju materiałów autorska metoda badawcza została zwalidowana, potwierdzono też przydatność prototypowych urządzeń przepływowych (UPE). W celu określenia poziomu ATP w wymazach z powierzchni badanych materiałów stosowano luminometr HY-LITE 2 (MERCK). Ogólną liczbę bakterii i grzybów oraz obecność mikroorganizmów patogennych oznaczono metodą hodowlaną, natomiast porównania i obserwacji struktury powstających biofilmów dokonano z zastosowaniem elektronowej mikroskopii skaningowej (FE QUANTA 200) umożliwiającej maksymalne powiększenie do 150 000 x. Dzięki wbudowanej kamerze cyfrowej obraz obserwowanych powierzchni archiwizowano w formie zdjęć o rozdzielczości 2048x1886 pikseli. Wszystkie zastosowane metody badawcze wykazały stopniowy przyrost biomasy na powierzchni badanych materiałów, przy czym przyrost ten był różny w zależności od rodzaju materiału.

W rezultacie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zastosowane metody (pomiar ATP i mikroskopia elektronowa) uzupełniają się wzajemnie i pozwalają uzyskać właściwy obraz powstawania biofilmu i tempa jego wzrostu. Z kolei metoda klasycznego posiewu mikrobiologicznego oznaczenia ogólnej liczby bakterii i grzybów na powierzchni badanych materiałów jest nieprzydatna w procesie ich dopuszczenia do kontaktu z wodą przeznaczoną do spożycia przez ludzi.

Wowk [2004], [2010] w wyniku przeprowadzonych wielu prób i praktycznych doświadczeń stwierdził, że w zbiorniku reakcji, w którym następuje kontynuacja napowietrzania wody surowej, powstaje osad, osiadający na bocznych ścianach i dnie zbiornika. Wówczas biofilm utworzony na cząstkach osadu nie ma właściwego kontaktu z wodą, a kontakt ten sprzyja rozwojowi mikroorganizmów w utworzonym biofilmie.

To spostrzeżenie przyczyniło się do opracowania przez **Wowka [2004]** konstrukcji zbiornika, zwanego też zbiornikiem z zawieszonym osadem czynnym, w którym nad otworem umieszczonym na dnie zainstalowana jest elastyczna przepona. Napowietrzona woda dopływająca do zbiornika ww. otworem powoduje drgania przepony, a to zapewnia ujednorodnienie w zbiorniku osadu z wodą.

Wowk [2004] na podstawie obserwacji funkcjonowania kilkunastu stacji uzdatniania wody uważa, że podstawowymi procesami uzdatniania wód podziemnych są: usunięcie nadmiaru zawartości żelaza i manganu, a niekiedy również amoniaku i siarkowodoru, oraz zmniejszenie barwy.

Wszystkie pozostałe procesy przebiegają w środowisku naturalnym odpowiednio dobranych urządzeń technologicznych, tj. napowietrzania i filtracji bez potrzeby stosowania środków chemicznych. Jediną ingerencją chemiczną, która może być potrzebna w procesie uzdatniania wody, jest korekta odczynu pH.

Biedroń i Traczewska [2016] na podstawie swoich doświadczeń i wyników innych badaczy stwierdzają, że system dystrybucji wody można traktować jako pewnego rodzaju bioreaktor, w którym mikroorganizmy rozwijają się w warunkach oligotroficznych i jednocześnie poddawane są czynnikom stresowym, jakim jest m.in. proces dezynfekcji. Struktura dojrzałego biofilmu jest odzwierciedleniem skomplikowanych zależności i preferencji środowiskowych, pokarmowych i oddechowych, gdzie każda z obecnych grup mikroorganizmów pełni istotną funkcję. Materiał, na którym powstaje biofilm, nie ma istotnego znaczenia dla różnorodności funkcjonalnej oraz jednorodności metabolicznej błony biologicznej. Jednocześnie mechanizm powstawania obrostów biologicznych, mogących pokryć 70% wewnętrznej powierzchni przewodów wodociągowych, bioróżnorodność na różnych materiałach powodują, że żaden zabieg technologiczny, ani materiał wykorzystywany do budowy sieci, nie jest w stanie zapobiec tworzeniu się biofilmu.

Lührig i in. [2015], Schleich i in. [2019], Chan i in. [2019] zajmowali się badaniem społeczności bakteryjnych z biofilmu zalegającego na powierzchniach wewnętrznych instalacji wodociągowych w południowej Szwecji; badania przeprowadzono zarówno w prywatnych ujęciach wody, jak i zbiorowych wodociągach.

Schleich i in. [2019] wykorzystali cytometrię przepływową, która pozwala szybko i niezawodnie określić liczbę bakterii w wodzie. W badaniu zastosowano ww. metodę do monitorowania dynamiki wzrostu społeczności bakteryjnej w ciągu jednego roku w pełnoskalowym systemie dystrybucji wody pitnej (ang. Drinking Water Distribution Systems – DWDS). Następnie, po wdrożeniu ultrafiltracji (UF) połączonej z koagulacją oczyszczonej wody pitnej (DWTP), badano korelację pomiędzy warunkami środowiskowymi w DWDS a obrostem mikrobiologicznym, określając wzrost całkowitej liczby komórek w zależności od czasu retencji (współczynnik korelacji $R = 0,89$) i wzrostu temperatury wody. W okresie letnim nastąpił 5,24-krotny wzrost liczby komórek.

Lührig i in. [2015] badali biofilm, monitorując DNA bakterii. Metoda polega na poszukiwaniu genów kodujących rybosomalny RNA (16S rRNA), które występują w genomach wszystkich mikroorganizmów, a jego sekwencja jest charakterystyczna dla określonego gatunku. Analizie podlegają hiperzmiennie części tego genu, materiał uzyskany za pomocą PCR jest poddawany wysokoprzepustowemu sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS – ang. new generation sequencing). Metoda pozwala na identyfikację bakterii, w zależności od sposobu obróbki danych, na poziomie gatunku lub wyższych jednostek systematycznych (rodzaj, typ). Jednostki oznaczane dzięki tym metodom opisuje się jako filotypy lub OTU (operational taxonomic unit). Metodyka ta jest coraz szerzej stosowana, użyta została m.in. w badaniu próbek wody ze Zbiornika Zaporowego w Goczałkowiczach **Woźnica i in. [2017]**.

W pracy **Lührig i in. [2015]** badano biofilm obecny w rurach i wodomierzach instalacji wodociągowej domów mieszkalnych. W poszczególnych próbkach biofilmu zidentyfikowano od 126 do 227 filotypów bakterii, w tym 57 filotypów wspólnych dla wszystkich próbek. Stwierdzono dużą liczbę taksonów sklasyfikowanych jako *Proteobacteria* (ponad 80%), ich liczebność była wyraźnie niższa (44%) w przypadku wody niesmacznej, o czerwonym zabarwieniu. Biofilmy w rurach różniły się od tych w wodomierzach i zawierały filotypy zidentyfikowane jako *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Desulfovibrio* i *Sulfuricurvum*. Przedstawione w pracy wyniki badań eksperymentalnych charakteryzują się wysokim stopniem odtwarzalności związanej z analizą zbiorowisk obecnych w kolejnych wodomierzach i rzadkim występowaniu replik biologicznych w działającym systemie dystrybucji wody pitnej.

Liang i in. [2016] analizowali próbki biofilmu pobierane w licznikach wody w domach w Illinois (USA); liczniki wymieniano po 15 latach użytkowania, pobierano także do analiz wodę z kranu. Próbki te analizowano, sekwencjonując 16S rDNA i selekcjonując uzyskane sekwencje metodą PCR NSG. Uzyskano 3639 OTU dla próbek biofilmu i 1189 OTU dla próbek wody, 191 OTU było wspólne dla obu rodzajów próbek. Pogłębiona analiza pozwoliła na wyróżnienie „rdzeniowej” populacji bakterii (core community), którą ostatecznie zawężono do 33 OTU dla próbek wody, 17 OTU dla biofilmu, 14 OTU były wspólne dla obu rodzajów próbek. Wartości te nie są zbyt wysokie, ale analizy wykazały, że reprezentujące je bakterie występują w szczególnie dużej liczbie w badanych lokalizacjach. Zidentyfikowano wiele taksonów bakterii z grupy metylotrofów, w tym taksonów zawierających gatunki chorobotwórcze (*Acinetobacter* spp., *Methylobacterium* spp., *Mycobacterium avium* i *Pseudomonas aeruginosa*). Skład rdzeniowej populacji mikroorganizmów jest zapewne związany z pochodzeniem wody i sposobem jej uzdatniania. **Pinto i in. [2014]** opisali trwającą 15 miesięcy analizę próbek wody pobieranej w 9 punktach systemu wodnego w Ann Arbor w Michigan (USA). W analizowanych próbkach wykryli 4369 OTU (przy podobieństwie 97%), z których 15-30% była specyficzna dla konkretnego miejsca poboru próbki. Należy przy tym podkreślić, że w obu przypadkach woda spełniała wszystkie wymagane normy, a instalacje były przez wiele lat eksploatowane, dostarczając bezpieczną wodę użytkownikom. Bakterie zasiedlające system, zwłaszcza część rdzeniowa populacji, stanowiły zapewne element stabilizujący ekosystem złożony z instalacji wodnej i populacji mikroorganizmów. **Liang i in. [2016]** podkreślają ponadto znaczenie analizy biofilmu obecnego na instalacjach dla prawidłowej oceny obecności mikroorganizmów i instalacji wodnej.

Przeprowadzono liczne badania, które wykazują, jak złożone populacje mikroorganizmów zasiedlają systemy wodne dostarczające wodę ludności. Rozwój technik molekularnych dostarczał narzędzi pozwalających na pogłębioną analizę próbek biologicznych zawierających dużą ilość DNA niosącego informację genetyczną.

Generalnie można stwierdzić, że odkryto w pewnym sensie zupełnie nieznaną ekosystem. Dzięki zastosowaniu cytometrii przepływowej stwierdzono obecność ok. 80 tysięcy bakterii na milimetr sześcienny wody pitnej, a technika wykorzystująca analizę 16S rDNA uwidacznia

ogromne gatunkowe zróżnicowanie społeczności drobnoustrojów tworzących biofilm. Cząstki odrywającego się biofilmu można traktować jako zanieczyszczenie, ale stabilny ekosystem drobnoustrojów w instalacjach wodociągowych może odgrywać ważniejszą rolę niż dotychczas sądzono, aż do naturalnej stabilizacji wody pitnej, czyniąc ją zdatną do spożycia.

Hull i in. [2019] wskazują na potrzebę wdrożenia programu kompleksowej analizy mikrobiomu wody pitnej – Drinking Water Microbiome Project, na podobieństwo zrealizowanego z powodzeniem programu sekwencjonowania genomu człowieka (Human Genome Project) czy toczących się teraz analiz mikrobiomu człowieka (Human Microbiome Project). Kompleksowe badania dostarczyłyby informacji o wodzie pitnej, ułatwiłyby tworzenie skutecznych instalacji dostarczających zdrową bezpieczną wodę oraz tworzenie systemów, w których prawidłowy biofilm (populacje bakterii) będzie wykorzystywany do uzdatniania i stabilizacji wody pitnej.

Spis literatury do rozdziału 2

1. Adamski W., 2014. Stan i trendy w rozwoju technologii oczyszczania wody. *Technologia Wody*, Nr 2 (34), s. 14-18.
2. Ayrapetyan M., Williams T., Oliver J.D., 2018. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells. *J. Bacteriol* 200:e00249-18.
3. Bauman-Kaszubska H., 2009. Gospodarka osadowa w stacjach uzdatniania wody na wybranym przykładzie. *Instal.*, Nr 7-8, s. 61-64.
4. Biedroń I., Trusz-Zdybek A., Traczewska T., Piekarska K., 2013. Zastosowanie pomiaru impedancji do oceny rozwoju biofilmu w systemach wodociągowych. *Instal.*, Nr 5, s. 37-42.
5. Biedroń I., Traczewska T.M., 2016. Ekologiczny aspekt biofilmu w systemie dystrybucji wody do picia. *Instal.*, Nr 2, s. 46-49.
6. Biń A., 2009. Uboczne produkty dezynfekcji wody w basenach pływakich. *Informacja Instal.*, Nr 2, s. 30-36.
7. Błachno B., 2001. Wpływ mikrobiologicznego skażenia gleby na jakość wody w studniach kopanych. *Zeszyty Naukowe Politechniki Białostockiej. Nauki Techniczne*, nr 142, zeszyt 15, Białystok, s. 89-91.
8. Castell-Exner C., 2012. Zapobiegawcze zarządzanie ryzykiem w sektorze zaopatrzenia w wodę. *Instal.*, Nr 3, s. 32-27.
9. Chan S., Pullerits K., Keucken A., Persson K., Paul C.J., Rådström P., 2019. Bacterial release from pipe biofilm in a full-scale drinking water distribution system. *npj Biofilms and Microbiomes*, Vol. 5, No. 1:9.
10. Chmara A., 2010. Małże na „etacie” w kaliskich wodociągach. *Technologia Wody*, Nr 1(03), s. 6-8.

11. Chojnacki M., 2010. Dezynfekcja wody z zastosowaniem promieniowania UV. Instal., Nr 2, s. 54-56.
12. Cleverus M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142, pp. 185-194.
13. Dąbrowski W., 2017. Zmiękczenie wody pitnej. *Technologia Wody*. Nr 2 (52), s. 35-37.
14. Dąbrowski W., Dąbrowska B., 2012. Uzdatnianie wody pod względem zagrożeń pierwotniakami. Instal., Nr 3, s. 60-64.
15. Dąbrowski W., Dąbrowska B., 2012. Intensyfikowanie procesów produkcji wody bezpiecznej mikrobiologicznie. Instal., Nr 6, s. 37-41.
16. Donlan R.M., 2009. Zapobieganie tworzeniu się w biofilmach określanych klinicznie organizmów za pomocą bakteriofagów. *Trends in Microbiology*, Vol. 17, No 2, Wydaw. Elsevier., s. 66-72.
17. Dudziak M., 2010. Usuwanie ksenostrogenów w procesach uzdatniania wody. Instal., Nr 3, s. 45-48.
18. Eymontt A., Wierzbicki K., 2019. Racjonalna technologia rewitalizacji wybranych ekosystemów wodnych. *Technologia Wody, Zeszyt 5(67)*.
19. Fent K., Watson A., Caminada D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquatic Toxicology*, 76, pp. 122-159.
20. Figiel D., 2010. Nowoczesne pomiary barwy w stacjach uzdatniania wody. *Technologia Wody*, Nr 1 (03), s. 36-37.
21. Giebułtowicz J., Tyski S., Wolinowska R., Grzybowska W., Zaręba T., Drobniewska A., Wroczyński P., Nałęcz-Jawecki G., 2018. Occurrence of antimicrobial agents, drug-resistant bacteria, and genes in the sewage-impacted Vistula River (Poland). *Environ Sci Pollut Res Int.*, 2018 Feb;25(6):5788-5807.
22. Giebułtowicz J., Nałęcz-Jawecki G., 2014. Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata rivers and in tap water in Warsaw (Poland). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2014 Jun;104:103-9.
23. Górecki A., 2006. Rozwiązania materiałowe instalacji wodnych w świetle przepisów i oczekiwań. Instal., Nr 10: 47-49.
24. Grabińska-Łoniewska A., 2006. Mikrobakterie jako potencjalny wskaźnik mikrobiologicznego zanieczyszczenia wód wykorzystywanych do celów komunalnych. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, Nr 12: 29-32.
25. Grabińska-Łoniewska A., Siński E., 2010. Mikroorganizmy chorobotwórcze i potencjalnie chorobotwórcze w ekosystemach wodnych i sieciach wodociągowych. Wydawnictwo Siedel – Przywecki Sp. z o.o., 256.
26. Grzegorzczuk-Nowacka M., 2010. Zastosowanie węgla aktywnych w oczyszczaniu wody i ścieków. *Technologia Wody*, Nr 1 (03): 27-35.
27. Gumińska J., 2006. Wpływ metody koagulacji na zmianę optymalnego odczynu. Instal., Nr 9:75-80.

28. Gumińska J., Kłos M. 2010. Wpływ rodzaju koagulantu na właściwości zawiesiny pokoagulacyjnej. *Instal.*, Nr 6: 46-48.
29. Harmelin T. 2012. Sposoby zarządzania kryzysowego w przedsiębiorstwach wodociągowych Izraela. *Instal.*, Nr 3:42-43.
30. Heureta-Fontela M., Galceran M.T., Ventura F., 2011. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research*, 45: 1432-442.
31. Hull N.M., Ling F., Pinto A.J., Albertsen M., Jang H.G., Hong P.Y., Konstantinidis K.T., LeChevallier M., Colwell R.R., Liu W.T., 2019. Drinking Water Microbiome Project: Is it Time? *Trends Microbiol.*, 27(8), 670-677.
32. Jassim S.A.A., Limoges R.G., El-Chekh H., 2016. Bacteriophage biocontrol in wastewater treatment. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 70.
33. Jørgensen S.E., Halling-Sørensen B., 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere*, 40 (7), pp. 691-699.
34. Kaniowska-Klarzyńska E., Gabroś S., Świącicka D., 2006. Badanie zawartości WWA w wodzie metodą chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną. *Instal.*, Nr 10: 58-60.
35. Kida M., Książek S., Koszelnik P., 2017. Procesy zaawansowanego utleniania jako zielone technologie. *Instal.*, Nr 5:50-53.
36. Kim S.D., Cho J., Kim I.S., Vanderford B.J., Snyder S.A., 2007. Occurrence and removal of pharmaceutical and endocrine in South Korean surface, drinking and waste waters. *Water Research* 41:1013-1021.
37. Kłos M., 2012. Wysokosprawna koagulacja i filtracja pośpieszna jako podstawa „multibarier” w uzdatnianiu wód powierzchniowych. *Instal.*, Nr 7-8:42-46.
38. Kłos M., Latawiec E., Gumińska J., 2010. Wpływ parametrów technologicznych na przebieg koagulacji i flotacji ciśnieniowej. *Instal.*, Nr 10:57-61.
39. Kłosok-Bazan I., Sawiniak W. 2011. Formalno-prawne, techniczne i ekonomiczne aspekty stosowania polielektrolitów w wodzie do picia. *Instal.* Nr 12: 65–68.
40. Konieczny K., Szałkol D., Bodzek M., Korycki M., Rajca M., 2007. Porównanie skuteczności wybranych koagulantów do usuwania substancji organicznych w procesie hybrydowym koagulacja / mikrofiltracja. *Instal.*, Nr 4: 53-57.
41. Korcz D., 2013. Naturalny koagulant o nieocenionych możliwościach. *Forum eksploatatora.* Nr maj/czerwiec: 50-51.
42. Korzeniowski P., 2012. Cele środowiskowe i zasady ochrony wód. *Wodociągi-kanalizacje.* Nr 3 (71): 28-29.
43. Kot-Wasik A.J., Dębska J., Namiesnik J., 2003. Przemiany stężenia i oznaczeni pozostałości środków farmaceutycznych w środowisku. *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym.* CEEAM, Gdańsk.
44. Kowal A.L., 1996. Usuwanie mikroorganizmów na drodze klarowania i filtracji w niektórych wodociągach w Polsce. *Gaz, woda i technika sanitarna.* Nr 11:392-394.

45. Kowal A.L., Świdarska-Bróz M., 2005. Oczyszczanie wody. Wyd. PWN, Warszawa, s. 613.
46. Kowalska B., Kowalski D., 2011. Zmiany jakości wody w instalacji badawczej wykonanej z polietylenu sieciowego. *Mat. z konferencji Instalacje wodociągowe i kanalizacyjne – projektowanie, wykonanie, eksploatacja*. Wyd. Seidel Przywecki, 43-52.
47. Kowalska B., Kowalski D., Kwietniewski M. 2009. Wymywanie związków organicznych w sieciach wodociągowych wykonanych z PVC. *Instal.* Nr 4:42-46.
48. Kowalska B., Kowalski D., Suchorab P., Iwanek M., 2016. Problem wtórnego zanieczyszczenia wody w wybranym wodociągu wiejskim. *Instal.*, Nr 7/8:58-61.
49. Kümmerer K. (ed.), 2008. *Pharmaceuticals In the environment: sources, fate, effects and risk*. Springer Verlag, 3rd edition, chapter 14:223-244.
50. Kwietniewski M., Kowalska B., Wąsowski J., Chudzicki J., Kowalski D., Miszta-Kruk K., 2012. Problematyka zarządzania jakością wody w systemach dystrybucji. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, Nr 3:117-121.
51. Kwietniewski M., Mulik B., Parafińska K., Parafiński J., 2014. *Wytyczne dotyczące jakości wody do picia (Guidelines for Drinking-water. Fourth edition)*. Wyd. Izba Gospodarcza „Wodociągi Polskie”, Bydgoszcz, 619.
52. Ling F., Hwang C., LeChevallier M.W., Andersen G.L., Liu W.T., 2016. Core-satellite populations and seasonality of water meter biofilms in a metropolitan drinking water distribution system. *ISME J.* 2016 Mar;10(3):582-95.
53. Liu M., Gill J.J., Summer E.J., 2015. Bacteriophages of wastewater foaming-associated filamentous *Gordonia* reduce host levels in raw activated sludge. *Sci. Rep.*, 5, 13754.
54. Lührig K., Canbäck B., Paul C., Johansson T., Persson K., Rådström P., 2015. Bacterial Community Analysis of Drinking Water Biofilms in Southern Sweden. *Microbes and Environments*, Vol. 30, No. 1:99-107.
55. Łebkowska M., Załęska-Radziwiłł M., Affek K., 2012. Substancje farmaceutyczne w środowisku wodnym – występowanie i zagrożenia. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*. Nr 3:129-133.
56. Michalski R., Łyko A., 2011. Badania zawartości bromianów (V) w stacjach uzdatniania wody Dzieckowice i Kozłowa Góra. *Instal.*, Nr 12:69-71.
57. Michałkiewicz M., 2013. Mikrobiologiczne skażenie wody – przyczyny, skutki, konsekwencje. *Technologia Wody*, Nr 4(24):8-14.
58. Michałkiewicz M., 2016. Czy można pić każdą wodę źródlaną? *Technologia Wody*, Nr 5(49): 50-54.
59. Michałkiewicz M., 2018. Mikrobiologiczne skażenie systemów wodnych. *Technologia Wody*, Nr 2 (58):25-29.
60. Michałkiewicz M., 2019. Czy polskie przepisy dają gwarancję bezpiecznej wody? *Technologia Wody*, Nr 3:56-64.
61. Miłaszewski R., Skoczko I., Waszkiewicz E., 2013. Koszty budowy i eksploatacji stacji uzdatniania wód podziemnych. *Technologia Wody*, Nr 3 (23):31-35.

62. Mnich M., 2009. Badania równoległe wody przeznaczonej do spożycia. *Wodociągi – kanalizacje*, Nr 7/8 (65/66):24-26.
63. Mulik B., Parafiańska K., Zimoch I., Marcinkowski J.T., 2015. Zagrożenia zdrowotne związane z wodą przeznaczoną do spożycia w krajach o wysokim stopniu rozwoju. *Technologia Wody*, Nr 2 i 3: 52-59, 58-65.
64. Munoz-Berbel X., Garcia-Aljaro C., Munoz F.J., 2008. Impedymetryczne podejście do monitorowania powstawania biofilmów na powierzchniach metalowych i kolejne zastosowanie do wykrywania bakteriofagów. *Electrochimica Acta* 53. Wyd. Elsevier: 5739-5744.
65. Nachlik E., 2012. Wdrożenie Ramowej Dyrektywy Wodnej gwarancją zapewnienia odpowiedniej jakości akwenów wykorzystywanych do poboru wody. *Instal.*, Nr 3:50-54.
66. Nawrocki J., 2006. Uboczne produkty dezynfekcji wody. *Instal.*, Nr 4-5:3-8.
67. Nawrocki J., 2010. *Uzdatnianie wody: procesy fizyczne, chemiczne i biologiczne*. PWN, Warszawa, T. 1: 422, t. 2, s. 359.
68. Nikolau A., Maric S., Fatta D., 2007. Occurrence patterns of pharmaceutical in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387:1225-1234.
69. Nocoń W., Moraczewska-Majkut K., Wiśniowska E., Pałka M., 2018. Mikroplastik w wodzie – stopień i zagrożenia związane z obecnością tych mikrozanieczyszczeń. *Technologia Wody*, Nr 4:24-29.
70. Nowak R., 2013. Wpływ prędkości filtracji na usuwanie manganu i żelaza z wody na wybranych złożach filtracyjnych. *Ekonomia i Środowisko*: 160-168.
71. Olko M., Wójcik W., 2009. Jakość wody w sieci wodociągów po zmianie sposobu dezynfekcji na przykładzie doświadczeń wodociągów krakowskich. *Instal.*, Nr 5:13-16.
72. Papciak D., 2013. Biofiltracja wód podziemnych na złożach chalcedonitowych. *Instal.*, Nr 10: 49-54.
73. Pelleïeux S., Bertrand I., Skali-Lami S., Mathieu L., Francius G., Gantzer C., Accumulation of MS2, GA, and Q β phages on high density polyethylene (HDPE) and drinking water biofilms under flow/non-flow conditions. *Water Research*, No. 46(19):6574-6584.
74. Petrovski S., Seviour R.J., Tillett D. 2011 Prevention of *Gordonia* and *Nocardia* stabilized foam formation by using bacteriophage GTE7. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77 (21), 7864-7867.
75. Petrovski S., Batinovic S., Rose J.J., Seviour, R.J., 2022. Biological control of problem bacterial populations causing foaming in activated sludge wastewater treatment plants – phage therapy and beyond. *Lett. Appl. Microbiol.* Accepted Manuscript. DOI: 10.1111/lam.13742.
76. Piątkiewicz D., Dąbrowski W., 2009. Wpływ zaburzeń przepływu na mętność filtratu. *Instal.*, Nr 12:67-69.
77. Pistelok F., Wiera B., Stuczyński T., 2012. Identyfikacja zagrożeń dla bezpieczeństwa zdrowotnego wody podczas zdarzeń wyjątkowych. *Instal.*, Nr 3:44-54.

78. Plujim D., 1998. Dezynfekcja ultrafioletem – krytyczne spojrzenie na wzrost bakterii w sieci wodociągowej. *Informacja Instal.*, Nr 5:1-3.
79. Pinto A.J., Schroeder J., Lunn M., Sloan W., Raskin L., 2014. Spatial-temporal survey and occupancy-abundance modeling to predict bacterial community dynamics in the drinking water microbiome. *mBio*. 2014 May 27;5(3):e01135-14.
80. Raport Końcowy Projektu INNOTECH, 2016. Biologiczna stabilizacja mikrobiologii wody przeznaczonej do spożycia, INNOTECH – K2/N2/7/181844/NCBR/13.
81. Quintana J.B., Rodil. R., Lopez-Machina P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodrigues D., 2010. Investigation the chlorination of acidic pharmaceuticals and by product formation aided by an experimental design methodology. *Water Research* 44:243-255.
82. Rajca M., 2011. Zastosowanie procesu MIEX–DOC w połączeniu z mikro- i ultrafiltracją do oczyszczania wody. *Instal.*, Nr 12:61-64.
83. Rak J., 2013. Przegląd alternatywnych metod oczyszczania wody w sytuacjach kryzysowych. *Instal.*, Nr 7-8:69-72.
84. Rak J., 2013. Wybrane aspekty inżynierii bezpieczeństwa w systemach zbiorowego zaopatrzenia w wodę. *Instal.*, Nr 3:47-49.
85. Rak J., Boryczko K., 2013. Metoda zagrożeń ujęć wód podziemnych. *Instal.*, Nr 5:64-66.
86. Rak J., Studziński A., 2011. Ryzyko eksploatacji sieci wodociągowej. *Instal.*, Nr 5: 42-45.
87. Rak J., Studziński A., Studziński J., 2011. Bezpieczeństwo eksploatacyjne wodociągów publicznych. *Instal.*, Nr 1:56-60.
88. Rak J., Tchórzewska-Cieślak B., 2013. Analiza zagrożeń i ryzyka w łańcuchu wodociągowym. *Technologia Wody*, Nr 2 (22):14-18.
89. Rak J., Zamorska J. 2013. Nowe trendy w zarządzaniu bezpieczeństwem wody – programowanie mikrobiologiczne. *Technologia Wody*, Nr 3 (23):16-19.
90. Rak J.R., 2013. Przegląd alternatywnych metod oczyszczania wody w sytuacjach kryzysowych. *Instal.*, Nr 7-8:69-72.
91. Rak J.R., 2014. Zaopatrzenie w wodę w sytuacjach kryzysowych w ujęciu ilościowym. *Instal.*, Nr 1:65-69.
92. Ramm K., 2019. Mikrozanieczyszczenia to substancje biologicznie czynne. *Technologia Wody*, Nr 6:42-46.
93. Rowney N.C., Johnson A.C., Williams R.J., 2009. Cytotoxic drugs in drinking water: A prediction and risk assessment exercise for the Thames catchment in the United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28:2733-2743.
94. Rożej A., Aftyka A., 2013. Zmiany jakości mikrobiologicznej wody podczas stagnacji w instalacji wodociągowej budynku użyteczności publicznej. *Mat. z konferencji Instalacje Wodociągowe i Kanalizacyjne*. Wydaw. Seidel Przywecki. Warszawa, s. 45-54.
95. Rożej A., Kowalski D., Kowalska B., 2011. Wpływ stagnacji na jakość mikrobiologiczną wody w instalacji pilotażowej, wykonanej z tworzyw sztucznych (PCV, PE-HD, PEX). *Instalacje wodociągowe i kanalizacyjne – projektowanie, wykonanie i eksploatacja*.

96. Sawiniak W., Kotlarczyk B., Nadolska K., Matusiak M., 2012. Badania nad podwyższeniem jakości uzdatnianej wody w SUW Czaniec. Instal., Nr 4, s. 52-56.
97. Schmitt M., 2012. Memorandum IAWR w codziennej działalności firmy RheinEnergie. Instal., Nr 3, s. 38-41.
98. Schricks M., Heringa M.B., van der Kooi M.M.E., de Voogt P., van Wezel A.P., 2010. Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. Water Research, 44, pp. 461-476.
99. Simões M., Simões L.C., Vieira M.J., 2009. A Review of Current and Emergent Biofilm Control Strategies [Przegląd bieżących i nowych strategii kontroli biofilmu]. LWT-Food Science and Technology. Wydaw. Elsevier, Nr 43, s. 573-583.
100. Siński E., Bayer A., Toczyłowska B., 2007. Ryzyko skażenia wód naturalnych w Polsce pasożytami *Cryptosporidium* spp. Instal., Nr 5, s. 68-71.
101. Sitarska M., 2010. Biofilm w sieci wodociągowej, podatność wybranych wewnętrznych powierzchni rur na obrosty mikrobiologiczne. Praca Doktorska wykonana na Politechnice Wrocławskiej Wydziale Inżynierii Środowiska, s. 201 (dostępna w internecie).
102. Siwiec T., 2011. Straty ciśnienia przy przepływie wody przez warstwę podtrzymującą filtrów pośpiesznych. Instal., Nr 10, s. 66-70.
103. Sozański M., 2010. Kierunki i metody rozwoju technologii współczesnych zakładów uzdatniania wody. Instal., Nr 2, s. 4-10.
104. Sozański M., 2012. Procesy naturalne w rozwoju technologii uzdatniania wody (TUW). Gaz, Woda i Technika Sanitarna, Nr 3, s. 110-116.
105. Sozański M., Jeż-Walkowiak J., Weber Ł., 2011. Metodyka badań przydatności technologicznej materiałów filtracyjnych do oddzielania i odmanganiania wód podziemnych na przykładzie Chalcedonitu. Instal., Nr 10, s. 61-65.
106. Sroka M., Kulesza M., 2011. Flotacja ciśnieniowa jako proces wstępnego uzdatniania wody w Zakładzie Wodociągu Północnego Miejskiego Przedsiębiorstwa Wodociągów i Kanalizacji w m. st. Warszawie S.A. Instal., Nr 5, s. 19-23.
107. Stankiewicz A., Jamsheer-Bratkowska M., Maziarka D., 2018. Wysoka twardość wody przeznaczonej do spożycia a jej bezpieczeństwo dla zdrowia w świetle współczesnych badań. INSTAL, Nr 2, s. 52-54.
108. Szatkiewicz K., 2010. Co nowego w dyrektywie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Technologia Wody, Nr 1 (03), s. 40-43.
109. Szczotko M., Krogulska B., Krogulski A., Kurzatkowski W., Staniszevska M., 2011. Porównanie struktury i tempa wzrostu biofilmów powstających na powierzchni materiałów budowlanych kontaktujących się z wodą przeznaczoną do spożycia. Materiały z konf. Instalacje Wodociągowe i Kanalizacyjne – projektowanie, wykonanie, eksploatacja. Wyd. Seidel Przywecki, Warszawa, 31-42.
110. Szczotko M., Stankiewicz A., Jamsheer-Bratkowska M., Maziarka D., Krogulska B., 2010. Nowe wymagania higieniczne dotyczące wyrobów z tworzyw sztucznych kontaktujących

- się z wodą przeznaczoną do spożycia – badanie podatności na powstawanie obrostów biologicznych. Instal., Nr 12:48-52.
111. Traczewska T.M., Sitarska M., Biedroń J., 2014. Ekologiczne i techniczne aspekty powstania biofilmu w wodzie. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, s.102.
 112. Tchórzewska-Cieślak B., 2013. Analiza akceptacji kosztów redukcji ryzyka awarii systemów zbiorowego zaopatrzenia w wodę. Instal., Nr 3:50-53.
 113. Tchórzewska-Cieślak B., Rak J., 2007. Bezpieczeństwo informatyczne firmy wodociągowej. Instal., Nr 12:57-60.
 114. Toczyłowska B., 2011. Skuteczność uzdatniania wody pod kątem ochrony zdrowia ludzi przed pasożytami *Cryptosporidium*. Instal., Nr 12:56-60.
 115. Toczyłowska B., Rutkiewicz A. 2009. Pobieranie próbek w celu izolowania i identyfikowania oocyst *Cryptosporidium* spp. Instal. Nr 5: 18–21.
 116. Tomaszewski W., Wichrowska B., Parafińska K., Dawidowska W. 2012. Działania Głównego Inspektoratu Sanitarnego na rzecz bezpieczeństwa wody. Gaz, Woda i Technika Sanitarna. Nr 3:134-137.
 117. Tomaszewski W., Wichrowska B., Mulik B., Stankiewicz A., 2011. Woda a zdrowie. Instal., Nr 7-8:49-54.
 118. Tomczyk B., Kaźmierczuk M., Kalinowski R., Paczkowski S., Rybak J., 2016. Biofilm – źródło zagrożeń mikrobiologicznych w przemyśle, *Przemysł Chemiczny*, 95 (3):581-586.
 119. Traczewska T.M., Dziubek A.M., 2007. Testy przesiewowe w biomonitoringu jakości wody. Instal., Nr 5:72-74.
 120. Traczewska T.M., Sitarska M., 2009. Aspekty mikrobiologiczne stosowania materiałów polimerowych w systemach dystrybucji wody. Instal., Nr 4:38-41.
 121. Urbanowska A., Kabsch-Korbutowicz M., 2012. Naturalne związki organiczne w wodach i metody ich usuwania. Instal., Nr 6:44-49.
 122. Walczak R., 2012. Wpływ nagłych zmian parametrów jakościowych wody ujmowanej na modyfikacje technologii uzdatniania wody powierzchniowej. Instal., Nr 6:50-54.
 123. Wanot B., Goczór T., 2018. Wpływ instalacji wodociągowych na jakość wody konsumowanej oraz uboczne produkty uzdatniania wody. *Technologia Wody*, Nr 3(59):64-67.
 124. Weber Ł., 2010. Eksploatacja stacji uzdatniania wody podziemnej. *Technologia Wody*, Nr 3(5):48-52.
 125. Weber Ł., 2012. Usuwanie z wody żelaza oraz jonu amonowego. *Wodociągi – Kanalizacja*. Nr 3(97), 43-47.
 126. Weber Ł., Witkowski J., 2013. Podstawowe metody dezynfekcji wody, cz. 2. Dezynfekcja chlorem. *Technologia Wody*, Nr 4 (24):28-34.
 127. Weber-Dąbrowska B., Gworek B., Wowk J., 2008. Raport z badań pobranych próbek wody z 20 miejsc. Maszynopis.

128. Wichrowska B., 1994. Zanieczyszczenie wody do picia w przewodach wodociągowych w zależności od ich rodzaju. *Informacja Instal.*, Nr 4:7-11.
129. Wichrowska B., Bratkowski J., Jamsheer-Bratkowska M., Maziarka D., 2007. Nowelizacja rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Instal.*, Nr 11:28-31.
130. Wichrowska B., Mulik B., 2013. Zintensyfikowanie działań Głównego Inspektora Sanitarnego na rzecz wdrożenia Dyrektywy 98/83/WE. *Technologia Wody*, 2/2013, 26-29.
131. Wichrowska B., Mulik B., Parafińska K., Stankiewicz A., 2012. Techniczne aspekty w zarządzaniu bezpieczeństwem zdrowotnym wody, ze szczególnym uwzględnieniem instalacji wewnętrznych. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, Nr 3:123-129.
132. Wichrowska B., Mulik B., Stankiewicz A., 2011. Problemy z wdrażaniem Drinking Water Directive (DWD). *Instal.*, Nr 11:69-72.
133. Wichrowska B., Mulik N., Dawidowska W., Stankiewicz A., 2010. Komentarz nowelizacji rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 20 kwietnia 2010 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Instal.*, Nr 6:53-58.
134. Withey S., Cartmell E., Avery L.M., Stephenson T., 2005. Bacteriophages-potential for application in wastewater treatment processes. *The Science of the Total Environment*. 2005, No. 1;339(1-3):1-18.
135. Wolborska A., Cyran J., Senderecki P., 2009. Wpływ wymagań prawnych na decyzje technologiczne w uzdatnianiu wody. *Instal.*, Nr 4:32-37.
136. Wowk J., 2004. Biochemiczne uzdatnianie wody w zbiorniku reakcji z zawieszonym osadem czynnym. *Informacje naukowe i techniczne*. Wyd. SITWM, Warszawa, Nr 2(13):40-42.
137. Wowk J., 2010. *Naturalna technologia wody*. WNT, Warszawa; s. 131.
138. Wowk J., 2012. *Naturalna technologia wody. Nowe rozwiązania, pozyskiwania, uzdatniania i dostawy użytkownikom*. Wyd. WNT, s. 132.
139. Woźnica A., Łuszczycza P., Kwaśniewski M., Augustyniak M., Miguła P., Siudy A., Szlęk Z., 2011. Zastosowanie biotestów i biomarkerów molekularnych w ocenie stanu zbiornika zaporowego i przewidywania skutków dla jakości wody. *Instal.*, Nr 9:74-78.
140. Xu H.S., Roberts N., Singleton F.L., Attwell R.W., Grimes D.J., Colwell R.R., 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol.*, 1982 Dec; 8(4):313-23.
141. Zamorska J., 2013. Jakość bakteriologiczna wody w wybranych punktach sieci wodociągowej miasta Rzeszowa. *Instal.*, Nr 5:54-56.
142. Zibuschka F., 1996. Skłonność wody pitnej do zakwitania. Międzynarodowa Konferencja pt. *Zaopatrzenie w wodę miast i wsi*. Wyd. PZITS, Poznań, s. 497-508.
143. Zimoch I., 2008. Ryzyko zmian jakości wody w sieci wodociągowej w funkcji generowania THM-ów. *Instal.*, Nr 10:64-67.

144. Zimoch I., 2009. Czynniki kształtujące czas usuwania awarii sieci wodociągowej. Instal., Nr 6:50-52.
145. Zimoch I., Łobos E., 2008. Szacowanie poziomu stężenia trihalometanów w wodzie jako parametr operacyjny eksploatacji zakładu uzdatniania wody. Instal., Nr 6:50-53.

Spis rozporządzeń i norm

1. Dyrektywa 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 października 2000 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej.
2. Dyrektywa Rady 89/106/EWG z dnia 21 grudnia 1988 r. w sprawie zbliżenia ustaw, rozporządzeń i przepisów administracyjnych państw członkowskich dotyczących wyrobów budowlanych.
3. Dyrektywa Rady 98/83/WE z dnia 3 listopada 1998 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi.
4. ISO 15553:2006 Water quality – Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water.
5. ISO/PAS 22399:2007. Societal security – Guideline for incident preparedness and operational continuity management.
6. ISO/TC 224/WG7. Technical Committees ISO/TC 224 – Service activities relating to drinking water supply, wastewater and stormwater systems, Working Group 7.
7. Norma ISO/IEC 27005:2018 Technika informatyczna – Techniki bezpieczeństwa – Zarządzanie ryzykiem w bezpieczeństwie informacji (Information technology – Security techniques – Information security risk management).
8. PN-EN 805:2002 Zaopatrzenie w wodę. Wymagania dotyczące systemów zewnętrznych i ich części składowych.
9. Rozporządzenie Ministra Infrastruktury z dnia 12 kwietnia 2002 r. w sprawie warunków technicznych, jakim powinny odpowiadać budynki i ich usytuowanie (Dz.U. 2002 Nr 75, poz. 690 z późn.zm.).
10. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 27 listopada 2002 r. w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę do spożycia (Dz.U. 2002 Nr 61, poz. 1728).
11. Rozporządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 4 maja 1990 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie warunków, jakimi powinna odpowiadać woda do picia i na potrzeby gospodarcze (Dz.U. 1990 Nr 35, poz. 205).
12. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2015 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U. 2015 poz. 1989).

13. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 20 kwietnia 2010 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U. 2010 Nr 72, poz. 466).
14. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U. 2007 Nr 61, poz. 417).
15. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U. 2017 poz. 2294).
16. Ustawa Prawo Budowlane (Dz.U. 2003 Nr 207, poz. 2016 z późn. zm.).
17. Ustawa z dnia 16 kwietnia 2004 r. o wyrobach budowlanych (Dz.U. 2004 Nr 92, poz. 881).
18. Ustawa z dnia 18 lipca 2001 r. Prawo wodne (Dz.U. 2001 Nr 115, poz. 1229).
19. Ustawa z dnia 20 lipca 2017 r. Prawo wodne (Dz.U. 2017 poz. 1566).
20. Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. o odpadach (Dz.U. 2001 Nr 62, poz. 628); Ustawa z dnia 14 grudnia 2012 r. o odpadach (Dz.U. 2013 poz. 21).
21. Ustawa z dnia 7 lipca 1994 r. – Prawo budowlane (Dz.U. 1994 Nr 89, poz. 414, tekst jednolity).

3. BADANIA PILOTAŻOWE NAD OBECNOŚCIĄ BAKTERIOFAGÓW W WODACH WODOCIĄGOWYCH I W ŚCIEKACH

Postawiono hipotezę, że na skład mikrobiologiczny wody mogą mieć wpływ bakteriofagi. W celu potwierdzenia tej tezy zespół autorski **Weber-Dąbrowska, Gworek, Wowk** przeprowadził badania próbek wody pobranych w okresie 5.09-20.12.2008 z 20 miejsc. Badania wykonano w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN we Wrocławiu (IITD PAN) zgodnie z normą ISO 1075-2:2000. Namnażanie oraz miareczkowanie referencyjnego bakteriofaga *Escherichia coli* ϕ X174/DSM 13127 prowadzono zgodnie z normą EN ISO 10705-2:2001. Do każdorazowego badania kolejnych serii próbek wykonywano próbę ślepą (sterylny bulion Scholtensa) oraz kontrolę pozytywną z zawiesiną faga ϕ X174.

Posiewy bakteriologiczne wykonano dla wszystkich próbek oraz dokonano pełnej identyfikacji szczepów, a także określono wrażliwość na antybiotyki szczepów izolowanych z badanych 20 próbek.

Badania obecności fagów prowadzono w próbkach bezpośrednich oraz po ich namnożeniu. Do badań poszukiwania fagów wykorzystano łącznie 476 szczepów bakteryjnych z kolekcji Laboratorium Bakteriofagowego, w tym: 118 szczepów *Enterococcus faecalis*, 54 szczepy *Klebsiella pneumoniae*, 50 szczepów *Staphylococcus aureus*, 41 szczepów *Escherichia coli*, 35 szczepów *Acinetobacter baumannii*, 32 szczepy *Proteus mirabilis*, 24 szczepy *Enterobacter cloacae*, 22 szczepy *Enterococcus faecium* oraz *Citrobacter freundii*, 7 szczepów *Klebsiella oxytoca*, 6 szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, 5 szczepów *Serratia marcescens*, 3 szczepy *Aeromonas hydrophila*, po 2 szczepy *Comamonas testosteroni*, *Raoultella terrigena*, *Pseudomonas fluorescens* i *Proteus vulgaris*, a także po 1 szczepie z rodzaju *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Providencia*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Salmonella* oraz *Staphylococcus intermedius*, jak również 62 szczepy bakterii izolowanych z badanych próbek.

Wyniki badań zestawiono w tabeli 3.1.

Tabela 3.1

Wyniki badań bakteriologicznych oraz obecności bakteriofagów
w 20 przebadanych próbkach

Lp.	Miejsce poboru próby	Wyhodowane szczepy bakteryjne	Obecność fagów
1	Woda ze studni z okolic Wschowy	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus koagulazoujemny</i>
2	Wiejska stacja wodociągowa (Lisiec)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Flavobacterium indologenes</i> <i>Staphylococcus koagulazoujemny</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Serratia liquefaciens</i>
3	Ujęcie wody dla wodociągu w Pleszewie skażone ściekami przemysłowymi	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas putida</i>
4	Wiejska stacja wodociągowa w Lenartowie	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas fuorescens</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
5	Woda z rzeki w Górach Kaczawskich	<i>Serratia liquefaciens</i> <i>Moraxella lacunata</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
6	Woda wodociągowa w Chojnowie	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
7	Ujęcie wody w Chojnowie	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
8	Woda wodociągowa w Ożarowie Mazowieckim	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
9	Ścieki surowe z oczyszczalni w Pleszewie	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Raoultella terrigena</i> <i>Proteus penneri</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Comamonas testosteroni</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

10	Ścieki oczyszczone z oczyszczalni w Pleszewie	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Moraxella lacunata</i> <i>Providencia rettgeri</i> <i>Comamonas testosteroni</i> <i>Pantoea</i> sp.	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Comamonas testosteroni</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
11	Woda wodociągowa Białawy	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Yersinia alginolyticum</i>	-
12	Woda wodociągowa Moczydnica Klasztorna	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Staphylococcus koagulazoujemny</i>
13	Woda wodociągowa Turzany	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Staphylococcus koagulazoujemny</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
14	Woda z rzeki Łacha Wińsko	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Sarcina</i> sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
15	Woda z Wisły Warszawa	<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>
16	Woda wodociągowa z ujęcia Gruba Kaśka Warszawa	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	-
17	Woda wodociągowa z SUW Praga Warszawa	<i>Staphylococcus koag.ujemny</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
18	Woda podskórna z ujęcia indywidualnego	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-
19	Woda wodociągowa Osetnica	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
20	Woda wodociągowa Ziemienice	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Źródło: Weber-Dąbrowska i in. [2008].

W 15 badanych próbkach (1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 20) stwierdzono obecność czynnika hamującego całkowicie (próbki nr 3, 8, 9, 10, 17) lub częściowo (próbki nr 1, 2, 4, 5, 12, 13, 14, 15, 19, 20) wzrost szczepów bakteryjnych. Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną badanych próbek wykazano dla szczepów *Enterococcus faecalis* (próbki nr 1, 2, 3, 8, 9), *Enterococcus faecium* (próbka nr 3), *Escherichia coli* (próbki nr 9, 10),

Comamonas testosteroni (próbka nr 9), *Pseudomonas putida* (próbka nr 10) oraz *Pseudomonas fluorescens* (próbka nr 9).

Obecność bakteriofagów określono na podstawie typowej dla fagów lizy oraz obecności pojedynczych łyseinek fagowych.

Wykazano obecność bakteriofagów także m.in. dla szczepów: *Escherichia coli* (próbki nr 3, 5, 8, 9, 10, 15), *Klebsiella pneumoniae* (próbki nr 3, 8, 9, 10), *Enterobacter cloacae* (próbka nr 5), *Comamonas testosteroni* (próbki nr 9, 10), *Serratia liquefaciens* (próbki nr 2, 9, 10), *Pseudomonas fluorescens* (próbki nr 4, 9, 14, 17), *Pseudomonas putida* (próbka nr 3), *Citrobacter freundii* oraz *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella oxytoca* (próbki nr 9, 10), a także *Stenotrophomonas maltophilia* (próbki nr 9, 19).

W tabeli 3.2 przedstawiono wyniki obecności bakteriofagów w badanych próbkach z wykorzystaniem szczepów laboratoryjnych. Dane przedstawione w tab. 3.2 wykazują najczęstsze występowanie w badanych próbkach bakteriofagów *Enterococcus faecalis* oraz *Enterococcus faecium*.

Tabela 3.2

Obecność bakteriofagów wykazana dla szczepów laboratoryjnych w 20 badanych próbkach wody (Oznaczenia: +++ – całkowita liza; +++;+;+.. – całkowita liza ze słabym wtórnym wzrostem bakterii; +++..ol – całkowita liza z mocnym wtórnym wzrostem bakterii; ++ – 40-80 pojedynczych łyseinek; + 20 – 40 pojedynczych łyseinek; +/- – do 10 pojedynczych łyseinek; ++ol – ślad lizy)

Szczep/nr próbki	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>E. faecalis</i> 779			++ol							
<i>E. faecium</i> 838			++ol							
<i>E. faecium</i> 1037				++ol						
<i>E. faecalis</i> Liw			++ol							
<i>E. faecalis</i> 1015			+++..							
<i>E. faecalis</i> 1035			++ol							
<i>E. faecalis</i> 975	++ol	++ol	++ol	++ol						
<i>E. faecalis</i> Ziu			++ol	++ol						
<i>E. faecalis</i> 981	++ol		++ol	++ol						
<i>E. faecalis</i> 969			++ol							
<i>E. faecalis</i> 968			+++							
<i>E. coli</i> Pich					++ol					
<i>E. faecium</i> 937			++ol							
<i>E. faecium</i> 938			+++.							
<i>E. faecium</i> 939			+++..ol							
<i>E. faecium</i> 940			+++..ol							
<i>E. faecalis</i> 1066			++ol							
<i>E. coli</i> ESBL+1060									+/-	+++.
<i>Enterobacter</i> 1063					++ol					
<i>E. coli</i> Kor								+++..		+++..
<i>E. faecalis</i> Jel								+/-		
<i>E. faecalis</i>										
<i>E. coli</i> 871			++ol							
<i>Klebsiella</i> 879			++ol							
<i>Comamonas</i> 961									+++..	++
<i>Klebsiella</i> 1041									++	++
<i>Klebsiella</i> 1040								++	++	

cd. tabeli 3.2

<i>E. coli</i> 1062									+/-	
<i>E. coli</i> 1061									++	++
<i>E. faecalis</i> 1010			+++..						+/-	
<i>S. aureus</i> 27498			+/-							
<i>S. aureus</i> 27577					+/-					
<i>Aerom. hydrophila</i> 958									+	+
<i>S. aureus</i> 26836										
<i>S. aureus</i> 27501/1										
<i>Citr. freundii</i> 33B/2d									+	+
<i>E. coli</i> 1181 ESBL+									+	
<i>E. coli</i> 1182 ESBL+										++
<i>E. coli</i> DSM								+	+++	+++
<i>Kl. oxytoca</i> 1134									+/-	+/-
<i>E. coli</i> 1189									++	++
<i>E. coli</i> 1188										++
<i>E. faecalis</i> 1098		++ol							+/-	
<i>E. faecium</i> 1058				++ol						
<i>E. faecalis</i> 1094									+/-	
<i>E. coli</i> 963										++
<i>E. faecalis</i> 27643								+++	+/-	
<i>K. pneumoniae</i> 1195								+	+	
<i>K. pneumoniae</i> 1335									+	
Szczep/Nr próbki	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>E. faecalis</i> 779										
<i>E. faecium</i> 838										
<i>E. faecium</i> 1037										
<i>E. faecalis</i> Liw										
<i>E. faecalis</i> 1015										
<i>E. faecalis</i> 1035										
<i>E. faecalis</i> 975										
<i>E. faecalis</i> Ziu										
<i>E. faecalis</i> 981										
<i>E. faecalis</i> 969										
<i>E. faecalis</i> 968										
<i>E. coli</i> Pich										
<i>E. faecium</i> 937										
<i>E. faecium</i> 938										
<i>E. faecium</i> 939										
<i>E. faecium</i> 940										
<i>E. faecalis</i> 1066										
<i>E. coli</i> ESBL+1060					+/-					
<i>Enterobacter</i> 1063										
<i>E. coli</i> Kor										
<i>E. faecalis</i> Jel										
<i>E. faecalis</i>										
<i>E. coli</i> 871										
<i>Klebsiella</i> 879										
<i>Comamonas</i> 961										
<i>Klebsiella</i> 1041										
<i>Klebsiella</i> 1040										
<i>E. coli</i> 1062										
<i>E. coli</i> 1061										
<i>E. faecalis</i> 1010										
<i>S. aureus</i> 27498										
<i>S. aureus</i> 27577										

<i>Aerom. hydrophila</i> 958										
<i>S. aureus</i> 26836					++					
<i>S. aureus</i> 27501/1			+/-						+/-	+/-
<i>Citr. freundii</i> 33B/2d										
<i>E. coli</i> 1181 ESBL+										
<i>E. coli</i> 1182 ESBL+					+/-					
<i>E. coli</i> DSM										
<i>Kl. oxytoca</i> 1134										
<i>E. coli</i> 1189										
<i>E. coli</i> 1188										
<i>E. faecalis</i> 1098										
<i>E. faecium</i> 1058										
<i>E. faecalis</i> 1094										
<i>E. coli</i> 963										
<i>E. faecalis</i> 27643										
<i>K. pneumoniae</i> 1195										
<i>K. pneumoniae</i> 1335										

Źródło: Weber-Dąbrowska i in. [2008].

Tabela 3.3

Obecność bakteriofagów wykazana dla szczepów izolowanych z badanych próbek.
(Oznaczenia: +++ – całkowita liza; +++;+;+;+.. – całkowita liza ze słabym wtórnym wzrostem bakterii; +++..ol – całkowita liza z mocnym wtórnym wzrostem bakterii; ++ – 40-80 pojedynczych łysinek; + – 20-40 pojedynczych łysinek; +/- – do 10 pojedynczych łysinek; ++ol – ślad lizy)

Nr próbki	Szczep	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10	<i>Pseudomonas putida</i>			+++..ol							+++..
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>				++ol						
12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>									++ol	
14	<i>Pseudomonas fluorescens</i>									+++.	
8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>									++ol	++
13	<i>Pseudomonas fluorescens</i>										
2	<i>Staphylococcus koagulazo-ujemny</i>	++ol									
5	<i>Serratia liquefaciens</i> 1									+/-	
5	<i>Serratia liquefaciens</i> 2		+/-							++	+/-
15	<i>Enterobacter cloacae</i>									+	
Nr próbki	Szczep	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
10	<i>Pseudomonas putida</i>										
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>										
12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>										
14	<i>Pseudomonas fluorescens</i>							+++..ol			
8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>									++ol	

13	<i>Pseudomonas fluorescens</i>							+++..ol			
2	<i>Staphylococcus koagulazo-ujemny</i>		++ol	++ol			++ol				
5	<i>Serratia liquefaciens</i> 1										
5	<i>Serratia liquefaciens</i> 2										
15	<i>Enterobacter cloacae</i>										

Źródło: Weber-Dąbrowska i in. [2008].

Badania wykonane z wykorzystaniem szczepów bakteryjnych izolowanych z badanych próbek (tab. 3.3) wykazały obecność bakteriofagów w próbkach 1, 2, 3, 4, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 19 oraz 20 (tab. 3.2). Jedynie w trzech badanych próbkach (próbki nr 4, 10, 14) udało się wykazać obecność faga dla izolowanego z tej próbki szczepu bakterii (dla próbki nr 4 – fag *Pseudomonas fluorescens*; dla próbki nr 10 – fag *Pseudomonas putida*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae* oraz *Comamonas testosteroni*; dla próbki nr 14 – fag *Pseudomonas fluorescens*) (tab. 3.2).

Przeprowadzone badania udokumentowały obecność bakteriofagów łącznie w 15 z przebadanych 20 próbek wody. Najlepszym źródłem fagów z rodz. *Enterococcus* oraz *Staphylococcus* okazała się próbka nr 3 pobrana z ujęcia wody Tursko A dla wodociągu w Pleszewie, które historycznie zostało skażone ściekami z przemysłu spożywczego. Niezwykle interesujący jest fakt, że były to poza 2 wyjątkami wyłącznie bakteriofagi aktywne w stosunku do szczepów *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* oraz *Staphylococcus aureus*. Z kolei w próbce ścieków surowych, pobranych ze ścieków dopływających do oczyszczalni w Pleszewie (próbka nr 9), wykazano obecność fagów dla szczepów *Escherichia coli* (w tym szczepów ESBL +), *Klebsiella pneumoniae* i *Klebsiella oxytoca*, *Comamonas testosteroni*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* oraz *Enterococcus faecalis*.

Należy także podkreślić, że w próbce nr 10, stanowiącej ścieki oczyszczone pobrane z tej samej oczyszczalni ścieków, wykazano obecność wszystkich (poza jednym fagiem *Pseudomonas fluorescens*) bakteriofagów obecnych w próbce nr 9 (ścieki surowe, oczyszczalnia w Pleszewie), co wskazuje na fakt, że proces oczyszczania ścieków nie wpływa negatywnie na aktywność lityczną bakteriofagów. Obecności bakteriofagów nie wykazano tylko w 5 badanych próbkach (próbce nr 6, pobranej z wody wodociągowej w Chojnowie, próbce nr 7, pobranej z ujęcia wody dla Chojnowa, próbce nr 11, pobranej z wody wodociągowej w Białawach, próbce nr 16, pobranej z wody wodociągowej wodociągu warszawskiego (Gruba Kaśka), oraz próbce nr 18, pobranej z wód podskórnych ujęcia indywidualnego). Uzyskane wyniki wykazały, że poza 1 przypadkiem (próbka nr 18) pozostałe próbki były skażone głównie przez szczepy z rodz. *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oryzihabitans*). Należy podkreślić, że szczepy bakteryjne

wykorzystane do poszukiwania bakteriofagów pochodzące z kolekcji Laboratorium Bakteriofagowego zostały wybrane do badań losowo i wykazywały wrażliwość na większą liczbę swoistych bakteriofagów.

Przeprowadzone badania wykazały dość powszechne występowanie bakteriofagów zarówno w środowisku naturalnym (woda rzeczna), w ściekach surowych i oczyszczonych, jak i w wodzie pobranej bezpośrednio ze stacji uzdatniania oraz wodzie wodociągowej. Obecność fagów wykazano w 75% badanych próbek.

Najliczniej izolowanymi drobnoustrojami z badanych 20 próbek okazały się szczepy z rodzaju *Pseudomonas* (7 szczepów *Pseudomonas putida*, 11 szczepów *Pseudomonas fluorescens* oraz 1 szczep *Pseudomonas oryzae*).

Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowanie występowania bakteriofagów w badanych próbkach bezpośrednich oraz po ich inkubacji zarówno dla szczepów bakteryjnych izolowanych z badanych próbek, jak i szczepów diagnostycznych pochodzących z kolekcji laboratorium (tab. 3.4).

Tabela 3.4

Występowanie szczepów bakteryjnych w badanych próbkach

Szczep	Nr próbki
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 19, 20
<i>Pseudomonas putida</i>	1, 6, 7, 9, 10, 14, 16
<i>Aeromonas hydrophila</i>	3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4, 10, 20
<i>Citrobacter freundii</i>	1, 3, 19
<i>Pseudomonas oryzae</i>	1, 16
<i>Staphylococcus koagulazoujemny</i>	2, 17
<i>Hafnia alvei</i>	3, 7
<i>Serratia liquefaciens</i>	5, 20
<i>Moraxella lacunata</i>	5, 10
<i>Flavobacterium indologenes</i>	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9
<i>Raoultella terrigena</i>	9
<i>Proteus penneri</i>	9
<i>Providencia rettgeri</i>	10
<i>Yersinia alginolyticum</i>	11
<i>Comamonas testosteroni</i>	10
<i>Pantoea</i> sp.	10
<i>Burkholderia cepacia</i>	13
<i>Sarcina</i> sp.	14
<i>Alcaligenes faecalis</i>	15
<i>Serratia marcescens</i>	15
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	18

Zródło: Weber-Dąbrowska i in. [2008].

Wykazano obecność bakteriofagów dla szczepów *Serratia liquefaciens* (próbki nr 2, 9, 10), *Stenotrophomonas maltophilia* (próbki nr 9, 10), *Aeromonas hydrophila* (próbki nr 9, 10), *Citrobacter freundii* (próbki nr 9, 10) oraz *Staphylococcus aureus* (próbka nr 15) tylko w próbkach bezpośrednich. W próbkach badanych po inkubacji wykazano obecność bakteriofagów dla szczepów *Staphylococcus koagulazo-ujemny* (próbki nr 13, 15), *Pseudomonas fluorescens* (próbka nr 17), *Comamonas testosteroni* (próbki nr 9, 10) oraz *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* (próbka nr 3). Natomiast obecność bakteriofagów dla szczepów *Pseudomonas putida* (próbka nr 1), *Escherichia coli* oraz *Klebsiella pneumoniae* (próbka nr 10) stwierdzono zarówno w próbkach bezpośrednich, jak i po ich inkubacji (tab. 3.5).

Tabela 3.5

Występowanie bakteriofagów w 20 próbkach bezpośrednich oraz po ich inkubacji (Oznaczenia: +++ – całkowita liza; +++;+++.. – całkowita liza ze słabym wtórnym wzrostem bakterii; +++..ol – całkowita liza z mocnym wtórnym wzrostem bakterii; ++ – 40-80 pojedynczych lysinek; + – 20 -40 pojedynczych lysinek; +/- – do 10 pojedynczych lysinek; ++ol – ślad lizy)

Nr próbki	Szczep	Obecność bakteriofagów/ próbka bezpośrednia	Obecność bakteriofagów/ próbka po inkubacji
2	<i>Staphylococcus koagulazo-ujemny</i>	1 +++ol	1 -
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9 + 14 -	9 – 14 +++
5	<i>Serratia liquefaciens</i>	9 +/-	9 -
7	<i>Pseudomonas putida</i>	5 +++ol	5 -
8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9 + 10 + 19 -	9 – 10 – 19 +++ol
10	<i>Pseudomonas putida</i>	10 +/- 3 +++	10 +++ 3 -
12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4 -	4 +++
13	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	17 -	17 +++
14	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9 +/-	++
15	<i>Enterobacter cloacae</i>	9 +	9 -
16	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	4 +	4 -
Szczepy laboratoryjne			
	<i>E.coli</i> ESBL+ 1060	9 +/- 10 ++ 15 +/-	9 – 10 +++ 15 -
	<i>Comamonas testosteroni</i> 961	9 – 10 -	9 +++ 10 ++
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1041	9 ++ 10 ++	9 – 10 ++

Źródło: Weber-Dąbrowska i in. [2008].

Udokumentowano zróżnicowane właściwości biologiczne bakteriofagów i ich różną wrażliwość na czynniki środowiskowe. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że obecność bakteriofagów wykazano zarówno w badanych próbkach ścieków (surowych i oczyszczonych), jak i próbkach wody wodociągowej.

Proces oczyszczania ścieków nie eliminuje więc obecności bakteriofagów w odpływających wodach z badanej oczyszczalni, co może wpływać na dalszą ich aktywność bakteriobójczą.

Również proces uzdatniania wody w badanej technologii nie wpływał na eliminację bakteriofagów, ani też nie oddziaływał ujemnie na przydatność wody do celów spożywczych. To odkrycie pozwoliło sformułować założenia do dalszych badań w kierunku opracowania nowych technologii wykorzystujących naturalne procesy do poprawy składu mikrobiologicznego wód wodociągowych.

Spis literatury do rozdziału 3

1. Weber-Dąbrowska B., Gworek B., Wowk J. 2008. Raport z badań pobranych próbek wody z 20 miejsc. Maszynopis.

4. CHARAKTERYSTYKA I ZAŁOŻENIA METODYCZNE PRAC BADAWCZYCH NAD BIOLOGICZNĄ STABILIZACJĄ WODY PRZEZNACZONEJ DO SPOŻYCIA (PROJEKT BADAWCZY K2/IN2/7/18/844/NCBIR/13)

4.1. Cel projektu badawczego

Wstępne badania przeprowadzone przez **Weber-Dąbrowską i in. [2008]** (rozdział 3) wykazały obecność bakteriofagów w wodzie wodociągowej, natomiast nie udokumentowano w nich roli bakteriofagów w uzdatnianiu wody. W poszukiwaniu innych możliwości dezynfekcji wody, oprócz bakteriofagów, na podstawie dotychczasowych badań wykazano, że właściwości sorpcyjne i bakteriobójcze mają również biopolimery chitozanu – **Bhatnagar i in. [2009]**.

Podstawowym celem projektu było opracowanie technologii uzdatniania wody, której podstawą są naturalne procesy mikrobiologiczne oraz tzw. zielona chemia w miejsce stosowanych metod chemicznych i fizycznych, co pozwoli rozszerzyć stan wiedzy o dezynfekcji wody.

Założono, że badania obejmować będą sprawdzenie efektów usuwania mikroorganizmów chorobotwórczych z zastosowaniem bakteriofagów oraz polimerów chitozanu w warunkach laboratoryjnych i w skali półtechnicznej.

Przyjęto następujące cele cząstkowe:

- dokonanie oceny, w jakim zakresie i w jakiej formie bakteriofagi mogą być wykorzystane do poprawy składu mikrobiologicznego wód wodociągowych,
- ustalenie możliwości zastosowania złożów filtracyjnych z polimerów chitozanowych w procesie dezynfekcji wody,
- określenie możliwości wykorzystania bakterii hemolizujących typu beta jako wskaźnika sanitarnego jakości wód podziemnych.

Badania przeprowadzono w laboratoriach mikrobiologicznych i fizykochemicznych, na modelu stacji uzdatniania zainstalowanej w Stacji Uzdatniania Wody (SUW) w Broniszach koło Warszawy oraz w SUW w Grodzisku koło Pleszewa.

W pierwszym okresie fazy badawczej wykonano następujące działania:

- a) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu (IITD PAN) przygotowano zestaw swoistych bakteriofagów do wprowadzenia do modelu SUW,

- b) na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej przygotowano matrycę biopolimerową do zastosowania w modelu SUW,
- c) w Zakładzie Ekotoksykologii Instytutu Ochrony Środowiska – Państwowego Instytutu Badawczego opracowano i zwalidowano metodę ilościowego oznaczania bakterii hemolizujących w próbkach wody,
- d) zaprojektowano i wykonano model SUW ze zbiornikami reakcji z zawieszonym hydraulicznie osadem i filtrami otwartymi do impulsowego płukania złoża, z możliwością podawania bakteriofagów i bakterii, oraz zainstalowano matrycę biopolimerową ze strukturami chitozanowymi,
- e) przeprowadzono badania laboratoryjne i terenowe skuteczności uzdatniania wody pitnej na stacji w Broniszach z oceną jakości mikrobiologicznej i fizykochemicznej wody oraz próbek wody z pobranych z SUW w Grodzisku.

4.2. Krótkie studium piśmiennictwa związanego z tematyką projektu

Jednym z najważniejszych elementów stanowiących o czystości wody i jej przydatności dla człowieka jest jej czystość mikrobiologiczna. W zbiornikach wodnych powszechnie występują zarówno bakterie autochtoniczne, dla których woda jest naturalnym środowiskiem życia, jak i allochtoniczne, naniesione ze ścieków, opadów i odchodów. Właśnie ta druga grupa bakterii jest szczególnie niebezpieczna, ponieważ niesie ze sobą poważne zagrożenia epidemiologiczne, jak zakażenia *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* (czerwonka bakteryjna), *Vibrio cholerae* czy krętkami z rodzaju *Leptospira* – **Kunicki-Goldfinger [1994]; Dziubek [2003]; Smylla [2005]**. Według danych RWD 2000/60/WE z 2000 r., Polska należy do najuboższych w zasoby wodne krajów Europy. Ze względu na małe zasoby dyspozycyjne wód, niewielką możliwość ich magazynowania w zbiornikach retencyjnych (ok. 6% przeciętnego rocznego odpływu) oraz duży stopień zanieczyszczenia w wielu rejonach kraju występują deficyty wody pitnej.

Zanieczyszczenie wód płynących może sięgać wielu kilometrów i może sumować się z innymi zrzutami zanieczyszczeń do odbiornika lub jego dopływów. Ścieki lub zanieczyszczone wody powierzchniowe mogą przedostawać się do wód wglębnych, powodując obniżenie ich wartości jako źródeł zaopatrzenia w wodę ludności i przemysłu. Zasięg zanieczyszczenia może być przy tym bardzo duży, a kierunek rozprzestrzeniania się trudny do przewidzenia. W systemach o mocno zindustrializowanym rolnictwie (np. masowy chów kur, bydła lub świń) powstają lokalne problemy, które dają się rozwiązać tylko za pomocą działań technologicznych. Podstawowymi źródłami antropogenicznego zanieczyszczenia wód są ścieki odprowadzane przez gospodarkę komunalną miast i wsi oraz przez zakłady przemysłowe.

Istotny wpływ mają również spływy powierzchniowe. Zanieczyszczenia te dostarczają materii organicznej, która stanowi substrat odżywczy dla mikroorganizmów – **Bish i in. [2006]**. Mimo że postęp w gospodarce wodno-ściekowej wyeliminował epidemie wywołane przez skażenie bakteryjne wód, to jednak zagrożenie nie minęło, ponieważ nie został rozwiązany problem skutecznego unieszkodliwiania ścieków – **Langergraber i in. [2005]**.

Wraz z kałem człowiek i zwierzęta wydalają bakterie w olbrzymich ilościach, np.: średnio w 1 g odchodów człowieka znajduje się $1,3 \times 10^7$ komórek *E. coli* i 3×10^6 komórek *E. faecalis*, podczas gdy w 1 g odchodów kota występuje $7,9 \times 10^6$ *E. coli* i $2,7 \times 10^7$ paciorkowców; bydło hodowlane wydała $2,3 \times 10^4$ *E. coli* i $1,3 \times 10^6$ paciorkowców, a dzięki ptactwo wodne $3,3 \times 10^7$ komórek *E. coli* i $5,4 \times 10^7$ paciorkowców na 1 g wydaliny – **Smyłła i in. [2003]**. Klasyczne oczyszczalnie ścieków, nieprowadzące specyficznej dezynfekcji, redukują liczebność bakterii kałowych o 1-3 rzędy wielkości. Ponieważ skażenie wyjściowe ścieków surowych jest bardzo wysokie, bakterie kałowe są w olbrzymich ilościach odprowadzane z oczyszczonymi ściekami do środowiska. Narastanie zanieczyszczeń w środowiskach naturalnych, w tym wodnych, jest przyczyną coraz liczniejszego rozprzestrzeniania się również bakterii z rodzaju *Aeromonas*.

Bakterie te charakteryzują się wyższą od pałeczek *E. coli* odpornością na chlorowanie wody i mogą być indykatozem skażenia fekaliami wód mocno chlorowanych. W pewnych warunkach mogą wywoływać schorzenia ludzi i zwierząt oraz sprzyjać szerzeniu się epidemii. – **Zmysłowska i in. [2006]**. Stosowana obecnie w SUW dezynfekcja wody do picia (chlorowanie lub ozonowanie) jest źródłem wtórnego, chemicznego zanieczyszczenia wody, co powoduje powstawanie wielu nowych związków chemicznych – ubocznych produktów dezynfekcji (UPD). Są one niepożądane w wodzie do picia, na ogół szkodliwe dla zdrowia i zostały ocenione jako działające rakotwórczo, mutagennie, teratogennie. Są to przede wszystkim związki organiczne: trihalometany, kwasy halogenooctowe, MX chlorofenole, halogenonitryle, aldehydy i ketony, a także związki nieorganiczne: bromiany, chloryny i chlorany – **Dojlido [2002]**; **Sozański [2012]**. Wykrywanie tych substancji przez organizacje kontrolujące, np. stacje sanitarno-epidemiologiczne, wymaga skomplikowanych procedur badawczych, które są często kosztowne i długotrwałe.

Także metoda fizyczna polegająca na stosowaniu promieni UV nie gwarantuje czystości mikrobiologicznej wody, która podczas wprowadzania do sieci wodociągowej ponownie ulega skażeniu bakteryjnemu. Ogromna część zanieczyszczeń wody (szczególnie te rozpuszczone w niej) jest tradycyjnymi metodami po prostu nieusuwalna. W celu zapobiegania epidemiom stosuje się skuteczne dawki chloru do dezynfekcji wody. Jesteśmy zatem zmuszeni wypijać z wodą kranową setki związków chemicznych, których ilość przekracza dzisiaj do 1000 mg na 1 litr wody. Przy spożywaniu tych substancji w stężeniach większych niż dozwolone mogą nastąpić: uszkodzenie układu nerwowego, zmiana składu krwi, porażenia, uszkodzenia nerek i wątroby, a nawet choroby nowotworowe. W celu osiągnięcia biologicznej stabilności wody zaczęto stosować aktywne filtry węglowe, będące odpowiednikiem filtrów powolnych –

Sozański [2012]. Jest to proces naturalny, natomiast jego wprowadzanie jest kosztowne zarówno inwestycyjnie, jak i eksploatacyjnie. W badaniach wody studziennej, uznanej za przydatną do picia na podstawie wskaźnika kałowego, stwierdzono obecność pałeczek z rodzaju *Yersinia*, które są przyczyną wielu zachorowań na jersiniozę. Wskazuje to, że stosowany rutynowo wskaźnik *coli* może być niemiarodajny w przypadku wystąpienia bakterii *Yersinia* spp., które mogą przeżywać w wodzie powyżej 7 miesięcy – **Smylla [2005]**. Tylko znikoma część społeczeństwa (około 2%) ma dostęp do wód głębinowych. W 2003 r., podczas Światowego Dnia Środowiska, Organizacja Narodów Zjednoczonych ogłosiła (Press Release SG/SM/8707 OBV/348), że ponad 80% współczesnych chorób ma bezpośredni związek z jakością pitej wody. Przypadki epidemii z 2011 r. wywołanej enteropatogennymi szczepami *E. coli* (EHEC) jednoznacznie wskazują na odzwierzęce pochodzenie szczepów, z drugiej strony na brak pełnej skuteczności prowadzonej antybiotykoterapii, która – jak wykazały badania – była przyczyną niezwykle groźnych skutków ubocznych, co podawało w wątpliwość stosowanie antybiotyków w ogóle. Zanieczyszczanie wód naturalnymi nawozami i produktami odzwierzęcymi pochodzącymi z upraw i hodowli wciąż stanowi realne zagrożenie epidemiologiczne. Na podstawie analizy i oceny wyników badań obecności bakteriofagów w 20 próbkach wody – **Weber-Dąbrowska i in. [2008]** – jest wielce prawdopodobne, że w chwili obecnej jedyną alternatywą naturalnej technologii uzdatniania wody pozostają bakteriofagi.

Wstępne badania szczepów *E. coli* EHEC (w tym szczepu EHEC O104:H4 izolowanego od chorego z Niemiec podczas wspomnianej epidemii w 2011 r.), z wykorzystaniem bakteriofagów z banku Laboratorium Bakteriofagowego IITD PAN, wykazały pełną ich wrażliwość na kilka fagów *E. coli*. Uzyskane wyniki są realną podstawą do podjęcia działań wykorzystujących bakteriofagi do skutecznego eliminowania chorobotwórczych bakterii. Warto dodać, że oczyszczanie wód z wykorzystaniem bakteriofagów wydaje się w pełni bezpieczne. Bakteriofagi powszechnie występują w środowisku, również w organizmach ssaków (w tym człowieka). Z danych zespołu IITD PAN przedstawionych w sierpniu 2011 r. na 19. konferencji „Phage Biology Meeting” w USA (Evergreen State College, Washington) przez **Żaczek i in. [2011]** wynika, że bakteriofagi mogą być obecne w miejskich wodociągach dużych europejskich miast, wykazując tym samym odporność na fizykochemiczne metody oczyszczania wody pitnej. Przykład ten wyraźnie wskazuje na ciągły, bezpośredni kontakt człowieka z bakteriofagami. Naszym zdaniem zastosowanie bakteriofagów w celu oczyszczania mikrobiologicznego wód stanowi obiecującą alternatywę dla obecnie używanych metod. Zaobserwowane przypadki samoistnej dezynfekcji wody na licznych stacjach uzdatniania nie znalazły dotąd należytego opisu w publikacjach. W projekcie przeprowadzono badania mające na celu zgłębienie tej problematyki i ustalenie, czy samoistna dezynfekcja wody jest wynikiem obecności fagów.

Bardzo istotna dla przedsiębiorstw wodociągowych jest propozycja WHO dotycząca wdrożenia tzw. planów bezpieczeństwa wody. Plany te zakładają monitoring produkcji i dystrybucji wody od ujęcia aż do kranu konsumenta. Według WHO podstawowym celem

WSP w zapewnieniu pewności dostaw bezpiecznej wody jest minimalizacja zanieczyszczeń wody surowej, a następnie zapobieganie zanieczyszczeniom w procesie magazynowania i dystrybucji. Do realizacji pierwszego celu cząstkowego mają być wykorzystane właściwości płukanych impulsowo otwartych filtrów, tak aby na powierzchni ziaren piasku złoża tworzyła i utrzymywała się błona biologiczna (biofilm) zawierająca bakteriofagi uprzednio wyselekcjonowane w IITD PAN we Wrocławiu i wprowadzane do złoża.

Do sprawdzenia oddziaływania bakteriofagów na bakterie będą wykorzystane właściwości zarówno bakteriofagów, jak i matrycy biopolimerowej z chitozanem. Wybór chitozanu oraz chityny jako potencjalnych surowców do zastosowania w projekcie jest nieprzypadkowy i opiera się na wyjątkowych właściwościach tych szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie aminopolisacharydów. Oba biopolimery charakteryzują się bioaktywnością, nietoksycznością, biodegradowalnością, wysoką adhezyjnością, błono- i włóknotwórczością, zdolnością do chelatowania i wiązania jonów metali oraz substancji organicznych, a także właściwościami antibakteryjnymi – **Chung i in. [2004]**. W chwili obecnej podejmowane są już próby wykorzystania chityny oraz chitozanu w procesach oczyszczania wody i ścieków – **Rinaudo [2006]**. Ideą projektu jest jednak taka modyfikacja ww. aminopolisacharydów, by uzyskać materiał pozwalający na osadzenie na jego powierzchni fagów stanowiących aktywną część systemu bakteriobójczego przy zachowaniu wysokiej aktywności bójczej oraz sorpcyjnej matrycy. Rozwiązanie takie pozwoli na uzyskanie wysokosprawnych wielofunkcyjnych układów oczyszczających opartych całkowicie lub w dużej mierze na materiałach pochodzenia naturalnego. Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że możliwe jest wykorzystanie chitozanu do otrzymywania biokompozytów o pożądanym przez nas właściwościach mechanicznych – **Krzesińska i in. [2007]**, czyli materiałów porowatych o dobrze zdefiniowanej strukturze. Odpowiednia porowatość materiału zapewnia dobre (wymagane) właściwości transportowe, m.in. przenikalność, jak również dostępność dla czynników zewnętrznych. Odpowiednio dobrane pory pod względem wielkości i ich otwarty charakter pozwalają na otrzymanie biomimetycznych materiałów zawierających nisze, w których mogą kolonizować się i rozwijać mikroorganizmy – **Drury, Mooney [2003]; Discher i in. [2005]**. W tym celu stosowane są zarówno polimery pochodzenia naturalnego, jak np. kwas hialuronowy, alginiany, chitozan, kolagen, etery celulozy jak i polimery syntetyczne: polilaktyd, politlenek etylenu, polialkohol winylowy – **Drury, Mooney [2003]**. Materiały porowate o dobrze zdefiniowanej strukturze są przedmiotem licznych badań ze względu na ich potencjalne wykorzystanie w wielu dziedzinach, m.in. jako rusztowań w zastosowaniach biomedycznych i inżynierii tkankowej, nośników leków i substancji aktywnych o zmodyfikowanych profilach uwalniania, w chromatografii, filtracji i inżynierii materiałowej – **Wang i in. [2006]; Talha Gokmen i in. [2009]; Lee i in. [2010]; Xie i in. [2002]**.

4.3. Zespół badawczy

Interdyscyplinarny 27 osobowy zespół badawczy był kierowany przez dr. hab. inż. Andrzeja Eymontta, prof. Instytutu Technologiczno-Przyrodniczego – Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Warszawie. W badaniach uczestniczyły następujące jednostki badawcze:

- a) Instytut Technologiczno-Przyrodniczy – Państwowy Instytut Badawczy, O. Warszawa w składzie: prof. dr hab. inż. Krzysztof Wierzbicki, technik Michał Kuźniar,
- b) Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu: dr n. biol. Beata Weber-Dąbrowska, prof. dr hab. med. Andrzej Górski, mgr Maciej Żaczek, mgr inż. Barbara Owczarek, mgr Beata Dziedzic, mgr Marta Kejzik,
- c) Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Puławach: dr Romuald Gryko, dr Sylwia Parasion, dr Lidia Mizak, dr Magdalena Kwiatek, dr Aleksandra Nakonieczna,
- d) Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów Politechnika Śląska, Gliwice: mgr inż. Dorota Łacka, mgr inż. Małgorzata Gnus, dr inż. Roman Turczyn, dr inż. Artur Tórz,
- e) Katedra Biotechnologii Środowiskowej Politechniki Śląskiej, Gliwice: dr hab. inż. Anna Małachowska-Jutcz,
- f) Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa: dr inż. Radosław Kalinowski; dr Marcin Kazimierzczuk, mgr Szymon Paczkowski, prof. dr hab. Barbara Gworek,
- g) Firma Energoopt, Leszno Wlkp: mgr inż. Józef Wowk, dr inż. Jan Gutkowski, mgr inż. Sebastian Tomkowiak, mgr inż. Sylwia Miller,
- h) Instytut Technologiczno-Przyrodniczy Oddział Warszawa: mgr inż. Dorota Olejniczak.

4.4. Zakres prac realizowanych przez ITP Warszawa

Prace realizowane przez ITP Warszawa obejmowały:

- a) rozpoznanie i analizę istniejącego stanu odnośnie do stosowania dezynfekcji wody w przygotowaniu jej do spożycia;
- b) przygotowanie stanowiska badawczego w postaci modelu stacji uzdatniania wody ze zbiornikami reakcji z zawieszonym hydraulicznie osadem i filtrami otwartymi do impulsowego płukania złoża, tak aby była możliwość tworzenia się biofilmu w złożu bez jego całkowitej likwidacji w trakcie płukania. Planowana przepustowość modelu stacji uzdatniania ma wynieść $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Model stacji został umieszczony przy nieużytkowanym ujęciu wody w SUW w Broniszach w gminie Ożarów Mazowiecki. Woda z modelu stacji nie będzie użytkowana na potrzeby ludności. Model stacji został zaprojektowany przez przedsiębiorstwo

Energoopt, wspólnie z ITP Oddział w Warszawie, a wykonany przez firmę Gutkowski z Leszna. Model wyposażono w następujące zespoły:

- zespół służący do wprowadzania bakterii lub bakteriofagów do wody przed jej uzdatnieniem z możliwością separacji wody doprowadzanej ze złoża od zespołu wprowadzającego oraz separacji złoża od zespołu,
 - zespół wyposażony w wymienną matrycę biopolimerową, umieszczony za złożem filtracyjnym,
 - odcinek rurociągu będący odpowiednikiem rurociągu doprowadzającego wodę dla ludności z możliwością okresowego poboru próbek tworzących się w nim biofilmów przy różnych prędkościach przepływu wody,
 - miejsca poboru próbek wody bezpośrednio z ujęcia, ze stacji filtrów, za filtrami i przy końcu rurociągu tłoczego,
 - manometry rejestrujące ciśnienie wody podawanej do modelu stacji, wody do impulsowego płukania i wody transportowanej rurociągiem tłocznym,
 - przepływomierze rejestrujące ilość wody dopływającej do złoża filtrującego i odprowadzanej rurociągiem tłocznym,
 - rejestratory temperatury i pH wody surowej i po uzdatnieniu,
 - rejestrator czasu pracy modelu stacji i poszczególnych zespołów pomiarowych;
- c) prowadzenie badań mikrobiologicznych mających na celu obserwację i identyfikację procesu samooczyszczania się wody w środowisku naturalnym i z zastosowaniem „zielonej chemii”:
- dostarczenie bakterii i fagów służących do zasiedlania złoża filtracyjnego stacji modelowej opracowanych przez IITD PAN we Wrocławiu,
 - pobieranie próbek wody do badań z modelu stacji oraz innych, działających stacji uzdatniania na których występuje skażenie mikrobiologiczne, i ich dostarczenie w zależności od sytuacji do jednego z trzech ośrodków, to jest: IITD PAN we Wrocławiu, WIHE w Puławach, IOŚ PIB w Warszawie, natomiast próbki na obecność fagów badane tylko w IITD PAN,
 - badanie matryc biopolimerowych z chitozanem, dostarczanie ich do oceny przez Politechnikę Śląską,
 - dostarczanie próbek biofilmu ze złoża piaskowego do badań w IOŚ w Warszawie,
 - przeprowadzanie na bieżąco analizy wyników badań z uwzględnieniem kryteriów określających charakter i stopień skażenia wody;
- d) udział w opracowaniu wyników badań z uwzględnieniem ochrony własności przemysłowej, uzyskanej trakcie realizacji projektu, a następnie przygotowanie wspólnych publikacji w czasopiśmie recenzowanych i popularnonaukowych:
- organizacja seminariów i konferencji.

4.5. Metodyka badań bakterii i bakteriofagów prowadzonych przez IITD PAN

Badania zostały przeprowadzone z użyciem standardowych podłoży bakteriologicznych stałych i płynnych do hodowli, izolacji, identyfikacji drobnoustrojów oraz hodowli bakteriofagów. Badanie przynależności gatunkowej izolowanych szczepów bakteryjnych prowadzono z użyciem standardowych testów używanych do identyfikacji bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Dla bakterii Gram-dodatnich oznaczono obecność koagulazy związanej (test CF), zastosowano E-test dla oznaczania szczepów *Enterococcus* VRE oraz wankomycynoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (VRSA). Do identyfikacji bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae* wykorzystano aparat BD Crystal firmy Becton Dickinson. Do uzyskania jałowych preparatów fagowych zostały użyte standardowe zestawy filtrujące (Sartorius) oraz jednorazowe filtry przeciwbakteryjne o średnicy 0,22 μm (Millipore).

- Oznaczanie gęstości hodowli bakteryjnych na aparacie Densilometr II (Lachema).
- Izolacja fagów z prób pochodzących ze środowiska (ścieki surowe i oczyszczone, wody śródlądowe i morskie, przesącze z materiałów biologicznych) według metodyki opracowanej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu. Wykonanie: płynne próbki środowiskowe zostały przesączone przez filtry bakteriologiczne ϕ 0,22 μm i zmieszane w proporcji 1:1 z płynnym podłożem odżywczym (np. bulion cukrowy). Do 10 ml próby zostało dodane 0,1 ml młodej hodowli bakteryjnej. Całość została dokładnie wymieszana, a następnie inkubowana w 37°C przez 1 godz. Pobrano 0,2 ml mieszaniny, którą następnie rozprowadzono głaszczką po powierzchni płytki z podłożem fagowym lub francuskim. Każdą próbę wykonano w 2 powtórzeniach. Próbki inkubowano 18 godz. w temp. 37°C. Następnie przeprowadzono obserwację uwzględniającą pojawienie się łysinek. Jeżeli powierzchnie łysinek zlewały się ze sobą (duże miano faga w próbie), próba pierwotna po przesączeniu została rozcieńczona 2, 5 i 10x. Łysinki o podobnej wielkości (obserwacja na 2 płytkach) przeniesiono do probówki z 5 ml bulionu cukrowego, a następnie dodano 1 kroplę hodowli bakteryjnej. Całość dokładnie wymieszano. Próba kontrolna: 5 ml bulionu + kropla hodowli bakteryjnej. Próbki inkubowano w temp. 37°C 18 godz. lub do wystąpienia wyraźnego przejaśnienia próby. Następnie próbki odwirowano 30 min, 4,5 tys. obr/min. Przygotowano płytki z agarem z naniesionym szczepem bakteryjnym (murawa), na które naniesiono kilka kropel odwirowanej próby. Płytki inkubowano w temp. 37 °C, czas – w zależności od rodzaju szczepu bakteryjnego. W celu uzyskania czystej linii fagowej reizolacje łysinek powtórzono 5-krotnie. Uzyskany supernatant odwirowanej próby przesączone przez filtr bakteriologiczny. Ostatnim krokiem było oznaczenie miana faga.
- Określenie wrażliwości szczepów bakteryjnych na swoiste bakteriofagi oraz charakterystyka fagów.

Wykonanie według standardowych technik – **Adams [1959]**. Na wysuszone i pokryte „murawą” badanego szczepu płytki naniesiono kroplę lizatu fagowego (na płytce nie

powinno być umieszczonych więcej niż 7 oznaczeń) na oznaczone pola. Płytki pozostały otwarte w temperaturze pokojowej na ok. 10-15 min, aż kropla wnuknie w podłoże na płytce. Po zamknięciu, płytki umieszczono w pojemniku w pozycji dnem do góry, po czym inkubowano je w temp. 37°C od 3 do 5 godzin, w zależności od badanego szczepu bakterii. Po inkubacji płytki przestawiono do chłodni na ok. 12 godzin.

- Określenie aktywności litycznej fagów (metoda Adamsa oraz technika płytek dwuwarstwowych według Gratia). Wykonanie: przygotowano płytki z „murawą” szczepu bakteryjnego: w 10 ml bulionu wykonano zawiesinę bakterii ok. 1 w skali McFarlanda i inkubowano w temp. 37°C przez 3 godz. Zawiesinę wylano na płytkę, a następnie zlewano nadmiar hodowli. Płytki suszono otwarte w pozycji dnem do góry w 37°C ok. 1 godz. Przygotowanie rozcieńczeń faga: w bulionie wykonano rozcieńczenia faga metodą kolejnych rozcieńczeń od 10⁻¹ do 10⁻¹⁰, przy czym końcowa objętość próby nie powinna być mniejsza niż 1 ml. Na płytkę naniesiono po 20 µl kolejnych rozcieńczeń faga i pozostawiono do wyschnięcia. Płytki inkubowano w temp. 37°C przez 3-5 godz., w zależności od rodzaju szczepu, i obliczono miano faga (liczba cząstek fagowych w 1 ml lizatu).

Plon fagów badano według metody **Chang H.-Ch. i in. [2005]** i **Pajunen i in. [2000]** z modyfikacją własną. Objętość 20 ml całonocnej hodowli bakteryjnej w bulionie cukrowym odwirowywano przez 15 min przy 3000 obr/min. Osad zawieszony oznaczono w 10 ml bulionu cukrowego. Zmierzono OD 600 nm-0,5, co odpowiada ok. 7x10⁸ kom/ml. Do badań zastosowano faga o mianie ok. 7x10⁶/ml. Hodowlę bakteryjną doprowadzono do miana 7x10⁶/ml. W doświadczeniu zastosowano MOI =1, czyli użyto 10 ml faga o mianie 7x10⁶/ml i 10 ml zawiesiny bakteryjnej w liczbie ~7x10⁶/ml, po czym mieszaninę inkubowano w 37°C przez 1 godz. Natychmiast pobrano próbkę 1,5 ml i dodano 0,6 ml 1% chloroformu (odstawiane na 10 min w temp. pokojowej), odstawiano do lodówki, przesączano, a następnie mianowano metodą Gratia (w dwóch powtórzeniach). Kolejne próbki pobierano po 1,5 ml co 5 min. przez 1 godz., dodawano 0,6 ml 1% chloroformu i odstawiano po 10 min do lodówki, przesączano i mianowano metodą Gratia (w dwóch powtórzeniach).

4.6. Metodyka wykonania i badań matryc z biopolimerów prowadzonych przez Politechnikę Śląską

Materiały porowate wytwarza się m.in. metodą *template polymerization*, polegającą na otrzymywaniu polimerów w obecności matrycy, którą może stanowić inny polimer lub substancje niskocząsteczkowe (*molecular templation*). Matrycę usuwa się po procesie otrzymywania polimeru z jego struktury. Substancje te stanowią swoisty porogen. Jako substancje porogenne można stosować również mieszaniny różnych rozpuszczalników lub obojętne gazy, np. azot lub dwutlenek węgla. Gazy stosuje się jako substancje porogenne

w procesie spieniania w fazie stałej (*solid-state foaming*). Proces ten polega na rozpuszczaniu/sorpcji gazu w polimerze i następczej desorpcji/spienianiu w podwyższonej temperaturze. Zastosowanie dodatkowego czynnika w postaci ultradźwięków pozwala zmienić strukturę przez zniszczenie ścian pomiędzy porami. Materiały porowate można otrzymać również w fizycznym procesie wymrażania, polegającym na adsorpcji rozpuszczalników w ich strukturze, np. wody lub acetonu, i następczym wymrażaniu w niskich temperaturach. Desorpcja w temperaturze pokojowej prowadzi do wzrostu porowatości polimeru. Materiały o zróżnicowanej porowatości można otrzymywać w procesie sieciowania międzycząsteczkowego w zawieszynie porowatych mikrosfer polimeru/nośnika nieorganicznego, prowadzącym do otrzymania monolitu z usieciowanych powierzchniowo ziaren o odmiennej porowatości wynikającej z przestrzeni międzyziarnowych. Metodą poprawy własności otrzymanej matrycy będzie jej modyfikacja przez kontrolę ilości i rodzaju grup funkcyjnych – transformację grup hydroksylowych do ugrupowania karbonylowego, tiolowego czy hydrazynowego oraz zmianę stopnia deacetylacji. Wprowadzenie dodatkowego łańcucha/”*spacera*” oraz stosowanie odpowiednich syntetycznych wypełniaczy, np. włókien, nanocząsteczek lub nanorurek, umożliwi regulację wielkości niszy tworzących się w matrycy, pozwalając dostosować je do rozmiarów komórek mikroorganizmów w niej umieszczonych. Reakcje te będą prowadzone drogą klasycznej syntezy chemicznej oraz z wykorzystaniem metod sonochemicznych. Informacje dotyczące struktury otrzymanych składników matrycy uzyskano znanymi metodami spektroskopowymi: NMR ^1H i ^{13}C , UV-VIS, FT-IR, FT-Raman i EPR. Umożliwiło to przeprowadzenie rutynowych analiz mających na celu określenie charakteru i zawartości grup funkcyjnych w łańcuchu i na jego końcach oraz określenie wielkości ciężarów cząsteczkowych (VPO, SEC). Budowę otrzymanych związków określono metodami spektroskopowymi (FTIR, FT-Raman, NMR), a zwłaszcza spektrometrii masowej (ESI-MS oraz MALDI-ToF MS). Próbkę matrycy badano Ramanowskim mikroanalizatorem powierzchni oraz technikami mikroskopowymi SEM/TEM oraz STM/AFM.

4.7. Metodyka badań prowadzonych przez WIHE, Oddział w Puławach

Ze względu na swoje niezwykle właściwości biologiczne chitozan znalazł szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, jak medycyna, przemysł farmaceutyczny, rolniczy, spożywczy czy kosmetyczny, zarówno w postaci kompleksów z innymi naturalnymi polimerami, jak i samodzielnie – **Kong [2010]**. Chitozany są nietoksyczne, hipoalergiczne, ponadto w porównaniu z syntetycznymi polimerami, tak dziś powszechnymi w przemyśle, chitozany (oraz ich pochodne) jako pseudonaturalne polimery są biodegradowalne oraz cechują się biozgodnością z żywymi organizmami – **Kumar [2000]**.

Kluczową rolę w aktywności przeciwbakteryjnej odgrywają oddziaływania długich, polikationowych łańcuchów chitozanu z ujemnie naładowanymi fosfolipidami ścian komórek bakterii, co prowadzi do zniszczenia ich struktury i uwolnienia substancji wewnątrzkomórkowych, a tym samym śmierci bakterii – **Zivanovic [2005]**. Również ważną właściwością chitozanów jest ich zdolność do chelatowania jonów metali dwuwartościowych (np. cynku, niklu, żelaza, miedzi, kobaltu) w warunkach niskiego pH za pomocą grup – NH₂. Jako że wiązanie metali przez ściany komórkowe bakterii jest kluczowe dla utrzymania ich stabilności, przypuszcza się, że chelatowanie może leżeć u podstaw aktywności przeciwbakteryjnej chitozanów – **Kong [2010]**. Dokładny mechanizm działania nie został jednak jeszcze całkowicie poznany – **Rinaudo [2006]**.

Pewne hipotezy zakładają także, że rozpuszczalny chitozan o małej masie cząsteczkowej w postaci nanocząstek może przenikać do wnętrza komórek bakteryjnych i zaburzać procesy syntezy mRNA oraz transkrypcji DNA, natomiast wielkocząsteczkowy rozpuszczalny oraz stały chitozan (np. w formie dużych nanocząstek) oddziałuje tylko z powierzchnią komórek, zmieniając ich przepuszczalność – **Kong [2010]** lub tworząc wokół nich nieprzepuszczalny płaszcz blokujący transport niezbędnych substancji – **Eaton [2008]**.

Mechanizm działania jest różny dla bakterii G⁺ i G⁻, co wynika z różnic w budowie ich ścian komórkowych. Ma na to jednak również wpływ masa molekularna chitozanu, jako że wykazano, że zwiększenie MW zwiększa aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii G⁺, a zmniejszenie zwiększa aktywność wobec bakterii G⁻ – **Zheng [2003]**.

W prowadzonych przez WIHE badaniach określano efekt bakteriobójczy otrzymywanych preparatów chitozanów (z Politechniki Śląskiej) w stosunku do bakterii dodawanych do wody: *Escherichia coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Enterococcus faecalis* ATCC 49523, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Bacillus subtilis* 6633 (endospory), *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 (endospory).

W warunkach laboratorium BSL-3 badano wpływ chitozanów na bakterie patogenne: *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae* i *Francisella tularensis*.

Bakterie z rodz. *Escherichia* i *Enterococcus* były namnażane na podłożu Tryptone Soya Broth (TSB) 24 godz., wirowane i przemywane trzykrotnie jałową wodą destylowaną. Wodną zawiesinę komórek bakteryjnych mianowano, stosując posiewy zalewowe na podłożu TSA (Trypticasein Soy Agar – Biocorp) z rozcieńczeń dziesiętnych.

Endospory laseczek tlenowych otrzymywano, namnażając szczepy na podłożu TSB w kolbie 500 ml w temp 37°C w termowyrzășarce o częstotliwosci 120/min przez 10 dni, następnie wirowano, osad dwukrotnie przemywano wodą destyl., zawieszano w 20 ml H₂O i dodawano etanol do stęż. 70%. Po 24 godz. wirowano, osad zawieszano w wodzie dejonizowanej i tak przygotowane endospory przechowywano w chłodni (6-8°C). Przed użyciem każdorazowo preparat mianowano. Próby wody pobierano jałowo do wysterylizowanych butelek laboratoryjnych o pojemności 1000 ml. Liczbę *E. coli* fekalnych, bakterii z grupy coliform i enterokoków określano w 100 ml. Badaną wodę sączono na

3-stanowiskowym aparacie Milipore (EZ-STREAMTM Pump), używając filtrów Milipore 0,45 µm. Filtry kładziono na płytki Petriego z podłożami: Fecal Coliforms z dodatkiem kwasu rozolowego (Biocorp), Podłoże ENDO (BTL), Slanetz and Bartley Lab-AgarTM. Do liczenia *E. coli* po skażeniu wody szczepami referencyjnymi używano podłoża McConkey Agar (Biocorp). Do oznaczania ogólnej liczby bakterii używano Yeast Extract Lab-AgarTM (Biocorp). Płytki z filtrami w kierunku fekalnych *E. coli* (FC i Endo) inkubowano w temp. 44°C przez 24 godz., a w kierunku bakterii z grupy *E. coli* (FC i Endo) w 37°C przez 24 godz. Płytki z filtrami w kierunku oznaczania liczby enterokoków inkubowano w temp. 37°C przez 24-48 godz. Płytki z podłożem Yeast Extract Lab-Agar posiane zalewowo inkubowano w temp. 36°C przez 44 godz. oraz w temp. 22°C przez 68 godz. (w kierunku bakterii mezofilnych i psychrofilnych).

Badanie wody skażonej endosporami *Bacillus spp.* – Próby wody ogrzewano 15 min w temp. 80°C i posiewano zalewowo na podłoże TSA. Inkubowano 24-48 godz. w temp. 37°C. Posiewy z użyciem filtrów były wykonywane bądź to w Broniszach w miejscu pobierania prób, bądź w laboratorium WIHE w Puławach (transport trwał 2-2,5 godz.). Posiewy zalewowe wykonywane były w Puławach. Jako wypełnienie kolumny początkowo stosowano chitozan naturalny (biały), a po stwierdzeniu braku jego wyraźnego działania bakteriobójczego – chitozan Ag (skompleksowany ze srebrem). Stosowano różne prędkości przepływu wody, zarówno z góry na dół filtra, jak i z doły do góry. W końcowym etapie doświadczeń stosowano płuczkę z chitozaniem (zamiast filtra).

Otrzymane chitozany badano także w warunkach laboratoryjnych. Do probówek typu Falcon (50 ml) odważano po 1 g chitozanu i wlewano po 20 ml zawiesiny bakterii w wodzie źródlanej jałowionej przez sączenie. Probówki umieszczano na kołysce laboratoryjnej (60 wahnięć/min) i posiewano po 1 ml zalewowo na TSA po 5, 15, 30 i 60 min oraz inkubowano w 37°C przez 24-48 godz. W przypadku bakterii chorobotwórczych badanie przeprowadzano w laboratorium BSL-3.

4.8. Metodyka badania prowadzonych przez Instytut Ochrony Środowiska w Warszawie

Przyjęte do realizacji zadanie wykonywano równolegle z innymi pracami w ramach projektu. Część badawcza polegała na opracowaniu metody izolowania i stosowania bakterii hemolizujących typu beta, co stanowi niezależną całość. Bakterie hemolizujące typu beta w próbkach wykrywano metodą posiewu powierzchniowego na wybrane podłoże agarowe zawierające dodatek krwinek baranich. Wzrost bakterii hemolizujących w postaci charakterystycznych obszarów przejaśnień wokół kolonii na podłożu można stwierdzić już po upływie 1 doby podczas inkubacji w temp. 37°C. Wynik podano jako obecność jtk ze strefą hemolizy typu beta. Dodatkowo wykonano barwienia metodą Grama w celu przeprowadzenia

wstępnego zróżnicowania bakterii na podstawie cech morfologicznych oraz powinowactwa chemicznego ściany komórkowej.

Realizację zadania wykonano według następującego harmonogramu:

Etap I

- przegląd piśmiennictwa na temat: bakterii hemolizujących typu beta oraz związków zjawiska hemolizy z innymi cechami tych bakterii, np. patogenność, toksyczność, zjadliwość, wirulencja, lekooporność,
- badania wstępne dotyczące stwierdzenia obecności bakterii hemolizujących typu beta w próbkach wody powierzchniowej, ścieków oczyszczonych i w miarę możliwości innych próbkach, np. wodzie z basenu itp.,
- badania wstępne dotyczące stwierdzenia obecności bakterii hemolizujących typu beta w próbkach wody uzdatnionej przeznaczonej do celów konsumpcyjnych,
- uzyskanie czystej kultury populacji bakterii hemolizujących typu beta,
- określenie cech morfologicznych bakterii hemolizujących typu beta z zastosowaniem różnicującego barwienia złożonego metodą Grama.

Etap II

- wykonano badania kontrolne skuteczności higienizacyjnej (dezynfekcji) zastosowanych procesów i metod uzdatniania z wykorzystaniem opracowanego testu. Próbkę wody po uzdatnieniu metodami i procesami wynikającymi z programu realizowanego projektu badano po dostarczeniu przez współwykonawców projektu. W tym etapie przeprowadzono badanie próbek wody skażonej różnego rodzaju bakteriami, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii hemolizujących typu beta, uzdatnionej przez zastosowanie bakteriofagów i/lub chitozanu.

Spis literatury do rozdziału 4

1. Adams M.H. Bacteriophages. 1959. New York, NY; Interscience Publishers, Inc.
2. Bassi R., Prasher S.O., Simpson B.K., 1999. Effects of Organic Acids on the Adsorption of Heavy Metal Ions by Chitosan Flakes. *J. Environ. Sci. Health Part A*, A34, 289-294.
3. Benhabiles M.S., Salah R., Lounici H., Drouiche N., Goosen M.F.A., Mameri N., 2012. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste, *Food Hydrocolloids* 29, 48-56.
4. Bhatnagar A., Sillanpää M., 2009. Applications of chitin – and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater – a short review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 152(1-2):26-38.
5. Bish J.P., Pendyal A., Ding L., Ferrante H., Nguen V., McDonald-McGinn D. et al., 2006. Specific cerebellar reductions in children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Neuroscience Letters*, 399 (3), 245-248.

6. Chang H.-Ch., Chen Ch.-R., Lin J.-W., Shen G.-H., Chang K.-M., Tseng Y.-H., Weng S.-F., 2005. Isolation and characterization of novel giant *Stenotrophomonas maltophilia* phage ϕ SMA5. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3, 1387-1393.
7. Chen Y.M., Chung Y.Ch., Wang L.W., Chen K.T., Li S.Y., 2002. Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen, *J. Environ. Sci. Health, Part A*, 37, 1379-1390.
8. Chung Y.C., Su Y.P., Chen C.C., Jia G., Wang H.L., Wu J.C., Lin J.G., 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin.*, 25 (7), 932-6.
9. Chung, Y.C., Chen, C.Y., 2008. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan, *Bioresource Technol.*, 99, 2806-2814.
10. De Alvarenga E.S., Pereira de Oliveira C., Bellato R.C., 2010. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan, *Carbohydr. Polym.* 80, 1155-1160.
11. Discher D.E., Janmey P., Wang Y.L., 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310, 1139.
12. Dojlido J. (red.), 2000. *Uboczne produkty dezynfekcji wody*. Wyd. PZITS, Warszawa, s. 56.
13. Drury J.L., Mooney D.J., 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, p. 4337-51.
14. Dyrektywa 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 października 2000 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej. *Ramowa Dyrektywa Wodna (The EU Water Framework Directive)*.
15. Dziubek Z. (red.), 2003. *Choroby zakaźne i pasożytnicze*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, s. 540.
16. Gnus M., Dudek G., Turczyn R., Tórz A., Łącka D., Konieczny K., Łapkowski M. 2015. Pervaporative investigation of ethyl alcohol dehydration. *Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv.* XX, p. 54-63.
17. El-Geundi M.S., 1997. Adsorbents for Industrial Pollution Control, *Adsorpt. Sci. Technol.* 15, 777-787.
18. Fideles T.B., Santos J.L., Tomás H., et al., 2018. Characterization of Chitosan Membranes Crosslinked by Sulfuric Acid. *Open Access Libr. J.* 05, 1-13.
19. Kołwzan B., 2011. Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochrona Środowiska*, nr 4 (33), s. 3-14.
20. Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J., 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63.
21. Krzesińska M., Tórz A., Zachariasz J., Muszyński J., Socha J., Marcinkowski A., 2007. New chitosan/CEG (compressed expanded graphite) composites – preparation and physical properties. *Green Chemistry*, Issue 9, 2007:842-844.
22. Kumar M.N.R., 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1), 1-27.

23. Kunicki-Goldfinger W., 1994. *Życie bakterii*. PWN Warszawa, wyd. 4, s. 618.
24. Langergraber G., 2005. The role of plant uptake on the removal of organic matter and nutrients in subsurface flow constructed wetlands – A simulation study. *Water Science and Technology*, 51 (9), pp. 213-223.
25. Lee W., Lee V., Polio S., Keegan P., Lee J-H., Fischer K., Park J-K., Yoo S-S., 2010. On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels. *Biotechnol. Bioeng.* 105(6):1178-86
26. Petrovski S., Batinovic S., Rose J.J., Seviour, R.J., 2022. Biological control of problem bacterial populations causing foaming in activated sludge wastewater treatment plants – phage therapy and beyond. *Lett. Appl. Microbiol.* Accepted Manuscript. DOI: 10.1111/lam.13742.
27. Ravi D., Sivasankara P., 2001. Flocculation of Kaolinite Suspensions in Water by Chitosan, *Wat. Res.* 35;3904-3908.
28. Rinaudo M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, Volume 31, Issue 7, July 2006:603-632.
29. Roller S., Covill N., 1999. The Antifungal Properties of Chitosan in Laboratory Media and Apple Juice, *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 67-77.
30. Sahariah P., Måsson M., 2017. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship, *Biomacromolecules* 18;3846-3868.
31. Sebti I., Martial-Gros A., Carnet-Pantiez A., Grelier S., Coma V., 2005. Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against *Aspergillus niger* Contamination, *J. Food Sci.*, 70, M100-M104.
32. Smyła A., 2005. Zagrożenia bakteryjne wód powierzchniowych. VII Ogólnopolska sesja popularnonaukowa „Środowisko a zdrowie – 2005”. Częstochowa, 2-3.06.2005. Wyd. DCZG, s. 113-128.
33. Smyła A., Piotrowska-Seget Z., Tyflewski A., 2003. Pathogenic bacteria hazard in surface. *Walters. AUMC Limnological Papers*, Toruń. XIII, z. 110: 159-169
34. Sozański M. 2012. Procesy naturalne w rozwoju technologii uzdatniania wody (TUW). *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, Nr 3, s. 110-116.
35. Szumilas T., Michalska M., Bartoszewicz M., 2001. Charakterystyka bakteryjnego zanieczyszczenia ścieków komunalnych z dużej aglomeracji miejskiej i ocena stopnia redukcji tego zanieczyszczenia w procesie biologicznego oczyszczania ścieków. *Roczn. PZH*, 2001 (52), nr 2, s. 155-164.
36. Talha Gokmen M., van Camp W., Colver P.J, Bon S.A., Du Prez F., 2009. Fabrication of Porous “Clickable” Polymer Beads and Rods through Generation of High Internal Phase Emulsion (HIPE) Droplets in a Simple Microfluidic Device. *Macromolecules* 42, 9289-9294.

37. Tórz A., Łącka D., Turczyn R., Gnus M., 2015. The investigations on process type influence on methyl violet adsorption on chitin and chitin deacetylation products. *Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv.* XX, pp. 273-280.
38. Vandenaabeele J., 1993. Manganese-removal by microbial consortia from rapid sand filters treating water containing Mn^{2+} and NH_4^+ . *Rozprawa doktorska*. Uniwersytet Gent, Belgue.
39. Wang G.-J., Hsu Y.-F., Hsu S.-H., Horng R., 2006. JSR photolithography based microvessel scaffold fabrication and cell seeding. *Biomed Microdevices* 8, 17.
40. Water safety plan manual (WSP manual). Step-by-step risk management for drinking-water suppliers. 2009. Wyd. World Health Organization; International Water Association, pp. 108.
41. Weber-Dąbrowska B., Gworek B., Wowk J., 2008. Raport z badań pobranych próbek wody z 20 miejsc. *Maszynopis*.
42. Xie W., Xu P.X., Wang W., Lu Q., 2002. Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. *Carbohydrate Polymers* 50, 35-40.
43. Zheng L.Y., Zhu J.F., 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 527-530.
44. Zivanovic S., Chi S., Draughon A.F., (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of food science*, 70(1), M45-M51.
45. Zmysłowska I., Golas I., Korzekwa K., 2006. *Aeromonas hydrophila* jako potencjalny wskaźnik antropogenicznego zanieczyszczenia środowiska wodnego. *Acta Agraria et Silvestria. Series Agraria*, t. 49, s. 541-547.
46. Żaczek M., Weber-Dąbrowska B., Łusiak-Szelachowska M., Międzybrodzki R., Lecion D., Wierzbicki K., Gworek B., Kassner J., Adamski R., Górski A., 2011. Occurrence and characteristics of bacteriophages in environmental waters. 19th International Phage Biology Meeting, 07-12.08.2011, Evergreen State College, Olympia, Washington, U.S.A., Abstract Book, p. 59.

5. OBIEKTY DOŚWIADCZALNE

5.1. Stacje badawcze w Broniszach

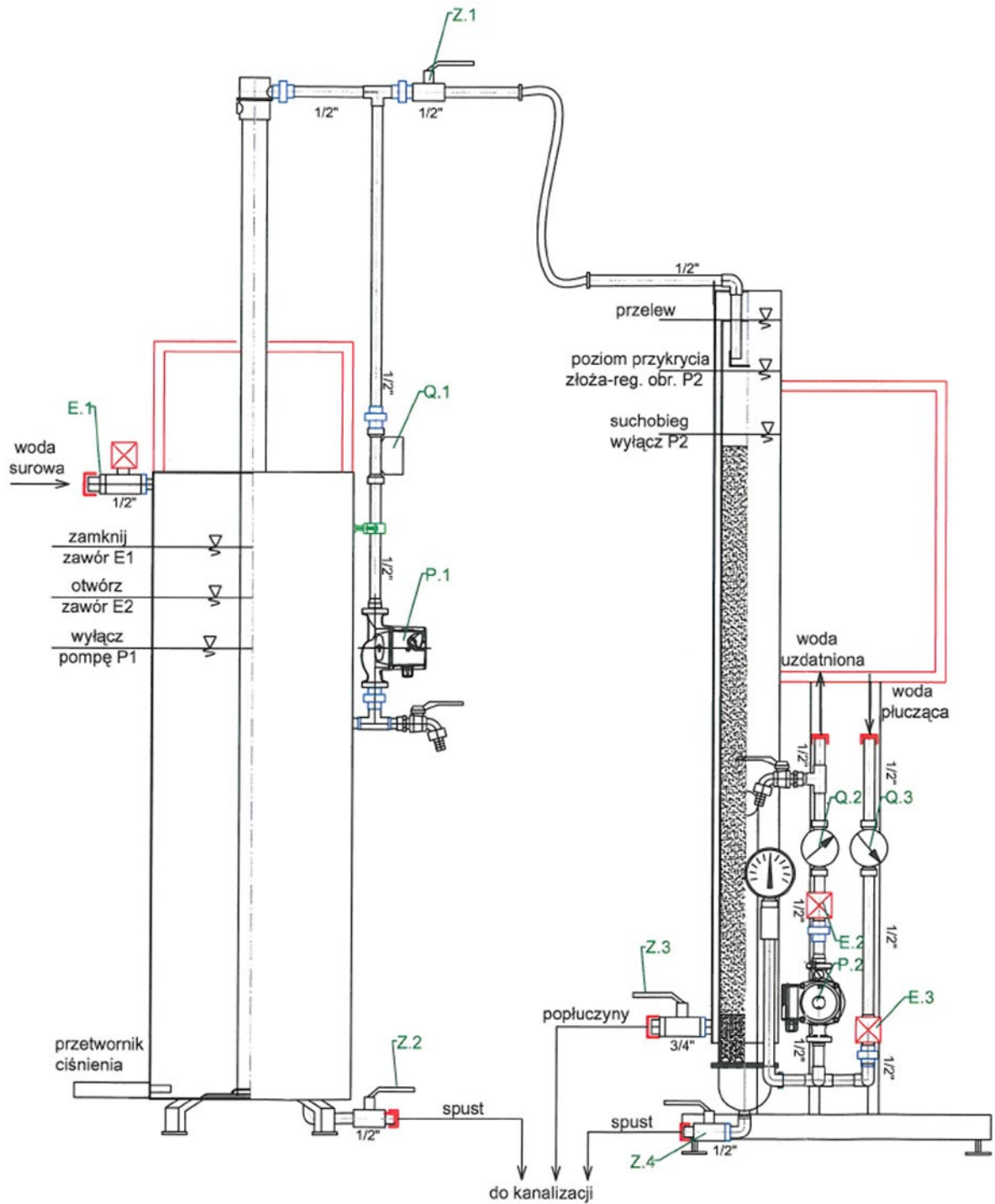
Koncepcję i projekt modelu stacji o wydajności 5 m³/h powierzono do wykonania firmie Energoopt, a jej budowę – firmie Gutkowski, drugiemu współuczestnikowi realizacji „Projektu badawczego”. Po wykonaniu zainstalowano ją w nieczynnej stacji uzdatniania wody w Broniszach k. Warszawy. Woda do tej stacji była czerpana ze studni głębinowej.

Schemat budowy stacji uzdatniania wody ilustruje rys. 5.1. Woda surowa ze studni głębinowej tłoczona była pompą do zaworu E1 zainstalowanego na zbiorniku reakcji o objętości 125 dm³. Po osiągnięciu górnego poziomu następowało włączenie pompy P1. Pompa P1, przy zamkniętym zaworze Z1, tłoczyła wodę do rurociągu zasilającego aerator strumieniowy w zbiorniku reakcji. Z chwilą osiągnięcia zadanego poziomu napowietrzania wody zawór Z1 został częściowo otwarty, co zapewniło wystarczający dopływ objętości wody do filtra oraz do zbiornika reakcji.

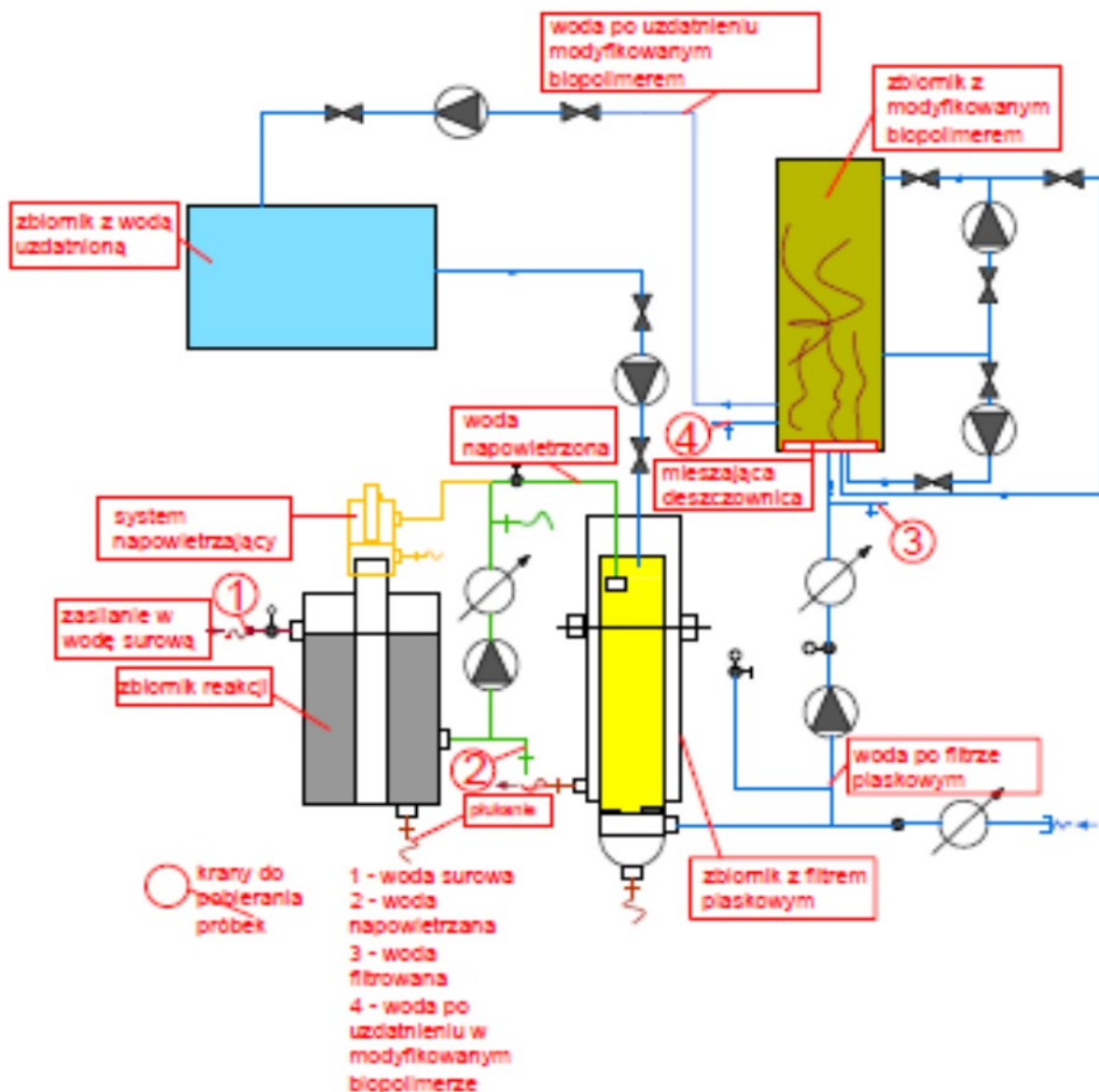
Kolumna filtra zbudowana jest z dwóch rur zmontowanych koncentrycznie. Rura zewnętrzna o średnicy 150 mm i wysokości 1600 mm oraz rura wewnętrzna o średnicy 130 mm i długości 1400 mm wypełnione są złożem filtracyjnym o granulacji od 3 mm do 5 mm oraz piaskiem kwarcowym o granulacji od 0,8 mm do 1,4 mm. Rura wewnętrzna (o mniejszej średnicy) zakończona jest rusztem z zainstalowanymi typowymi dyszami. Rura zewnętrzna służy do odprowadzania wody przez przelew w trakcie płukania złoża.

Woda uzdatniona z kolumny filtra jest odpompowywana pompą P2. W kolumnie tej jest zainstalowany przetwornik ciśnienia sygnalizujący 3 oznaczone poziomy wody. Przekroczenie poziomu (przelew) sygnalizuje potrzebę zwrotnego przepływu wody przez kolumnę filtra, którego przepustowość uległa zmianie na skutek kolmatacji. Wówczas po zamknięciu zaworu E2 i wyłączeniu pompy P2 oraz otwarciu zaworu E3 i doprowadzeniu wody surowej następuje przepłukanie filtra. Popłuczyny odpływają do kanalizacji, a ich jakość jest kontrolowana wizualnie przez obsługującego.

Zainstalowane na poszczególnych przewodach doprowadzających wodę wodomierze Q1, Q2, Q3 umożliwiają ocenę objętości przepływającej wody. Schemat zmodyfikowanej stacji przedstawiono na rys. 5.2.



Rys. 5.1. Schemat działania modelowej stacji uzdatniania wody
 Fig. 5.1. Work diagram of the model water treatment plant
 Źródło: The Gutkowski company.



Rys. 5.2. Schemat zmodyfikowanego stanowiska do uzdatniania wody w Broniszach
 Fig. 5.2. Diagram of the modified experimental water treatment facility in Broniszce
 Źródło: Innotech Project Final Report [2016].

Na rys. 5.3. przedstawiono modelową stację uzdatniania wody z widocznymi szafami sterowniczymi, zapewniającymi kontrolę i sygnalizację ewentualnych nieprawidłowości w sterowaniu procesem uzdatniania wody.

W ramach dostosowania stacji do rozszerzonego programu, wprowadzono szereg jej modyfikacji, a mianowicie zainstalowano:

- dodatkową kolumnę filtracyjną wypełnioną kolejno chitozaniem modyfikowanym miedzią i srebrem (dostarczone przez Politechnikę Śląską).
- zbiornik o pojemności 150 l oraz pompy, tworząc układ mieszający, w którym umieszczono modyfikowany srebrem chitozan, co umożliwiło określenie wymaganego czasu kontaktu modyfikowanego chitozanu z bakteriami w przepływającej wodzie oraz jego koncentrację.



Rys. 5.3. Zdjęcie przedstawiające modelową stację uzdatniania wody zainstalowaną w Broniszach z widocznymi szafami sterowniczymi

Fig. 5.3. A photo of a model water treatment facility installed in Broniszach with visible control cabinets
Źródło: A. Eymontt.

5.2. Stacja badawcza w Grodzisku koło Pleszewa

Na stacji wodociągowej wybudowanej do zasilania wodociągu wiejskiego w Grodzisku, zasilanej w wodę ze studni głębinowej i typowym układzie technologicznym uzdatniania (zbiornik reakcji, zamknięte filtry), nie udało się przez 18 lat uzyskać wody o parametrach zgodnych z wymogami wody do spożycia. Spowodowało to zaprzestanie eksploatacji stacji. W 2013 r. przekazano obiekt do badań nad wpływem sztucznego skażenia wód studziennych ściekami na szybkość poprawy składu mikrobiologicznego wód uzdatnionych.

Przekazaną do badań stację wodociągową o wydajności 50 m³/h i studni o głębokości 60 m, przystosowano do planowanych badań.

6. SELEKCJA BAKTERIOFAGÓW

6.1. Izolacja bakteriofagów doświadczalnych

W badaniach wykorzystano 185 szczepów bakterii pochodzących z kolekcji Samodzielnego Laboratorium Bakteriofagowego IITD, Laboratorium Diagnostyka we Wrocławiu oraz Wojewódzkiego Centrum Medycznego w Opolu, w tym 35 szczepów *Escherichia coli* ESBL-dodatnich, 22 szczepy *Klebsiella pneumoniae* ESBL-dodatnie, 25 szczepów *Enterococcus faecalis* HLGR, 3 szczepy *Enterococcus faecium* VRE, 25 szczepów *Enterobacter cloacae*, 10 szczepów *Citrobacter freundii*, 30 szczepów z rodzaju *Pseudomonas* oraz 35 szczepów z rodzaju *Aeromonas*.

Z pobranych próbek wody surowej oraz po jej zagęszczeniu wyhodowano 278 szczepów bakteryjnych należących do 59 gatunków. Najliczniejszą grupę stanowiły szczepy należące do rodzaju *Pseudomonas* (52 szczepy, w tym *Pseudomonas fluorescens* – 30 szczepów), *Acinetobacter* (41 szczepów, w tym *Acinetobacter haemolyticus* – 28 szczepów) oraz 44 szczepy z rodzaju *Aeromonas* (w tym *Aeromonas hydrophila/caviae* – 7 szczepów) oraz pojedyncze szczepy bakterii będących wskaźnikiem skażenia wody (w tym *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*). W badaniach wykorzystano 69 próbek środowiskowych z kolekcji SLBF oraz 67 próbek z ujęć wody Grodzisko, Zielona Łąka, Czeczotki, Chełmek, Lenartowice, Bógwidze, Kuczków oraz stacji modelowej w Broniszach, a także oczyszczalni ścieków w Pleszewie.

Posiewy bakteryjne wykonywano z wykorzystaniem podłoży standardowych (podłoże MacConkey, agar z krwią, podłoże Chapmana); identyfikację szczepów prowadzono z zastosowaniem analizatora Vitek 2 Compact. Szczepy przechowywano w temperaturze – 70°C w mieszaninie LB Broth E ZMix Powder (Sigma-Aldrich) oraz Glicerolu (Difco, BD Company) w proporcji 8,5 : 1,5 i objętości 1,5 ml (Procedura LBF/LP/01/B).

W celu izolacji fagów przygotowywano 3 różne zestawy próbek – próbek bezpośrednich, inkubowanych oraz zagęszczonych. Aby wykazać możliwości izolacji bakteriofagów z próbek bezpośrednich, niepoddanych inkubacji, próbki płynne (ścieki, wody śródlądowe, morskie) poddawano wstępnemu wirowaniu przy 3 tys. obr/min oraz filtracji. Zestaw próbek inkubowanych po 48-godzinnej inkubacji w wodzie peptonowej w 24°C, poddawano filtracji, wykonywano posiewy w celu identyfikacji namnożonych szczepów bakteryjnych i badano na

obecność fagów. Dodatkowo próbki zagęszczano z wykorzystaniem kasyety Hydrosart o średnicy porów membrany 30 kDa oraz zestawu do ultrafiltracji Viva flow 200. Ze względu na wymaganą dużą objętość wyjściową próbki do zagęszczania wykorzystano 14 próbek o objętości 3,5 l. W celu izolacji fagów stosowano metodę płytkową oraz metodę kolorymetryczną. W metodzie płytkowej na murawę badanego szczepu bakteryjnego nanoszono badaną próbkę środowiskową, inkubowano w temperaturze 37°C przez okres właściwy dla danego szczepu bakterii. Wystąpienie lizy w obszarach nakropień wskazywało na możliwość obecności fagów w badanej próbce. Obszar, w którym wystąpiła liza szczepu bakteryjnego, wycinano wraz z podłożem, umieszczano w 10 ml podłoża płynnego LB z dodatkiem zawiesiny szczepu i inkubowano 18 godzin w 37°C. W celu uzyskania czystych linii fagowych prowadzono 5-krotną reizolację z lysinek badanych fagów.

Izolacja bakteriofagów była prowadzona również z wykorzystaniem metody kolorymetrycznej. Jest to metoda opierająca się na zdolności żywych komórek bakteryjnych do enzymatycznej redukcji chlorku 2,3,5-trójfenylotetrazolu (TTC) do nierozpuszczalnego w wodzie, dającego ciemnoczerwone zabarwienie trójfenyloformazanu (TPF). TTC dostępny jest w postaci sproszkowanej. Przyrządza się go przez rozpuszczenie w wodzie MQ lub wodzie peptonowej (0,1 g na 10 ml). Po rozpuszczeniu preparat ma słomkową barwę, jest wrażliwy na światło, należy go zużyć w ciągu 3 tygodni. Wyniki są stosunkowo łatwe do interpretacji. Metoda umożliwia oznaczanie lizy komórek bakteryjnych zarówno jakościowo, jak i ilościowo, opiera się na obserwacji poszczególnych studzienek mikropłytki z naniesionymi próbkami: bakteria + fag lub bakteria (kontrola). Pojawienie się ciemnoczerwonego zabarwienia świadczy o braku lizy komórek bakteryjnych (braku aktywnych fagów w badanej próbce).

Obecność bakteriofagów stwierdzono w 51 próbkach, w tym w 16 próbkach wody surowej, 10 próbkach wody uzdatnionej, w 5 próbkach po ich zagęszczeniu oraz 20 próbkach środowiskowych. Największą liczbę fagów obserwowano w zagęszczonej próbce ścieków surowych pobranych z ujęcia Grodzisko (stwierdzono obecność fagów dla 34 różnych gatunków bakterii, w tym najliczniej dla szczepów z rodzaju *Aeromonas* i *Klebsiella*). Izolowano łącznie 60 swoistych bakteriofagów (20 fagów *Aeromonas*, 8 fagów *Escherichia*, po 6 fagów *Pseudomonas* i *Acinetobacter* oraz *Klebsiella*, 5 fagów *Enterococcus*, po 2 fagi *Citrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* oraz *Raoultella* i 1 faga *Shevanella*). Czyste linie fagowe wyprowadzono dla 36 bakteriofagów.

Prowadzono badania mające na celu określenie budowy genomów wybranych bakteriofagów przede wszystkim pod kątem obecności kaset lizogenności, a więc wykrycia sekwencji kodujących białka (integraza, transpozaza, ParB), odpowiedzialnych za proces wbudowywania materiału genetycznego faga do genomu bakteryjnego gospodarza w postaci profaga, co pozwala ustalić, czy jest to fag łagodny, czy wirulentny. Przeprowadzono analizę baz danych, utworzono kolekcję sekwencji genomowych badanych fagów; pogrupowano sekwencje kodujące białka odpowiedzialne za lizogenność fagów. Z użyciem specyficznych starterów (program BioEdit, Primer3) przeprowadzono reakcje PCR na matrycy genomów

badanych fagów. Produkty reakcji PCR wyizolowano, oczyszczono z żelu i poddano sekwencjonowaniu, wyniki poddano analizie elektroforetycznej. Badania przeprowadzono dla 2 fagów *Escherichia coli*, 2 fagów *Klebsiella*, 1 faga *Enterobacter*, 1 faga *Citrobacter* oraz dodatkowo dla 2 fagów *Pseudomonas*. Geny kodujące białka odpowiedzialne za lizogenność faga (t – transpozaza) wykryto jedynie u faga *E. coli* 105/WII43, natomiast u pozostałych badanych fagów (Ps 105/WII23(1), PsWII31/Ps39WII, PsWII56/WII53(3) oraz KIWII43/KI8c, KIWI 105/kl8c, *Citrobacter* 105/WII31(5), *E. coli* 115/ATCC11229 oraz *Enterobacter* 105/WII31(2)) nie wykryto obecności badanych białek, co wskazuje na lityczną budowę powyższych bakteriofagów.

6.2. Badania właściwości biologicznych izolowanych bakteriofagów

Dla każdego z badanych fagów określono wrażliwość na czynniki fizykochemiczne. Zbadano wpływ temperatury 60°C przez 10 min, chloroformu (po 2 godz. i 24 godz.), a także pH 4, 5, 6, 8 po upływie 1 godz. i 5 godz. Doświadczenia prowadzono w temperaturze pokojowej, a miano lizatów określano po działaniu wymienionych czynników. Sprawdzone także stabilność fagów przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych: w temperaturze pokojowej, w 4°C, -70°C, w -70°C w 25% glicerolu. Zbadano miana lizatów wyjściowych oraz próbek fagów przechowywanych przez 3 miesiące oraz 12 miesięcy przy użyciu testu RTD i metodą płytek dwuwarstwowych (metoda Gratia). Zbadano także wpływ UV na aktywność fagów (po jednym z każdego rodzaju). Fagi naświetlano UV (40 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) przez 0,5, 1 i 2 godz. Kontrolę dla doświadczenia stanowiły lizaty fagowe niepoddane działaniu temperatury; określono ich miana za pomocą testu RTD i metody płytek dwuwarstwowych (test Gratia). Aby zmierzyć zdolność adsorpcji wybranych fagów do powierzchni komórek bakteryjnych gospodarzy zastosowano metodę Roncero i in. 1990 i Gallet i in. 2009 z modyfikacją własną. Całonocną hodowlę bakterii ze skosu agarowego doprowadzano do gęstości $\sim 1,0$, oznaczanej przy użyciu spektrofotometru przy długości fali 600 nm. Oznaczono miano fagów wyjściowych i do badań użyto fagi o mianie 10^5 - 10^6 pfu/ml. Równe objętości zawiesiny bakteryjnej i faga inkubowano w 37°C przez 10 min i 20 min.

W badaniach biologii nowo izolowanych fagów wykorzystano lizaty czterech bakteriofagów *Escherichia coli* (103.1/WII 43, 105.2/WII 43, 106.2/WII 43, 115/ATCC11229), 2 bakteriofagów *Klebsiella* (WII43/KI 8c, WI 105/ KI 8c), 2 bakteriofagów *Pseudomonas* (Ps 105/Ps23WII, Ps WII31/Ps39 WII), faga *Citrobacter* 105/WII 31, faga *Enterobacter* 105/WII 31 oraz 2 fagów *Aeromonas* (Aerom 103/WII21, Aerom 106/WII32).

Wykazano stabilność badanych lizatów fagowych przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych: w temperaturze pokojowej, w 4°C, -70°C oraz w -70°C i 25% glicerolu przez 3 miesiące oraz przez 12 miesięcy. Zaobserwowano, że zarówno temperatura pokojowa, jak i 25-procentowy glicerol i temperatura -70°C nie są sprzyjającymi warunkami

do przechowywania fagów, ponieważ powodowały wyraźny spadek ich miana. Działanie temperatury 60°C przez 10 minut powodowało spadek miana badanych lizatów od pół aż do 4 rzędów (fagi *Aeromonas*), a najbardziej stabilnym fagiem okazał się w tych warunkach fag *E. coli* 105.2/WII43. W badaniach wpływu pH na aktywność lityczną fagów wykazano niewielki spadek miana badanych fagów w zakresie pH 5-8 i ich całkowitą inaktywację w pH 4. Wykazano wysoki stopień adsorpcji do komórek bakteryjnych dla większości badanych fagów – już po upływie 10 minut, a dla fagów *Aeromonas* po 20 minutach, średni procent absorpcji wynosił 91,2%. Badania plonu (liczby cząstek fagowych uwolnionych z 1 komórki bakteryjnej) nowoizolowanych bakteriofagów wykazały dość wyraźne różnice między badanymi fagami – najniższe wartości uzyskano dla faga *Aeromonas hydrophila* 103/WII21 – 17 czf/kom, a najwyższe dla faga *Escherichia coli* – 108,7 czf/kom. Dla wszystkich badanych fagów wykazano niekorzystny wpływ promieniowania UV o mocy 40 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Powodowało ono spadek miana do 4 rzędów po 2 godzinach naświetlania.

Określono spektrum lityczne fagów dla bakterii wskaźnikowych skażenia wody. W badaniach wykorzystano szczepy z kolekcji SLBF oraz szczepy izolowane z próbek wody zgromadzonych w ramach projektu. Ocenie poddano fagi szczepów *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*. Wszystkie badane fagi wykazywały wąskie spektra lityczne, w granicach od 30% (dla fagów *Enterobacter*) do 42 % dla fagów *Escherichia coli*.

W badaniach swoistości gatunkowej tylko w przypadku faga *Escherichia coli* 106.2/WII43 obserwowano słabo dodatnią reakcję z dwoma szczepami *Citrobacter* z kolekcji SLBF.

Do prowadzenia badań w modelowej stacji uzdatniania wody w Broniszach przygotowano wyjściowe lizaty *E. coli* 115/ATCC11229 i *Aeromonas hydrophila* 106/WII32 oraz ich oczyszczone preparaty.

Postanowiono wykorzystać bakteriofagi do badania skuteczności uzdatniania wody na modelu badawczym i w warunkach rzeczywistych. Do badań wybrano fagi *E. coli* 115/ATCC 1129 i Aerom 106/21 WII(1) oraz szczepy bakteryjne *Escherichia coli* i *Aeromonas hydrophila* β -hemolizujące ze względu na wysoką odporność *Aeromonas hydrophila* na chlorowanie. Szczepy *A. hydrophila* mogą stanowić indykator skażenia wód fekaliami. Działania IITD PAN w ramach zadania polegały na wyizolowaniu specyficznych bakteriofagów oraz optymalizacji warunków namnażania fagów na modelu uzdatniania wody.

Z otrzymanej wody wyizolowano 40 szczepów *A. hydrophila*, które typowano próbkami środowiskowymi (WI, WII jak również Wzag. – zebrane w ramach realizacji projektu; oraz A, B i S – kolekcja Samodzielnego Laboratorium Bakteriofagowego (SLBF)). Wyizolowano 20 swoistych bakteriofagów, z których wybrano i przygotowano 3 preparaty fagowe o mianie 10^9 pfu/ml: (106/21WII(1), 106/32WII(4), 106/35WII(2)). W dalszym etapie przeprowadzono optymalizację namnażania fagów przy różnych: stosunkach ilościowych faga do bakterii (1:1, 1:2, 1:20), czasie zaszczepienia hodowli bakteryjnej fagiem (jednoczesne dodanie faga i bakterii, dodanie faga 1 godz. po wprowadzeniu bakterii) oraz temperaturze inkubacji lizatów fagowych (4°C, temp. pokojowa – ok. 21°C, 37°C). Najlepsze wyniki osiągnięto stosując

stosunek faga do bakterii 1:2 i inkubując hodowlę w temp. 37°C i temp. pokojowej. Na podstawie uzyskanych wyników przygotowano lizat faga *Aeromonas* 106/21WII(1) (miano 10^{10} pfu/ml) przeznaczony do zastosowania w modelowym zbiorniku reakcji o pojemności 150 l oraz zawiesinę szczepu *A. hydrophila* 21WII(1). W skali laboratoryjnej optymalizację namnażania lizatów fagowych przeznaczonych do doświadczenia w zbiorniku reakcyjnym prowadzono początkowo na podłożu płynnym LB. Procedura doświadczalna w stacji uzdatniania wody Bronisze zakładała dodanie inokulum bakteryjnego do zbiornika, mieszanie przez 3 godz., a następnie dodanie lizatu fagaowego. Przed skażeniem wody nie stwierdzono obecności szczepów *Aeromonas* w wodzie surowej ze zbiornika reakcji oraz po przejściu przez filtr. Bezpośrednio po dodaniu bakterie te były wykrywane we wszystkich częściach zbiornika reakcji. Po dodaniu faga *Aeromonas* 106/21WII(1) w zbiorniku reakcji wykrywano obecność szczepów *Aeromonas* sp. w wodzie po jednej, a także 4 dobach. Nie obserwowano wrażliwości tych szczepów na zastosowanego faga, co może wskazywać, że szczepy *Aeromonas* izolowane po upływie co najmniej 24 godz. od skażenia zbiornika były szczepami odmiennymi od tego, który wprowadzono do zbiornika reakcji, bądź też szczep ten nabył oporność na zastosowanego faga. Obserwowano niewielki wzrost miana faga i po 24 godz. utrzymywało się ono na stałym poziomie. Krótki czas inkubacji hodowli bakteryjnej (fag dodany 30 min od skażenia zbiornika szczepem bakteryjnym) mógł być przyczyną osłabionego wzrostu bakterii w zbiorniku reakcji, co z kolei mogło wpłynąć na liczbę cząstek fagowych wykrywanych w wodzie.

Dalsze eksperymenty optymalizacji namnażania faga *Aeromonas* 106/21WII(1) prowadzone były na wodzie surowej pobranej ze stacji uzdatniania wody. Wykorzystanie wody do namnażania fagów pozwalało uniknąć spienienia wody po dodaniu lizatu namnażanego w typowym podłożu mikrobiologicznym, jakim jest podłoże LB. Prowadzono kontrolę miana faga w warunkach zaciemnienia (symulacja warunków panujących w zbiorniku), w różnych warunkach temperaturowych (4°C, temp. pokojowa), po różnym czasie zaszczepienia wody surowej bakteriami i fagiem, przy różnym stosunku faga i bakterii oraz kontrolę aktywności faga *Aeromonas* 106/21WII(1) po kilku dobach. Najlepsze rezultaty uzyskano prowadząc hodowlę w temperaturze pokojowej i przy 100-krotnym rozcieńczeniu zawiesiny bakteryjnej (miano faga 10^9 pfu/ml, stosunek bakterii do faga – 2:1). Optymalny czas zaszczepienia hodowli bakteryjnej lizatem fagowym stanowiły 3 godz. od rozpoczęcia inkubacji bakterii (w temperaturze zarówno 22°C, jak i 4°C). Prowadzenie hodowli w zaciemnieniu lub przy dostępie światła nie miało wpływu na miano lizatu bakteriofagowego.

W kolejnym doświadczeniu w modelowej stacji uzdatniania wody wykorzystano 750 ml lizatu faga *Aeromonas* 106/21WII(1) o mianie $2,8 \times 10^{10}$ pfu/ml oraz 1500 ml zawiesiny bakterii. Nie wyhodowano żadnego szczepu *Aeromonas* z pobranej wody, natomiast faga *Aeromonas* 106/21WII(1) wykrywano zarówno w wodzie ze zbiornika reakcji, jak i w wodzie pobranej po przejściu przez filtry, przy czym obserwowano wzrost miana tego faga w wodzie

po filtrze (jeden rząd w stosunku do wody ze zbiornika reakcji). Woda po przejściu przez filtr zawierała fagi jak i różne gatunki bakterii, co może sugerować niewystarczającą skuteczność zastosowanych filtrów piaskowych.

Testową stację uzdatniania wody skażono także szczepem *Escherichia coli* (ATCC 11229), patogennym dla człowieka (otrzymany z Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Puławach). Wykonano typowanie fagowe szczepu zestawem fagów *Escherichia* z Kolekcji SLBF IITD PAN, w wyniku którego najwyższą aktywność lityczną wykazał fag 115/Zol. Został on namnożony na otrzymanym szczepie *E. coli* do miana $4,75 \times 10^9$ pfu/ml i zawieszony w PBS. Nie stwierdzono obecności szczepów *E. coli* zarówno w zbiorniku reakcji, filtrze piaskowym, jak i kolumnie z modyfikowanym chitozaniem przed skażeniem wody szczepem *E. coli*. Po 3 godz. od skażenia wody szczep ten izolowano jedynie w zbiorniku reakcji, natomiast po 24 godz. szczep wykryto w wodzie pochodzącej ze zbiornika reakcji i wodzie po przejściu przez filtr piaskowy. W czwartej dobie doświadczenia nie wykryto już szczepów *E. coli* w całym układzie doświadczalnym. Po jednej dobie od dodania faga do zbiornika reakcji był on obecny w zbiorniku reakcji, filtrze piaskowym, kolumnie chitozanowej. Najwyższe miano faga stwierdzono w wodzie po kolumnie chitozanowej (107 pfu/ml). Po 4 dobach nie stwierdzono obecności faga w zbiorniku reakcji, natomiast w wodzie po filtrze piaskowym i kolumnie chitozanowej obecne były cząstki fagów w mianie rzędu 10^4 pfu/ml, podobnie w pierwszych i drugich popłuczynach z filtra piaskowego. W próbie końcowej ze zbiornika reakcji nie stwierdzono obecności zastosowanego faga. Po pierwszej dobie od dodania bakterii i fagów do zbiornika reakcji stwierdzono obecność fagów w każdym z 3 elementów układu, natomiast obecność bakterii *E. coli* ATCC 11229 stwierdzono w zbiorniku reakcji oraz w wodzie po filtrze piaskowym. Wysokie miano fagów w kolumnie chitozanowej mogło być spowodowane retencją cząstek tychże wirusów lub zwiększoną dostępnością bakterii. W wodzie po kolumnie z chitozaniem nie stwierdzano obecności bakterii, natomiast potwierdzano obecność cząstek fagowych, swoistych względem użytego szczepu *E. coli*. Najprawdopodobniej modyfikowany chitozan działał bakteriobójczo i nie wpływał na aktywność faga *coli* 117/ATCC 11229.

W kolejnym doświadczeniu użyto szczepu *E. coli* (ATCC 11229) i oczyszczonego lisatu faga zawieszzonego w PBS z laktoalbuminą. Nie stwierdzono obecności szczepu *E. coli* w wodzie pochodzącej ze studni wlanej do zbiornika reakcji przed skażeniem szczepem ATCC 11229. Od momentu dodania bakterii do zbiornika reakcji był on wykrywany w zbiorniku reakcji, filtrze piaskowym do czwartej doby, przy czym w czwartej dobie wykazano obecność jedynie pojedynczych kolonii *E. coli*. W zbiorniku reakcji nie wykryto szczepu *E. coli* po 5 dobach od dodania bakterii, natomiast w wodzie po filtrze piaskowym tego dnia wciąż obecne były pojedyncze kolonie. Bakterie *E. coli* wykryto również w popłuczynach z filtra piaskowego przed dodaniem bakterii. Wśród flory towarzyszącej wykrywano głównie

szczyepy z rodzaju *Pseudomonas* i *Acinetobacter*. Eksperyment powtórzono, stosując faga zawieszony w PBS bez laktoalbuminy. Szczep *E. coli* wykryto jedynie w zbiorniku reakcji, bezpośrednio po skażeniu, przed zastosowaniem faga. Obecność fagów stwierdzono w każdym z elementów układu testowej stacji uzdatniania wody aż do czwartej doby ($\sim 10^5$ i 10^6 pfu/ml).

Próbie wykrycia faga *E. coli* 117/ATCC 11229 w wodzie przeprowadzono metodą płytkową, która wykazała jego obecność w zbiorniku reakcji i filtrze piaskowym 30 min od dodania faga, oraz metodą kolorymetryczną, która pozwoliła na stwierdzenie obecności faga we wszystkich próbkach od momentu dodania faga do zbiornika reakcji. Testowa stacja pozostała jeszcze przez 25 dni w układzie otwartym. Nie stwierdzono w układzie obecności szczepu *E. coli*.

Zbadano także skuteczność działania filtrów bez bakteriofagów. Nie wykryto bakterii *E. coli* w wodzie pochodzącej z filtra piaskowego i chitozanowego, jednocześnie stwierdzono obecność głównie szczepów z rodzaju *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* i nie wykrywano faga *E. coli* 115/ATCC 11229. Sprawdzone także skuteczność działania bakteriofagów przeciwko bakteriom w filtrze piaskowym, tworzącym biofilm. W zbiorniku reakcji przed skażeniem układu stwierdzono obecność bakterii *E. coli* wrażliwych na faga *coli* 115/ATCC 11229, co przypuszczalnie spowodowane było skażeniem układu po poprzednich doświadczeniach. Jednocześnie nie wykrywano tego faga przed dodaniem go do układu. Szczep *E. coli* nie był obecny w żadnej z kolejnych próbek wody, natomiast zastosowany fag został wykryty w zbiorniku reakcji oraz filtrze piaskowym w 24 godz. od momentu dodania go do zbiornika reakcji, a także w zbiorniku reakcji, filtrze piaskowym i chitozanowym nawet po 5 dobach od dodania go do zbiornika reakcji. Miano faga nieznacznie wzrosło w zbiorniku reakcji i filtrach, co świadczyć może o obecności bakterii gospodarzy w układzie lub namnażaniu się fagów. Sprawdzano także, czy utworzony biofilm w filtrze piaskowym jest eliminowany przez fagi oraz czy filtr chitozanowy eliminuje bakterie. W wyniku tychże badań wykryto faga *coli* w układzie, mimo że model badawczy nie przewidywał dodania go do zbiornika reakcji, co przypuszczalnie mogło być efektem utrzymania się faga w układzie po poprzednim doświadczeniu. W wodzie pobranej z całego układu nie wykryto szczepu *E. coli*, którym ponownie skażano układ.

Na podstawie badań mikrobiologicznych wody pochodzącej z modelowej stacji uzdatniania wody Bronisze, izolowano różnorodne gatunki bakterii, przy czym znikomy odsetek stanowiły szczepy będące indykatorami skażenia wody fekaliami, takie jak: *E. coli*, *E. faecalis*, czy *Clostridium perfringens*. Woda jest bardzo dynamicznym środowiskiem i obserwowana była sezonowa zmienność flory bakteryjnej, przy czym jesienią dominowały szczepy z rodzajów *Acinetobacter*, *Aeromonas* i *Pseudomonas*, bardziej różnorodną florę bakteryjną izolowano w sezonie wiosenno-letnim.

Uzyskane w trakcie realizacji zadania wyniki (wysokie miano fagów w kolumnie z modyfikowanym chitozanem spowodowane prawdopodobną retencją cząstek fagowych lub

retencją bakterii przez chitozan bądź też działaniem bakteriobójczym i brakiem jego wpływu na aktywność faga) świadczą, że łączne zastosowanie fagów i chitozanu może stanowić skuteczną metodę dezynfekcji wody. Bakteriofagi aktywne wobec badanych szczepów powodowały zniszczenie patogenu, którym skażono wodę, co może wskazywać na skuteczność ich zastosowania jako czynnika dezynfekcyjnego przeznaczonego do odkażania wody wodociągowej przeznaczonej do spożycia.

6.3. Morfologia i ultrastruktura izolowanych bakteriofagów

Morfologię i ultrastrukturę bakteriofagów charakteryzowano za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM firmy JEOL JEM 100sx). W badaniach stosowano technikę kontrastowania negatywowego według następującej preparatyki: zagęszczanie i oczyszczanie w wirówce lizatów fagów z dodatkiem 0,1 M octanu amonu; przygotowanie siatek miedzianych i wykonanie błonek nośnych; wykonanie preparatów fagów do mikroskopu elektronowego metodą barwienia negatywowego w octanie uranylu; obserwacja preparatów w mikroskopie elektronowym oraz opracowanie dokumentacji w formie elektronogramów na błonach ciętych; obróbka ciemniowa materiałów negatywowych oraz wykonanie pozytywowych skanów cyfrowych; obróbka komputerowa obrazów fagów w programie Photoshop Elements; ocena uzyskanych wyników i wykonanie dokumentacji badań.

Obecność bakteriofagów wykazano w 20 badanych próbkach wody. Najliczniejszą grupę stanowiły fagi izolowane z próbki wody surowej bezpośredniej i po jej inkubacji (WI/II 42), pobranej z ujęcia Grodzisko w kwietniu 2014 r. Z próbki tej izolowano 11 fagów dla szczepów z rodzaju *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* oraz *Raoultella*. Określono łącznie morfologię i ultrastrukturę 37 bakteriofagów. Najliczniejszą grupę stanowiły fagi dla szczepów z rodzaju *Aeromonas* – izolowano 20 fagów, w tym 12 dla szczepów *A. hydrophila/caviae*. Wszystkie izolowane bakteriofagi zaliczono do grupy fagów ogonkowych rzędu *Caudovirales* i należących do niego 3 rodzin – *Myoviridae*, *Siphoviridae* i *Podoviridae*. Najliczniejszą grupę stanowiły fagi należące do rodziny *Siphoviridae* – 18 fagów, w tym 16 zaliczono do morfotypu B1. Do rodziny *Myoviridae* zaklasyfikowano 16 fagów, w tym do morfotypu A1 – 13 fagów, a do morfotypu A2 – 3 fagi. Rodzinę *Podoviridae* reprezentowały 3 fagi należące do morfotypu C1. Określono wymiary wirionów badanych fagów, ich elementów morfotycznych oraz wykonano i zabezpieczono ich dokumentację fotograficzną.

6.4. Konkluzje

W rezultacie realizacji opisanych badań opracowano skład preparatu bakteriofagowego skierowanego przeciwko szczepom bakteryjnym, będącym przyczyną skażenia wody pitnej. W ramach prowadzonych badań utworzono kolekcję patogennych szczepów bakteryjnych pochodzących ze zbiorów SLBF IITD PAN oraz izolowanych bezpośrednio ze zgromadzonych próbek wody surowej, pochodzących z wybranych stacji uzdatniania wody. Do badań izolacji fagów wykorzystano próbki środowiskowe z kolekcji SLBF oraz próbki pozyskane w ramach projektu z wybranych stacji uzdatniania. Z pobranych próbek wody surowej bezpośrednich oraz po ich inkubacji wyhodowano szczepy bakteryjne reprezentujące 66 gatunków, w tym bakterii wskaźnikowych skażenia wody (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter cloacae*), stanowiące niecałe 10% ogólnej liczby izolowanych szczepów. Opracowano wstępny skład preparatu fagowego obejmujący jedynie fagi przeciwko bakteriom wskaźnikowym skażenia wody. W związku z faktem, że bakterie z rodzaju *Aeromonas* stanowiły najliczniejszą grupę izolowanych szczepów (23%) i ze względu na ostatnie sugestie wskazujące na ich ewentualne zaliczenie do grupy bakterii wskaźnikowych izolowano i zbadano 20 swoistych bakteriofagów – **Petrovski i in. [2022]**.

Przygotowano lizaty fagów *Escherichia coli* 115/ATTC 11229 oraz *Aeromonas* 106/21WII(1) do badań w modelowej stacji uzdatniania wody w Broniszach. Ze względu na mnogość izolowanych gatunków bakterii z badanych próbek wody surowej oraz ich sezonową zmienność uzyskane wyniki nie pozwalają na opracowanie wieloważnego preparatu fagowego przeznaczonego do eliminacji całej flory bakteryjnej. W związku z tym, skoncentrowano się na opracowaniu preparatu fagowego przeciwko bakteriom zaliczanym do grupy bakterii wskaźnikowych skażenia wody.

Autorzy składają podziękowania Pani dr n. biol. Kingie Świtale-Jeleń z Pure Biologics sp. z o.o. za badania sekwencji genomów izolowanych bakteriofagów.

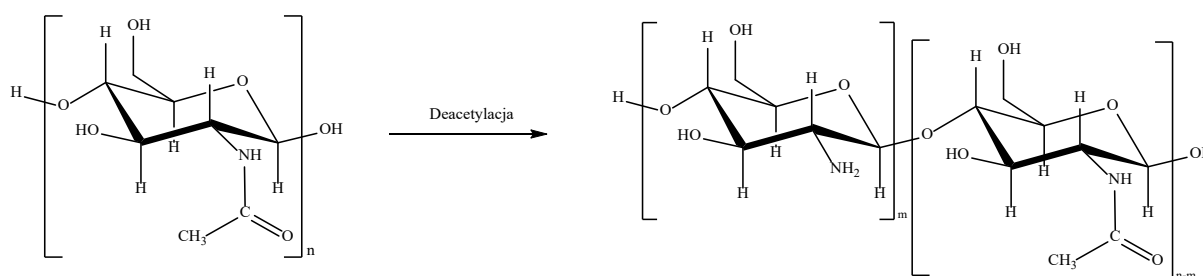
Spis literatury do rozdziału 6

1. Petrovski S., Batinovic S., Rose J.J., Seviour R.J., 2022. Biological control of problem bacterial populations causing foaming in activated sludge wastewater treatment plants – phage therapy and beyond. Lett. Appl. Microbiol. Accepted Manuscript. DOI: 10.1111/lam.13742.

7. BIOKOMPOZYTY OTRZYMYWANE NA BAZIE CHITOZANU

7.1. Metoda otrzymywania doświadczalnych biopolimerów

Chityna jest drugim, po celulozie, najbardziej rozpowszechnionym na świecie biopolimerem naturalnym, który jest syntezowanym przez organizmy morskie. Jej najważniejszą pochodną jest chitozan, otrzymywany w wyniku reakcji deacetylacji w środowisku alkalicznym (rys. 7.1). Pod względem struktury chitozan można traktować jako kopolimerem zbudowany z dwóch jednostek: 2-amino-2-deoxy- β -glukopiranozy (glukozaminy) oraz 2-acetamino-2-deoxy- β -glukopiranozy (N-acetyloglukozaminy). Ten drugi składnik jest pozostałością po niecałkowitej deacetylacji chityny. Obie jednostki połączone są między sobą wiązaniem β -(1-4)-glikozydowym.



Rys. 7.1. Deacetylacja chityny

Fig. 7.1. Deacetylation of chitin

Ze względu na losowy charakter procesu deacetylacji wzajemne rozmieszczenie obu merów w łańcuchu polimerowym ma charakter przypadkowy, jednakże zazwyczaj obserwuje się, że jednostki zawierające grupę N-acetylową tworzą dłuższe bloki **Fideles i in. [2018]**. W zależności od sposobu prowadzenia procesu deacetylacji otrzymuje się polimer o różnych właściwościach. Wpływa na to tzw. stopień deacetylacji, czyli wyrażona w procentach molowych zawartość merów zawierających wolną grupę aminową w łańcuchu polimerowym, jak również wspomniane powyżej rozmieszczenie obu merów w łańcuchu, źródło pochodzenia chityny, mający duży wpływ na masę cząsteczkową i czystość chitozanu.

Szerokie zainteresowanie możliwością wykorzystania chitozanu związane jest z jego właściwościami fizykochemicznymi będącymi pochodną jego struktury i dostępnością szeregu grup funkcyjnych – acetamidowych, I-rzędowych grup aminowych, I- i II-rzędowych grup hydroksylowych, których obecność umożliwia wytworzenie oddziaływań inter-

i intramolekularnych przez wiązania wodorowe. Polimer wykazuje dobrą stabilność zarówno chemiczną, jak i mechaniczną, właściwości kompleksujące, wysoką biogodność czy właściwości bakteriobójcze. Z wieloma jonami metali tworzy chylaty, wykorzystując jako ligandy obecne w polimerze grupy funkcyjne. Ze względu na obecność protonowanych grup aminowych chitozan wykazuje właściwości polikationowe. Może tworzyć kompleksy z substancjami obdarzonymi ładunkiem ujemnym, np. polianionami, białkami, barwnikami. Liczne grupy funkcyjne chitozanu pozwalają na jego modyfikację chemiczną, co umożliwia zmianę rozpuszczalności tego polimeru, wpływa na jego biodegradowalność i bioaktywność. Zalety chitozanu i jego naturalne pochodzenie powodują, że od wielu lat jest on w kręgu zainteresowań licznych grup badawczych oraz znajduje praktyczne zastosowania w wielu dziedzinach, m.in. w uzdatnianiu wody i separacji membranowej, biotechnologii, medycynie, farmacji czy kosmetyce.

Chitozan jest biokompatybilnym, biodegradowalnym oraz nietoksycznym polimerem cechującym się aktywnością biologiczną, do której można zaliczyć działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz przeciwwgrzbiące wobec szerokiego spektrum mikroorganizmów. Jego aktywność przypisuje się obecności w łańcuchu polimerowym protonowanych grup aminowych obdarzonych ładunkiem, które mogą oddziaływać ze składnikami tworzącymi ściany komórkowe bakterii czy też otoczki białkowe wirusów. Mechanizm ten zakłada, że wywołane oddziaływania elektrostatyczne powodują zmiany w strukturze i przepuszczalności ściany komórkowej, co zaburza równowagę osmotyczną komórki i jej rozwój. Możliwa jest również hydroliza peptydoglikanów obecnych w ścianach komórkowych mikroorganizmów prowadząca do utraty przez komórkę elektrolitów, np. jonów potasowych, oraz niskocząsteczkowych składników białkowych, np. protein, enzymów, kwasów nukleinowych – **Chung i Chen [2008]**.

Wykazano również, że chitozan może wnikać do jądra komórkowego i łączyć się z DNA mikroorganizmów, zaburzając syntezę mRNA i białek – **Sebti i in. [2005]**.

Roller jako źródło właściwości antybakteryjnych wskazuje na jego zdolność do chelatacji jonów metali, przez co konkuruje z dostępem do mikroelementów niezbędnych dla rozwoju mikroorganizmów. Mechanizm ten jest preferowany przy wyższych pH, przy których grupa aminowa nie jest protonowana i może być ligandem kompleksującym kationy metali – **Roller i Covill [1999]**.

Wiele prac badawczych wykazało, że chitozan wykazuje właściwości przeciwgrzybicze, m.in. wobec *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans*, oraz antybakteryjne zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, np. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* jak i Gram-ujemnych: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio*

parahaemolyticus. Najistotniejszymi czynnikami wpływającymi na aktywność chitozanu są jego struktura, stopień podstawienia grupami modyfikującymi, stopień deacetylacji oraz masa cząsteczkowa – **Sahariah i Másson [2017]**.

Badania prowadzone przez **Chen i in. [2002]** z patogenami zawartymi w wodzie wykazały, że chitozan może być stosowany jako naturalny środek dezynfekujący, szczególnie wobec bakterii Gram-ujemnych. Spośród przebadanych szczepów: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* i *Streptococcus faecalis* najwyższą aktywność chitozan wykazywał wobec *Pseudomonas aeruginosa*. Wyższy stopień deacetylacji i wyższe stężenie chitozanu powodują wzrost jego aktywności antybakteryjnej, natomiast wpływ masy cząsteczkowej chitozanu na jego zdolność rozwoju bakterii zależy od szczepu bakterii – **Benhabiles i in. [2012]**.

Wykorzystując zdolności kompleksujące chitozanu, badano go pod kątem zastosowania jako adsorbentu jonów metali ciężkich w ściekach przemysłowych. Wolne grupy aminowe w łańcuchu chitozanu mogą służyć jako miejsca koordynacji wielu metali, w tym Cd(II), Cu(II), Cr(III), Pb(II), Zn(II), Ni(II), Hg(II), U(VI) i V(IV), oraz wiązania innych zanieczyszczeń zawartych w wodzie, jak zawieszane cząstki ciał stałych, barwniki, substancje o kwaśnym charakterze, różne związki organiczne – **Bassi, Prasher, Simpson [1999], Ravi, Sivasankara [2001], El-Geundi [1997]**.

Zastosowanie biopolimerów i biopolimerów modyfikowanych metalami w procesach oczyszczania i uzdatniania wody wymaga dalszych intensywnych badań, chociaż wstępne badania potwierdziły celowość ich używania. Chitozan ze względu na opisane właściwości wydaje się idealnym komponentem w układzie do mikrobiologicznej stabilizacji wody ze względu na zdolność do usuwania składników natury nieożywionej, jak również na możliwość wykorzystania jego aktywności biologicznej. W warunkach laboratoryjnych zastosowanie adsorbentów chitozanowych modyfikowanych srebrem prowadziło do znacznego ograniczenia ilości bakterii, nawet przy sztucznym, masywnym zakażeniu. Wyniki potwierdziły się częściowo także w warunkach doświadczalnej stacji uzdatniania wody, chociaż niezbędne są dalsze eksperymenty dotyczące zarówno rodzajów wypełnień kolumn, jak i warunków przepływu.

W ramach prowadzonych badań opracowano wiele kompozytów na bazie chitozanu, zawierających różnorakie wypełnienia. W badaniach laboratoryjnych zastosowano chitozany różnych producentów, m.in. Acros Organics, Sigma Aldrich i BioLog, natomiast do badań w doświadczalnej stacji uzdatniania wody Bronisze wykorzystywano adsorbenty otrzymane z chitozanów zakupionych w firmie BioLog o różnym stopniu deacetylacji i różnej masie cząsteczkowej o symbolach: 95/100/A1; 90/60/A1; 90/30/A1; 90/100/A1; 90/200/A1; 90/400/A1; 90/1000/A1; 85/10/A1; 85/100/A4; 85/400/A1; 85/600/A1; 85/800/A1; 85/100/A1; 85/1500/A1; 85/2000/A1; 85/2500/A1; 85/3000/A1; 85/5000/A1; 80/1000/A1; 75/200/A3.

Hydrożel chitozanowy oraz odpowiednie biokompozyty otrzymano metodą opracowaną w laboratorium badawczym Katedry Fizykochemii i Technologii Polimerów Politechniki Śląskiej. Ogólna procedura otrzymywania kompozytów w postaci hydrożeli o sferycznym kształcie polega na koagulacji roztworu chitozanu w rozcieńczonym wodnym roztworze kwasu octowego za pomocą roztworu wodorotlenku sodu. Otrzymane hydrożele przemywano wodą destylowaną do odczynu obojętnego i przechowywano „na mokro” w wodzie destylowanej. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na dobranie optymalnych warunków procesu koagulacji, tj. stężeń roztworu polimeru do koagulacji, stężenia roztworu koagulacyjnego, czasu trwania procesu koagulacji, co pozwoliło na opracowanie metodyki postępowania dla różnych odmian chitozanów i rodzajów ich modyfikacji oraz określenie wpływu tych parametrów na trwałość hydrożelu. Osobnym badanym zagadnieniem był dobór środków sieciujących i warunków procesu sieciowania hydrożeli chitozanowych prowadzony jednocześnie z procesem koagulacji lub jako niezależny proces następczy. Do procesu sieciowania wykorzystano roztwory aldehydu glutarowego, formaldehydu, bezwodnika maleinowego, mocznika, kwasu bursztynowego i kwasu 2-sulfobutanodikarboksylowego (sieciowanie chemiczne) lub kwasu siarkowego i fosforowego (sieciowanie fizyczne), jak również ich mieszaniny. Zawartość wody w serii biokompozytów zawierających zmieloną opokę o uziarnieniu $D_{50} = 40 \mu\text{m}$ oraz pył węgla drzewnego otrzymany z miękkiego drewna brzoźowego określona metodą suszenia termicznego w temp. 120°C do uzyskania stałej masy przedstawiono w tabeli 7.1. Opoka to skała osadowa wapienno-krzemionkowa zawierająca ponad 30% zarówno tlenku wapnia CaO , jak i dwutlenku krzemu SiO_2 oraz domieszki minerałów ilastych o gęstości ok. $1,4 \text{ g/cm}^3$. Jest ona zbudowana z pozostałości fauny morskiej z okresów geologicznych późnej kredy i wczesnego trzeciorzędu. Opoka powstaje w wyniku wietrzenia chemicznego i odwapnienia pierwotnych osadów, stąd ma porowatą strukturę. Jej porowatość mieści się w przedziale 43-48%.

Tabela 7.1

Procentowa zawartość wody w biosorbentach chitozanowych

Biosorbent	Zawartość wody [%]
Chitozan	97,1
Chitozan-opoka 100%	94,1
Chitozan-opoka 200%	91,3
Chitozan-pył 100%	94,5
Chitozan-pył 200%	92,1

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

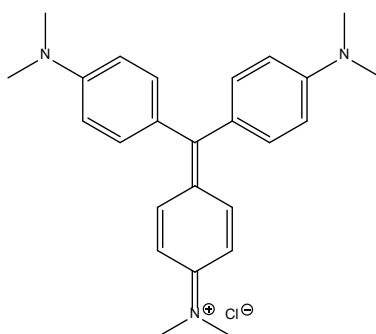
W ramach prowadzonych badań wszystkie rodzaje otrzymanych kompozytów charakteryzowano i oceniano pod względem ich właściwości sorpcyjnych w układzie stacjonarnym w stosunku do substancji modelowej – fioletu metylowego 3B (związek z grupy barwników anilinowych, rys. 7.2). W badaniach wykorzystano cztery próbki chitozanu o różnym stopniu deacetylacji Ch1-Ch4 (tab. 7.2) – **Gnus i in. [2015]**.

Tabela 7.2

Stopień deacetylacji próbek chitozanu do badań adsorpcji fioletu metylowego 3B

Próbka	Stopień deacetylacji [%]
Ch1	12,5
Ch2	56,1
Ch3	73,4
Ch4	88,6

Źródło: Raport Końcowy projektu Innotech [2016].



Rys. 7.2. Struktura fioletu metylowego 3B – substancji modelowej do badań adsorpcji na kompozytach chitozanowych

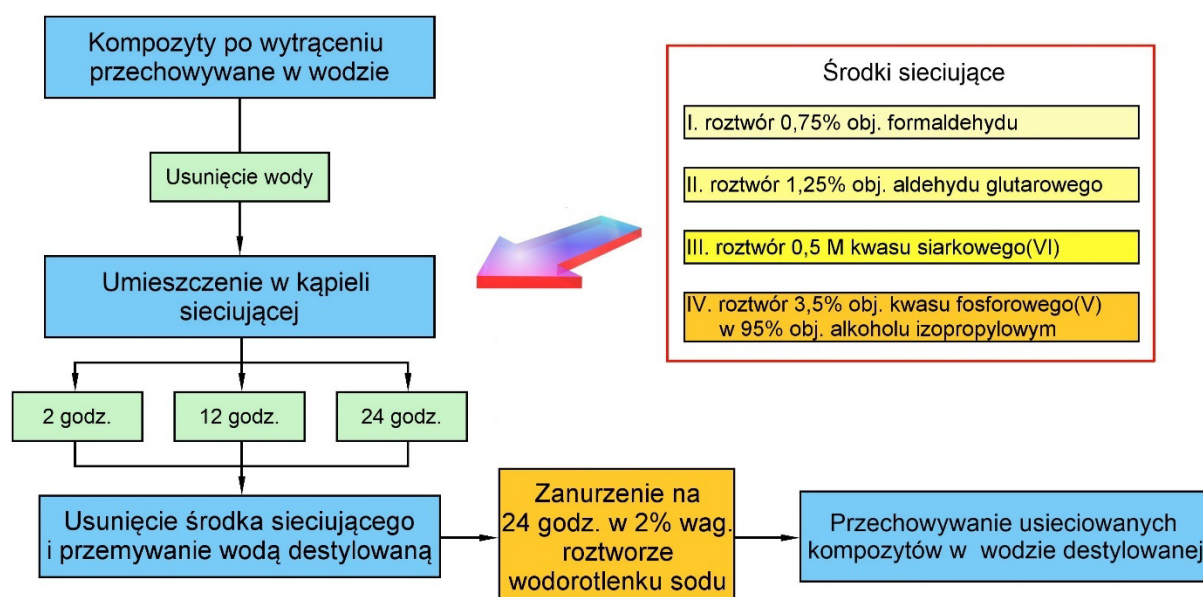
Fig. 7.2. Molecular formula of methyl violet 3B dye – model substance used in adsorption studies of chitosan composites

Typowe eksperymenty adsorpcyjne w układzie okresowym przeprowadzono przez dodanie stałej ilości sorbentu (400 mg) do zlewki zawierającej 250 ml roztworu barwnika o stężeniu początkowym 6 mg/l i stałym pH = 6,3 ± 0,3. Zlewkę z roztworem barwnika umieszczono w wytrząsarce w termostатовanej kąpeli wodnej. Czas sorpcji wynosił 180 minut. W przypadku eksperymentów adsorpcji przepływowej ustaloną ilość sorbentu (400 mg) umieszczano w szklanej kolumnie o średnicy wewnętrznej ok. 1,0 cm i długości 10 cm. Pojemnik z roztworem barwnika o początkowym stężeniu 6 mg/l i stałym pH = 6,3 ± 0,3 umieszczono w termostатовanej łaźni wodnej na wytrząsarce. Roztwór barwnika przepływał przez kolumnę w układzie zamkniętym ze stałą szybkością przepływu (25 ml/min). Proces adsorpcji prowadzono przez 180 minut.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że:

- otrzymane biokompozyty (niezależnie od rodzaju i zawartości wypełniacza) charakteryzowały się dobrymi wartościami efektywności usunięcia substancji modelowej;
- efektywność usunięcia substancji modelowej wzrasta wraz ze wzrostem zawartości wypełniacza;
- wartość efektywnego usunięcia substancji modelowej jest zależna od początkowego stężenia barwnika;
- maksymalne wartości adsorpcji uzyskane dla biokompozytów chitozan-opoka oraz chitozan-pył wynosiły odpowiednio 1100 oraz 2500 mg/g suchej masy;
- na wartość współczynnika podziału nie wpływa ani na wartość adsorpcji, ani też stężenie początkowe zastosowanej substancji modelowej;
- wartość stopnia pokrycia wszystkich zastosowanych adsorbentów jest bardzo wysoka i oscyluje w granicach 95-100%;
- proces sorpcji fioletu metylowego można opisać modelem izotermy Freundlicha oraz Langmuira.

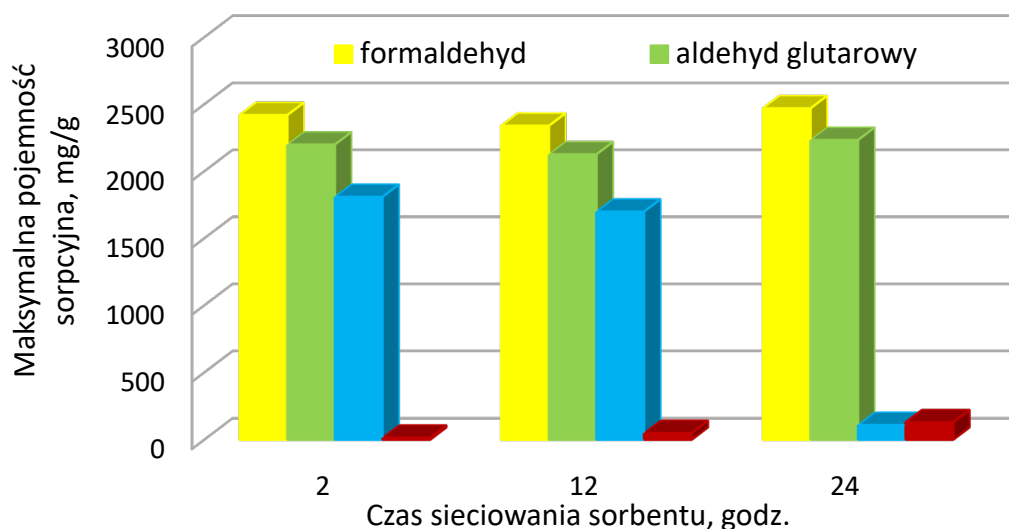
Otrzymane biokompozyty są trwałe i łatwe do usunięcia z oczyszczonej fazy ciekłej. Przeprowadzono wiele prób procesu sieciowania, w których badano wpływ warunków tego procesu, tj. czasu sieciowania, ilości składnika sieciującego, składu rozpuszczalników kąpieli sieciującej na efektywność i trwałość usieciowanych hydrożeli. Na podstawie wstępnych wyników do dalszych badań wybrano po dwa czynniki sieciujące według mechanizmu chemicznego i fizycznego: aldehyd glutarowy, formaldehyd, kwas siarkowy (IV) i kwas ortofosforowy (V), dla których przebadano wpływ procesu sieciowania na charakterystykę sorpcyjną kompozytu. Przykładowy schemat przygotowania próbek do badań wpływu procesu sieciowania na przykładzie kompozytu chitozan-pył przedstawiono na rys. 7.3.



Rys. 7.3. Schemat procedury sieciowania kompozytów chitozanowych
Fig. 7.3. Diagram of the cross-linking routine of chitosan composites

W trakcie badań opracowano i zoptymalizowano metodę otrzymywania kompozytów chitozanowych w dwóch postaciach: hydrożel o kulistym kształcie i kompozyt w postaci płatków. Ogólna procedura otrzymywania kompozytów w postaci hydrożeli o kształcie kulek polega na koagulacji wodnego roztworu chitozanu w roztworze wodorotlenku sodu. Przeprowadzono optymalizacje w zakresie stężeń roztworu polimeru i roztworu koagulacyjnego, czasu trwania procesu oraz metodyki postępowania. Otrzymane kompozyty mogą być usieciowane. Do procesu sieciowania wykorzystano roztwory aldehydu glutarowego (sieciowanie chemiczne) lub kwasu siarkowego i fosforowego (sieciowanie fizyczne). W przypadku kompozytów w postaci płatków zawiesina chitozanu adsorbowała odpowiedni dodatek w roztworze wodnym i w dalszym etapie była poddawana obróbce termicznej lub reakcji sieciowania. Wszystkie rodzaje otrzymanych kompozytów charakteryzowano i oceniano pod względem ich zdolności sorpcyjnych w układzie stacjonarnym i aktywności mikrobiologicznej.

Badania kinetyki sorpcji wykonano w układzie stacjonarnym, wykorzystując jako substancję modelową, podobnie jak uprzednio, roztwór fioletu metylowego o stężeniu 200 mg/dm^3 (rys. 7.4). Proces prowadzono w temperaturze pokojowej, a pomiary absorbancji wykonywano w odstępach 24-godzinnych przez 7 dni. Najwyższą pojemność wykazuje kompozyt sieciowany formaldehydem. W tym przypadku wynosi ona ponad 2400 mg/g suchej masy. W przypadku sieciowania chemicznego, podczas którego tworzą się wiązania kowalencyjne pomiędzy środkiem sieciującym a matrycą polimerową, wartość całkowitej pojemności sorpcyjnej kompozytu nie zależy od czasu procesu sieciowania i dla każdego z badanych czasów – 2, 12 i 24 godziny – jest zbliżona. Można założyć więc, że proces sieciowania w tym wypadku jest szybki i wydłużanie go nie zmienia już właściwości kompozytu. Sieciowanie kwasem siarkowym powoduje drastyczne obniżenie zdolności sorpcyjnej. O ile w przypadku membran chitozanowych jest skutecznym sposobem sieciowania, o tyle w przypadku materiałów hydrożelowych o dużej zawartości wody w strukturze jest nieefektywne. Obserwowany spadek zdolności sorpcyjnej można przypisać procesowi degradacji kompozytu i jego dezintegracji. Dla kompozytów sieciowanych kwasem fosforowym dla najdłuższego czasu sieciowania, tj. 24 godzin, również obserwuje się znaczny spadek zdolności sorpcyjnej sorbentu kompozytowego (rys. 7.4). Dla wszystkich badanych układów można zauważyć, że proces sieciowania ma wpływ na kinetykę sorpcji barwnika. W przypadku układów usieciowanych proces sorpcji jest wolniejszy i zwiększa się czas niezbędny do osiągnięcia stanu równowagi – **Tórz i in. [2015]**.



Rys. 7.4. Zmiany pojemności sorpcyjnej kompozytu chitozan-pył węgla drzewnego (w mg/g suchej masy sorbentu) dla czterech układów sieciujących w zależności od czasu, określonej w układzie stacjonarnym po 24 godzinach kontaktu roztworu fioletu metylowego o stężeniu 200 mg/dm³ z sorbentem kompozytowym chitozan-pył w temperaturze pokojowej

Fig. 7.4. Changes in the sorption capacity of the chitosan- charcoal dust composite (in mg/g of sorbent dry matter) after 24 hours of sorption at room temperature determined in the stationary state for four used different cross-linking approaches. Adsorbate: methyl violet 3B solution with a concentration of 200 mg/dm³

Źródło: Innotech Project Final Report [2016].

Dla układów sieciowanych chemicznie z wykorzystaniem wolnych grup aminowych chitozanu, w wyniku których powstają wiązania iminowe, podjęto badania nad możliwością redukcji tych wiązań. Wiązanie iminowe powstaje w wyniku odwracalnej (równowagowej) reakcji addycji wodoru grupy aminowej do wiązania karbonylowego. Wiązanie to jest z natury nietrwałe i może w wyniku zmiany stanu równowagi ulec rozerwaniu. Proces redukcji iminy powoduje, że reakcja sieciowania staje się nieodwracalna. Do badań wykorzystano wiele środków redukujących: wodór gazowy, hydrazynę, borowodorek sodu, borowodorek litu i trimetylochlorosilan. Proces redukcji w badanym układzie nie zachodzi z dużą wydajnością. Najlepsze rezultaty osiągnięto dla układu hydrazyna:borowodorek sodu (1:3), dla którego stopień redukcji wynosi ok. 3%.

Istotnym parametrem charakteryzującym chitozan jest stopień deacetylacji (DD). Dla wykorzystywanych w badaniach polimerów wykonano oznaczenie ich stopnia deacetylacji. Popularną metodą oznaczania tej wielkości jest miareczkowanie konduktometryczne. Oznaczenie wykonano zgodnie z procedurą opisaną przez de Alvarengę – **de Alvarenga i in. [2010]**. Próbkę chitozanu (ok. 0,2 g) umieszczono w 40 ml roztworu HCl o znanym stężeniu i pozostawiono na 48 h w celu pełnego rozpuszczenia polimeru. Miareczkowanie przeprowadzono za pomocą roztworu NaOH o znanym stężeniu (porcjami po 0,5 ml) w odstępie czasu umożliwiającym wykonanie pomiaru przewodności. Następnie sporządzono

wykres zależności przewodnictwa ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) od objętości titranta, z którego wyznaczano punkty przecięcia, a stopień deacetylacji wyliczano z równania:

$$DD = \frac{n \cdot (V_2 - V_1) \cdot 161}{m} \cdot 100\%$$

gdzie: n – stężenie titranta (mol/ml), V_1 i V_2 – objętość titranta (ml) dla punktów przecięcia, 161 – masa molowa monomeru (g/mol), m – masa badanej próbki (g).

Dla porównania wyznaczono stopień deacetylacji chitozanu metodą potencjometryczną mierząc zmiany pH w trakcie miareczkowania próbki polimeru. Oznaczenie wykonano w sposób analogiczny do miareczkowania konduktometrycznego. Chitozan (około 0,2 g) umieszczono w 40 ml r-ru HCl o znanym stężeniu i pozostawiono na 48 h w celu dobrego rozpuszczenia polimeru. Miareczkowanie przeprowadzono za pomocą r-ru NaOH o znanym stężeniu (porcjami po 0,5 ml) w odstępie czasu umożliwiającym wykonanie pomiaru pH. Ponieważ uzyskane wyniki różniły się i odbiegały od deklarowanych przez producenta wartości postanowiono potwierdzić uzyskane rezultaty stopnia deacetylacji trzecią metodą – metodą NMR, która jest obecnie uznawana przez Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów za najodpowiedniejszą metodę oznaczania stopnia deacetylacji. W tym przypadku 100 mg chitozanu rozpuszczono w 10 ml 0,07 M HCl i mieszano przez noc w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 4 mg stałego NaNO_2 i po 4 godzinach próbkę liofilizowano. Około 5-10 mg tak przygotowanej próbki rozpuszczono w 0,7 ml D_2O i wykonano widmo ^1H NMR wobec wzorca wewnętrznego - soli sodowej kwasu 3-(trimetylosilylo)propionowego-2,2,3,3- d_4 (TMSP- d_4). Na podstawie intensywności pasm stopień deacetylacji wyznaczano ze wzoru:

$$DD = \left(1 - \frac{\frac{1}{3} \cdot I_{\text{CH}_3}}{\frac{1}{6} \cdot I_{\text{H}2-\text{H}6}} \right) \cdot 100 [\%]$$

gdzie: I_{CH_3} – całka z sygnału odpowiadającego protonom grupy – CH_3 , $I_{\text{H}2-\text{H}6}$ – całka z sygnałów odpowiadających protonom przy atomach węgla C2 – C6.

Wyniki obliczeń zamieszczono w tabeli 7.3.

Tabela 7.3

Zestawienie wyznaczonego stopnia deacetylacji trzema metodami

próbka chitozanu	Stopień deacetylacji, [%]		
	miareczkowanie konduktometryczne	miareczkowanie pH-metryczne	^1H NMR
CS600	61,94	52,11	96,58
BioLog 90/30/A1	58,12	-	92,01
CS100	-	-	98,11

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016]

Zróznicowanie wyników związane jest z metodyką wyznaczania stopnia deacetylacji. Podczas miareczkowania konduktometrycznego oraz pH-metrycznego następuje stopniowe wytrącanie chitozanu, co pomimo intensywnego mieszania i długiego czasu stabilizowania próbek jest źródłem błędów. Efekt ten jest szczególnie istotny dla polimerów o większych ciężarach cząsteczkowych. Próbkę zarówno przed analizą, jak i po analizie ^1H NMR nie wykazywały zmętnień, widma były dobrej jakości, a wyniki najbardziej zbliżone do deklarowanych przez producenta (np. deklarowany stopień deacetylacji chitozanu BioLog 90/30/A1 wynosi DD = 90%).

7.2. Badania bakteriobójczych właściwości biopolimerów

Badania ocen właściwości bakteriobójczych chitozanów o różnych masach cząsteczkowych, kompozytów hydrożelowych, poszczególnych składników kompozytów oraz cieczy znaną z hydrożeli chitozanowych przeprowadzono z wykorzystaniem 9 szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, wyizolowanych z gleby, oraz *Bacillus subtilis* – szczep nr 2021 i *Escherichia coli* – szczep nr 2561, pochodzących z banku szczepów bakterii z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Ocenę stopnia właściwości bakteriobójczych prowadzono metodą dyfuzji krążkowej Kirby-Bauera. W badaniach testowano właściwości antybakteryjne pięciu różnych hydrożelowych kompozytów chitozanowych: opoka przemysłowa-chitozan-TiO₂, 50% chitozan-TiO₂, 50% opoka przemysłowa-chitozan, pył przemysłowy z odsiarczania-chitozan oraz niewypełniony chitozan, do przygotowania których wykorzystano trzy różniące się średnią masą cząsteczkową chitozany firmy BioLog Heppe GmbH: 85/10/A1, 85/2500/A1, 85/5000/A1.

W pierwszym etapie badań, mającym na celu sprawdzenie właściwości bakteriobójczych badanych cieczy (wyciągów wodnych) pochodzących znaną z kompozytów hydrożelowych, nie zaobserwowano żadnej strefy zahamowania wzrostu dla żadnego z 9 szczepów bakterii. Wykonano także badania właściwości bakteriobójczych poszczególnych składników kompozytów. Opoka przemysłowa przemysłowa powodowała minimalne zahamowanie wzrostu *E. coli* i *B. subtilis*. Na płytkach z tlenkiem tytanu (IV) oraz opoką niekalcynowaną średnia strefa zahamowania wzrostu *E. coli* wynosiła 0,3-0,5 mm, a *B. subtilis* pozostał odporny na te substancje. Pył z odsiarczania spalin w ogóle nie zahamował wzrostu badanych bakterii.

W drugim etapie eksperymentu badano także właściwości biobójcze pięciu hydrożelowych kompozytów chitozanowych względem wyizolowanych szczepów z rodzaju *Bacillus* oraz na bakterii *E. coli* i *B. subtilis* pochodzących z banku szczepów. Najmniej wrażliwy na działanie hydrożeli wyizolowanym szczepem okazał się szczep 1. Największą wrażliwością cechowały się szczepy 4, 5 i 8. Najsilniejszym działaniem biobójczym charakteryzowały się dwa

kompozyty hydrożelowe chitozanu, w skład których wchodził TiO_2 . Na płytkach, na których umieszczono kompozyt opoka-chitozan- TiO_2 , średnia strefa zahamowania wzrostu wynosiła ≥ 2 mm dla szczepów 4, 5, 6, 7, 8, natomiast na płytkach, na których umieszczono kompozyt TiO_2 -chitozan, średnią strefę zahamowania wzrostu ≥ 2 mm zaobserwowano dla szczepów 3, 4, 5, 7, 8. Kompozyt hydrożelowy opoka przemysłowa-chitozan wykazał właściwości biobójcze dla szczepów 6 i 7. W przypadku pozostałych szczepów średnia strefa zahamowania wzrostu wahała się w granicach 0,3-1,3 mm. W próbkach z kompozytem hydrożelowym zawierającym dodatek pyłu z odsiarczania spalin nie odnotowano zahamowania wzrostu dla szczepów 3 i 8. Zahamowanie wzrostu o średnicy 0,7-1 mm zaobserwowano dla szczepów 1, 2, 4, 6, 7 i 9, a najbardziej wrażliwy okazał się szczep 5, dla którego zaobserwowano strefę równą 2,7 mm. Czysty hydrożel chitozanowy w przypadku szczepu 7 wykazał średnią strefę zahamowania wzrostu równą 2 mm, nie hamował wzrostu szczepu 9, a ograniczał wzrost pozostałych szczepów. W przypadku szczepów *E. coli* i *B. subtilis* pochodzących z banku szczepów badane kompozyty hydrożelowe wykazywały słabsze działanie biobójcze. Jedynie kompozyt składający się z opoki przemysłowej i chitozanu wykazał strefę zahamowania wzrostu wynoszącą 2,5 mm dla szczepu *E. coli*. Pozostałe kompozyty hydrożelowe dla tego szczepu powodowały zahamowanie jego wzrostu w odległości 1-1,5 mm od krążka. Niewielkie strefy zahamowania wzrostu (0,3 mm) zaobserwowano dla szczepu *B. subtilis* w przypadku hydrożeli zawierających TiO_2 , chitozan i opokę przemysłową, natomiast brak strefy zahamowanego wzrostu widoczny był na wszystkich płytkach, na których umieszczono pozostałe trzy kompozyty chitozanowe. W trakcie testu oceny właściwości bakteriobójczych chitozanu o różnej masie cząsteczkowej (chitozan w postaci suchej) nie uzyskano żadnej strefy zahamowania wzrostu dla badanych szczepów *E. coli* i *B. subtilis*. Rezultaty analogicznych badań przeprowadzonych z zastosowaniem chitozanu o różnej masie cząsteczkowej (chitozan w postaci hydrożelu) pokazują, że wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej wzrost szczepów *E. coli* i *B. subtilis* hamowany był intensywniej.

W trzecim etapie przebadano również możliwość zastosowania opoki lekkiej do procesu uzdatniania wody. Do badania otrzymano opokę niekalcynowaną oraz opokę kalcynowaną. W pierwszym etapie przebadano bezpośrednio właściwości bakteriobójcze otrzymanych granulatów nakładając je na dwuwarstwową płytkę Petriego z podłożem TSA (górna warstwa – 0,7% agar), inokulowaną hodowlami wskaźnikowych szczepów bakteryjnych i obserwowano strefy zahamowania wzrostu. Działanie hamujące wzrost bakterii wszystkich badanych szczepów wykazują preparaty opoki kalcynowanej nieprzemijanej 0,25-0,5 mm i opoki kalcynowanej nieprzemijanej 0,5-1,0 mm. Słabsze właściwości wykazują preparaty opoki kalcynowanej nieprzemijanej 63-125 μm i opoki kalcynowanej nieprzemijanej 125-250 μm . Opoki kalcynowane w porównaniu z niekalcynowanymi mają lepsze właściwości bakteriobójcze w bezpośrednim kontakcie na płytce Petriego. Przeprowadzono również badania na kolumnach w skali laboratoryjnej z wodą jałową skażoną szczepami *Escherichia coli* ATCC 11229 $2,0 \times 10^2$ jtk/100 ml wody źródlanej i *Enterococcus faecalis*

ATCC 49523 $2,0 \times 10^2$ jtk/100 ml wody źródlanej. Wyniki z czterech doświadczeń, wskazują na niewielki stopień spadku liczby bakterii po przejściu wody przez kolumnę z przepłukanymi i doprowadzonymi do $\text{pH} \leq 8$ opokami.

W czwartym etapie określono możliwość zastosowania szeregu modyfikowanych chitozanów do procesu uzdatniania wody: Chitozan Zn, Chityna Cu, Chitozan Cu, Chitozan Ag (1), Chitozan Ag (2), Chitozan Ag (3), które otrzymano z handlowych preparatów firmy BioLog o różnym stopniu deacetylacji a także o różnej masie cząsteczkowej: 95/100/A1; 90/60/A1; 90/30/A1; 90/100/A1; 90/200/A1; 90/400/A1; 90/1000/A1; 85/10/A1; 85/100/A4; 85/400/A1; 85/600/A1; 85/800/A1; 85/100/A1; 85/1500/A1; 85/2000/A1; 85/2500/A1; 85/3000/A1; 85/5000/A1; 80/1000/A1; 75/200/A3. Otrzymane chitozany badano w warunkach laboratoryjnych. Do probówek typu Falcon (50 ml), odważano po 1 g chitozanu i wlewano po 20 ml zawiesiny bakterii w wodzie źródlanej jałowionej przez sączenie. Probówki umieszczano na kołysce laboratoryjnej (60 wahnięć/min) i posiewano po 1 ml zalewowo na TSA po 5, 15, 30 i 60 min oraz inkubowano w 37°C przez 24-48 h. Wyraźny spadek ilości bakterii widoczny jest przy chitozanych modyfikowanych metalami, największy ze srebrem.

7.3. Badania laboratoryjne z zastosowaniem zmodyfikowanych biopolimerów chitozanu

W ramach projektu przebadano aktywność bakteriobójczą zmodyfikowanych biopolimerów (chitozany) w stosunku do bakterii uznawanych za wskaźnikowe oraz do wybranych niebezpiecznych drobnoustrojów, dla których woda może być wektorem (laseczka węgliką, pałeczka tularemii, przecinkowiec cholery). Stosowano następującą metodykę: jałową wodę destylowaną oraz wodę źródlaną (butelkowana, zakupiona w markecie), jałowioną przez sączenie przez filtr $0,2 \mu\text{m}$ (*cellulose nitrate filter* – Sartorius), skażano dwukrotnie przemytą wodną zawiesiną komórek *Escherichia coli* ATCC 11229 oraz *Enterococcus faecalis* ATCC 49523 do końcowej ich zawartości $1,5 \times 10^3/\text{ml}$ i wlewano do probówek typu Falcon 50 ml, po 20 ml. Do probówek tych odważano po 1,0 g poszczególnych chitozanów, wstrząsano i umieszczano na kołysce laboratoryjnej o częstotliwości wahnięć 60/min. Próby po 1 ml pobierano po 5, 15, 30 i 60 min, sporządzano rozcieńczenia dziesiętne i wysiewano zalewowo na podłoże TSA (Trypticasein Soy Agar- Biocorp). Po skrzepnięciu posiewu pokrywano go cienką warstwą takiego samego jałowego, ostudzonego do 48°C podłoża. Płytki inkubowano w 37°C 24-48 godz. i liczono kolonie. Wyniki przy używaniu wody destylowanej w porównaniu z wodą źródlaną nie różniły się istotnie, dlatego w wynikach przedstawiono wartości średnie.

Aktywność następujących chitozanów: Chitozan 90/30/A1, Chitozan 85/5000/A1, Chitozan 85/3000/A1, Chitozan 85/10/A1, Chitozan 75/200/A3, Chitozan 85/100/A4, Chitozan

90/100/A1, Chitozan 85/1500/A1, Chitozan 85/600/A1, Chitozan 85/800/A1, Chitozan 90/60/A1, Chitozan85/400/A1, Chitozan 90/30/A1, Chitozan 85/2000/A1, Chitozan 85/2500/A1, Chitozan 85/1000/A1, Chitozan 95/100/A1, Chitozan 90/200/A1, Chitozan 90/400/A1, Chitozan 90/1000/A1, Chityna:Cu, Chitozan:Zn i Chitozan:Ag (1), została przebadana w stosunku do *Escherichia coli* ATCC 11229 i *Enterococcus faecalis* ATCC 49523.

Jedynie chitozan modyfikowany Ag działał bakteriobójczo zarówno na *E. coli*, jak i na *E. faecalis*. Chityna:Cu działa również silnie bakteriobójczo, natomiast chitozan modyfikowany Zn w stopniu mniejszym. Inne chitozany niemodyfikowane metalami nie wykazywały działania bakteriobójczego lub wykazywały je w stopniu nieznacznym.

Badanie chitozanów modyfikowanych [Ag 01 – Ag jak w kolumnie w Broniszach, 0,1 Ag 100⁰, 0,2 Ag 100⁰, 0,3 Ag 100⁰, 0,4 Ag 100⁰, 0,5 Ag 100⁰, 0,6 Ag 100⁰, 0,7 Ag 100⁰, 0,8 Ag 100⁰, 0,075 Ag 100⁰, 0,05 Ag 100⁰, 0,025 Ag 100⁰, 0,0125 Ag 100⁰, 0,8 Ag próba chlorkowa, 0,8 Ag (próbka odniesienia do 25) Ag (3'), Ag 1:100, Ag 2:100, Ag 3:100, Ag 4:100, Ag 5:100, Ag 6:100, Ag 7:100, Ag 8:100] w kierunku ich bakteriobójczego działania wykazało, że wszystkie one powodują znaczny spadek *E. coli* i *Enterococcus faecalis* w wodzie. Większość modyfikowanych srebrem chitozanów już po 5 min działania doprowadza do znacznego spadku żywych bakterii, a odsetek ten po 15 min sięga 80-99%.

Wybrane chitozany modyfikowane srebrem (5 preparatów) badano w kierunku ich działania bakteriobójczego po kilkukrotnym wypłukaniu wodą (stosowano 3-krotne płukanie po 120 min na kołysce). Nie nastąpił spadek właściwości bakteriobójczych w stosunku do *E. coli* i *Enterococcus faecalis*.

Badano również działanie chitozanów na bakterie zaliczane do czynników biologicznych z grupy A (*Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* i *Bacillus anthracis*). Do namnażania *Francisella tularensis* używano TSB wzbogaconego cysteiną i glukozą, natomiast kolonie liczono na podłożu Columbia Agar po 5-dniowej inkubacji w 37°C. *Vibrio cholerae* i *Bacillus anthracis* namnażano i liczono kolonie z użyciem TSB i TSA. Endospory szczepu 34F2 *Bacillus anthracis* otrzymywano następująco:

Szczep namnażano na podłożu TSB w kolbie 500 ml w temp 37°C, w termowyrząsarce o częstotliwości 120/min przez 10 dni, następnie wirowano, osad dwukrotnie przemywano H₂O destyl., zawieszano w 20 ml H₂O i dodawano etanol do stęż. 70%. Po 24 godz. wirowano, osad zawieszano w wodzie dejonizowanej i tak przygotowane endospory przechowywano w chłodni (6-8°C). Przed użyciem każdorazowo preparat mianowano. *Francisella tularensis* i *Vibrio cholerae* są wysoce wrażliwe na działanie chitozanu modyfikowanego srebrem (już po 5 min. następuje spadek bakterii o 100%), a także bardzo wrażliwe na chitozany modyfikowane Cu – Cu 85/2500/A1 i Cu 85/1500/A1, niewrażliwe są natomiast na chitozan Cu 95/100/A1. Endospory laseczek węglików są wrażliwe na działanie chitozanów modyfikowanych srebrem, ale dopiero po 60 min, a w 100% po 6 godz. działania. Dynamikę działania chitozanów przedstawiono w tabelach (tab. 7.4 i 7.5).

Tabela 7.4

Wpływ chitozanów na komórki *Francisella tularensis* ser. *Codar* w wodzie przy zakażeniu wyjściowym $4,6 \times 10^2$ / ml

Próbka	Czas kontaktu							
	5 min	% spadku liczby bakterii	15 min	% spadku liczby bakterii	30 min	% spadku liczby bakterii	60 min	% spadku liczby bakterii
Chitozan naturalny – biały	$4,8 \times 10^2$	-4,3	$5,6 \times 10^2$	-24,4	$5,0 \times 10^2$	-11,1	$4,5 \times 10^2$	10,0
Ag (3)	0	100	0	100	0	100	0	100
Cu 85/2500/A1	$4,8 \times 10^1$	89,6	$3,3 \times 10^1$	92,8	$3,5 \times 10^1$	92,4	$1,2 \times 10^1$	97,4
Cu 95/100/A1	$4,7 \times 10^2$	-2,2	$3,4 \times 10^2$	26,1	$4,0 \times 10^2$	13,1	$4,7 \times 10^2$	-2,2
Cu 85/1500/A1	$4,0 \times 10^1$	87,0	$3,6 \times 10^1$	92,7	$3,7 \times 10^1$	92,0	$1,0 \times 10^1$	99,8
Ag	0	100	0	100	0	100	0	100
Kontrola	$4,6 \times 10^2$	0	$4,4 \times 10^2$	4,4	$4,4 \times 10^2$	4,4	$4,3 \times 10^2$	6,5

* wzrost liczby bakterii, prawdopodobnie wskutek pęcznienia chitozanu i spadku wody wolnej w próbce

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Tabela 7.5

Wpływ chitozanów na *Vibrio cholerae* w wodzie przy zakażeniu wyjściowym $5,76 \times 10^2$ /ml

Próbka	Czas kontaktu							
	5 min	% spadku liczby bakterii	15 min	% spadku liczby bakterii	30 min	% spadku liczby bakterii	60 min	% spadku liczby bakterii
Chitozan naturalny – biały	$7,6 \times 10^2$	-32*	$7,7 \times 10^2$	-33,7*	$7,0 \times 10^2$	-21,5*	$4,5 \times 10^2$	21,9
Ag (3)	0	100	0	100	0	100	0	100
Cu 85/2500/A1	$5,5 \times 10^1$	90,5	$5,6 \times 10^1$	90,3	$5,8 \times 10^1$	90,0	$1,0 \times 10^1$	98,3
Cu 95/100/A1	$1,18 \times 10^3$	-104*	$1,1 \times 10^3$	-90,9*	$8,8 \times 10^2$	-52,7*	$5,9 \times 10^2$	-2,4*
Cu 85/1500/A1	$5,0 \times 10^1$	90,6	$4,8 \times 10^1$	91,7	$3,7 \times 10^1$	93,6	$1,5 \times 10^1$	97,4
Ag	0	100	0	100	0	100	0	100
Kontrola	$5,76 \times 10^2$	0	$5,7 \times 10^2$	1,1	$5,75 \times 10^2$	0,88	$5,7 \times 10^2$	1,1

* wzrost liczby bakterii, prawdopodobnie wskutek pęcznienia chitozanu i spadku wody wolnej w próbce

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Spis literatury do rozdziału 7

1. Adams M.H. Bacteriophages. 1959. New York, NY; Interscience Publishers, Inc.
2. Bassi R., Prasher S.O., Simpson B.K., 1999. Effects of Organic Acids on the Adsorption of Heavy Metal Ions by Chitosan Flakes. *J. Environ. Sci. Health Part A*, A34, 289-294.
3. Benhabiles M.S., Salah R., Lounici H., Drouiche N., Goosen M.F.A., Mameri N., 2012. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste, *Food Hydrocolloids* 29; 48-56.
4. Bhatnagar A, Sillanpää M., 2009. Applications of chitin – and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater – a short review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 152(1-2):26-38.
5. Bish J.P., Pendyal A., Ding L., Ferrante H., Nguen V., McDonald-McGinn D. et al., 2006. Specific cerebellar reductions in children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Neuroscience Letters*, 399 (3), 245-248.
6. Chang H.-Ch., Chen Ch.-R., Lin J.-W., Shen G.-H., Chang K.-M., Tseng Y.-H., Weng S.-F., 2005. Isolation and characterization of novel giant *Stenotrophomonas maltophilia* phage ϕ SMA5. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3, 1387-1393.
7. Chen Y.M., Chung Y.Ch., Wang L.W., Chen K.T., Li S.Y., 2002. Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen, *J. Environ. Sci. Health, Part A*, 37; 1379-1390.
8. Chung Y.C., Su Y.P., Chen C.C., Jia G., Wang H.L., Wu J.C., Lin J.G., 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin.*, 25 (7), 932-6.
9. Chung Y.C., Chen C.Y., 2008. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan, *Bioresource Technol.*, 99, 2806-2814.
10. De Alvarenga E.S., Pereira de Oliveira C., Bellato R.C., 2010. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan, *Carbohydr. Polym.* 80; 1155-1160.
11. Discher D.E., Janmey P., Wang Y.L., 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310; 1139.
12. Dojlido J. (red.), 2000. Uboczne produkty dezynfekcji wody. Wyd. PZITS, Warszawa, s. 56
13. Drury J.L., Mooney D.J., 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, p. 4337-51.
14. Dyrektywa 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 października 2000 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej. Ramowa Dyrektywa Wodna (The EU Water Framework Directive).
15. Dziubek Z. (red.), 2003. Choroby zakaźne i pasożytnicze. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, s. 540.
16. Gnus M., Dudek G., Turczyn R., Tórz A., Łacka D., Konieczny K., Łapkowski M., 2015. Pervaporative investigation of ethyl alcohol dehydration. *Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv.* XX, pp. 54-63.

17. El-Geundi, M.S., 1997. Adsorbents for Industrial Pollution Control, *Adsorpt. Sci. Technol.*, 15, 777-787.
18. Fideles T.B., Santos J.L., Tomás H., et al., 2018. Characterization of Chitosan Membranes Crosslinked by Sulfuric Acid. *Open Access Libr. J.* 05, 1-13.
19. Kołwzan B., 2011. Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochrona Środowiska*, nr 4 (33), s. 3-14.
20. Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J., 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-63.
21. Krzesińska M., Tórz A., Zachariasz J., Muszyński J., Socha J., Marcinkowski A., 2007. New chitosan/CEG (compressed expanded graphite) composites – preparation and physical properties. *Green Chemistry*, Issue 9, 2007: 842-844.
22. Kumar M.N.R., 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1), 1-27.
23. Kunicki-Goldfinger W., 1994. *Życie bakterii*. PWN, Warszawa, wyd. 4, s. 618.
24. Langergraber G., 2005. The role of plant uptake on the removal of organic matter and nutrients in subsurface flow constructed wetlands – A simulation study. *Water Science and Technology*, 51 (9), pp. 213-223.
25. Lee W., Lee V., Polio S., Keegan P., Lee J-H., Fischer K., Park J-K., Yoo S-S., 2010. On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels. *Biotechnol. Bioeng.* 105(6):1178-86.
26. Petrovski S., Batinovic S., Rose J.J., Seviour, R.J., 2022. Biological control of problem bacterial populations causing foaming in activated sludge wastewater treatment plants – phage therapy and beyond. *Lett. Appl. Microbiol.* Accepted Manuscript. DOI: 10.1111/lam.13742.
27. Ravi D., Sivasankara P., 2001. Flocculation of Kaolinite Suspensions in Water by Chitosan, *Wat. Res.* 35; 3904-3908.
28. Rinaudo M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, Volume 31, Issue 7, July 2006: 603-632.
29. Roller S., Covill N., 1999. The Antifungal Properties of Chitosan in Laboratory Media and Apple Juice, *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 67-77.
30. Sahariah P., Másson M., 2017. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship, *Biomacromolecules* 18; 3846-3868.
31. Sebti I., Martial-Gros A., Carnet-Pantiez A., Grelier S., Coma V., 2005. Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against *Aspergillus niger* Contamination, *J. Food Sci.*, 70, M100-M104.
32. Smyła A., 2005. Zagrożenia bakteryjne wód powierzchniowych. VII Ogólnopolska sesja popularnonaukowa „Środowisko a zdrowie – 2005”. Częstochowa, 2-3.06.2005. Wyd. DCZG, Częstochowa, s. 113-128.

33. Smyła A., Piotrowska-Seget Z., Tyflewski A., 2003. Pathogenic bacteria hazard in surface. Walters. AUMC Limnological Papers, Toruń. XIII, z. 110: 159-169.
34. Sozański M., 2012. Procesy naturalne w rozwoju technologii uzdatniania wody (TUW). Gaz, Woda i Technika Sanitarna, nr 3 s. 110-116.
35. Szumilas T., Michalska M., Bartoszewicz M., 2001. Charakterystyka bakteryjnego zanieczyszczenia ścieków komunalnych z dużej aglomeracji miejskiej i ocena stopnia redukcji tego zanieczyszczenia w procesie biologicznego oczyszczania ścieków. Roczn. PZH, 2001 (52), nr 2, s. 155-164.
36. Talha Gokmen M., van Camp W., Colver P.J, Bon S.A., Du Prez F., 2009. Fabrication of Porous "Clickable" Polymer Beads and Rods through Generation of High Internal Phase Emulsion (HIPE) Droplets in a Simple Microfluidic Device. *Macromolecules* 42, 9289-9294.
37. Tórz A., Łącka D., Turczyn R., Gnus M., 2015. The investigations on process type influence on methyl violet adsorption on chitin and chitin deacetylation products. *Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv.*, XX, pp. 273-280.
38. Vandenaabeele J., 1993. Manganese-removal by microbial consortia from rapid sand filters treating water containing Mn^{2+} and NH_4^+ . Rozprawa doktorska. Uniwersytet Gent, Belgie.
39. Wang G.-J., Hsu Y.-F., Hsu S.-H., Horng R., 2006. JSR photolithography based microvessel scaffold fabrication and cell seeding. *Biomed Microdevices* 8, 17.
40. Water safety plan manual (WSP manual). Step-by-step risk management for drinking-water suppliers. 2009. Wyd. World Health Organization; International Water Association, p. 108.
41. Weber-Dąbrowska B., Gworek B., Wowk J., 2008. Raport z badań pobranych próbek wody z 20 miejsc. Maszynopis.
42. Xie W., Xu P.X., Wang W., Lu Q., 2002. Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. *Carbohydrate Polymers* 50, 35-40.
43. Zheng L.Y., Zhu J.F., 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 527-530.
44. Zivanovic S., Chi S., Draughon A.F., 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70(1), M45-M51.
45. Zmysłowska I., Golas I., Korzekwa K., 2006. *Aeromonas hydrophila* jako potencjalny wskaźnik antropogenicznego zanieczyszczenia środowiska wodnego. *Acta Agraria et Silvestria. Series Agraria*, t. 49, s. 541-547.
46. Żaczek M., Weber-Dąbrowska B., Łusiak-Szelachowska M., Międzybrodzki R., Lecion D., Wierzbicki K., Gworek B., Kassner J., Adamski R., Górski A., 2011. Occurrence and characteristics of bacteriophages in environmental waters. 19th International Phage Biology Meeting, 07-12.08.2011, Evergreen State College, Olympia, Washington, U.S.A., Abstract Book, p. 59.

8. BAKTERIE CHOROBOTWÓRCZE I HEMOLIZUJĄCE

8.1. Kompendium wiedzy o bakteriach chorobotwórczych

Bakterie należą do drobnoustrojów, które są najliczniej reprezentowane w środowisku pod względem rodzajów i gatunków. W próbkach pobranych z różnych biotopów, w tym również wodnych, można wykryć bakterie zarówno saprofityczne, jak i chorobotwórcze, względnie chorobotwórcze oraz oportunistyczne. Z punktu widzenia bezpiecznego wykorzystania wody do celów konsumpcyjnych na uwagę zasługują jedynie bakterie stwarzające potencjalne zagrożenie dla zdrowia człowieka, zwierząt lub roślin, czyli odpowiedzialne za wywoływanie chorób. Bakterie w wodzie mogą występować w postaci wegetatywnej lub w formie przetrwalnej. Oprócz nich innymi czynnikami biologicznymi stwarzającymi ryzyko są bakteryjne lub grzybicze toksyny oraz geny przenoszone za pośrednictwem bakteriofagów, odpowiedzialne m.in. za lekooporność bakterii. Bakterie obecne w wodzie, szczególnie niewłaściwie uzdatnionej, mogą wywoływać różne stany chorobowe.

Każda bakteria uznawana w medycynie za chorobotwórczą musi mieć pewne specyficzne cechy, umożliwiające jej zaatakowanie organizmu gospodarza, penetrację błon komórkowych, rozmnażanie się w zaatakowanym organizmie i w konsekwencji wywołanie procesu chorobowego. Jedną z takich cech może być produkcja toksyn lub innych substancji wewnątrzkomórkowych oraz pozakomórkowych, dezintegrujących prawidłowy metabolizm komórki, tkanki i w konsekwencji całego zaatakowanego organu – **Todar [2012]**. Cechy mikroorganizmów, które pozwalają im powodować chorobę, znane są jako czynniki wirulencji lub patogenności. Miarą chorobotwórczości bakterii jest zakaźność i zjadliwość.

Zakaźność bakterii chorobotwórczych jest określana za pomocą dawki zakaźnej ID₅₀, czyli liczby komórek bakterii potrzebnych do zainfekowania 50% zwierząt narażonych na ich działanie. Zjadliwość, często w piśmiennictwie określana mianem wirulencji, jest definiowana w postaci dawki letalnej LD₅₀, czyli liczby komórek bakterii wymaganej dla zabicia 50% zwierząt narażonych na ich działanie. Na wirulencję składają się zakaźność, inwazyjność i toksyczność – **Zaremba i Borowski [2002]**, **Murray i in. [2011]**. Powstaje ona w wyniku wielu jednostkowych procesów, takich jak: adhezja, kolonizacja tkanek, inwazja, ewazja (uniknięcie mechanizmów obronnych gospodarza), wytwarzanie specyficznych czynników (enzymów, toksyn, egzopolisacharydów) i zdolności bakterii do utrzymania się i odpowiedzi

na stymulację środowiska. Z punktu widzenia chorobotwórczości danej bakterii zdolność do utrzymania się oraz odpowiedzi na stymulację środowiska jest bardzo istotna, ponieważ bakterie patogenne powinny przeżywać w różnych, zmieniających się warunkach organizmu gospodarza, np. ciała ludzkiego. U wielu bakterii chorobotwórczych wykazano obecność genów zjadliwości zawartych w chromosomach i/lub w DNA pozachromosomalnym. Wiele czynników fizycznych i chemicznych oraz biologicznych pozwala bakteriom na przyleganie (adhezję), wytwarzanie egzopolisacharydów, namnażanie się i tworzenie błon biologicznych. Dzięki tym czynnikom proces zakażenia może ulec stabilizacji lub rozprzestrzeniać się. Adhezja jest podstawowym warunkiem w procesach zjadliwości – **Todar [2012]**.

Wytwarzane przez niektóre bakterie egzopolisacharydy (zewnątrzotoczkowy polisacharyd i alginat) są istotnymi czynnikami uczestniczącymi w rozwoju zakażeń w procesie przylegania do powierzchni przez tworzenie błony biologicznej, wewnątrz której namnażają się bakterie – **Murray i in. [2011]**.

Toksyny bakteryjne uważane są przez wielu badaczy za podstawowy wyznacznik chorobotwórczości bakterii. Są one prostymi lub złożonymi białkami, peptydami (czasem zawierającymi grupy węglowodanowe lub lipidowe) bądź lipolisacharydami pochodzenia bakteryjnego, które łącząc się z receptorami, doprowadzają do uszkodzenia komórki i/lub zaburzenia jednej lub kilku funkcji fizjologicznych organizmu człowieka, zwierzęcia lub rośliny. Uszkodzenie to może prowadzić do choroby lub śmierci gospodarza. Do najbardziej poznanych toksyn bakteryjnych należą: toksyny lipolisacharydowe, tzw. endotoksyny bakteryjne, oraz toksyny białkowe i peptydowe, wśród nich toksyny cytolityczne o właściwościach hemolitycznych.

Ogółem poznano 90 toksyn cytolitycznych, w tym 52 występujące u bakterii G+ i 38 u bakterii G-. Mają one wspólną cechę: uszkodzają błonę komórkową u organizmów eukariotycznych przez jej rozerwanie lub zaburzenie funkcji oraz błony otaczające organella komórkowe.

Stwierdzono istnienie czterech głównych mechanizmów działania toksyn cytolitycznych:

1. rozbicie fosfolipidów błony np. α -toksyna *C. perfringens* i β -toksyna *S. aureus*,
2. rozpuszczenie składników błony np. surfaktyna *B. subtilis*,
3. wbudowywanie białkowych lub peptydowych cząsteczek w błonę np. α -hemolizyna *E. coli*, α i δ -toksyna *S. aureus* i aerolizyna *A. hydrophila*,
4. interakcja toksyny ze składnikami błony, np. streptolizyna O.

Zaremba i Borowski [2002] wymieniają toksyny uszkodzające błonę. Wiele z nich jest wytwarzanych przez bakterie o dużym znaczeniu klinicznym, np. *Vibrio* sp. czy *Listeria monocytogenes*.

Bakterie G+, a także liczne bakterie G- mogą wytwarzać różnego typu białka, które są klasyfikowane do grupy enzymów toksycznych – **Murray i in. [2011]**. Należą do nich proteazy, hialuronidaza, lipazy, nukleazy (DN-aza), fosfatazy, koagulaza, katalaza i inne.

Choroby przewodu pokarmowego wywołują najczęściej: *Enterococcus* sp., *E. faecalis*, bakterie grupy *coli*, bakterie grupy *coli* typu kałowego, termotolerancyjne szczepy *E. coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. Wydaje się, że spośród wymienionych *E. coli* stwarza największe zagrożenie zdrowotne ze względu na odkrycie wielu szczepów tej bakterii, które charakteryzują się wyznacznikami chorobotwórczości. Należą do nich następujące seropatogenne szczepy: ETEC – enterotoksygenne, EPEC – enteropatogenne, EIEC – enteroinwazyjne, EHEC – enterokrwotoczne i EAEC – enteroadherentne.

Szczepy z grupy EHEC opisywane były pierwotnie jako VTEC, czyli szczepy *E. coli* produkujące werotoksyny (VT).

W wodzie występują także inne bakterie chorobotwórcze, również nieobjęte kontrolą sanitarną. Jak wynika z przytoczonych danych z piśmiennictwa, należą do nich takie bakterie jak: *Shigella* sp., *Yersinia* sp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio* sp., *Campylobacter jejuni* czy chorobotwórcze szczepy *E. coli*. Bakterie te identyfikuje się jako przyczyny zatruć pokarmowych. Spożycie pokarmu wraz z żywymi drobnoustrojami (*Salmonella* sp., *Shigella* sp., enteropatogenne *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Yersinia* sp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp., *C. jejuni*, *Aeromonas hydrophila*) może powodować toksykoinfekcje.

Niektóre bakterie mają wyjątkową cechę fizjologiczną polegającą na wywoływaniu hemolizy erytrocytów pochodzących od różnych zwierząt. Pod względem tej unikalnej cechy fizjologicznej bakterie hemolizujące stanowią jednolitą grupę łatwo odróżniającą się od pozostałych bakterii. Hemoliza jest cechą polegającą na niszczeniu czerwonych krwinek (np. baranich, końskich lub ludzkich) przez ich rozpuszczenie (lizę) w bezpośrednim kontakcie z bakteriami produkującymi białkowe lub peptydowe toksyny cytolityczne, tzw cytolizyny. Toksyny te, z powodu ich właściwości hemolitycznych, często nazywane są hemolizynami. Z warsztatowego punktu widzenia interesujące jest, że zjawisko to występuje u różnych bakterii. Według Bergeya cecha ta jest charakterystyczna głównie dla bakterii chorobotwórczych – **Holt i in. [2000]**. Wiele z nich ma duże znaczenie kliniczne. Zdolność wywoływania hemolizy mają zarówno bakterie tlenowe, jak i beztlenowe (np. z rodzaju *Bacteroides*). Większość hemolizyn jest wytwarzana przez bakterie Gram-dodatnie należące do rodzin: *Bacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*. Są to cytolizyny należące do rodziny hemolizyn aktywowanych przez grupy tiolowe. Większość cytolizyn bakterii G- tworzy dość jednorodną rodzinę toksyn RTX (ang. *repeats in toxin*). Są tak nazwane, ponieważ charakterystyczną cechą tych białek są powtórzenia w sekwencji aminokwasów. Cytolizyny bakterii Gram-ujemnych są znacznie większe, ich masa cząsteczkowa wynosi ok. 110 kDa – **Bauer i Welch [1996]**, **LeChevallier i in. [1996]**.

Do **bakterii cylindrycznych G+** należą bakterie klasyfikowane do różnych rodzajów, mających odmienne właściwości, a zaliczyć do nich można:

- a) tlenowe **laseczki** wytwarzające przetrwalniki, *Bacillus* sp. Bakterie z gatunku *Bacillus cereus* są organizmami, które dostosowały się do możliwości bytowania w różnorodnych warunkach. Są one w stanie rosnąć w niskich temperaturach, co charakteryzuje szczepy

zarówno psychrofilne, jak i termofilne, rosnące w temperaturze wynoszącej nawet 50°C, a ich przetrwalniki przeżywiają warunki obróbki cieplnej w temperaturze bliskiej wrzeniu wody. Chorobotwórczość *B. cereus* związana jest z obecnością w ich komórkach licznych substancji o charakterze enterotoksyn. Do najważniejszych enterotoksyn bakteryjnych należą:

- enterotoksyna emetyczna (cerulide) wywołująca bóle, wymioty i nudności w czasie krótszym niż 6 godzin od spożycia zakażonego pokarmu,
- enterotoksyna odpowiedzialna za wywoływanie biegunki,
- enterotoksyny o charakterze hemolizyn (cereolizyny), zbliżone w budowie i działaniu do streptolizyny O,
- fosfolipaza C, zbudowana z trzech podjednostek: hydrolazy fosfotydyloinozytolu, fosfotydylocholiny oraz hemolitycznej sfingomieliny,
- kolagenaza i proteinaza seryny – czynniki chorobotwórcze przy infekcjach oczu i skóry – **Murray i in. [2011]**.

b) ziarniaki stanowiące charakterystyczną i wyróżniającą się ze względu na kulisty kształt komórki bakteryjnej grupę bakterii G+. Z klinicznego punktu widzenia z drobnoustrojów tlenowych największe znaczenie mają rodzaje: katalazododatni *Staphylococcus* oraz katalazoujemne *Streptococcus* i *Enterococcus*. Do rodzaju *Staphylococcus* należy 40 gatunków i 24 podgatunków, które mogą być podzielone pod względem jednej różnicującej cechy o charakterze klinicznym na dwie podstawowe grupy – gronkowce koagulazododatnie i koagulazoujemne – **Murray i in. [2011]**.

Najważniejszy i najbardziej wirulentny gatunek gronkowców to *S. aureus*. Chorobotwórczość tego gatunku jest ściśle związana z wytwarzaniem licznych zewnątrzkomórkowych substancji takich jak: hemolizyny, leukocydyna, koagulaza, stafylokinaza, hialuronidaza, nukleazy, proteazy, lipazy, toksyna pirogenna, oraz z wieloma składnikami ich powierzchni (białko A, otoczka, peptydoglikan, kwasy teichojoyowe), które są czynnikami różnorodnych infekcji. Zagrożenie zdrowotne jest spotęgowane faktem, że nie wynika z jednego zdefiniowanego czynnika zjadliwości, za chorobotwórczość jest odpowiedzialny zespół cech. Stałą cechą *S. aureus* jest wytwarzanie koagulazy oraz ciepłostajłej DNA-zy. Fakt ten jest wykorzystywany w diagnostyce tych bakterii, ponieważ gronkowce koagulazoujemne stanowią komensalną i fizjologiczną florę skóry i błon śluzowych człowieka. Uważa się jednak, że mogą to być drobnoustroje oportunistyczne, powodujące zakażenia w sytuacji osłabienia tkanek. Gatunkiem najczęściej izolowanym przy zakażeniach oportunistycznych jest *S. epidermidis*. Przyczyną infekcji dróg moczowych mogą być inne gronkowce, takie jak: *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* oraz *S. schleiferi* – **Murray i in. [2011]**. Na podłożu agarowym wzbogaconym krwią baranią, króliczą lub końską (rzadziej ludzką) krwinki są hemolizowane przez α lub β hemolizyny gronkowców, a ich kolonie są barwy białej, szarej lub złocistopomarańczowej, o powierzchni gładkiej, wilgotnej, okrągłe

i kopulaste. Oprócz wzmiankowanej grupy gronkowców wśród ziarniaków istotnych z punktu widzenia zdrowia człowieka wyróżnić możemy ziarniaki katalazoujemne. Występują one powszechnie w środowisku naturalnym (gleba, woda, powietrze, rośliny), w produktach żywnościowych pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Mogą kolonizować skórę i/lub błony śluzowe człowieka i uczestniczyć w zakażeniach z różną lokalizacją. Występowanie i znaczenie kliniczne najpowszechniejszych ziarniaków katalazoujemnych przedstawiono za **Zarębą i Borowskim [2002]** w tabeli 8.1.

Tabela 8.1

Występowanie i znaczenie kliniczne ziarniaków katalazoujemnych

Gatunek	Występowanie i znaczenie kliniczne
<i>Streptococcus</i> sp.	mikroflora przewodu pokarmowego, duże znaczenie kliniczne
<i>Enterococcus</i> sp.	mikroflora przewodu pokarmowego, duże znaczenie kliniczne
<i>Gemella</i> sp.	mikroflora górnych dróg oddechowych, rzadko izolowane z materiałów klinicznych
<i>Aerococcus</i> sp.	środowisko naturalne, produkty zwierzęce, rzadko izolowane z materiałów klinicznych
<i>Leuconostoc</i> sp.	środowisko naturalne, znaczenie w przemyśle mleczarskim, przy produkcji marynat, win, rzadko izolowane z materiałów klinicznych
<i>Pediococcus</i> sp.	środowisko naturalne, wykorzystywane w przemyśle browarniczym i spożywczym (piwo, wino, sery, kiełbasy, produkty warzywne), bakterie kwasu mlekowego, rzadko izolowane z materiałów klinicznych
<i>Lactococcus</i> sp.	występują w żywności, przewodzie pokarmowym człowieka, wykorzystywane w przemyśle spożywczym, bakterie kwasu mlekowego, rzadko izolowane z materiałów klinicznych

Źródło: Zaręba i Borowski [2002].

Rodzaj *Streptococcus* skupia liczne gatunki charakteryzujące się odmiennymi właściwościami morfologicznymi i genotypowymi oraz różną chorobotwórczością. Paciorkowce to bakterie kształtu kulistego lub owalnego, w preparacie mikroskopowym układają się w pary lub tworzą łańcuszki. Nie wytwarzają przetrwalników i (poza nielicznymi wyjątkami) nie wykazują ruchu, fermentują glukozę do kwasu mlekowego. Są tlenowcami lub względnymi beztlenowcami. Należą do drobnoustrojów wybrednych, ponieważ rosną słabo lub nie rosną wcale na podłożach zwykłych. Jedną ze stosowanych rutynowo klasyfikacji paciorkowców uwzględnia typ hemolizy na podłożu agarowym z dodatkiem krwi. Na podłożu agarowym z krwią tworzą małe kolonie (0,5-1,0 mm), najczęściej wypukłe, gładkie, błyszczące, matowe lub śluzowe, często otoczone strefą hemolizy. Jednakże morfologia kolonii paciorkowców jest zróżnicowana. *S. pyogenes* tworzy małe, przezroczyste kolonie, otoczone relatywnie dużą strefą β -hemolizy, natomiast kolonie *S. agalactiae* są większe, bardziej płaskie, kremowe, śluzowate i otoczone mniejszą strefą hemolizy, często możliwą do zaobserwowania dopiero po usunięciu kolonii z podłoża – **Ślopek [1972]**.

c) **G+ pałeczki**, wśród których wyróżnić można pałeczki nieprzetrwalnikujące o regularnych i nieregularnych kształtach. **Pałeczki nieprzetrwalnikujące o regularnych kształtach** – należą na ogół do rodzajów *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, a także wielu innych występujących w środowisku lub stanowiących tzw. mikroflorę fizjologiczną, np. przewodu pokarmowego zwierząt. Spośród wymienionych *L. monocytogenes* jest najbardziej podstępny i niebezpiecznym patogenem. Jest ona przez wielu uważana za bardziej niebezpieczną niż *Salmonella* sp. i *Campylobacter* sp. Może ona rosnąć w szerokim zakresie temperatur od 1°C do 45°C, może również jako organizm psychrotrofowy, namnażać się w domowych lodówkach. Jest jedynym gatunkiem chorobotwórczym w rodzaju *Listeria*. Bytuje wewnątrzkomórkowo w makrofagach i w odróżnieniu od innych niepatogennych pałeczek *Listeria* sp. ma zdolność wywoływania hemolizy typu β – **Todar [2012]**. Ponieważ głównym mechanizmem obronnym przed drobnoustrojami wewnątrzkomórkowymi jest fagocytoza, możliwe, że właśnie hemoliza, dzięki obecności toksyny listeriolizyny O, stanowi unikalną cechę obronną tej bakterii przed fagocytozą, polegającą na „ucieczce” z bakteriobójczego środowiska wodniczek do cytoplazmy – **Zaremba i Borowski [2002]**. Listeriolizyna O należy do nowo odkrytych toksyn uszkodzających błony. Toksyna ta wydaje się być głównym czynnikiem zjadliwości wpływającym na wewnątrzkomórkowy wzrost tych bakterii. Zdolność wywoływania hemolizy typu β jest wykorzystywana w identyfikacji klinicznej do odróżnienia *L. monocytogenes* od 6 niepatogennych gatunków klasyfikowanych do tego samego rodzaju, ale niemających tej cechy. Zakażenia pałeczką *L. monocytogenes* należą do najważniejszych bakteryjnych zakażeń okołoporodowych. Mogą powodować poronienia, porody przedwczesne, a także postacie posocznicowe płodu, które w obrazie klinicznym i histopatologicznym są swoiste dla zakażenia tym gatunkiem. Do innych groźnych dla życia chorób oprócz listeriozy należą również przypadki zapalenia opon mózgowych i mózgu, zmiany skórne, zapalenie spojówek, węzłów chłonnych, wsierdzia, otrzewnej, szpiku i kości, płuc oraz zapalenia żołądkowo-jelitowe, ropnie mózgu. **Pałeczki nieprzetrwalnikujące o nieregularnych kształtach** – bakterie z tej grupy mogą występować także w charakterystycznych układach komórek w preparatach barwionych. Do tej grupy można zaliczyć takie rodzaje jak: *Corynebacterium*, *Arcanobacterium*, *Rothia*.

Cechą charakterystyczną chorobotwórczych **bakterii cylindrycznych G-** mających zdolność hemolizy jest obecność w ścianie komórkowej specyficznego związku wielkocząsteczkowego o charakterze endotoksyny, odpowiadającego za swoistość antygenową. Są to biologicznie aktywne lipopolisacharydy (LPS) występujące w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej, stanowiące jej integralny i unikatowy składnik. Będąc elementem osłony, komórki są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania i przeżywalności bakterii. Pokrywając ok. 70% jej powierzchni, chronią mikroorganizm przed obronnymi mechanizmami zainfekowanego organizmu, kwasami żółciowymi i hydrofobowymi antybiotykami. LPS stwarza szczególne zagrożenie ze względu na dużą toksyczność objawiającą się gorączką, zmianą liczebności leukocytów, trudnościami w oddychaniu, a nawet śmiercią. Uwolnienie LPS ze zniszczonych

bakterii wywołuje odpowiedź zapalną powodującą wiele objawów infekcji. Endotoksyny wdychane wraz z kurzem aktywują makrofagi płucne, co wiąże się z nadprodukcją mediatorów, obniżeniem ciśnienia krwi, wysoką gorączką, rozsianym wewnątrznacyniowym krzepnięciem krwi i wstrząsem septycznym prowadzącym do śmierci. Działanie fizjopatologiczne endotoksyn G- bakterii jelitowych polega na: indukcji interleukiny IL-1, pirogeny endogenne wywołującego gorączkę, leukopenii, hipotensji, upośledzeniu perfuzji (ukrwienia narządów) i kwasicy metabolicznej, aktywacji dopełniacza, rozsianym krzepnięciu wewnątrznacyniowym i wstrząsie endotoksycznym.

LPS odgrywa tę samą rolę podczas infekcji co kwasy lipoteichojoye występujące w ścianie komórkowej niektórych bakterii G+ – **Todar [2012]**.

Kolejną z grup bakterii występujących w wodzie, mogących wywołać u ludzi zakażenia żołądka i jelit, są *Aeromonas sp.*, G-, fakultatywnie beztlenowe, morfologicznie przypominające pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Najważniejszymi patogenami człowieka są *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. veronii* biovar *sobria*. Bakterie te występują powszechnie w słodkiej i słonawej wodzie. Gatunki z rodzaju *Aeromonas* wywołują u ludzi trzy różne postacie zakażenia: biegunki u ludzi zdrowych, zakażenia ran, oportunistyczne zakażenia układowe u osób z immunosupresją (szczególnie u pacjentów z chorobami wątroby i dróg żółciowych lub nowotworami) – **Aeromonas [2006], Murray i in. [2011]**.

Pomimo zidentyfikowania u bakterii *Aeromonas sp.* wielu czynników wirulencji tj. endotoksyna, hemolizyna, ciepłoodporna i ciepłowrażliwa enterotoksyna, nadal nie ustalono ich roli w zakażeniach.

8.2. Bakterie hemolizujące

Królestwo *Procaroyota* obejmuje 936 rodzajów bakterii, w których wyróżnia się od 15 do 20 tys. gatunków. Wśród nich ocenia się, że 300-500 gatunków bakterii ma różne cechy pozwalające określić je jako patogenne, potencjalnie chorobotwórcze lub oportunistyczne – **Ryan i Ray [2004]**. Zdolność wywoływania hemolizy całkowitej beta lub niepełnej alfa mają bakterie zarówno tlenowe, jak i beztlenowe (np. z rodzaju *Bacteroides*). Dokonany przegląd piśmiennictwa, ze względu na tlenowy charakter procesów uzdatniania wody, nie obejmował bakterii beztlenowych.

Na podstawie nielicznych danych w piśmiennictwie można stwierdzić, że cecha wywoływania hemolizy na odpowiednim podłożu hodowlanym jest wśród bakterii rzadko spotykana. Bakteriami o potwierdzonych zdolnościach hemolizowania różnych erytrocytów są zarówno bakterie saprofityczne, obojętne z sanitarnego punktu widzenia, jak i bakterie określane jako chorobotwórcze, potencjalnie chorobotwórcze oraz oportunistyczne.

Właściwości hemolityczne wśród **bakterii saprofitycznych** stwierdzono dotychczas jedynie u 5 rodzajów – **Holt i in. [1994]**:

- *Propionibacterium avidum* i *P. thoeni* – są to przeważnie G+ pałeczki, czasami pleomorficzne, względnie beztlenowe. Niektóre formy w tym rodzaju mogą być określane jako ziarniakopodobne. Występują w produktach mlecznych, np. serze, oraz sporadycznie spotyka się je na skórze człowieka.
- *Serpulina innocens* (obecnie *Brachyspira*) są to G- krętki. Obecność ich stwierdza się w treści przewodu pokarmowego. Mają zdolność syntezy substancji antybiotycznych (spektinomycyna, kolistyna, wankomycyna, ryfampicyna i spiramycyna).
- *Treponema socranskii*, krętki G- przeważnie bytujące w warunkach beztlenowych w przewodzie pokarmowym i układzie rozrodczym, można je także wykryć w jamie ustnej.
- *Kingella kingae*, ziarniakopałeczki lub pałeczki G-, występują na błonach śluzowych górnych dróg oddechowych u człowieka.
- *Morococcus cerebrosus*, ziarniaki G- chorobotwórcze jedynie dla myszy. Filogenetycznie zbliżone są do bakterii z rodzaju *Neisseria*.

W obrębie niektórych rodzajów spotyka się gatunki zarówno wyraźnie saprofityczne, jak i patogenne. Przykładowo w rodzaju *Bacillus*, w którym dotychczas identyfikowano jeden gatunek chorobotwórczy – *B. anthracis*, występuje gatunek *B. cereus*, również chorobotwórczy dla człowieka – **Bednarczyk i Dackowska-Kozon [2007]**, **Libudzisz i in. [2008]**. Pozostałe gatunki wchodzące w skład rodzaju *Bacillus*, takie jak np. *B. circulans*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. sphericus*, nadal uważane są za nieszkodliwe. Jednakże nawet gatunki uznawane dotychczas za niechorobotwórcze są coraz częściej izolowane od chorych, szczególnie mających osłabioną odporność lub nieprawidłowy metabolizm – **Zaremba i Borowski [2002]**. W rodzaju *Listeria* również występuje bardzo niebezpieczny dla zdrowia człowieka gatunek *L. monocytogenes* oprócz nieszkodliwego *L. ivanovii*. Prawdopodobnie zjawisko to będzie się nasilać i jest ono związane z obserwowaną wśród bakterii ogólną tendencją do nabywania cech wirulencji drogą mutacji genowych. Pomimo stosowania w niniejszej pracy podziału na bakterie saprofityczne i chorobotwórcze należy stwierdzić, że ten tradycyjny podział przestaje powoli obowiązywać. Powodem coraz większego zacierania się granicy między bakteriami saprofitycznymi i patogennymi jest pojawienie się nowych etiologicznych czynników zakażeń (ang. *emerging pathogens*) oraz rozszerzanie się oporności bakterii na antybiotyki. Bakterie uznawane dotychczas za niegroźne coraz częściej stają się przyczyną uogólnionego zakażenia, a nawet mogą być groźnym czynnikiem zakażeń człowieka. Tak stało się w przypadku *Streptococcus agalactiae*, uważanego za komensala, a obecnie będącego częstym czynnikiem zakażeń. To samo zjawisko w ostatnim czasie zaobserwowano wśród *Staphylococcus aureus* i toksogenicznych szczepów *Escherichia coli* O157:H7. Powodem mogą być także pewne upośledzenia układu immunologicznego, które nakładają się często na inne czynniki blokujące układ odpornościowy – **Ryan i Ray [2004]**, **Hryniewicz [2009]**.

Wśród bakterii chorobotwórczych, potencjalnie chorobotwórczych i oportunistycznych zjawisko cytolizowania erytrocytów występuje znacznie częściej niż wśród bakterii saprofitycznych i zostało stwierdzone u 18 rodzajów – **Holt i in. [2000]**. Na podstawie piśmiennictwa można przyjąć, że cecha ta jest niezwykle unikalna w świecie bakterii, charakteryzuje jednak w większym stopniu bakterie zagrażające zdrowiu człowieka lub zwierząt niż bakterie saprofityczne. Wiele z nich ma znaczenie kliniczne [tabela 8.2]. Należą do nich np. bardzo groźne patogeny, jak: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* oraz chorobotwórcze szczepy *E. coli* (O157:H7). Bakterie chorobotwórcze, potencjalnie chorobotwórcze oraz oportunistyczne mające zdolność hemolizy typu α lub β zaliczane są zarówno do grupy G+, jak i G-.

Na rys. 8.1 w sposób uproszczony przedstawiono występowanie cechy hemolizy wśród bakterii. Cecha ta występuje znacznie częściej i w wyraźnie większej liczbie rodzajów oraz gatunków wśród bakterii G+.

Payment i in. [1994] stwierdzili obecność bakterii hemolizujących w 57% badanych próbek wody do picia. W 6% bakterii hemolizujących wykryto właściwości wirulencyjne, które określono jako cytotoksyczność w stosunku do komórek Hep-2, adherencję komórkową przy użyciu komórek Caco-2 i inwazyjność. Badania wykazały w próbkach badanej wody wodociągowej obecność bakterii chorobotwórczych mających zdolność wywoływania hemolizy erytrocytów w podłożu hodowlanym. Autorzy uważają, że alternatywą do obecnie prowadzonych badań kontrolnych wody, polegających na wykryciu bakterii *E. coli* typu kałowego i określeniu ogólnej liczby bakterii heterotroficznych, może być zastosowanie wskaźnika oznaczającego liczbę bakterii hemolizujących.

Pavlov i in. [2004] stwierdzili obecność bakterii hemolizujących w próbkach wody przeznaczonej do konsumpcji. Z ogólnej liczby 339 jtk bakterii heterotroficznych 188 (55,5%) wykazywało zdolność hemolizy ludzkich i końskich erytrocytów. Przeprowadzone badania właściwości enzymatycznych charakteryzujących bakterie chorobotwórcze pokazały, że wykryte w wodzie do picia bakterie hemolizujące zawierają pozakomórkowe enzymy działające niszcząco na kwasy nukleinowe i białka w komórkach.

Tabela 8.1

Spis wybranych bakterii hemolizujących

Lp.	Rodzaj	Gatunek	Barwienie Grama	Forma morfologiczna	Hemoliza	Chorobotwórczość	Źródło
1	<i>Serpulina</i>	<i>innocens</i>	(-)	Krętek	β		Holt i in [2000]
2	<i>Treponema</i>	<i>socranskii</i>		Krętek	β		-“-
3	<i>Anicetobacter</i>	<i>haemolyticus</i>	(-)	Pałeczka	(+)	Rzadko mogą powodować zapalenie płuc, bakteriemie, posocznicę, zakażenie dróg moczowych, skóry oraz ran, zapalenie kości i stawów, spojówek oraz opon mózgowych	-“-
4	<i>Anicetobacter</i>	„6”	(-)	Pałeczka	(+)	Rzadko mogą powodować zapalenie płuc, bakteriemie, posocznicę, zakażenie dróg moczowych, skóry oraz ran, zapalenie kości i stawów, spojówek oraz opon mózgowych	-“-
5	<i>Kingella</i>	<i>kingae</i>	(-)	Pałeczka	β		-“-
6	<i>Moraxella</i>	subgenus <i>Branhamelia</i> <i>caviae</i>	(-)	Ziarniak	Słabo pozytywna hemoliza ludzkich krwinek (+)	Mogą być szkodliwe; są przyczyną oportunistycznych zakażeń szpitalnych podobnych do tych wywołanych przez <i>Acinetobacter</i> sp.	-“-
7	<i>Moraxella</i>	<i>ovis</i>	(-)	Ziarniak	Hemoliza krwinek ludzkich w większości wyników (+)	Mogą być szkodliwe; są przyczyną oportunistycznych zakażeń szpitalnych podobnych do tych wywołanych przez <i>Acinetobacter</i> sp.	-“-
8	<i>Moraxella</i>	subgenus <i>Moraxella</i> <i>bovis</i>	(-)	Pałeczka	W większości pozytywna (+)	Mogą być szkodliwe; są przyczyną oportunistycznych zakażeń szpitalnych podobnych do tych wywołanych przez <i>Acinetobacter</i> sp.	-“-

9	<i>Neisseria</i>	<i>canis</i>	(-)	Ziarniak	(+) w 11-89% (krwinki końskie i królicze)	Niektóre gatunki mogą być patogenne dla ludzi	-“-
10	<i>Neisseria</i>	<i>lactamica</i>	(-)	Ziarniak	(+) w 11-89% (krwinki końskie i królicze)	Niektóre gatunki mogą być patogenne dla ludzi	-“-
11	<i>Neisseria</i>	<i>macacae</i>	(-)	Ziarniak	(+) (krwinki końskie i królicze)	Niektóre gatunki mogą być patogenne dla ludzi	-“-
12	<i>Neisseria</i>	<i>sicca</i>	(-)	Ziarniak	(+) w 11-89% (krwinki baranie, ludzkie końskie i królicze)	Niektóre gatunki mogą być patogenne dla ludzi	-“-
13	<i>Morococcus</i>	<i>cerebrosus</i>	(-)	Ziarniak	(+) (krwinki końskie)	Chorobotwórcza dla myszy	-“-
14	Rodzina: <i>Pasteurellaceae</i>	<i>pleuropneumoniae</i>	(-)	Pałeczka – forma cyldryczna	β	Patogenne lub komensalne w stosunku do ludzi	-“-
15	<i>Actinobacillus</i> <i>Haemophilus</i>	<i>rossii</i>	(-)	Pałeczka – forma cyldryczna	β	Patogenne lub komensalne w stosunku do ludzi	-“-
16	<i>Haemophilus</i>	<i>suis</i>	(-)	Pałeczka	β	Mogą powodować zmiany ziarniakowe w poszczególnych częściach układu pokarmowego u zwierząt; zmiany ropne na skórze i płucach. U ludzi zakażenia skórne po ukąszeniach przez zwierzęta	-“-
17	<i>Haemophilus</i>	<i>haemolyticus</i>	(-)	Pałeczka	β	Zapalenie dolnych i górnych dróg oddechowych, zakażenie dróg moczowo-płciowych oraz ran, ropienie tkanek miękkich; zakażenie okołoporodowe	-“-

18	<i>Chromobacterium</i>	<i>violaceum</i>	(-)	Pałeczka	(+) w 95%	Okazjonalnie mogą powodować infekcje ropne i ogólnoustrojowe u ssaków	-“-
19	<i>Chromobacterium</i>	<i>fluviatile</i>	(-)	Pałeczka	(-) Hemoliza krwinek końskich słaba lub jej brak	Okazjonalnie mogą powodować infekcje ropne i ogólnoustrojowe u ssaków	-“-
20	<i>Gardnerella</i>	-	(-)	Ziarniak	β	Niektóre gatunki odpowiedzialne za zapalenie pochwy	-“-
21	<i>Gemella</i>	<i>haemolysans</i>	(+)	Ziarniak	β	Mogą powodować bakterie, zapalenie osierdza lub opon mózgowo-rdzeniowych	-“-
22	<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>	(+)	Ziarniakopodobna forma cylindryczna	β	Mogą powodować bakterie, zapalenie osierdza lub opon mózgowo-rdzeniowych	-“-
23	<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	(-)	Pałeczka	β	Zapalenie tkanki łącznej (cellulitis) i zakażenia ran: – ostra choroba biegunkowa podobna do cholery – posocznica – zakażenie układu moczowego i wątroby – dróg żółciowych – opon mózgowo-rdzeniowych – uszu – posocznica jako następstwo zakażenia jelitowego lub ropnego	Kręgiel i Rygała [2010]
24	<i>Aeromonas</i>	<i>bestiarum</i>	(-)	Pałeczka	β		Aeromonas: Human health criteria document [2006]
25	<i>Aeromonas</i>	<i>caviae</i>	(-)	Pałeczka	β		-“-

26	<i>Aeromonas</i>	<i>veronii</i> biovar <i>sobria</i>	(-)	Pałeczka	β		-,,-
27	<i>Aeromonas</i>	<i>veroni</i> biovar <i>veroni</i>	(-)	Pałeczka	β		-,,-
28	<i>Aeromonas</i>	<i>jandaei</i>	(-)	Pałeczka	β		-,,-
29	<i>Aeromonas</i>	<i>schubertii</i>	(-)	Pałeczka	β		-,,-
30	<i>Aeromonas</i>	<i>trota</i>	(-)	Pałeczka	β		-,,-
31	<i>Stenotrophomonas</i> (dawniej <i>Xantomonas</i>)	<i>maltophilia</i>	(-)	Pałeczki	β	Bakteriemia, posocznica, zgorzelowe zapalenie skóry, pooperacyjne zapalenie wsierdza, zapalenie ran pooperacyjnych, zapalenie układu moczowego, oddechowego	Zaremba i Borowski [2001]
32	<i>Staphylococcus</i>	<i>caprae</i>	(+)	Ziarniak	(+) > 90% reakcja opóźniona	Oportunistyczne patogeny szkodliwe dla ludzi i zwierząt. Wytwarzają toksyny	Holt i in. [2000]
33	<i>Staphylococcus</i>	<i>delphini</i>	(+)	Ziarniak	(+) > 90%	Oportunistyczne patogeny szkodliwe dla ludzi i zwierząt. Wytwarzają toksyny	-“-
34	<i>Staphylococcus</i>	<i>equorum</i>	(+)	Ziarniak	11-89% wyników pozytywnych	Oportunistyczne patogeny szkodliwe dla ludzi i zwierząt. Wytwarzają toksyny	-“-
35	<i>Staphylococcus</i>	<i>gallinarum</i>	(+)	Ziarniak	Słaby wynik pozytywny	Oportunistyczne patogeny szkodliwe dla ludzi i zwierząt. Wytwarzają toksyny	-“-
36	<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>	(+)	Ziarniak	(+) > 90% reakcja opóźniona	Oportunistyczne patogeny szkodliwe dla ludzi i zwierząt. Wytwarzają toksyny	-“-
37	<i>Staphylococcus</i>	<i>intermedius</i>	(+)	Ziarniak	11-89% wyników pozytywnych	Oportunistyczne patogeny szkodliwe dla ludzi i zwierząt. Wytwarzają toksyny	-“-

38	<i>Staphylococcus</i>	<i>kloosil</i>	(+)	Ziarniak	11-89% wyników pozytywnych	Oportunistyczne patogeny szkodliwe dla ludzi i zwierząt. Wytwarzają toksyny	-“-
39	<i>Staphylococcus</i>	<i>lugdunensis</i>	(+)	Ziarniak	Słaby wynik pozytywny	Oportunistyczne patogeny szkodliwe dla ludzi i zwierząt. Wytwarzają toksyny	-“-
40	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	(+)	Ziarniak	(+) > 90%	Choroby skórne, układu oddechowego, moczowego, posocznice, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie szpiku, kości i stawów	-“-
41	<i>Staphylococcus</i>	<i>anaerobus</i>	(+)	Ziarniak	(+) > 90%	Oportunistyczne patogeny szkodliwe dla ludzi i zwierząt.	-“-
42	<i>Staphylococcus</i>	<i>ureoliticus</i>	(+)	Ziarniak	11-89% (+) reakcja opóźniona	Oportunistyczne patogeny szkodliwe dla ludzi i zwierząt.	-“-
43	<i>Staphylococcus</i>	<i>cohnii subsp cohnii</i>	(+)	Ziarniak	11-89% (+) reakcja opóźniona	Oportunistyczne patogeny szkodliwe dla ludzi i zwierząt.	-“-
44	<i>Staphylococcus</i>	<i>cohnii subsp urealyticus</i>	(+)	Ziarniak	11-89% (+) reakcja opóźniona	Oportunistyczne patogeny szkodliwe dla ludzi i zwierząt.	-“-
45	<i>Streptococcus</i>	<i>suis</i>	(+)	Ziarniak	β > 90%	Bakteriemia, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	-“-
46	<i>Streptococcus</i>	<i>canis</i>	(+)	Ziarniak	β > 90%	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
47	<i>Streptococcus</i>	<i>equi subsp. equi</i>	(+)	Ziarniak	B > 11-89%	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
48	<i>Streptococcus</i>	<i>equi subsp. zooepidemicus</i>	(+)	Ziarniak	B > 11-89%	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
49	<i>Streptococcus</i>	<i>equi subsp.equisimilis</i>	(+)	Ziarniak	B > 11-89%	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-

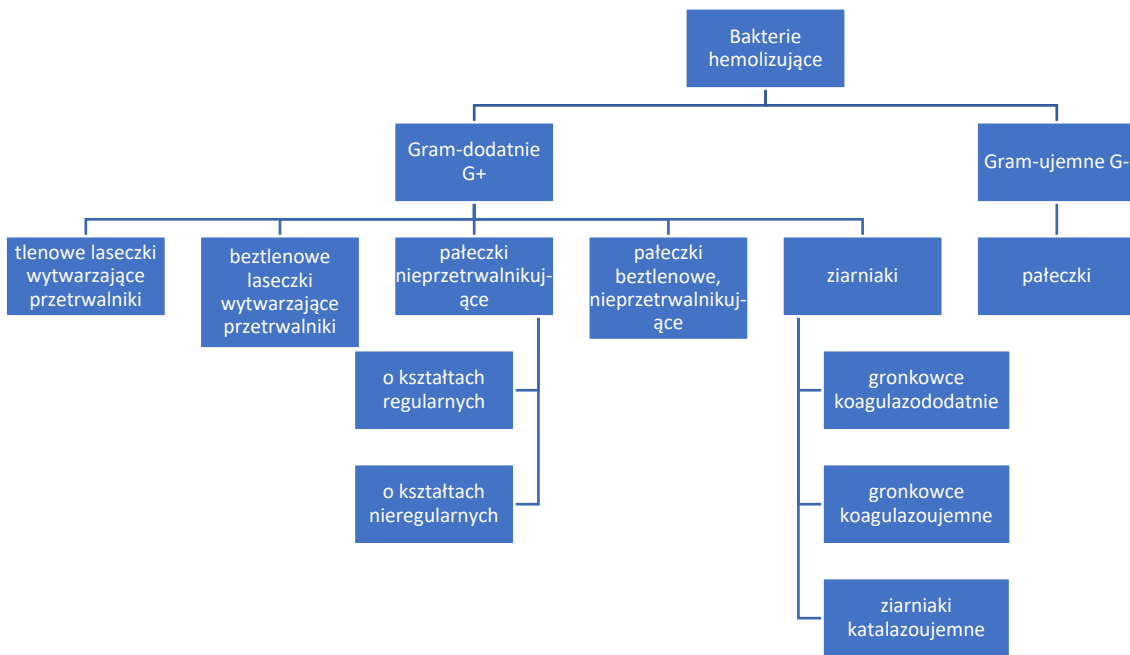
50	<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	(+)	Ziarniak	$\beta > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
51	<i>Streptococcus</i>	<i>dysgalactiae</i>	(+)	Ziarniak	$\beta > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
52	<i>Streptococcus</i>	<i>iniae</i>	(+)	Ziarniak	α i $\beta > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
53	<i>Streptococcus</i>	<i>porcinus</i>	(+)	Ziarniak	$\beta > 90\%$ reakcja opóźniona	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
54	<i>Streptococcus</i>	<i>adjacenus</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
55	<i>Streptococcus</i>	<i>defectivus</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
56	<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
57	<i>Streptococcus</i>	<i>macacae</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
58	<i>Streptococcus</i>	<i>milleri</i>	(+)	Ziarniak	β 11-89%	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
59	<i>Streptococcus</i>	<i>mitior</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
60	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-

61	<i>Streptococcus</i>	<i>oralis</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
62	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
63	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha 11-89\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
64	<i>Streptococcus</i>	<i>sanguis</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
65	<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
66	<i>Streptococcus</i>	<i>morbilorum</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha 11-89\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
67	<i>Strepto-coccus</i>	<i>acidominimus</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha 11-89\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
68	<i>Streptococcus</i>	<i>alactolyticus</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha 11-89\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
69	<i>Streptococcus</i>	<i>hyointestinalis</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
70	<i>Streptococcus</i>	<i>intestinalis</i>	(+)	Ziarniak	$\beta > 90\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
71	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	(+)	Ziarniak	$\alpha 11-89\%$	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-

72	<i>Streptococcus</i>	<i>ubenis</i>	(+)	Ziarniak	α 11-89%	Niektóre gatunki mogą być chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt	-“-
73	<i>Streptococcus</i>	<i>pyogenes</i>	(+)	Ziarniak	$\beta > 90\%$	Ropne zapalenie dróg oddechowych, skóry	-“-
74	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	(+)	Ziarniak	Czasem β	Powoduje bakteriemię	-“-
75	<i>Enterococcus</i>	<i>avium</i>	(+)	Ziarniak	Zazwyczaj α	Czasem może powodować ropne infekcje	-“-
76	<i>Enterococcus</i>	<i>cecourum</i>	(+)	Ziarniak	Zazwyczaj α	Czasem może powodować ropne infekcje	-“-
77	<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	(+)	Ziarniak	α lub β	Czasem może powodować ropne infekcje	-“-
78	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	(+)	Ziarniak	Czasem α	Czasem może powodować ropne infekcje	-“-
79	<i>Enterococcus</i>	<i>gallinarum</i>	(+)	Ziarniak	α lub β	Czasem może powodować ropne infekcje	-“-
80	<i>Enterococcus</i>	<i>pseudoavium</i>	(+)	Ziarniak	Zazwyczaj α	Czasem może powodować ropne infekcje	-“-
81	<i>Enterococcus</i>	<i>seridiciola</i>	(+)	Ziarniak	Zazwyczaj α	Czasem może powodować ropne infekcje	-“-
82	<i>Listeria</i>	<i>ivanovii</i>	(+)	Pałeczka niesporująca	$\beta > 90\%$		Leimeister-Wachter i Chakraborty [1989]
83	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	(+)	Pałeczka niesporująca	$\beta > 90\%$	Może być chorobotwórcza dla ludzi i zwierząt. Zakażenia okołoporodowe, listeriozy, zmiany skóry, zapalenie spojówek, szpiku, kości, zapalenie płuc, infekcje żołądkowo-jelitowe	-“-
84	<i>Propionibacterium</i>	<i>avidum</i>	(+)	Pałeczka	$\beta > 90\%$		Holt i in. [2000]

cd. tabeli 8.2

85	<i>Propionibacterium</i>	<i>thoenii</i>	(+)	Pałeczka	$\beta > 90\%$		-“-
86	<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>	(+)	Pałeczka	$\beta -11-89\%$		-“-
87	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	(+)	laseczka	β	zakażenia przewodu pokarmowego – wymioty, nudności, gorączka, biegunka	Libudzisz i in. [2008]
88	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	(+)	laseczka	β		-„-
89	<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>	(+)	laseczka	β		-„-
90	<i>Bacillus</i>	<i>mycoides</i>	(+) (?)	laseczka (?)	β (?)		-„-
91	<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>	(+)	laseczka beztlenowa	β	Zgorzel gazowa	McArthur i in. [2006]



Rys. 8.1. Schemat przedstawiający podział bakterii hemolizujących ze względu na morfologię
 Fig. 8.1. Classification of haemolytic bacteria regarding their morphology
 Źródło: Innotech Project Final Report [2016].

Wśród 188 jtk z hemolizą: najczęściej 64,4% wytwarzało proteinazę, 62,2% żelatynazę, 60,6% nukleazę, 53,7% fibrynolizynę oraz 47,9% lipazę, 33,0% elastazę, 21,3% hialuronidazę, 16,0% koagulazę, (DNAzę) i najmniej 5,3% – jtk miało chondroitynazę. Niektóre bakterie zawierały tylko jeden zewnątrzkomórkowy enzym, ale były także i takie, u których wykryto obecność więcej niż dwóch. Te ostatnie, które zidentyfikowano jako: *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Aureobacterium terregens*, *Bacillus* sp., *Chryseobacterium (Flaviobacterium)* sp., *Corynebacterium* sp., *Rhodococcus equi*, *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Staphylococcus* sp., *Tsukamurella inchonensis* i *Vibrio* sp., uznano za szczególnie groźne dla zdrowia konsumentów badanej wody. U tych bakterii wykryto enzymy pozakomórkowe uznawane jako cechy wirulencji bakterii chorobotwórczych. Należały do nich: proteinaza, żelatynaza, DNAza, lipaza i fibrynolizyna. Obecność kilku enzymów podwyższa wirulencję bakterii przez łatwiejsze niszczenie błon lipoproteidowych, kwasu hialuronowego oraz immunoglobulin, które są elementami systemu obronnego organizmu człowieka i zwierząt. U tych samych bakterii stwierdzono oporność na antybiotyki: 77,7% bakterii wykazywało oporność na oxacylinę, 59,6% na penicylinę G2, 54,3% na ampicylinę 10 µg, 47,3% na penicylinę G10 i 43,1% na ampicylinę 25 µg. Wykazano także, że 96-98% bakterii hemolizujących posiada właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek Hep-2 i Caco-2. Barwienie metodą Grama wykazało, że były to zarówno bakterie G+ (71%) jak i G- (29%). Autorzy przeprowadzonych badań proponują, aby bakterie hemolizujące zastosować jako dodatkowy test sanitarny w badaniach kontrolnych wody do picia. Uważają, że obecnie stosowany wskaźnik – ogólna liczba heterotroficznych bakterii (ang. *Heterotrophic Plate Count* – HPC) – nie jest wystarczający, aby w pełni ocenić zagrożenie zdrowotne wynikające

z obecności w wodzie do picia bakterii chorobotwórczych, potencjalnie chorobotwórczych oraz oportunistycznych. Szczególnie zwracają uwagę na obecność w wodzie do picia bakterii oportunistycznych należących do rodzaju: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flaviobacterium*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas* i *Xanthomonas* ze względu na powiększającą się liczbę ludzi, dla których bakterie te mogą być bardzo groźne. Uważa się, że hemolizyny są bardzo ważnymi determinantami patogenezy. Delecja genu cytolizyny prowadzi do znacznego spadku wirulencji, czasami do jej całkowitej utraty – **Bielecki i in. [1990]**.

Autorzy z różnych części świata: z Indii – **Tantawiwat i in. [2005]**, z Pakistanu – **Quazi i in. [2006]**, z Hondurasu – **Trevett i in. [2004]**, z krajów afrykańskich – **Okafo i in. [2003]** oraz z Kanady – **Payment i in. [1994]** proponują stosowanie bakterii hemolizujących jako wskaźnika jakości wody do picia. Jak wspomniano wcześniej, zachodzi duża korelacja pomiędzy zdolnością do przeprowadzania hemolizy a chorobotwórczością u ludzi – **Payment i in. [1994]**. W Polsce również rozważana jest możliwość włączenia pałeczek *Aeromonas* sp. do rutynowych badań mikrobiologicznych wody, zwłaszcza do monitoringu instalacji wodociągowych – **Kręgiel i Rygała [2010]**. Ponadto obecność bakterii hemolizujących może wskazywać na obecność innych bakterii niż powszechnie stosowane w sanitarnym monitoringu wody uzdatnionej. Na podstawie danych z piśmiennictwa można także stwierdzić, że liczebność bakterii hemolizujących w próbkach wody uzdatnionej często przewyższa liczbę bakterii wskaźnikowych, a czas ich przeżywalności jest dłuższy.

W związku z tym faktem uważa się, że można wykorzystać grupę bakterii hemolizujących jako uzupełniający wskaźnik jakości sanitarnej wody – **Quazi i in. [2006]**, **El Taweel i Shaban [2001]** zastosowali jako mikroorganizmy wskaźnikowe *Aeromonas* sp. w próbkach wody pobranych do badań ze stacji uzdatniania wody w Egipcie. W badaniach określono liczebność tych bakterii w próbkach wody przed uzdatnieniem i po uzdatnieniu. Stwierdzono, że procesy uzdatniania powodują znaczące obniżenie liczby *Aeromonas* sp. Ponieważ ogólna liczba *Aeromonas* sp. w badanych próbkach wody była znacznie większa od liczby innych bakterii, autorzy ci proponują wprowadzenie oznaczania liczby *Aeromonas* sp. jako rutynowego badania jakości wody. Bakterie *Aeromonas* sp. również mają zdolność wywoływania hemolizy typu β – **Quazi i in. [2006]**.

Spis literatury do rozdziału 8

1. *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. 2006. EPA Contract no. 68-C-02-026.
2. Bauer M.E., Welch R.A., 1996. Association of RTX toxins with erythrocytes. – *Infect. Immun.* 64,4665.
3. Bednarczyk A., Dackowska-Kozon E.G., 2007. Pathogenic features of bacteria from the *Bacillus cereus* group. *Post. Mikrobiol.*, 47, 1, 51-63.

4. Bielecki J.E., Youngman P., Connely P., Portnoy D.A., 1990. *Bacillus subtilis* expressing haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345, 175-176.
5. El Taweel G., Shaban M., 2001. Microbiological quality of drinking water at eight water treatment plants. *International Journal of Environmental Health Research* 11(4):285-290.
6. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J., Williams, S.T., 1994. Aerobic chemolithotrophic bacteria and associated organisms. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 427-455.
7. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T., 2000. *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth ed. Lippincott Williams & Wilkins.
8. Hryniewicz W. 2009. *Mikrobiologia kliniczna. Medycyna Praktyczna*, Warszawa.
9. Kaźmierczuk M., Kalisz L., 2008. A Proposal for Extending Biological Criteria Applied In Sanitary Control of Sewage Sludge Intended for Agricultural Use. *Polish J. of Environmental Studies* 17 (5).
10. Kręgiel D., Rygała A., 2010. Występowanie heterotroficznych bakterii z rodzaju *Aeromonas* w wybranym systemie dystrybucji wody. *Ochrona Środowiska*, t. 32.
11. Le Chevallier M.W., Welch N.J., Smith D.B., 1996. Full-scale Studies of Factors Related to Coliform Regrowth in Drinking Water. *Appl. Environ. Microb.* 62(7), 2201-2211.
12. Leimeister-Wachter M., Chakraborty, 1989. Detection of listeriolysin, the thiol-dependent hemolysin in *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria seeligeri* – *Infect. Immun*, vol. 57, no. 8, 2350-2357.
13. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., 2008. *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa.
14. McArthur H.L., Dalal B.I., Kollmannsberger Ch., 2006. Intravascular Hemolysis As a Complication of *Clostridium Perfringens* Sepsis. *J. Clin. Oncol.*, 24(15), 2387-2388.
15. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A., 2011. *Mikrobiologia*. Elsevier Urban and Partner.
16. Okafo C.N., Umoh V.J., Galadiama M., 2003. Occurrence of pathogens on vegetables harvested from soils irrigated with contaminated streams. *Sci. Total. Environ.* 331:49-56.
17. Pavlov D., de Wet C.M.E., Grabov W.O.K., Ehlers M.M., 2004. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. *Int. J. Microbiol.* 92(3):275-287.
18. Payment P., Coffin E., Paquette G., 1994. Blood Agar to Detect Virulence Factors in Tap Water Heterotrophic Bacteria Applied and Environmental Microbiology 60 (4):1179-83.
19. Quazi I.J., Shahid S.S., Chaudhary N., 2006. Occurrence of Hemolytic Coliform Bacteria in Drinking Water Samples of Lahore. *Pakistan J. of Zoology*, 38 (2), 119-123.
20. Ryan K.J., Ray C.G. (eds), 2004. *Sherris medical microbiology*. 4th Edition, McGraw Hill, 551-552.

21. Schlegel H.G., 2000. Mikrobiologia Ogólna. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa.
22. Ślopek S., 1972. Mikrobiologia Lekarska. Podręcznik dla studentów Akademii Medycznych. Wydanie I PZWL Warszawa.
23. Tantawiwat S., Tansupharsiri U., Wongwit W., Wongchotigul V., Kitayaporn D., 2005. Development of multiplex PCR for the detection of total coliform bacteria for *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* in drinking water. Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health, 36:162-169.
24. Todar K., 2012. Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. Online Textbook Of Bacteriology, <http://textbookofbacteriology.net/pathogenesis.html>
25. Trevett A.F., Carter R., Tyrrel S., 2004. Water quality deterioration: a study of household drinking water quality in rural Honduras. Int. J. Environ. Health. Res., 14:273-283.
26. Wytyczne dotyczące jakości wody do picia, wyd. 4. Izba Gospodarcza Wodociągi Polskie, 2014.
27. Zaremba M.L., Borowski J., 2002. Mikrobiologia lekarska. Wyd. Lek. PZWL.
28. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2015 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U. 2015 poz. 1989).
29. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 20 kwietnia 2010 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Dz.U. 2010 Nr 72, poz. 466.

9. BADANIA NA OBIEKTACH DOŚWIADCZALNYCH

9.1. Wstępne badania nad uzdatnianiem wody na SUW w Grodzisku skażonej mikrobiologicznie oczyszczonymi ściekami komunalnymi

W ramach prac prowadzonych w skali półtechnicznej w wyłączonej z użytkowania SUW w Grodzisku k. Pleszewa postanowiono przeprowadzić eksperyment polegający na skażeniu wody w studni głębinowej zasilającej tę stację.

W celu uproszczenia zapisu tabel przedstawiających wyniki badań w opisie kolumn zastosowano następujące cyfrowe kody oznaczeń: **1** – Mętność – NTU; **2** – Barwa – mg Pt/l; **3** – Zawartość żelaza – $\mu\text{g Fe/l}$; **4** – Zawartość manganu – $\mu\text{g Mn/l}$; **5** – Zawartość jonu amonowego – mg NH_4/l ; **6** – Ogólna liczba mikroorganizmów w temperaturze 22°C po 72 h – jtk/ml; **7** – Ogólna liczba mikroorganizmów w temperaturze 37°C po 48 h – jtk/ml; **8** – Liczba bakterii grupy *E. coli* – jtk/100 ml; **9** – Liczba bakterii *Escherichia coli* – jtk/100 ml; **10** – Liczba enterokoków kałowych – jtk/100 ml; **11** – Zawartość tlenu – mg O_2/l

W tabeli 9.1 przedstawiono wyniki trzech pierwszych serii badań wykonanych w dniach od 08.11.2013 r. do 28.11.2013 r. przed skażeniem wody studziennej. Z analizy wyników można wnioskować, że po dłuższym postoju stacji uzdatniania wody (SUW) uzdatniona woda nie wymagała dezynfekcji.

Tabela 9.1

Wyniki badań wykonanych w dniach od 08.11.2013 do 28.11.2013 r.

Kod oznaczenia / Miejsce poboru	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
08.11.2013											
Woda surowa	0,40	34	858	154	1,97	3	1	0	0	0	–
Woda uzdatniona	0,29	20	75	53	1,34	>300	44	1	0	0	9
Filtr I	<0,2	20	81	60	1,47	143	0	0	0	0	
Filtr II	0,23	20	46	48	1,38	19	0	0	0	0	
15.11.2013											
Woda surowa			1021	162							
Woda uzdatniona			128	61							
Filtr I	0,41	27	73	50	0,32	>300	33	1	0	0	
Filtr II	0,57	27	106	57	0,28	>300	15	0	0	0	

cd. tabeli 9.1

28.11.2013											
Woda surowa	0,23	32	410	178	0,65	19	1	0	0	0	
Filtr I	0,68	29	85	60	0,34	139	27	0	0	0	
Filtr II	0,64	28	104	48	0,31	107	0	0	0	0	

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Na stacji wodociągowej w Grodzisku postanowiono przedłużyć okres pracy między płukaniem filtrów do czasu osiągnięcia wartości dopuszczalnych strat ciśnienia na złożu tj. 5 m sł. Po tym czasie filtry zostały wypłukane wodą i powietrzem. W tabeli 9.2 zestawiono wyniki badań wody przed płukaniem filtra oraz po 1 dniu eksploatacji.

Tabela 9.2

Wyniki badań nad wpływem płukania filtrów na skład chemiczny i mikrobiologiczny wody na SUW w Grodzisku

Kod oznaczenia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Miejsce poboru											
	16.01.2014										
Woda surowa	0,48	32	855	171	0,63	11		0	0	0	–
Woda uzdatniona	0,34	21	186	<40	0,12	12		0	0	0	6
Filtr I	0,51	24	255	<40	0,06	10		0	0	0	
Filtr II	0,38	21	220	<40	0,01	61		0	0	0	
	17.01.2014										
Woda surowa	0,57	35	903	175	0,60	7		0	0	0	
Woda uzdatniona	0,64	33	343	50	0,1	28		0	0	0	6
Filtr I	0,47	33	351	42	0,06	39		0	0	0	
Filtr II	0,60	32	351	48	0,14	179		0	0	0	

Źródło: Raport Końcowy projektu Innotech [2016]

Wyniki badań przed płukaniem filtrów (16.01.2014) wskazują, że stacja wodociągowa uzyskiwała sprawność technologiczną w zakresie wszystkich analizowanych wskaźników oprócz barwy wody.

Badanie wody przeprowadzone w następnym dniu (17.01.2014) po płukaniu powietrzem wskazuje, że uzdatniana woda nie nadawała się do podania do sieci wodociągowej.

Należy zwrócić uwagę, że w wodzie surowej stwierdzono obecność azotu amonowego w ilościach większych od ilości oznaczanych w wodzie uzdatnionej. Świadczy to o tym, że na filtrze dochodziło do rozwoju bakterii nityfikacyjnych. Najczęściej podczas eksploatacji filtrów do odmanganiania wody z podwyższoną zawartością azotu amonowego obserwuje się periodyczną zmienność skuteczności usuwania manganu. Badania **Vandenabeele [1993]** wykazały, że opisane zjawisko związane jest z rozwojem bakterii nityfikacyjnych w złożu filtracyjnym. Powstające w I etapie nityfikacji azotyny redukują na drodze chemicznej Mn(IV) do Mn(II), który przechodzi do filtratu w formie rozpuszczonej, niszcząc w ten sposób właściwości katalityczne złoża w kierunku usuwania manganu. Rozwój bakterii

nitryfikacyjnych na złożu wiąże się z powstawaniem na nim biofilmów, które miały wpływ na pogarszanie się składu mikrobiologicznego wody na analizowanej stacji w Grodzisku koło Pleszewa.

Przeprowadzono eksperyment ze sztucznym skażeniem wody studziennej oczyszczonymi ściekami pobranymi na odpływie z oczyszczalni komunalnej w Pleszewie i rozcieńczonymi wodą w stosunku 1 do 1000. Skład mikrobiologiczny rozcieńczonych ścieków użytych do skażenia wody studziennej przedstawiono w tabeli 9.3.

Tabela 9.3

Wyniki badań oczyszczonych ścieków przeprowadzonych w dniu 28.01.2014

Kod oznaczenia	6	7	8	9	10
Oczyszczone ścieki rozcieńczone wodą w stosunku 1:1000	115	89	42	36	39

Źródło: Raport Końcowy projektu Innotech [2016].

Wlane do studni ścieki znajdują się w początkowej fazie w górnej części tego słupa wody. Aby ścieki rozmieszać i natlenić równomiernie w tym słupie, w każdym cyklu pracy pompy trwającym 15 minut, postanowiono doprowadzić wodę z rurociągu tłocznego pompy z powrotem do studni. W tym celu w stalowym kolanie rurociągu tłocznego przed zaworem zwrotnym wspawano króciec do kurka czerpalnego. Do kurka tego dołączono przewód elastyczny z zainstalowaną na końcu dyszą rozbryzgową, umieszczoną w studni, w celu lepszego napowietrzenia i wymieszania wody ze ściekami.

Pierwszą próbkę wody pobrano do badań po 5 godz. od wiania do studni ścieków. Następną próbę przeprowadzono po upływie jednej doby. Trzecią próbę wykonano po 6 dobach. Wyniki badań zamieszczono w tabeli 9.4.

Tabela 9.4

Wyniki badania wody po wlaniu do studni 5 dm³ oczyszczonych ścieków

Kod oznaczenia / Miejsce poboru	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
28.01.2014 po 5 godzinach od skażenia										
Woda surowa	0,40	49	922	133	0,71	14	2	3	3	0
Woda uzdatniona	0,29	30	156	27	0,01	24	10	0	0	0
29.01.2014 po 24 godzinach od skażenia										
Woda surowa						1	2	2	2	0
Woda uzdatniona						43	8	0	0	0
03.02.2014 po 6 dniach od skażenia										
Woda surowa						7	4	0	0	0
Woda uzdatniona						0	4	0	0	0

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Dane z tabeli 9.4 wskazują, że w rozcieńczonych ściekach oczyszczonych wlanych do studni była zbyt mała ilość bakterii, co nie doprowadziło do znaczącego pogorszenia się składu mikrobiologicznego ujmowanej wody studziennej.

W celu skażenia wody postanowiono wlać do studni 50 dm³ oczyszczonych ścieków pobranych z komunalnej oczyszczalni ścieków. Pobrane ścieki z oczyszczalni wiano do studni rano 10.03.2014. Pierwsze próbki wody surowej i uzdatnionej pobrano po południu. Badania powtarzano przez cztery kolejne dni. Wyniki badań umieszczono w tabeli 9.5.

Instytut Ochrony Środowiska – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie uczestniczył w realizacji eksperymentu prowadzonego na okresowo wyłączonej z eksploatacji SUW w Grodzisku k. Pleszewa. Próby przeprowadzone w dniach 10–14. 03.2014 r. polegały na sprawdzeniu właściwości dezynfekcyjnych oczyszczonych ścieków komunalnych w procesie uzdatniania wody do celów konsumpcyjnych. W tym celu do studni wody surowej wiano 50 l ścieków oczyszczonych pochodzących z biologicznej oczyszczalni w Pleszewie. Następnie przez kolejne dni pobierano do badania bakteriologicznego próbki wody surowej i uzdatnionej. W tabeli 9.5 przedstawiono wyniki badań bakteriologicznych dla tego eksperymentu. Liczbę bakterii grupy *coli* oraz enterokoków określono tylko w ściekach oczyszczonych oraz wodzie surowej i uzdatnionej w próbkach pobranych do badania po 3 dniach od wiania ścieków oczyszczonych do studni.

Tabela 9.5

Wyniki badania właściwości dezynfekcyjnych oczyszczonych ścieków komunalnych w procesie uzdatniania wody

Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii mezofilnych jtk/ml	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych jtk/ml	<i>Enterococcus</i> sp. jtk/100 ml	Bakterie grupy <i>coli</i> jtk/100 ml	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta jtk/100 ml
Przed dodaniem ścieków						
10.03.2014	Woda surowa	8	21	-	-	10
10.03.2014	Woda uzdatniona	5	6	-	-	8
10.03.2014	Ścieki oczyszczone	$1,1 \cdot 10^6 - 5,5 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^7 - 3,0 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^4 - 1,0 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^3 - 1,0 \cdot 10^5$
Po dodaniu ścieków						
10.03.2014	Woda surowa w dniu wiania ścieków	80	120	-	-	40
10.03.2014	Woda uzdatniona w dniu wiania ścieków	40	80	-	-	20
13.03.2014	Woda surowa po 3 dniach od wiania ścieków	4	8	0	0	4
13.03.2014	Woda uzdatniona po 3 dniach od wiania ścieków	8	22	0	0	4

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że po początkowym wzroście skażenia bakteriologicznego wody surowej, spowodowanym waniem do studni 50 l ścieków oczyszczonych, po upływie 3-4 dni woda uzdatniona osiąga stan sanitarny zbliżony do początkowego, przed skażeniem ściekami. Na podstawie uzyskanych wyników trudno jest jednak jednoznacznie stwierdzić, jaka była przyczyna zaobserwowanego zjawiska. Czy obniżenie liczby bakterii w wodzie uzdatnionej nastąpiło na skutek naturalnej dezynfekcji za pomocą biofilmu utworzonego w systemie wody doprowadzanej do układu uzdatniania, czy też z powodu wypompowania lub stopniowego rozcieńczenia dolanych ścieków w wyniku prowadzonej eksploatacji. Zakładając objętość studni ok. 6,6 m³ i wydajność pompy w 1 cyklu ok. 6 m³, to przy takich parametrach jeden cykl pracy pompy wynoszący ok. 15 min powoduje fizyczne usunięcie wprowadzonych ścieków, czyli całego skażenia. W badaniu bakteriologicznym pobranych próbek wody stwierdzono obecność grzybów strzępkowych w wodzie surowej oraz uzdatnionej. W preparatach barwionych metodą Grama, wykonanych z kolonii bakterii wyhodowanych na podłożu TSA oraz Columbia, stwierdzono w próbkach wody surowej i uzdatnionej obecność bakterii cylindrycznych zarówno G+, jak i G-. G- formy cylindryczne miały zdolność hemolizowania erytrocytów baranich.

Hipotetycznie podczas filtracji poprawa składu biologicznego wody sztucznie skażonej ściekami może być wywołana efektem separacji drobnoustrojów na powstającym w złożu filtracyjnym filtrze namywanym wskutek odkładania się zawiesin w porach złoża. Zjawisko usuwania mikroorganizmów na materiałach filtracyjnych jest powszechnie znane od czasu wynalezienia filtrów powolnych. Efekt ten obserwuje się również podczas infiltracji brzegowej lub ze stawów infiltracyjnych przy wstępnym uzdatnianiu wód powierzchniowych na ujęciach infiltracyjnych. Do poprawy składu biologicznego dochodzi także przy oczyszczaniu ścieków na polach irygowanych. Należy zaznaczyć, że wielkość poprawy składu mikrobiologicznego podczas filtracji zależy od wielkości cząstek zawiesin, na powierzchni których znajdują się drobnoustroje, oraz szybkości filtracji. Przy dużych prędkościach filtracji dochodzi do przemieszczania się pojedynczych komórek bakteryjnych w głąb złoża filtracyjnego. Poprawa składu biologicznego wody mogła być również efektem oddziaływania biofagów obecnych w ściekach lub na biofilmach powstałych na złożu filtracyjnym.

Postanowiono także określić stopień poprawy składu biologicznego w czasie oczyszczania ścieków w oczyszczalni w Pleszewie. W tym celu pobrano ścieki surowe i oczyszczone i wykonano badania mikrobiologiczne. Wyniki tych badań przedstawiono w tabeli 9.6.

Tabela 9.6

Wyniki badań wskaźników mikrobiologicznych ścieków surowych i oczyszczonych

Kod oznaczenia		6	7	8	9	10
Miejsce poboru						
24.03.2014						
Ścieki surowe rozcieńczone	1:10 ⁷	290	76			
	1:10 ⁵			115	58	20
Ścieki oczyszczone rozcieńczone	1:10 ⁵	226	37			
	1:10 ³			120	30	10
25.03.2014						
Ścieki surowe rozcieńczone	1:10 ⁷	260	82			
	1:10 ⁵			179	36	16
Ścieki oczyszczone rozcieńczone	1:10 ⁵	298	11			
	1:10 ³			100	90	0
26.03.2014						
Ścieki surowe rozcieńczone	1:10 ⁷		96			
	1:10 ⁵			173	64	22
Ścieki oczyszczone rozcieńczone	1:10 ⁵		18			
	1:10 ³			150	30	10
27.03.2014						
Ścieki surowe rozcieńczone	1:10 ⁷					
	1:10 ⁵			185	52	30
Ścieki oczyszczone rozcieńczone	1:10 ⁵					
	1:10 ³			120	60	20

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Przy ocenie usuwania mikroorganizmów stosuje się umowną jednostkę log₁₀ – **Carrington [2001]**. Wartość 1 log₁₀ oznacza, że nastąpiło 10-krotne zmniejszenie liczby analizowanych drobnoustrojów. Z uzyskanych danych wynika, że poprawa składu mikrobiologicznego była rzędu 4 log₁₀. W oczyszczalniach obserwuje się obniżenie liczby bakterii od 4 do 8 log₁₀. Z przeprowadzonych badań wynika, że w procesie biologicznego oczyszczania ścieków występuje prawie lub ponadstukrotne zmniejszenie liczebności mikroorganizmów, które były poddane badaniom. Stopień i czas zmniejszania mikroorganizmów w procesie oczyszczania ścieków świadczy o niespotykanej w środowisku naturalnym koncentracji naturalnego mechanizmu oczyszczania wody.

W celu zwiększenia liczebności bakterii pobrano w dniu 22.04.2014 r. 10 dm³ ścieków surowych za piaskownikiem. Wyniki badań mikrobiologicznych ścieków surowych oraz wody surowej i uzdatnionej wykonane w trakcie eksperymentu zestawiono w tabelach 9.7 i 9.8.

Tabela 9.7

Wyniki badań ścieków surowych pobranych w dniu 22.04.2014

Kod oznaczenia	6	7	8	9	10
Rozcieńczenie					
1:10 ⁷	195	145			
1: 10 ⁵			120	42	3

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Tabela 9.8

Wyniki badań mikrobiologicznych wody

Kod oznaczenia	6	7	8	9	10
Miejsce poboru					
22.04.2014 przed waniem ścieków					
Woda surowa	6	1	0	0	0
Woda uzdatniona	0	0	0	0	0
22.04.2014 po 5 godzinach od wiania ścieków					
Woda surowa	198	43	849	185	15
Woda uzdatniona	83	7	112	37	3
23.04.2014					
Woda surowa	122	36	240	55	10
Woda uzdatniona	68	8	78	28	3
24.04.2014					
Woda surowa	102	19	136	17	5
Woda uzdatniona	41	8	6	2	2
25.04.2014					
Woda surowa	67	4	13	2	3
Woda uzdatniona	18	2	9	0	0
28.04.2014					
Woda surowa	9	0	1	0	0
Woda uzdatniona	232	3	2	0	0

Źródło: Raport Końcowy projektu Innotech [2016].

Dodanie ścieków surowych spowodowało znaczące pogorszenie się składu mikrobiologicznego wody surowej. W czasie wydłużania czasu eksploatacji stacji obserwowano zmniejszanie się wszystkich wskaźników mikrobiologicznych, przy czym w ostatniej analizie, wykonanej 28.04.2014 r. stwierdzono wzrost ogólnej liczby bakterii psychrofilnych oznaczanej w temperaturze 22°C po 72 godz.

Poprawa składu biologicznego wody, jaką obserwowano w miarę wydłużania czasu filtracji, była prawdopodobnie wynikiem wymywania mikroorganizmów ze złoża filtracyjnego oraz procesów ich obumierania, w tym lizy wywołanej bakteriofagami.

Powtórnego zakażenia układu technologicznego dokonano 12.05.2014 r. Do skażenia wody użyto, podobnie jak poprzednio, 10 dm³ ścieków surowych. Z pobranych ścieków wzięto próbkę do badania mikrobiologicznego. Wyniki badań ścieków surowych umieszczono w tabeli 9.9, a wody surowej i uzdatnionej w tabeli 9.10.

Tabela 9.9

Wyniki badań ścieków surowych pobranych w dniu 12.05.2014

Kod oznaczenia	6	7	8	9	10
Rozcieńczenie					
1:10 ⁷	165	121			
1:10 ⁵			85	30	2

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Tabela 9.10

Wyniki badań uzdatnionej wody po skażeniu ściekami surowymi

Kod oznaczenia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Miejsce poboru										
12.05.2014										
Woda surowa	0,78	21	745	168	0,67	64	12	0	0	0
Woda uzdatniona	0,49	19	221	49	0,25	18	5	0	0	0
12.05.2014										
Woda surowa						186	37	308	89	10
Woda uzdatniona						94	9	81	40	2
13.05.2014										
Woda surowa						55	28	91	24	2
Woda uzdatniona						70	18	48	13	6
14.05.2014										
Woda surowa						25	18	32	5	2
Woda uzdatniona						8	6	15	2	1
15.05.2014										
Woda surowa						23	2	12	3	0
Woda uzdatniona						18	3	2	1	1
16.05.2014										
Woda surowa						2	1	2	0	0
Woda uzdatniona						26	1	1	0	0

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Porównując uzyskane wyniki z poprzednim eksperymentem można stwierdzić, że podobnie w miarę wydłużania się czasu eksploatacji stacji obserwowano poprawę składu mikrobiologicznego wody, co świadczy o zachodzeniu zjawiska samooczyszczania się układu technologicznego, wody surowej i uzdatnionej. To spostrzeżenie było podstawą do podjęcia badań nad określeniem, w jakim stopniu za zjawisko samooczyszczania się instalacji wodociągowej są odpowiedzialne naturalne procesy lizy bakterii z udziałem bakteriofagów.

9.2. Badania nad możliwością stabilizacji składu mikrobiologicznego z wykorzystaniem procesów naturalnych

Badania, których głównym celem było potwierdzenie hipotezy o możliwości przygotowania wody do spożycia z wykorzystaniem naturalnych procesów biologicznych, przeprowadzono na dwóch instalacjach badawczych w warunkach rzeczywistych. W obu przypadkach instalacje te były zasilane wodą głębinową z istniejących studni, natomiast konstrukcja instalacji różniła się znacznie, co umożliwiło przeprowadzenie wielu eksperymentów. Mianowicie instalacja nazwana laboratoryjną w Broniszach pozwalała na zmianę prędkości filtracji w filtrze żwirowym w zakresie od 8 m/h do 15 m/h, a w filtrze z biopolimerami 10-25 m/h, intensywności napowietrzania w zbiorniku reakcji w zakresie uzyskania efektu od 7 do 9 mg O₂/l, a ponadto powtórne skierowanie wody uzdatnionej do zbiornika reakcji oraz płukanie filtra żwirowego wodą uzdatnioną gromadzoną w zbiorniku z ciągłą cyrkulacją przy ciągłym napowietrzaniu. Po przeprowadzeniu licznych prób w ramach rozruchu technologicznego opisywanej instalacji ustalono przepustowość instalacji na 1 dm³/min przy efektywności napowietrzania 8 mg O₂/l, jednocześnie uzyskując dobre funkcjonowanie filtra żwirowego na podstawie efektu jego działania potwierdzonego rezultatami analizy uzdatnionej wody. W celu uzyskania danych początkowych wykonano analizę fizykochemiczną oraz bakteriologiczną wody, a jej wyniki zamieszczone są w dokumentacji z badań.

Na stacji tej przeprowadzono doświadczenia polegające na wprowadzaniu do zbiornika reakcji określonego rodzaju bakterii i po intensywnym mieszaniu przez 6 h zadawano odpowiednio dobrane bakteriofagi, uruchamiając ciąg technologiczny uzdatniania wody. Próbkę pobierano co kilka godzin ze zbiornika reakcji, filtra żwirowego i filtra z biopolimerami, a także po zakończeniu ww. cyklu trwającego 96 godz. pobierano próbki z wody popłucznej (z filtra). Po przeprowadzeniu kilkunastu cykli badań dotyczących filtracji przez złożę z biopolimerami oraz równolegle zrealizowanych badaniach laboratoryjnych okazało się, że eliminacja bakterii przez złożę jest uzależniona od czasu kontaktu. Wobec tego opracowano nowy sposób kontaktu wody z biopolimerami w dodatkowym zbiorniku o pojemności 120 dm³ i wymuszonym natężeniu cyrkulacji wody (40 dm³), pozostawiając natężenie dopływu do zbiornika 1 dm³/min. Próbkę te były poddawane ocenie w Instytucie Ochrony Środowiska PIB w Warszawie, Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnych PAN we Wrocławiu oraz w Wojskowym Instytucie Higieny i Epidemiologii w Puławach. Wyniki bakteriologiczne są prezentowane w dokumentacji badawczej przez ww. poszczególne podmioty realizujące.

Podsumowując wymieniony. zakres badań na instalacji laboratoryjnej, można stwierdzić, że:

1. Pod względem parametrów fizyczno-chemicznych woda uzdatniana spełniała podstawowe wymagania zamieszczone w rozporządzeniu ministra zdrowia (Dz.U. Nr 61 poz. 417 z 2007 r. z późniejszymi zmianami).

2. Pod względem bakteriologicznym w początkowym okresie pracy instalacji woda uzdatniona spełniała wymagania „A” i „B” według zał. 1 do rozporządzenia ministra zdrowia. Z kolei po podaniu do instalacji zawiesiny bakterii w bulionie odżywczym jako pożywki dla badanych bakterii nastąpiło bardzo znaczne zwiększenie liczby bakterii zaliczanych do mikroorganizmów rozwijających się w $36 \pm 2^\circ\text{C}$ po 48 godzinach oraz w $22 \pm 2^\circ\text{C}$ po 72 godzinach. Ich liczba wzrosła do ponad 300 jtk/ml, a niekiedy nawet do 500 jtk/ml. Bakterie te były eliminowane w ok. 50% w filtrze żwirowym oraz w ok. 85% w filtrze biopolimerowym przy prędkości filtracji ok. 25 m/h. Szczegółowe wyniki badań są zawarte w dokumentacji pomiarów. Pozostałe bakterie według rozporządzenia były eliminowane w 100%.
3. Ze względu na znaczną i trudną do usunięcia w podstawowym układzie technologicznym z filtrem żwirowym liczbę bakterii zdecydowano się na przeprowadzenie 5-krotnej dezynfekcji chlorem przy koncentracji 100 ml na 100 dm³ wody przez okres 24 godz., a następnie płuczac instalację myjką ciśnieniową. Pomimo tych zabiegów nie udało się obniżyć liczby bakterii poniżej 100 jtk/ml. Podjęto próbę dezynfekcji środkami stosowanymi do sanitarnych urządzeń domowych i po kilkukrotnym zabiegu uzyskano wynik w wysokości 100 jtk/ml. Po tych zabiegach trudno było również odbudować błonę biologiczną w filtrze żwirowym nawet po jego dwukrotnej wymianie.

Opisany powyżej wynik potwierdza dotychczas uzyskane wyniki doświadczeń świadczące o trudnościach w odbudowie błony biologicznej (biofilmu) w instalacjach uzdatniających wodę po chemicznej dezynfekcji.

Drugą instalację stanowiła stacja uzdatniania wody w miejscowości Grodzisko k. Pleszewa, wyłączona z eksploatacji po 18 latach użytkowania ze względu na niemożliwość uzyskania wody o składzie odpowiadającym przepisom sanitarnym. Dezynfekcja wody chlorem nie przyniosła oczekiwanych rezultatów. Udostępnienie ww. stacji umożliwiło zrealizowanie badań w rzeczywistych warunkach. Po przeprowadzeniu inwentaryzacji i sporządzeniu kosztorysu modernizacji zgodnie z opracowanym projektem okazało się, że jej modernizacja wymaga nakładów rzędu 800 tys. PLN, co przekraczało budżet projektu. Wobec tego dokonano niezbędnych remontów i po uruchomieniu stacji sprawdzono jakość uzdatnionej wody. Uzyskane wyniki badań potwierdziły złą jakość wody pod względem bakteriologicznym, a także fizykochemicznym. Tu również woda pozyskiwana (w 2013 r.) z ujęcia głębinowego miała lepszą jakość pod względem bakteriologicznym niż woda uzdatniona (np. ogólna liczba mikroorganizmów w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$ po 72 godz. w wodzie surowej 3 jtk/ml, w wodzie uzdatnionej > 300 jtk/ml). Zmiana technologii płukania filtrów żwirowych poprawiła parametry jakościowe wody, pozostawiając nadal ponadnormatywną liczbę bakterii, co utrudniło przeprowadzenie kolejnych eksperymentów z bakteriami i eliminującymi je bakteriofagami.

Badania w skali półlaboratoryjnej przeprowadzono w doświadczalnej stacji uzdatniania wody w m. Bronisze. Wodę surową, a następnie wodę skażoną szczepami *E. coli* ATCC 11229 i *Enterococcus faecalis* ATCC 49523 w liczbie po ok. 2×10^2 komórek na 100 ml wody

filtrowano przez kolumnę wypełnioną opoką. Próbki 100 ml wody kładziono do inkubacji na podłożach Endo i Slanetz, a po 1 ml posiewano zalewowo na podłoże TSA. Odczyt wykonano po 24 i 48 godz. Uzyskane wyniki wskazują na niewielki spadek liczby bakterii po przejściu wody przez kolumnę z opoką.

Badania z wodą skażoną ściekami w trzech powtórzeniach w ciągu 3 dni przeprowadzone na urządzeniu modelowym na SUW w Broniszach potwierdziły, że kolumna wypełniona chitozaniem niemodyfikowanym nie daje zadowalających wyników. Spadek bakterii z grupy *coli* jest absolutnie niewystarczający. Kolumna wypełniona chitozaniem modyfikowanym srebrem bez wstępnego oczyszczenia wody redukuje ilość bakterii od 50% do 100%, ale nie są to wyniki powtarzalne. Badania powtórzone z zastosowaniem układu dwóch kolumn – jedna piaskowa i następna wypełniona modyfikowanym chitozaniem. Na kolumnie piaskowej następowały wstępne oczyszczenie i redukcja ilości drobnoustrojów. W układzie takim badano oczyszczanie wody surowej i skażonej *E. coli* i *E. faecalis*, a następnie ze względu na dość duże zanieczyszczenie zbiornika poddano go dezynfekcji chlorem (15 mg/dm³) i ponownie skażano. Wyniki wskazują, że zastosowanie modyfikowanego filtra chitozanowego redukuje prawie zupełnie liczbę bakterii mimo bardzo intensywnego zakażenia pierwotnego. Kolejne badania potwierdziły skuteczność oczyszczania wody przy użyciu filtra z chitozaniem modyfikowanym srebrem, i to praktycznie niezależnie od szybkości przepływu i jego kierunku (opadowy przepływ – z góry, czy wypełniający – od dołu do góry).

Analogiczne badania przeprowadzono po podaniu bakteriofagów aktywnych litycznie w stosunku do szczepu *E. coli* ATCC 11229 do zbiornika reakcji inokulowanego tym szczepem. Pobierano próby wody z układu dwóch filtrów. Uzyskane wyniki wskazują, że w pierwszym dniu po podaniu bakteriofagów bakterie z grupy *coli* zredukowane są do zera, natomiast potem ich ilość narasta. Filtr chitozanowy skutecznie redukuje ilość wszystkich bakterii.

Do skażenia wody w układzie uzdatniania w Broniszach stosowano zawiesiny wodne następujących szczepów bakterii: *Escherichia coli* ATCC 11229; *Escherichia coli* ATCC 10536; *Enterococcus faecalis* ATCC 49523; *Enterococcus hirae* ATCC 10541; *Bacillus subtilis* 6633 (endospory) i *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 (endospory).

Bakterie z rodzaju *Escherichia* i *Enterococcus* były namnażane na podłożu TSB przez 24 godz., wirowane i przemywane trzykrotnie jałową wodą destylowaną. Wodną zawiesinę komórek bakteryjnych mianowano, stosując posiewy zalewowe na podłoże TSA z rozcieńczeń dziesiętnych. Endospory laseczek tlenowych otrzymywano, namnażając szczepy na podłożu TSB w kolbie 500 ml w temp. 37°C, w termowyrząsarce o częstotliwości 120/min przez 10 dni, następnie wirowano, osad dwukrotnie przemywano H₂O destyl., zawieszano w 20 ml H₂O i dodawano etanol do stęż. 70%. Po 24 h wirowano, osad zawieszano w wodzie dejonizowanej i tak przygotowane endospory przechowywano w chłodni (6-8°C). Przed użyciem każdorazowo preparat mianowano.

Próby wody z układu uzdatniania w Broniszach pobierano jałowo do wysterylizowanych butelek laboratoryjnych o pojemności 1000 ml. Liczbę *E. coli* fekalnych, bakterii z grupy *coli* i enterokoków określano w 100 ml. Badaną wodę sączone na 3-stanowiskowym aparacie

Milipore (EZ-STREAM™ Pump), używając filtrów Milipore 0,45 µm. Filtry kładziono na płytki Petriego z podłożami: Fecal Coliforms z dodatkiem kwasu rozolowego (Biocorp), Podłoże ENDO (BTL), Slanetz and Bartley Lab-Agar™. Do liczenia *E. coli* po skażeniu wody szczepami referencyjnymi stosowano podłoża McConkey Agar (Biocorp). Do oznaczania ogólnej liczby bakterii używano Yeast Extract Lab-Agar™ (Biocorp). Płytki z filtrami w kierunku fekalnych *E. coli* (FC i Endo) inkubowano w temp. 44°C przez 24 godz., a w kierunku bakterii z grupy *coli* (FC i Endo) w 37°C przez 24 godz. Płytki z filtrami w kierunku oznaczania liczby enterokoków inkubowano w temp. 37°C przez 24-48 godz. Płytki z podłożem Yeast Extract Lab-Agar posiane zalewowo inkubowano w temp. 36°C przez 44 godz. oraz w temp. 22°C przez 68 godz. (w kierunku bakterii mezofilnych i psychrofilnych).

Badanie wody skażonej endosporami *Bacillus sp.* – Próby wody ogrzewano 15 min w temp 80°C i posiewano zalewowo na podłoże TSA. Inkubowano 24-48 godz. w temp. 37°C. Posiewy z użyciem filtrów były wykonywane bądź to w Broniszach – bezpośrednio w miejscu pobierania prób, bądź w laboratorium WIHE w Puławach (transport trwał 2-2,5 godz.). Posiewy zalewowe wykonywane były w Puławach.

Tabela 9.11

Badanie wody – 2 kolumny. Wodę w zbiorniku skażono komórkami *Escherichia coli* ATCC 11229 i *Enterococcus faecalis* ATCC 49523 w ilości ok. 100 bakterii/100 ml. Badanie powtórzono dwukrotnie w odstępie 1 godziny

Lp	Miejsce	Coliform/100 ml	% spadku liczby bakterii	Enterokoki/100 ml	% spadku liczby bakterii	Mezofile/1 ml	% spadku liczby bakterii	Psychrofile/1 ml	% spadku liczby bakterii
1	Zbiornik	2x10 ²		0		6,6x10 ⁴		7,7x10 ³	
2	Filtr piaskowy	8 x10 ¹	60,0	0		4,8 x 10 ⁴	39,4	1,2 x 10 ⁴	-55,8*
3	Filtr chitozanowy	1,3x 10 ¹	93,5	0		5,5 x 10 ²	99,2	6,0 x 10 ³	22,1
4	Zbiornik – skażenie	2,8 x 10 ²		9 x 10 ¹		8 x 10 ³		7,36 x 10 ⁴	
5	Filtr piaskowy	3,0x 10 ¹	89,3	6,9x 10 ¹	33,3	3,1 x 10 ²	96,1	8,5 x 10 ⁴	-15,5*
6	Filtr chitozanowy	0,2x 10 ¹	99,3	0,2x 10 ¹	97,8	2,7 x 10 ²	96,6	1,4 x 10 ³	98,0
10	Zbiornik – skażenie	3,8 x 10 ²		2,2 x 10 ²		8,5 x 10 ³		8,2 x 10 ⁴	
11	Filtr piaskowy	2,0x 10 ¹	94,3	6,6x 10 ¹	70,0	9,5 x 10 ²	88,8	8,1 x 10 ⁴	1,2
12	Filtr chitozanowy	0,1x 10 ¹	99,7	0	100	3,5 x 10 ²	95,9	3,4x10 ³	95,9

* wzrost liczby bakterii, prawdopodobnie jako skutek zanieczyszczenia filtra

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Przy skażeniu wody *E. coli* i *E. faecalis* w ilości ok. 1 x 10²/100 ml spadek liczby bakterii po filtrze chitozanowym sięga 99,7% w przypadku *E. coli* i 100% w przypadku *E. faecalis*. Spadek liczby bakterii mezofilnych i psychrofilnych sięga 95-98% na filtrze chitozanowym (tab. 9.11), co jednak przy wysokim skażeniu wody jest wartością niewystarczającą. Rezultaty badania aktywności bakteriobójczej kolumny piaskowej i kolumny chitozanowej (Ag) przy skażeniu endosporami *B. subtilis* oraz bakteriami *E. coli* i *E. faecalis* przedstawiono w tabeli 9.12.

Tabela 9.12

Aktywność bakteriobójcza kolumny piaskowej i chitozanowej

	Coliform /100ml		Enterokoki/100ml		Endospory/ml		Mezofile/ml		Psychrofile/ml	
	Woda surowa		- zbiornik		odkazyany					
zbiornik	0	% spadku liczby bakterii	0	% spadku liczb. bakterii	0	% spadku liczby bakterii	1,4 x 10 ²	% spadku liczby bakterii	9 x 10 ¹	% spadku liczby bakterii
Filtr	6 x 10 ²	*	0,1 x 10 ¹	*	0,2 x 10 ¹	*	9,7 x 10 ¹	30,7	1,06 x 10 ²	*
Filtr chitozan	0	-	0	-	0	-	0	100	8,9 x 10 ¹	1,1
	skażenie		endosporami		<i>B. subtilis</i>					
zbiornik	0		0	-	9,8 x 10 ¹		1,5 x 10 ²		1,6 x 10 ²	
Filtr piaskowy	2,2 x 10 ²	*	0	-	1,2 x 10 ¹	87,7	1,2 x 10 ²	20,0	2,4 x 10 ²	*
Filtr chitozan	0	-	0	-	0	100	0	100	1,7 x 10 ¹	89,4
	skażenie		<i>E. coli</i>		i		<i>E. faecalis</i>			
zbiornik	3,3 x 10 ²		3,5 x 10 ²		9,0 x 10 ¹		2,83 x		3,4 x 10 ²	
Filtr piaskowy	1,1 x 10 ¹	96,7	1,4 x 10 ¹	96	0,2 x 10 ¹	87,8	2,6 x 10 ²	8,13	2,2 x 10 ²	35,3
Filtr chitozan	0	100	0	100	0	100	0,7 x 10 ¹	97,5	1,6 x 10 ¹	95,3

* wzrost liczby bakterii, prawdopodobnie jako skutek zanieczyszczenia filtra. Filtr chitozanowy (Ag) redukuje liczbę endospor *Bacillus subtilis* o 100%. Zastosowanie płuczki chitozanowej zamiast filtra redukuje liczbę *E. coli* i *E. faecalis* o 100%, w znacznie mniejszym stopniu redukuje natomiast liczbę bakterii mezofilnych i psychrofilnych

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

9.3. Badania nad usuwaniem bakterii hemolizujących

9.3.1. Metodyka badań

Materiałem do badań bakteriologicznych były próbki wody pobierane z SUW w Grodzisku k. Pleszewa oraz z modelowej stacji uzdatniania wody wykonanej w skali 1:10 w Broniszach, które stanowiły główny materiał badawczy. Wykonywano również badania bakteriologiczne innych materiałów stosowanych w opracowywanych i testowanych technologiach. Były to próbki biopolimerów chitozanu.

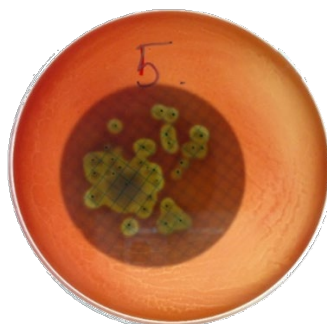
Zakres badań obejmował badania bakteriologiczne próbek wody według opracowanej procedury własnej zgodnie z rozporządzeniem ministra zdrowia. Metoda własna, zaproponowana jako badanie kontrolne polegała na stwierdzeniu obecności oraz ewentualnie określeniu całkowitej liczby bakterii hemolizujących typu beta w badanej próbce wody. Badanie to daje dodatkowo możliwość określenia ogólnej liczby mezofilnych bakterii heterotroficznych, czyli wszystkich innych bakterii niż hemolizujące, które wyrosły po posiewie próbki wody na pełnym podłożu z dodatkiem krwi baraniej. Obecność ich w wodzie uzdatnionej jest niepożądana, ponieważ może stanowić zagrożenie zdrowotne dla konsumenta. Dodatkowo wykonywano pełny zestaw badań bakteriologicznych próbek wody przewidziany Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z 20 kwietnia 2010 r., tj. ogólną liczbę mikroorganizmów

inkubowanych w 22°C przez 72 godz. [PN-EN- ISO 6222:2004], ogólną liczbę mikroorganizmów inkubowanych w 36°C przez 48 godz. [PN-EN- ISO 6222:2004], obecność bakterii grupy *coli* [PN-EN ISO 9308-1:2004 + Ap1:2005], obecność *Escherichia coli* [PN-EN ISO 9308-1:2004 + Ap1:2005] oraz obecność enterokoków kałowych [PN-EN ISO 7899-2:2004].

Do wykrywania bakterii hemolizujących w próbkach wody zaadaptowano metodę opracowaną przez **Każmierczuk i Kalisz [2008]**. Procedura określa sposób oznaczania całkowitej liczby bakterii heterotroficznych z wyróżnieniem bakterii hemolizujących typu beta w próbce wody za pomocą filtracji membranowej na pełnym podłożu z dodatkiem krwi. Jako wynik badania otrzymujemy całkowitą liczbę bakterii heterotroficznych oraz liczbę bakterii hemolizujących typu beta. Obecność bakterii hemolizujących w badanej próbce wody stwierdzamy na podstawie hemolizy, polegającej na rozpadzie (lizie) erytrocytów, obserwowanej na podłożu hodowlanym. Rozróżnia się następujące typy hemolizy:

- hemoliza typu beta (hemoliza całkowita) – obserwowany jest całkowity rozpad erytrocytów charakteryzujący się wyraźnym odbarwieniem podłoża mikrobiologicznego. Strefa wokół kolonii jest przezroczysta, a pod mikroskopem wokół kolonii nie występują erytrocyty,
- hemoliza typu alfa (hemoliza niepełna) – utlenienie hemoglobiny do methemoglobiny. Widoczne zielone zabarwienie podłoża. W miejscu odbarwienia agaru pod mikroskopem widoczne pojedyncze erytrocyty,
- hemoliza typu gamma – brak hemolizy.

Po przefiltrowaniu odpowiedniej objętości próbki wody filtr membranowy o średnicy porów 0,45 µm przenosimy na podłoże agarowe z 5-procentowym dodatkiem krwi baraniej. Następnie szalkę Petriego wraz z filtrem należy umieścić w cieplarni nastawionej na 37°C i inkubować od 18 do 48 godzin. Po inkubacji liczymy powstałe na filtrze kolonie. Wzrost bakterii hemolizujących po 18-48 godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C jest łatwy do identyfikacji makroskopowej. Kolonie bakterii hemolizujących są duże, a strefa hemolizy typu zarówno beta, jak i alfa jest dobrze widoczna i łatwa do identyfikacji na tle nieprzezroczystego podłoża hodowlanego. Podczas liczenia kolonii na filtrze należy pominąć kolonie charakterystyczne dla grzybów strzępkowych. Wynik stanowi całkowitą liczbę bakterii heterotroficznych w przefiltrowanej próbce wody. Następnie należy odwrócić szalkę dnem do góry i policzyć miejsca, w których doszło do odbarwienia podłoża. Wynik podaje się jako obecność tzw. łysinek (rys. 9.1), czyli kolonii otoczonych strefą hemolizy typu beta, który stanowi liczbę bakterii hemolizujących typu beta obecnych w przefiltrowanej próbce wody.



Rys. 9.1. Kolonie bakterii hemolizujących na filtrze membranowym umieszczonym na podłożu Columbia z 5-procentowym dodatkiem krwi baraniej

Fig. 9.1. Colonies of haemolytic bacteria on a membrane filter placed on Columbia medium with 5% sheep blood

Źródło: Innotech Project Final Report [2016].

W badanych próbkach wody zarówno surowej, czyli przed uzdatnieniem, jak i uzdatnionej stwierdzano obecność bakterii hemolizujących, których wzrost na podłożu różnił się cechami morfologicznymi. Kolonie tych bakterii miały różne: konsystencję, barwę, kształt oraz inne cechy, tj. regularny lub postrzępiony brzeg czy wklęsłą lub wypukłą formę wzrostu. W różnych próbkach wody pochodzących z różnych punktów poboru dominowały bakterie tworzące wyraźne duże (średnica 3-5 mm) kolonie o zabarwieniu szarobiałym, mlecznym lub białym. Oprócz nich sporadycznie występowały kolonie o zabarwieniu żółtym, kremowym i pomarańczowym. W preparatach barwionych metodą złożoną Grama można było stwierdzić obecność G- pałeczek oraz G+ laseczek i ziarniaków. Na podkreślenie zasługuje fakt wielokrotnego stwierdzania obecności bakterii hemolizujących w próbkach wody po jej uzdatnieniu, czyli przeznaczonej do konsumpcji. Były to kolonie żółte, błyszczące, gładkie, G+, które na podstawie obrazu mikroskopowego można było zidentyfikować jako ziarniaki, oraz biało-kremowe lub mlecznobiałe, błyszczące, gładkie, G- formy cylindryczne (pałeczki).

9.3.2. Wyniki badań pilotażowych

Próbki do badań pobrano ze studni oraz po procesie uzdatnienia. Wyniki badań zastosowaniem opracowanego testu, przedstawiono w tabelach 9.13.–9.16.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można stwierdzić co następuje:

- bakterie hemolizujące w niektórych próbkach występowały w większej liczbie niż obecnie stosowane w rutynowych badaniach sanitarnych, bakterie wskaźnikowe,
- w próbkach, w których nie wykazano obecności bakterii wskaźnikowych stwierdzono bakterie hemolizujące typu beta,
- uzyskane wyniki badań wstępnych sugerują, że metoda wykrywania bakterii hemolizujących w próbkach wody może stanowić uzupełnienie w stosunku do obecnej analizy sanitarnej wody,
- test wykrywania bakterii hemolizujących charakteryzuje się dużą czułością, a jednocześnie prostotą wykonania.

Tabela 9.13

Wyniki badań bakteriologicznych próbek wody pobranych w dniu 23.10.2013 r. w stacjach uzdatniania wody w Ożarowie Mazowieckim i Świącicach

Punkt poboru	Całkowita liczba bakterii mezofilnych po 48 h inkubacji jtk/ml	Całkowita liczba bakterii psychrofilnych po 72 h inkubacji jtk/ml	Liczba bakterii <i>Enterococcus</i> jtk/100 ml	Liczba bakterii <i>Escherichia coli</i> jtk/100 ml	Liczba bakterii z grupy <i>coli</i> jtk/100 ml	Liczba bakterii heterotroficznych na podłożu Columbia z 5-proc. dodatkiem krwi jtk/100 ml		Liczba bakterii hemolizujących jtk/100 ml	
						po 24 h	po 48 h	po 24 h	po 48 h
Ożarów Maz. surowa	Nie badano	Nie badano	Nie badano	Nie badano	Nie badano	>400	>400	1	3
Ożarów Maz. uzdatniona	Nie badano	Nie badano	Nie badano	Nie badano	Nie badano	80	80	1	2
Świącice surowa	Nie badano	Nie badano	Nie badano	Nie badano	Nie badano	>400	>400	1	5
Świącice uzdatniona	Nie badano	Nie badano	Nie badano	Nie badano	Nie badano	100	100	1	3

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Tabela 9.14

Wyniki badań bakteriologicznych próbek wody pobranych w dniu 4.12.2013 r. w stacjach uzdatniania wody w Ożarowie Mazowieckim i Świącicach

Punkt poboru	Całkowita liczba bakterii mezofilnych po 48 h inkubacji jtk/ml	Całkowita liczba bakterii psychrofilnych po 72 h inkubacji jtk/ml	Liczba bakterii <i>Enterococcus</i> jtk/100 ml	Liczba bakterii <i>Escherichia coli</i> jtk/100 ml	Liczba bakterii z grupy <i>coli</i> jtk/100 ml	Liczba bakterii heterotroficznych na podłożu Columbia z 5-proc. dodatkiem krwi jtk/100 ml		Liczba bakterii hemolizujących jtk/100 ml	
						po 24 h	po 48 h	po 24 h	po 48 h
Ożarów Maz. Woda surowa	0	20	0	0	0	6	38	0	4
Ożarów Maz. Woda uzdatniona	10	10	0	1	3	21	36	0	11
Świącice Woda surowa	0	30	0	0	1	2	5	0	3
Świącice Woda uzdatniona	20	90	0	0	0	30	23	0	5

Tabela 9.15

Wyniki badań bakteriologicznych próbek wody pobranych w dniu 9.12.2013 r. w stacji uzdatniania wody w Grodzisku koło Pleszewa

Punkt poboru	Całkowita liczba bakterii mezofilnych po 48 h inkubacji jtk/ml	Całkowita liczba bakterii psychrofilnych po 72 h inkubacji jtk/ml	Liczba bakterii <i>Enterococcus</i> jtk/100 ml	Liczba bakterii <i>Escherichia coli</i> jtk/100 ml	Liczba bakterii z grupy <i>coli</i> jtk/100 ml	Liczba bakterii heterotroficznych na podłożu Columbia z 5-proc. dodatkiem krwi jtk/100 ml		Liczba bakterii hemolizujących jtk/100 ml	
						po 24 h	po 48 h	po 24 h	po 48 h
Woda uzdatniona	40	130	0	0	0	0	58	0	1
Filtr I	0	30	0	0	0	0	25	0	1
Filtr II	1070	>400	0	0	0	0	7	0	0
Studnia zbiorcza	30	120	0	0	0	>400	>400	1	1

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Tabela 9.16

Wyniki badań bakteriologicznych próbek wody pobranych w dniu 20.01.2014 r. w stacjach uzdatniania wody w Ożarowie Mazowieckim i Święcicach

Punkt poboru	Całkowita liczba bakterii mezofilnych po 48 h inkubacji jtk/ml	Całkowita liczba bakterii psychrofilnych po 72 h inkubacji jtk/ml	Liczba bakterii <i>Enterococcus</i> jtk/100 ml	Liczba bakterii <i>Escherichia coli</i> jtk/100 ml	Liczba bakterii z grupy <i>coli</i> jtk/100 ml	Liczba bakterii heterotroficznych na podłożu Columbia z 5-proc. dodatkiem krwi jtk/100 ml		Liczba bakterii hemolizujących jtk/100 ml	
						po 24 h	po 48 h	po 24 h	po 48 h
Ożarów Maz. Woda surowa. Studnia 1	2	0	0	0	0	0	0	0	0 *
Ożarów Maz. Woda surowa. Studnia 2 **	Nie badano	0	Nie badano	Nie badano	Nie badano	3	Nie badano	1	Nie badano
Ożarów Maz. Woda surowa Studnia 2 ***	3	0	0	0	0	1	Nie badano	0	Nie badano
Ożarów Maz. Woda uzdatniona	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Święcice Woda surowa	3	1	0	1	0	50	Nie badano	27	Nie badano

Oznaczenia: * Zauważono wzrost grzybów strzępkowych; ** Pobór na zewnątrz budynku SUW; *** Pobór wewnątrz budynku SUW

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

W pracy przedstawiono propozycję jakościowego testu sanitarnego, polegającego na stwierdzeniu obecności bakterii hemolizujących w wodzie poddanej procesom uzdatniania. Opracowany test biologiczny to innowacyjny sposób oceny skuteczności dezynfekcji w procesach uzdatniania wody przeznaczonej zarówno do bezpośredniej konsumpcji, jak i do celów gospodarczych. W teście wykorzystano grupę bakterii mających unikalną cechę fizjologiczną polegającą na wywoływaniu hemolizy typu β erytrocytów obecnych w zastosowanym w badaniu agarowym podłożu hodowlanym. Test ten umożliwia wykrycie w badanym materiale obecności bakterii chorobotwórczych, potencjalnie chorobotwórczych oraz oportunistycznych, innych niż bakterie wskaźnikowe, stosowane obecnie w sanitarnej analizie wody, ponieważ te ostatnie nie mają zdolności do wywoływania hemolizy erytrocytów. Pozytywny wynik testu może świadczyć, że w wodzie uzdatnionej, ocenionej zgodnie z obecnymi kryteriami jako bezpieczna z sanitarnego punktu widzenia, są nadal obecne bakterie chorobotwórcze, potencjalnie chorobotwórcze oraz oportunistyczne, mogące stwarzać zagrożenie dla zdrowia konsumenta. Na szczególną uwagę zasługuje fakt wykrycia w badaniach bakterii hemolizujących w próbkach wody uzdatnionej, w których nie stwierdzono bakterii wskaźnikowych w ponadnormatywnej liczbie. Wykrywanie hemolizy jest szybkie i proste dzięki temu, że analizuje się pojedynczą cechę fizjologiczną pozwalającą jednoznacznie wyróżnić te bakterie. Dzięki temu, że hemoliza występuje u różnych bakterii chorobotwórczych, niezależnie od ich przynależności systematycznej, opracowany nowy wskaźnik sanitarny miałby szerszy i bardziej uniwersalny charakter niż wykrywanie wielu rodzajów bakterii wskaźnikowych, które wymagają zastosowania skomplikowanych, a przez to drogich i czasochłonnych metod identyfikacyjnych.

Obecność bakterii hemolizujących w badanej próbce może sugerować, że w procesie uzdatniania z różnych przyczyn nie uzyskano efektu higienizacji. Można więc stwierdzić, że obecność bakterii hemolizujących w takim przypadku mogłaby być dobrym wskaźnikiem nieskuteczności procesu uzdatniania wody. Opracowany test, zastosowany w rutynowych, sanitarnych badaniach kontrolnych wody, może być użytecznym narzędziem, umożliwiającym weryfikację efektu uzdatniania. Szczególnie przydatne są pewne cechy fizjologiczne bakterii hemolizujących, takie jak odporność na wysoką temperaturę i podwyższoną wartość pH. Jakościowy test posiewowy, polegający na wykryciu w próbkach wody przed uzdatnieniem i po procesach uzdatniania bakterii hemolizujących, może rozszerzyć zakres wskaźników biologicznych stosowanych w kontrolnych badaniach sanitarnych, dopuszczających je do konsumpcji oraz innego wykorzystania. Powinno się to również przyczynić do zmniejszenia ryzyka wywołania chorób infekcyjnych spowodowanych wprowadzeniem do organizmu konsumenta produktów zawierających biologiczne czynniki szkodliwe i przez to niebezpiecznych z sanitarnego punktu widzenia. Metoda ta ze względu na krótki czas inkubacji (pierwsze oznaki hemolizy można zaobserwować już po 18–24 godzinach) może być przydatna jako narzędzie wczesnego ostrzegania w przypadku sprawdzania skuteczności procesów uzdatniania wody przeznaczonej do konsumpcji lub badania skutków zmiany parametrów procesu uzdatniania.

Na podstawie uzyskanych wyników opracowano metodę w postaci Standardowej Procedury Operacyjnej „Oznaczanie całkowitej liczby bakterii w wodzie z uwzględnieniem liczby bakterii hemolizujących metodą filtracji membranowej”. W ramach współpracy, zgodnie z zasadami opisanymi w procedurze, badania obecności bakterii hemolizujących w wodzie były ponadstandardowo wykonywane w okresie 12-16.05.2014 r. w Laboratorium PK Pleszew Sp. z o.o. przy Oczyszczalni Ścieków w Pleszewie. Badania bakteriologiczne realizowano jako kontrole skuteczności dezynfekcyjnej ścieków surowych na SUW w Grodzisku k. Pleszewa w eksperymencie prowadzonym przez współuczestnika konsorcjum.

9.3.3. Podsumowanie wyników badań

Grupa bakterii hemolizujących, heterotroficznych, zróżnicowana fenotypowo i genotypowo, obejmuje wiele gatunków i rodzajów. Bakterie te występują powszechnie w środowisku, w tym również i w wodzie. W związku z tym istnieje możliwość wyodrębnienia i wykrycia obecności tej grupy potencjalnie chorobotwórczych bakterii na podstawie wyniku szybkiego testu posiewowego na określonym podłożu hodowlanym. Po potwierdzeniu uzyskanych wyników wskaźnik ten mógłby być przydatnym kryterium rozszerzającym zakres obecnie stosowanej kontroli sanitarnej wody przeznaczonej do picia, zmniejszając ryzyko zagrożenia zdrowia konsumenta.

Uzyskane rezultaty wskazują, że za pomocą opracowanego testu bakteriologicznego można wykryć bakterie hemolizujące. Taki wynik może świadczyć o tym, że w wodzie uzdatnionej, uważanej zgodnie z aktualnymi kryteriami za bezpieczną z sanitarnego punktu widzenia, znajdują się nadal bakterie chorobotwórcze, potencjalnie chorobotwórcze oraz oportunistyczne, mogące stwarzać zagrożenie dla zdrowia konsumenta.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt wykrycia bakterii hemolizujących w próbkach wody uzdatnionej, w których nie stwierdzono bakterii wskaźnikowych w ponadnormatywnej liczbie.

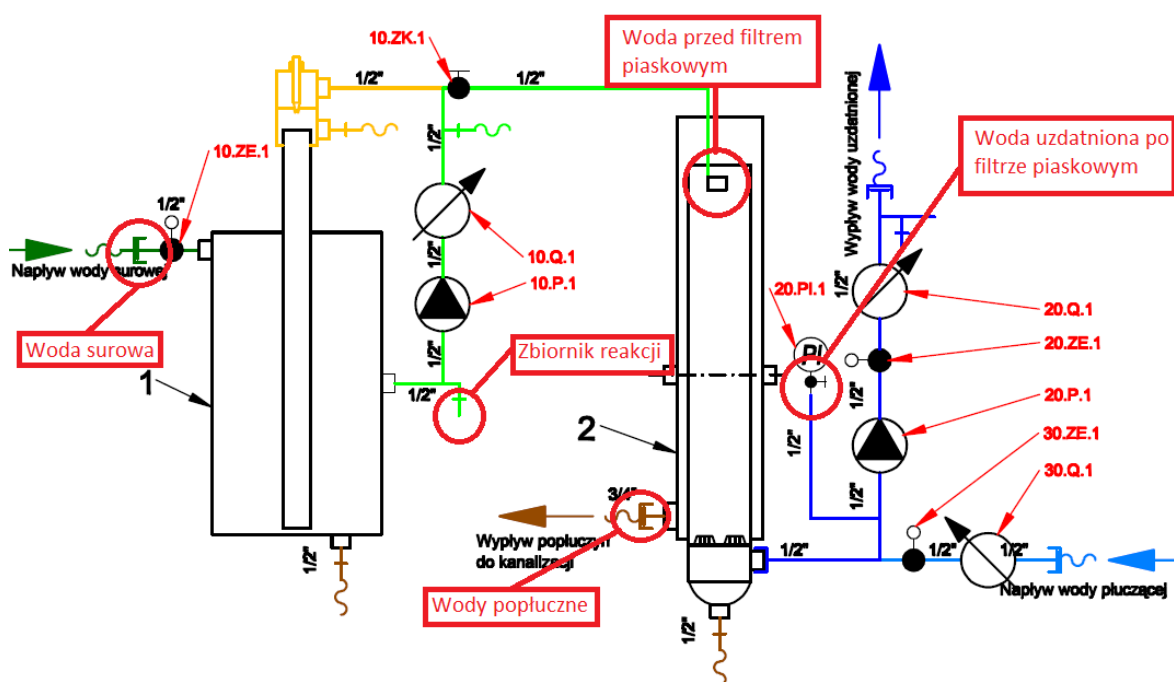
Wykrywanie hemolizy jest szybkie i proste dzięki temu, że wykrywa się jedną cechę pozwalającą jednoznacznie wyróżnić te bakterie. Fakt hemolizy jest charakterystyczny dla różnych bakterii chorobotwórczych niezależnie od ich przynależności systematycznej. Opracowany nowy wskaźnik sanitarny miałby szerszy i bardziej uniwersalny charakter niż wykrywanie wielu rodzajów bakterii wskaźnikowych, które wymagają zastosowania skomplikowanych, a przez to drogich i czasochłonnych metod identyfikacyjnych.

Obecność bakterii hemolizujących w badanej próbce może sugerować, że w procesie uzdatniania wody z różnych przyczyn nie uzyskano efektu higienizacji. Można więc stwierdzić, że obecność bakterii hemolizujących w takim przypadku mogłaby być dobrym wskaźnikiem nieskuteczności higienizacyjnej procesu uzdatniania wody.

9.4. Badania przeprowadzone w modelowej stacji uzdatniania wody w Broniszach

9.4.1. Badania nad samooczyszczaniem się układu doświadczalnego z zanieczyszczeń mikrobiologicznych

W wyłączonej z eksploatacji stacji uzdatniania wody w Broniszach zainstalowano model w skali 1:10 układu uzdatniania wody składający się ze zbiornika reakcji oraz filtru piaskowego (rys. 9.2). Po ustabilizowaniu parametrów pracy układu przeprowadzono wstępne badania procesu uzdatniania wody surowej pobieranej z lokalnej studni. W tabeli 9.17 przedstawiono zestawienie wyników badań mikrobiologicznych próbek wody pobranych przed uzdatnieniem i po uzdatnieniu w stacji modelowej.



Rys. 9.2. Schemat modelowego układu stacji uzdatniania wody. Na rysunku oznaczono miejsca poboru próbek do badań mikrobiologicznych

Fig. 9.2. Diagram of model water treatment plant with marked the water sampling points for microbiological tests

Źródło: Innotech Project Final Report [2016].

Tabela 9.17

Zestawienie wyników badań mikrobiologicznych próbek wody pobranych przed uzdatnieniem i po uzdatnieniu w stacji modelowej

Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba mezofilnych bakterii heterotroficznych na podłożu Columbia	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta
		jtk/ml			
23.10.2014	Zbiornik reakcji	$1,1 \cdot 10^4$	$8,8 \cdot 10^3$	-	$1,4 \cdot 10^3$
	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym	$7,2 \cdot 10^3$	$9,6 \cdot 10^3$	-	$1,7 \cdot 10^3$
24.10.2014	Zbiornik reakcji	$4,1 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^2$
	Przed filtrem piaskowym	$2,0 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^2$
	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym	$1,1 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	$8,0 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^2$
6.11.2014	Zbiornik reakcji	$1,8 \cdot 10^4$	$>10^5$	-	$3,0 \cdot 10^2$
	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym	$1,4 \cdot 10^4$	$>10^5$	-	$2,2 \cdot 10^2$
12.11.2014	Zbiornik reakcji	$7 \cdot 10^2$	$6 \cdot 10^2$	-	$1,5 \cdot 10^2$
	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym	$1,1 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^2$	-	75
	Wody popłuczne	$1,8 \cdot 10^3$	$5,2 \cdot 10^4$	-	$1,7 \cdot 10^5$

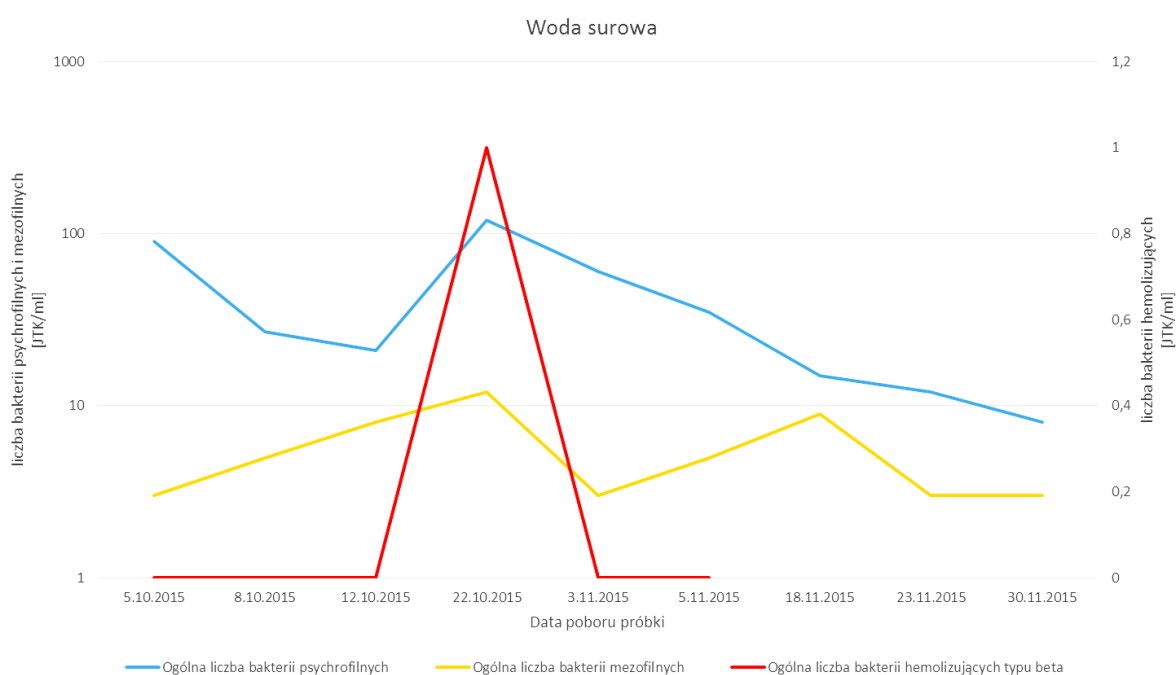
Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Na podstawie analizy zaprezentowanych wyników można stwierdzić, że modelowy układ składający się ze zbiornika reakcji oraz filtra piaskowego tylko nieznacznie (lub nawet wcale) obniża zanieczyszczenie mikrobiologiczne wody, przez co poziom uzdatnienia jest wysoce niewystarczający, aby uzyskaną procesie wodę można było uznać za bezpieczną z sanitarnego punktu widzenia. Niepokojący jest fakt, że woda po przejściu przez filtr piaskowy jest bardziej skażona niż woda poddana procesowi uzdatniania, co może świadczyć o zjawisku wtórnego zanieczyszczenia układu.

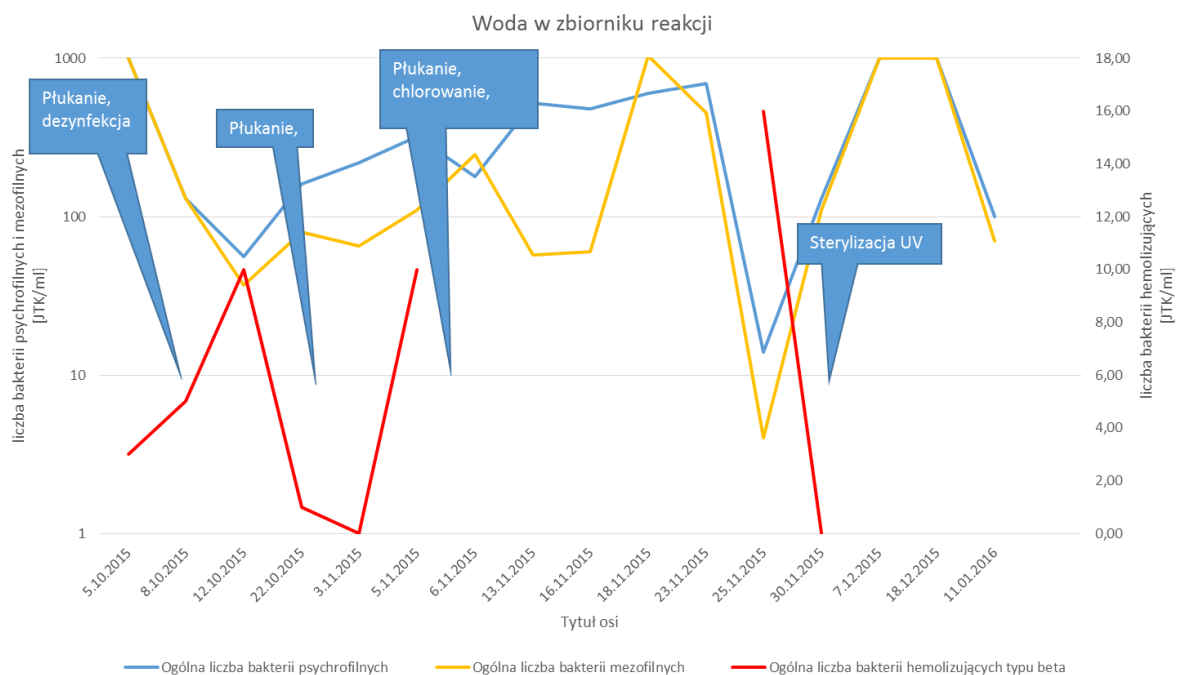
W związku z podejrzeniem pojawienia się w układzie wtórnego zanieczyszczenia w modelowej stacji rozpoczęto cykl zabiegów polegających na wielokrotnym myciu,

czyszczeniu mechanicznym oraz dezynfekcji z zastosowaniem silnych środków chemicznych. Sukcesywnie wykonywano bakteriologiczne badania kontrolne skuteczności dezynfekcyjnej zastosowanych metod. Poniżej, w tabeli 9.18, przedstawiono wyniki badań przeprowadzanych od września 2015 do stycznia 2016 r. Zestawienia wyników kontrolnych badań bakteriologicznych dokonano w formie wykresów pokazanych na rys. 9.3-9.5.

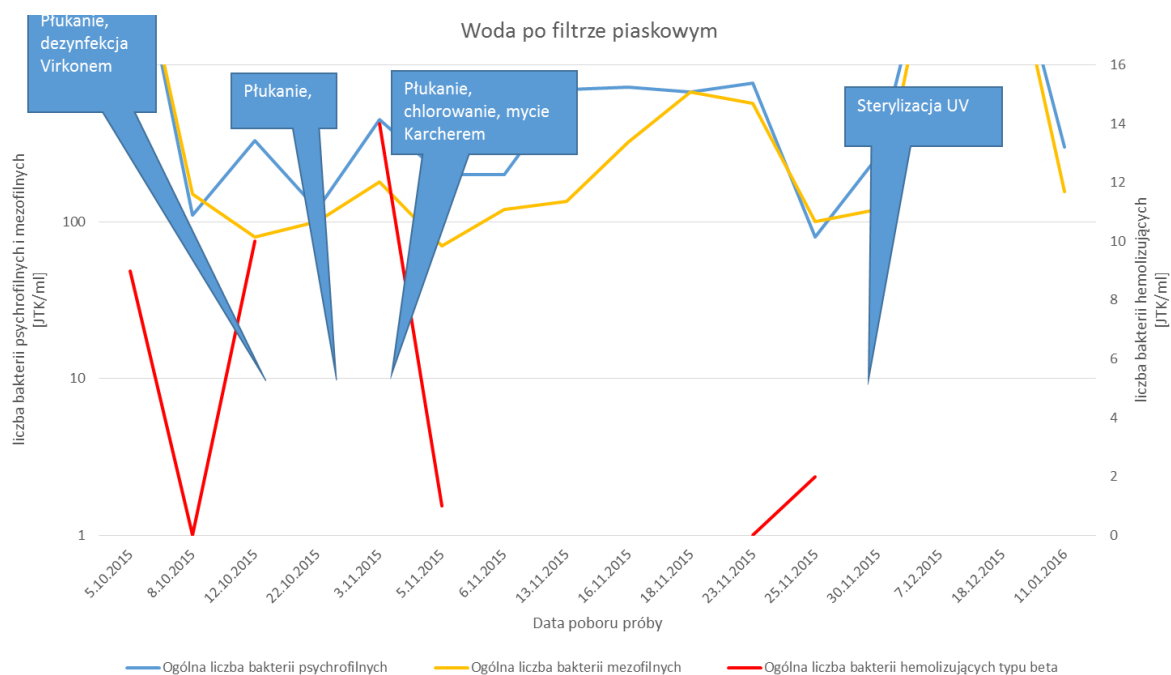
Przedstawione wyniki badań bakteriologicznych próbek wody potwierdzają, że skażenie bakteryjne powstałe na skutek świadomego wprowadzania do układu różnych bakterii podczas realizowanych eksperymentów z fagami oraz ewentualnie bulionu będącego dla nich podłożem hodowlanym ma charakter stały i bardzo trudny do usunięcia. Porównując wyniki badań charakteryzujących stan sanitarny wody surowej, można stwierdzić, że wykryte skażenie jest wtórne i dotyczy prawdopodobnie zbiornika reakcji oraz filtra piaskowego.



Rys. 9.3. Liczba bakterii w wodzie surowej
 Fig. 9.3. The number of bacteria in raw water
 Źródło: Innotech Project Final Report [2016].



Rys. 9.4. Liczba bakterii w wodzie ze zbiornika reakcji
 Fig. 9.4. The number of bacteria in water from the reaction tank
 Źródło: Innotech Project Final Report [2016].



Rys. 9.5. Liczba bakterii w wodzie po filtrze piaskowym
 Fig. 9.5. The number of bacteria in water after the sand filter
 Źródło: Innotech Project Final Report [2016].

Biorąc pod uwagę efekty uzyskane w SUW Grodzisko, przeprowadzono analogiczną próbę z zastosowaniem oczyszczonych ścieków komunalnych jako czynnikiem dezynfekcyjnym w procesie uzdatniania wody. W tym celu do zbiornika reakcji wlewo początkowo 600 ml

(próba A) i następnie 1 l (próba B) ścieków oczyszczonych pochodzących z oczyszczalni w Broniszach. Do badania bakteriologicznego pobierano próbki wody ze zbiornika reakcji i uzdatnionej po przejściu przez filtr piaskowy. W tabelach 9.18 i 9.19 przedstawiono uzyskane wyniki badań mikrobiologicznych.

Tabela 9.18

Wyniki badania właściwości dezynfekcyjnych oczyszczonych ścieków komunalnych w procesie uzdatniania wody do celów konsumpcyjnych z użyciem 600 ml ścieków (próba A)

Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta
		jtk/ml		
Przed dodaniem ścieków				
19.11.2014	Zbiornik reakcji	1,5*10 ³	1,3*10 ³	3,3*10 ³
	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym	1,6*10 ³	2,5*10 ³	4,1*10 ³
Po dodaniu ścieków				
20.11.2014	Zbiornik reakcji 24 h	1,8*10 ³	6,6*10 ²	3,4*10 ²
	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym 24 h	1,3*10 ³	1,4*10 ²	1,3*10 ²
21.11.2014	Zbiornik reakcji 48 h	2,2*10 ²	2,7*10 ³	3,2*10 ²
	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym 48 h	2,1*10 ³	1,9*10 ³	2,0*10 ²

Zródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Tabela 9.19

Wyniki badania właściwości dezynfekcyjnych oczyszczonych ścieków komunalnych w procesie uzdatniania wody do celów konsumpcyjnych z użyciem 1000 ml ścieków (próba B)

Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta
		jtk/ml		
Przed dodaniem ścieków				
25.11.2014	Zbiornik reakcji	1,2*10 ³	1,0*10 ³	1,5*10 ³
	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym	3,7*10 ³	2,0*10 ³	1,4*10 ³
Po dodaniu ścieków				
26.11.2014	Zbiornik reakcji 24 h	1,7*10 ³	1,3*10 ³	3,4*10 ³
	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym 24 h	1,3*10 ³	2,6*10 ³	7,7*10 ²
27.11.2014	Zbiornik reakcji 48 h	1,1*10 ³	3,2*10 ³	7,9*10 ²
	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym 48 h	2,7*10 ²	2,1*10 ²	1,0*10 ²
28.11.2014	Zbiornik reakcji 72 h	1,6*10 ³	1,8*10 ³	1,4*10 ³
	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym 72 h	2,3*10 ³	6,3*10 ²	3,5*10 ²

Zródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

W obu eksperymentach, przeprowadzonych w modelowej stacji w Broniszach w analogiczny sposób do wcześniejszego w SUW w Grodzisku k. Pleszewa, uzyskane wyniki nie potwierdzają zdolności dezynfekcyjnych zastosowanych w badaniu oczyszczonych ścieków komunalnych. Liczebność bakterii wskaźnikowych w próbkach pobranych przed dolaniem ścieków i wody uzdatnionej jest na zbliżonym poziomie.

9.4.2. Badania z zastosowaniem fagów do poprawy składu biologicznego wody

Na terenie modelowej stacji w Broniszach przeprowadzono próby z zastosowaniem wyselekcjonowanych przez Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu szczepów bakteriofagów w celu poprawy składu mikrobiologicznego wody. Eksperyment polegał na użyciu zestawu składającego się z zawiesiny bakterii oraz swoistego, czyli litycznego dla nich bakteriofaga. Do zbiornika reakcji wlewo 300 ml zawiesiny z całonocnej hodowli bakterii, stanowiącej inokulum o stężeniu 10^8 jtk/ml bakterii *Aeromonas* sp. Po upływie 3 godzin do tego samego zbiornika wlewo 150 ml zawiesiny fagów *Aeromonas* sp. 106/21 w bulionie. Następnie pobrano próbki wody ze zbiornika reakcji oraz po filtrze piaskowym. Na początkowym etapie eksperymentu w celu sprawdzenia skuteczności mieszania zawartości w zbiorniku reakcji pobrano 3 próbki z różnej wysokości: z powierzchni wody, ze środkowej części zbiornika oraz z jego części dennej. Po stwierdzeniu, na podstawie zbliżonej liczby bakterii w poszczególnych próbkach, że w zbiorniku jest wystarczające mieszanie, w dalszych badaniach pobierano jedynie próbkę wody z powierzchni wody w zbiorniku reakcji i po filtrze piaskowym. W tabeli 9.20 zamieszczono uzyskane wyniki.

Tabela 9.20

Wyniki badania skuteczności uzdatniania wody w modelowej stacji z zastosowaniem fagów

Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta [jtk/ml]
11.09.2014	Woda surowa	$1,2 \cdot 10^3$
Przed dodaniem bakterii wskaźnikowych		
11.09.2014	Zbiornik reakcji	$1,6 \cdot 10^3$
11.09.2014	Woda przed filtrem piaskowym	$8,8 \cdot 10^3$
11.09.2014	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym	$7,2 \cdot 10^3$
Po dodaniu bakterii wskaźnikowych		
11.09.2014	Zbiornik reakcji	ok. 10^5
Po dodaniu fagów		
11.09.2014	Zbiornik reakcji – powierzchnia zbiornika	$6,8 \cdot 10^4$
11.09.2014	Zbiornik reakcji – środek zbiornika	$3,8 \cdot 10^4$
11.09.2014	Zbiornik reakcji – dno zbiornika	$2,4 \cdot 10^4$
12.09.2014	Zbiornik reakcji po 27 godzinach	$9,6 \cdot 10^3$
13.09.2014	Zbiornik reakcji po 51 godzinach	$1,9 \cdot 10^3$
14.09.2014	Zbiornik reakcji po 75 godzinach	$1,1 \cdot 10^3$
15.09.2014	Zbiornik reakcji po 99 godzinach	$2,2 \cdot 10^3$

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Z przedstawionych w tabeli 9.20 danych nie wynika jednoznacznie efekt bakteriobójczy faga *Aeromonas* sp. 106/21. Na podstawie uzyskanych rezultatów można stwierdzić, że niektóre bakterie występujące w wodzie surowej mają właściwości hemolizujące typu beta. Dostarczony z IITD we Wrocławiu fag mógł nie wykazywać działania litycznego w stosunku do nieswoistych bakterii autochtonicznych obecnych w wodzie surowej. Jedną z przypuszczalnych przyczyn uzyskania w tym eksperymencie takiego wyniku mogło być także wprowadzenie do wody uzdatnianej bulionu razem z zawiesiną bakterii i fagów. Obecność wielu substancji odżywczych w wodzie uzdatnianej mogła naruszyć bardzo delikatną równowagę w filtrze piaskowym przy tworzeniu biofilmu i spowodować nadmierne namnażanie bakterii. Wyniki ponownego badania z zastosowaniem bakterii wskaźnikowych *Aeromonas* sp. (hodowla nocna) oraz swoistego faga *Aeromonas* sp. 106/21 przedstawiono w tabeli 9.21.

Tabela 9.21

Wyniki badania z zastosowaniem bakterii wskaźnikowych *Aeromonas* sp. oraz swoistego faga *Aeromonas* sp. 106/21

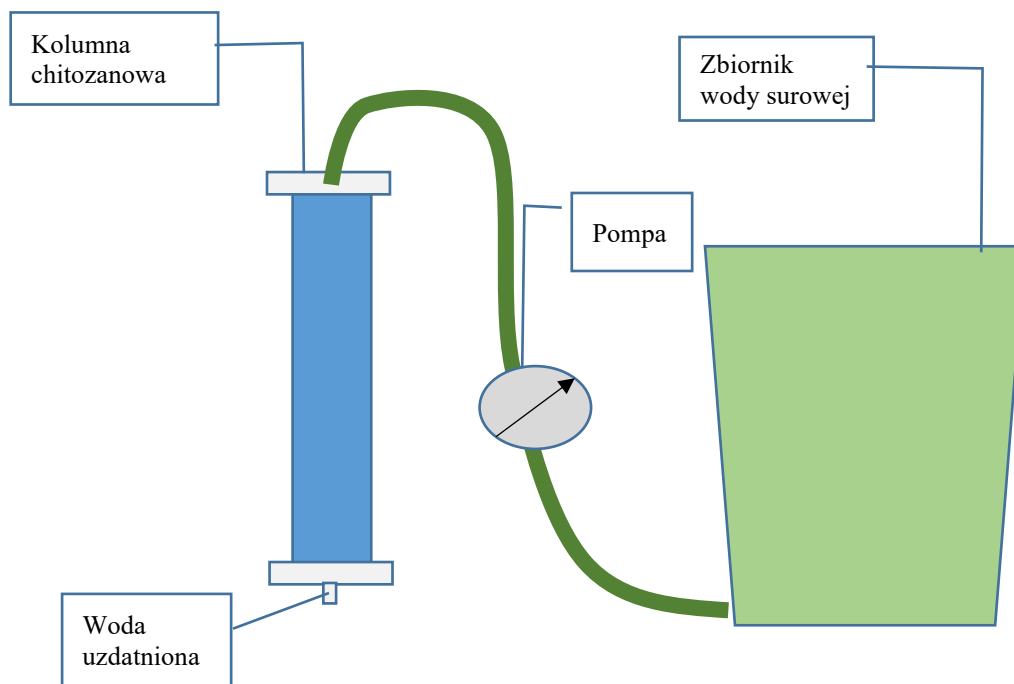
Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta
		jtk/ml		
23.10.2014	Woda surowa	$5,6 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^2$
Przed dodaniem bakterii wskaźnikowych				
23.10.2014	Zbiornik reakcji	$1,1 \cdot 10^4$	$8,8 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$
23.10.2014	Woda przed filtrem piaskowym	$1,3 \cdot 10^4$	$9,3 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$
23.10.2014	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym	$7,2 \cdot 10^3$	$9,6 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$
Po dodaniu bakterii wskaźnikowych				
23.10.2014	Zbiornik reakcji 3 h	$2,1 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^5$
23.10.2014	Woda przed filtrem piaskowym 3 h	$1,8 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$
23.10.2014	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym 3 h	$7,6 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^5$
24.10.2014	Zbiornik reakcji 24 h	$2,8 \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^4$	$5,5 \cdot 10^5$
24.10.2014	Woda przed filtrem piaskowym 24 h	$2,0 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$
24.10.2014	Woda uzdatniona po filtrze piaskowym 24 h	$4,0 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^5$

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Na podstawie zaprezentowanych powyżej wyników analizy bakteriologicznej próbek wody nie można jednoznacznie stwierdzić, iż w przeprowadzonym eksperymencie wystąpił efekt biobójczy w stosunku do bakterii wskaźnikowych, na skutek działania faga *Aeromonas* sp. 106/21.

9.4.3. Ocena skuteczności uzdatniania wody w modelowej stacji z zastosowaniem kolumny filtracyjnej wypełnionej chitozanem

W badaniach wykorzystano dodatkowy model w postaci kolumny wypełnionej biopolimerem wykonanym na bazie chitozanu. Przeprowadzono eksperyment, którego celem była ocena skuteczności bakteriobójczej tej technologii. W tym celu wodę surową w zbiorniku zaszczerpiono bakteriami hemolizującymi typu beta, wyizolowanymi z wody pochodzącej z naturalnego środowiska. Na rys. 9.6 przedstawiono schemat ideowy instalacji badania skuteczności biobójczej kolumny wypełnionej chitozanem. Do analizy bakteriologicznej pobierano próbki wody z następujących punktów poboru: zbiornik wody surowej przed i po zaszczerpieniu zawiesiną bakterii oraz wylot z kolumny z chitozanem jako próbka wody uzdatnionej. Wyniki badania skuteczności dezynfekcyjnej chitozanu przedstawiono w tabeli 9.22.



Rys. 9.6. Model układu kolumny chitozanowej
Fig. 9.6. The scheme of the chitosan column unit
Źródło: Innotech Project Final Report [2016].

Tabela 9.22

Wyniki badania skuteczności uzdatniania wody w kolumnie filtracyjnej wypełnionej chitozanem

Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta
		jtk/ml		
Przed dodaniem bakterii wskaźnikowych				
20.10.2014	Zbiornik wody surowej	$5,6 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^1$
20.10.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej	$3,2 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^1$
Po dodaniu bakterii wskaźnikowych				
20.10.2014	Zbiornik wody surowej	$9,4 \cdot 10^3$	$8,7 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^2$
20.10.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej	$6,8 \cdot 10^3$	$6,4 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^1$

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016]

Analogiczny eksperyment przeprowadzono 10.11.2014 r. W tabeli 9.23 przedstawiono wyniki badania bakteriologicznego wody po przejściu przez pełny cykl uzdatniania wzbogacony filtrem chitozanowym, ale bez stosowania bakterii wskaźnikowych. Bakterie hemolizujące typu beta w tym badaniu stanowiły autochtoniczną mikroflorę wody surowej.

Tabela 9.23

Wyniki analiz mikrobiologicznych wody przed kolumną i po kolumnie z chitozanem

Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta
		jtk/ml		
10.11.2014	Woda surowa	$1,44 \cdot 10^2$	$1,12 \cdot 10^2$	$4,8 \cdot 10^1$
10.11.2014	Zbiornik reakcji	$3,46 \cdot 10^2$	$9,5 \cdot 10^1$	$1,4 \cdot 10^1$
10.11.2014	Filtr piaskowy	$2,55 \cdot 10^2$	$2,9 \cdot 10^2$	$2,55 \cdot 10^2$
10.11.2014	Filtr chitozanowy	$7,9 \cdot 10^1$	$1,6 \cdot 10^1$	7
10.11.2014	Woda popłuczna	$1,45 \cdot 10^4$	$5,16 \cdot 10^4$	$6,2 \cdot 10^2$

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016]

W posiewach próbek wody uzdatnionej na podłoże stałe stwierdzono obecność różnych form morfologicznych bakterii, z których po przesianiu z podłoża TSA na podłoże Columbia wykonano preparaty barwione metodą Grama:

- kolonie żółte, błyszczące, gładkie z hemolizą typu beta – G+ ziarniaki,
- kolonie biało-kremowe, błyszczące, gładkie z hemolizą typu beta – G- formy cylindryczne (pałeczki),
- kolonie czarno zabarwione błyszczące, gładkie bez hemolizy typu beta – G+ ziarniaki
- kolonie pomarańczowe, błyszczące, gładkie bez hemolizy typu beta – G- formy cylindryczne (pałeczki)
- kolonie mlecznobiałe, błyszczące, gładkie z hemolizą typu beta – G- formy cylindryczne (pałeczki).

Na podstawie przedstawionych wyników można przyjąć, że zastosowany do uzdatniania wody biopolimer nie wykazuje właściwości bakteriobójczych. W wodzie przed filtracją i po uzdatnieniu wykryto obecność bakterii na zbliżonym poziomie. Jednocześnie na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że filtr piaskowy może być przyczyną pojawienia się wtórnego skażenia w układzie uzdatniania wody w stacji modelowej.

Tabela 9.24

Wyniki analiz mikrobiologicznych wody przed kolumną i po kolumnie z chitozaniem modyfikowanym miedzią

Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta
		jtk/ml		
14.11.2014	Zbiornik wody surowej	$9,4 \cdot 10^3$	$8,7 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^2$
14.11.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Cu	$6,8 \cdot 10^3$	$6,4 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^2$

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016]

Ze względu na niewystarczający efekt higienizacji wody następny eksperyment przeprowadzono w identycznych warunkach technicznych jak wyżej, ale do wypełnienia kolumny zastosowano chitozan modyfikowany miedzią. Wyniki analiz mikrobiologicznych próbek wody pobranych przed kolumną i po kolumnie chitozanowej przedstawiono w tabeli 9.24. Przeprowadzona próba wykazała, że chitozan zawierający dodatek miedzi, podobnie jak chitozan niemodyfikowany, również nie ma właściwości bakteriobójczych wystarczających do uzyskania wody odpowiednio uzdatnionej.

Ze względu na otrzymane wyniki przeprowadzono doświadczenie mające na celu określenie, czy efekt biobójczy chitozanu z dodatkiem miedzi jest zależny od czasu kontaktu bakterii z wypełnieniem. W badaniu zastosowano zawiesinę bakterii wskaźnikowych w takim stężeniu, aby uzyskać liczebność bakterii w wodzie zaszczepionej ok. 10^3 jtk/ml. W pierwszym etapie badań dokonano oceny czasu niezbędnego do uzyskania jednorodnej zawiesiny bakteryjnej w zbiorniku wody surowej (tabela 9.25).

Tabela 9.25

Wyniki badania efektu mieszania w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny bakteryjnej w zbiorniku wody surowej

Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba mezofilnych bakterii heterotroficznych na podłożu Columbia	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta
		jtk/ml			
Przed zaszczepieniem					
5.11.2014	Zbiornik wody surowej	$3,0 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$
5.11.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej	$3,0 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^1$
Po zaszczepieniu					
5.11.2014	Zbiornik wody surowej	$2,2 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^3$
5.11.2014	Woda po kolumnie chitozanowej, po 15 min	$3,0 \cdot 10^3$	0	$1,0 \cdot 10^3$	0
5.11.2014	Woda po kolumnie chitozanowej, po 30 min	$4,0 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	0
5.11.2014	Woda po kolumnie chitozanowej, po 45 min	$4,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	0
5.11.2014	Woda po kolumnie chitozanowej, po 60 min	$4,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	0

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Przeprowadzone badanie pozwoliło ustalić, że minimalny czas, jaki jest potrzebny do uzyskania jednorodnej zawiesiny bakterii w roboczym dodatkowym zbiorniku wody surowej, wynosi 15 minut. Następnie przeprowadzono próbę z kolumną wypełnioną chitozaniem z dodatkiem miedzi, polegającą na określeniu, czy efekt bakteriobójczy zmodyfikowanego chitozanu jest zależny od czasu kontaktu (natężenia przepływu wody) bakterii z wypełnieniem. Próbkę wody pobrano przed eksperymentem, po zaszczepieniu zawiesiną bakterii i po przejściu przez kolumnę po różnym czasie kontaktu. Regulując natężenie przepływu wody przez kolumnę, uzyskiwano różny czas kontaktu chitozanu z bakteriami w wodzie. W tabeli 9.26 zamieszczono wyniki dotyczące tego eksperymentu.

Tabela 9.26

Wyniki badania zależności efektu biobójczego chitozanu z miedzią od czasu kontaktu (natężenia przepływu wody) bakterii z wypełnieniem

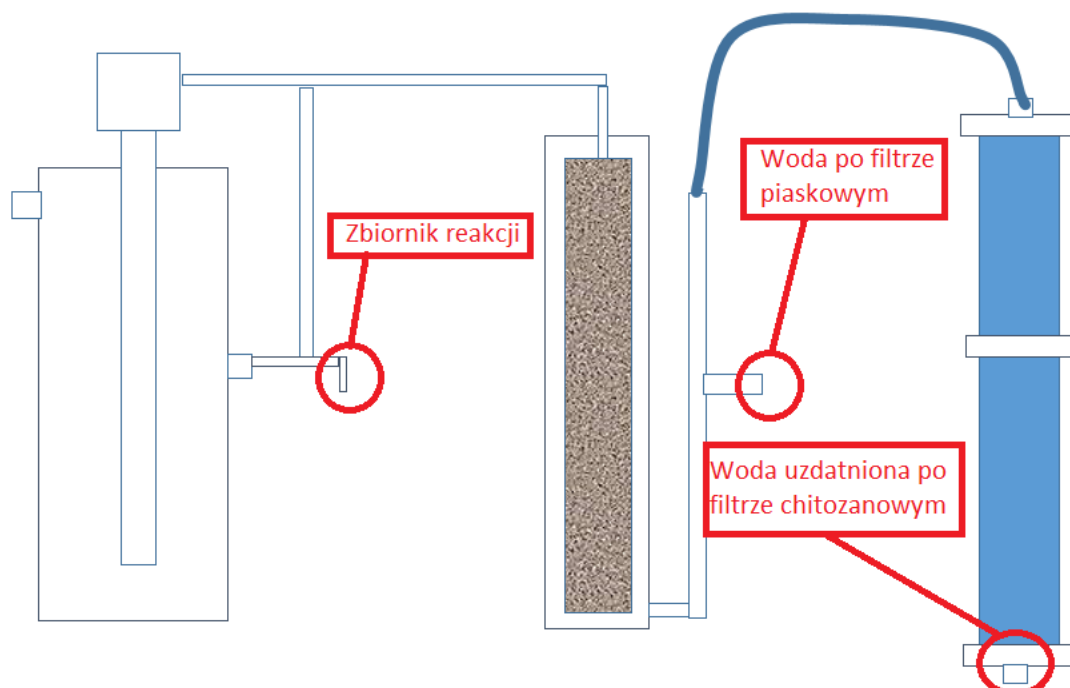
Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta
		jtk/ml		
Przed zaszczepieniem				
14.11.2014	Zbiornik wody surowej	$4,0 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$
14.11.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Cu	$4,0 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^1$
Po zaszczepieniu				
14.11.2014	Zbiornik wody surowej	$2,2 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^1$
14.11.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Cu, przy czasie kontaktu 3,09 minuty	$5,0 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^3$	0
14.11.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Cu, przy czasie kontaktu 5,85 minuty	$2,9 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^3$	0
14.11.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Cu, przy czasie kontaktu 10,05 minut	$2,7 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^3$	0
14.11.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Cu, przy czasie kontaktu 15,75 minut	$5,5 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	0
14.11.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Cu, przy czasie kontaktu 43,61 minut	$1,8 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	0

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016]

Wykazano, że wydłużenie czasu kontaktu bakterii z chitozaniem zmodyfikowanym miedzią nie ma istotnego wpływu na efekt biobójczy w stosunku do bakterii psychrofilnych i mezofilnych. Prawdopodobnie chitozan z dodatkiem miedzi był przyczyną unieszkodliwienia bakterii hemolizujących typu beta.

9.4.4. Ocena działania układu: zbiornik reakcji, filtr piaskowy, kolumna wypełniona chitozanem

Na podstawie wyników uzyskanych we wcześniejszych eksperymentach podjęto decyzję o połączeniu otwartego zbiornika reakcji i filtra piaskowego z kolumną wypełnioną chitozanami. Na rys. 9.7 przedstawiono schematycznie ten układ.



Rys. 9.7. Schemat zintegrowanego systemu uzdatniania wody z zaznaczonymi miejscami poboru próbek do badań

Fig. 9.7. The scheme of integrated water treatment facility with marked the water sampling points for tests

Źródło: Innotech Project Final Report [2016].

W grudniu dwukrotnie wykonano badania bakteriologiczne dostarczonych próbek wody, pobranych podczas eksperymentu uzdatniania wody w kolumnie z chitozanem modyfikowanym srebrem, pracującej za filtrem piaskowym (tabela 9.27 i 9.28).

Tabela 9.27

Wyniki badania skuteczności dezynfekcyjnej kolumny z chitozanem zmodyfikowanym srebrem Chitozan:Ag – badanie I

Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta
		jtk/ml		
8.12.2014	Zbiornik reakcji	$6,5 \cdot 10^4$	$5,2 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$
8.12.2014	Woda po filtrze piaskowym	$9,0 \cdot 10^2$	$6,1 \cdot 10^2$	33
8.12.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Ag	0	0	0

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Tabela 9.28

Wyniki badania skuteczności dezynfekcyjnej kolumny z chitozanem zmodyfikowanym srebrem Chitozan:Ag – badanie II

Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta
		jtk/ml		
29.12.2014	Zbiornik reakcji	$1,2 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	10
29.12.2014	Woda po filtrze piaskowym	$4,5 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^2$
29.12.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Ag	20	2	0

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że w przeprowadzonym doświadczeniu uzyskano pełny efekt dezynfekcji wody. Woda po przejściu przez kolumnę z chitozanem modyfikowanym srebrem nie zawierała bakterii wskaźnikowych, a liczba bakterii psychro- i mezofilnych odpowiadała wymogom jakości wody przeznaczonej do spożycia.

9.4.5. Ocena działania zintegrowanego układu dwóch filtrów z jednoczesnym zaszczepieniem bakteriami i fagami

W kolejnym eksperymencie wykorzystano ponownie zintegrowany układ dwóch filtrów: piaskowego i kolumny wypełnionej chitozanem z dodatkiem srebra, z jednoczesnym zastosowaniem zawiesiny bakterii wskaźnikowych dostarczonych przez WIHE w Puławach (*Escherichia coli* ATCC 11229) oraz zawiesiny swoistych fagów pochodzących z IITD we Wrocławiu (*E. coli* 117/ATCC 11229). Wyniki badań mikrobiologicznych przedstawiono w tabeli 9.29.

Tabela 9.29

Wyniki badania skuteczności uzdatniania wody układu złożonego z dwóch filtrów: piaskowego i kolumny wypełnionej chitozanem zmodyfikowanym srebrem, z jednoczesnym zastosowaniem zawiesiny bakterii wskaźnikowych oraz zawiesiny swoistych fagów

Data poboru	Punkt poboru	Ogólna liczba bakterii psychrofilnych	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba bakterii hemolizujących typu beta
		jtk/ml		
Po dodaniu bakterii i fagów				
12.12.2014	Zbiornik reakcji 24 h	$1,2 \cdot 10^5$	ok. 10^5	0
12.12.2014	Woda po filtrze piaskowym 24 h	ok. 10^7	ok. 10^7	0
12.12.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Ag 24 h	$1,8 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^3$	0
15.12.2014	Zbiornik reakcji 72 h	$1,6 \cdot 10^4$	$5,9 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^3$

15.12.2014	Woda po filtrze piaskowym 72 h	$2,9 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^1$
15.12.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Ag 72 h	20	$1,3 \cdot 10^2$	0
16.12.2014	Zbiornik reakcji 96 h	$7,8 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^2$
16.12.2014	Woda po filtrze piaskowym 96 h	$4,6 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^2$
16.12.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Ag 96 h	14	$6,0 \cdot 10^1$	0
29.12.2014	Zbiornik reakcji 408 h	$1,1 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$	1
29.12.2014	Woda po filtrze piaskowym 408 h	$3,7 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$	1
29.12.2014	Woda uzdatniona po kolumnie chitozanowej + Ag 408 h	21	20	0

Źródło: Raport końcowy projektu Innotech [2016].

Uzyskane wyniki wskazują, że w wodzie uzdatnionej po układzie składającym się z dwóch filtrów: filtra piaskowego oraz kolumny wypełnionej chitozanem modyfikowanym srebrem i z jednoczesnym zastosowaniem fagów wyraźnie obniża się liczebność bakterii psychrofilnych i hemolizujących typu beta. Przy uwzględnieniu ogólnej liczby bakterii psychrofilnych woda uzdatniona spełnia warunek określony w rozporządzeniu ministra zdrowia z 2010 r. Należy jednak zauważyć, że podobną skuteczność uzdatniania osiągnięto z zastosowaniem wyłącznie kolumny chitozanowej modyfikowanej srebrem. Dlatego na podstawie jednego wyniku nie można jednoznacznie stwierdzić, jaka była przyczyna tak znacznego obniżenia liczby bakterii w wodzie uzdatnionej. Wyniki dotyczące zmiany liczby bakterii hemolizujących typu beta sugerują, że w przypadku kontroli skuteczności stosowanych metod lub technologii wystarczy do oceny stosować jedynie badanie skriningowe, polegające na określeniu ogólnej liczby tych bakterii, pod warunkiem że zastosowane bakterie wskaźnikowe będą miały zdolność hemolizowania krwinek baranich.

9.4.6. Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań

Przeprowadzone badania pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Wyniki eksperymentu przeprowadzonego w marcu na SUW w Grodzisku k. Pleszewa, polegającego na zastosowaniu ścieków oczyszczonych z innej oczyszczalni jako środka dezynfekcyjnego, nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie skuteczności tej technologii w procesie uzdatniania wody. W analogicznym eksperymencie przeprowadzonym w SUW w Broniszach uzyskane wyniki nie potwierdzają zdolności dezynfekcyjnych

zastosowanych w badaniu ścieków komunalnych. Powyższe stwierdzenie utwierdza potrzebę prowadzenia dalszych badań wyjaśniających przyczynę powstałej anomalii, tym bardziej że użycie ścieków oczyszczonych do dezynfekcji wody ze skutkiem pozytywnym skłania do wielu refleksji.

2. Modelowy układ stacji uzdatniania wody w Broniszach, składający się ze zbiornika reakcji i filtru piaskowego, obniża stopień zanieczyszczenia bakteriologicznego, lecz nie zapewnia wody nadającej się do celów konsumpcyjnych.
3. Na podstawie wyników uzyskanych w eksperymencie z zastosowaniem bakterii *Aeromonas* sp. oraz swoistego dla nich faga *Aeromonas* sp. 106/21 przeprowadzonym na stacji modelowej w Broniszach nie można jednoznacznie stwierdzić wystąpienia efektu bakteriobójczego na skutek działania faga.
4. W eksperymencie z zastosowaniem *Escherichia coli* ATCC 11229 oraz swoistego dla niej faga *E. coli*/117/ATCC 11229 w wodzie uzdatnionej po przejściu przez kolumnę wypełnioną chitozaniem modyfikowanym srebrem stwierdzono nieznaczną liczbę, dopuszczalną w świetle przepisów, bakterii wskaźnikowych.
5. Na podstawie wyników badania skuteczności dezynfekcyjnej chitozanu oraz chitozanu modyfikowanego miedzią należy przypuszczać, że obie formy biopolimeru nie wykazują dostatecznie dużych właściwości bakteriobójczych.
6. Zastosowanie chitozanu modyfikowanego srebrem jako dodatkowego w systemie stopnia uzdatniania wody pozwoliło uzyskać bardzo dobry wynik w procesie uzdatniania wody. Obniżenie liczby bakterii jest wystarczające do spełnienia normy dla wody przeznaczonej do spożycia.

9.5. Badania toksyczności zmodyfikowanych biopolimerów chitozanu

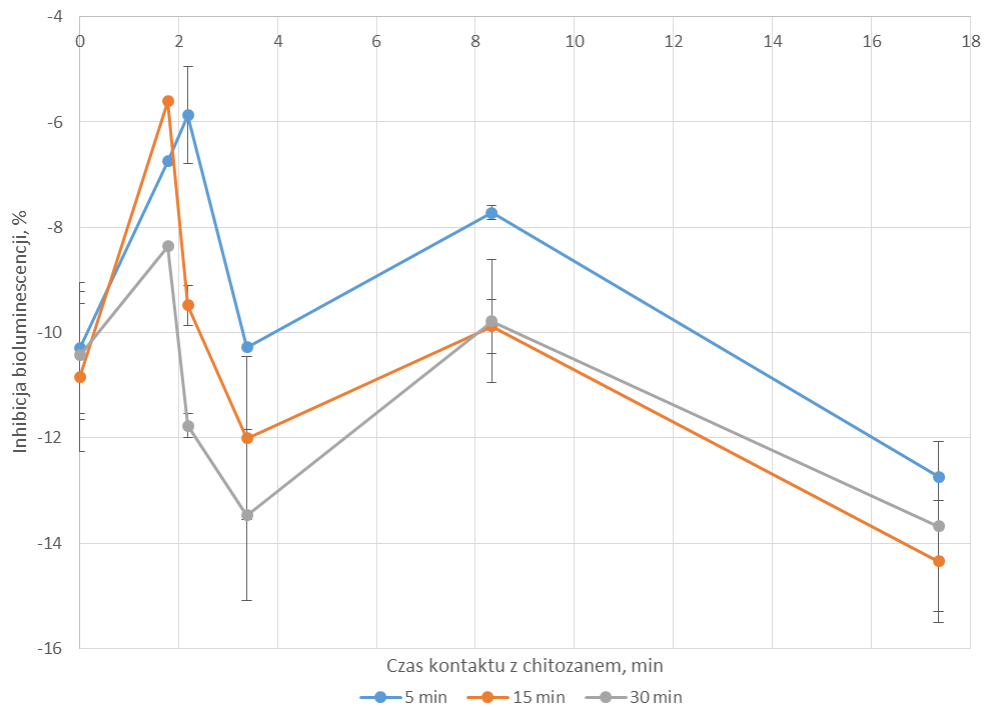
W eksperymentach opisanych w rozdziale 9.4 użyto matrycy biopolimerowej z chitozanu (CAS: 9012-76-4) firmy Heppe Medical Chitosan GmbH (Halle an der Saale, Niemcy) o średniej masie cząsteczkowej. Użyty materiał charakteryzował się 85-procentowym stopniem deacetylacji. Przeprowadzono również eksperymenty z modyfikacjami tej matrycy z zastosowaniem jonów Ag oraz Cu. Modyfikacji dokonano oryginalną metodą opracowaną przez zespół prowadzący badania z matrycami z chitozanu. Modyfikowane jonami srebra i miedzi matryce biopolimerowe z chitozanu mogą wykazywać toksyczność. Dlatego wykonano badania toksyczności wody po procesie uzdatniania w stacji modelowej testem Microtox (procedura 81,9% Screening Test) z zastosowaniem bakterii *Vibrio fischeri* (Szczep: NRRL B-11177, Lot: 14A4003). Bakterie inkubowano przez 5, 15 i 30 minut w próbkach wody

przedprzejściem (czas 0) i po przejściu przez kolumnę filtracyjną wypełnioną modyfikowanymi chitozanami. Próbą kontrolną obrazującą naturalnie zachodzące zmiany bioluminescencji bakterii, w stosunku do której odnoszono pomiar bioluminescencji dla próbek wody uzdatnionej, był 2-procentowy roztwór NaCl.

Chitozan zastosowany w badaniach wypełnienia kolumny filtracyjnej w dwóch modyfikacjach (srebrem i miedzią) ze względu na różne właściwości hydrauliczne w zróżnicowanym stopniu pozwolił na regulację czasu zatrzymania wody w filtrze. Dla kolumny wypełnionej chitozanem w modyfikacji srebrem maksymalny do uzyskania czas zatrzymania niepowodujący przerw w ciągłości przepływu wynosił ok. 17 minut. W przypadku kolumny wypełnionej chitozanem w modyfikacji miedzią był on krótszy i wynosił nieco ponad 12 minut.

Bioluminescencja bakterii w próbkach po przejściu przez kolumnę wypełnioną chitozanem modyfikowanym srebrem utrzymywała się na stałym poziomie. W porównaniu z próbą kontrolną (wodny roztwór NaCl) inhibicja efektu świecenia zarówno w wodzie przed kolumną chitozanową (czas 0), jak i po przejściu przez kolumnę wahała się w granicach od -5,6% do -14,3%, niezależnie od czasu zatrzymania wody w kolumnie. Wydłużenie czasu kontaktu bakterii z badanymi próbkami nie wpływało znacząco na zmianę poziomu bioluminescencji (rys. 9.8).

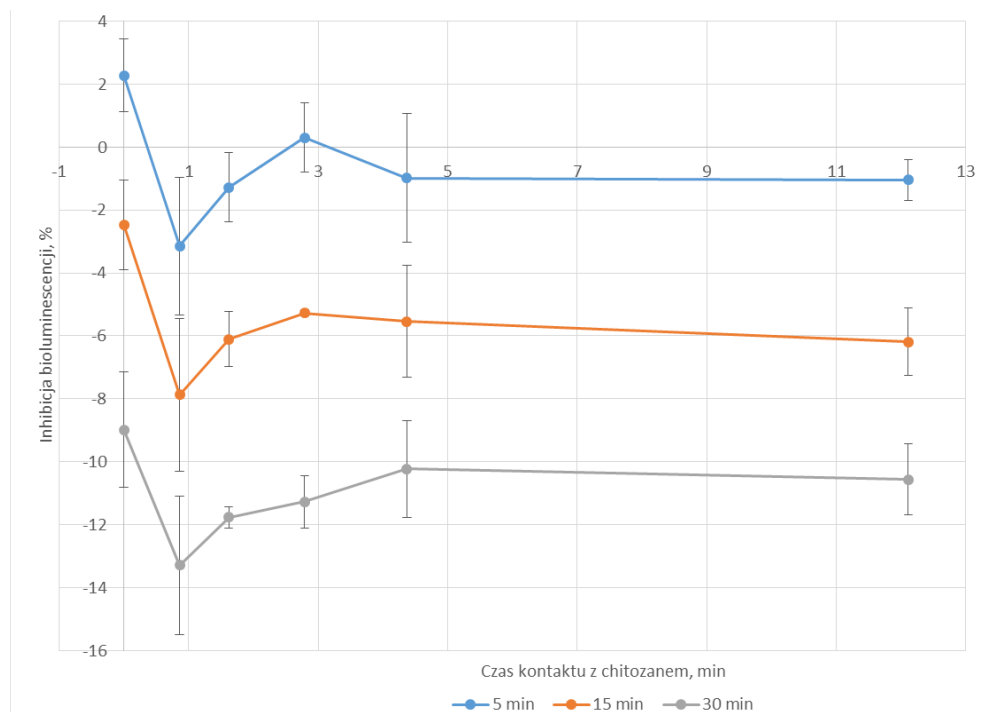
Czas zatrzymania wody w kolumnie chitozanowej wypełnionej biopolimerem modyfikowanym miedzią również nie wpływał na zmianę inhibicji bioluminescencji bakterii. Zaobserwowano jednak zależność pomiędzy czasem inkubacji bioindykatorów a ich aktywnością metaboliczną. Wydłużenie czasu kontaktu bakterii z próbką z 5 do 30 minut powodowało wzrost intensywności świecenia bakterii o ok. 10%. Efekt ten był obserwowany zarówno w próbach wody uzdatnionej jedynie metodami fizycznymi (aeracja, filtracja przez złożę piaskowe) – zerowy czas kontaktu z chitozanem, jak i w próbach po przejściu przez kolumnę filtracyjną. Może to świadczyć o obecności w wodzie surowej substancji odżywczych stymulujących metabolizm bakterii (rys. 9.9).



Rys. 9.8. Zmiany bioluminescencji *Vibrio fischeri* w próbkach po filtrze chitozanowym modyfikowanym srebrem. Na wykresie zaznaczono 95-procentowe przedziały ufności dla pomiaru bioluminescencji

Fig. 9.8. Changes in the bioluminescence of *Vibrio fischeri* in samples taken after filter with silver modified chitosan. Confidence intervals: 95%

Źródło: Innotech Project Final Report [2016].



Rys. 9.9. Zmiany bioluminescencji *Vibrio fischeri* w próbkach po filtrze chitozanowym modyfikowanym miedzią. Na wykresie zaznaczono 95-procentowe przedziały ufności dla pomiaru bioluminescencji

Fig. 9.9. Changes in the bioluminescence of *Vibrio fischeri* in samples taken after the filter with copper modified chitosan. Confidence intervals: 95%

Źródło: Innotech Project Final Report [2016].

Bakterie *Vibrio fischeri* wykazują wrażliwość na działanie metali przy ekspozycji zarówno krótkotrwałej (ostrej), jak i długotrwałej (chronicznej). Petela wskazuje na zróżnicowaną odpowiedź tych bakterii na kontakt z metalami ciężkimi w badaniach przeprowadzonych testem Microtox. Wartości EC50-15 min oszacowano na zbliżonym poziomie dla kadmu, niklu i chromu (odpowiednio 14,5 mg/l 17,8 mg/l i 38,2 mg/l). W przypadku miedzi i rtęci wartości te były o 2 i 3 rzędy wielkości niższe (0,30 mg/l dla miedzi i 0,08 mg/l dla rtęci). EC50 dla niklu w stosunku do bioluminescencji bakterii określone przez **Lankinen i in. [2011]** było kilkukrotnie wyższe niż w badaniach **Petala i in. [2005]** i wynosiło 85 mg/l. W chronicznej wersji testu Microtox (inkubacja 18 godz.) **Hsieh i in. [2004]** przebadali 13 priorytetowych metali – antymon, arsen, beryl, kadm, chrom (III i VI), miedź, ołów, rtęć, nikiel, selen, srebro, tal i cynk. Autorzy oszacowali stężenia powodujące 50-procentową inhibicję na poziomie od 1,36 µg/l dla berylu do 6250 µg/l dla talu. Dodatkowo autorzy podkreślają znacznie wyższą wrażliwość bakterii *Vibrio fischeri* w porównaniu z innymi konwencjonalnymi biotestami. Stężenia efektywne uzyskiwane w teście Microtox były przykładowo dla srebra ok. 150 razy niższe niż stężenia letalne w teście z rybami. Podobnie w przypadku miedzi toksyczność w stosunku do ryb była ponad 1500 razy niższa, w stosunku do skorupiaków – 25 razy niższa, a bakterii *Pseudomonas fluorescens* przeszło 7000 razy niższa niż dla *Vibrio fischeri*.

W badaniach nad wpływem różnych form srebra (nano – wytworzonego na drodze biologicznej i redukcji chemicznej oraz formy jonowej Ag⁺) **Binaeian i in. [2012]** wykazali 50-procentowe ograniczenie bioluminescencji bakterii *Vibrio fischeri*, po 5-minutowym czasie kontaktu przy stężeniach odpowiednio 47,2 mg/l, 45,1 mg/l oraz 15,9 mg/l. Stężenia ok. 3 razy niższe wywoływały 20-procentowy spadek bioluminescencji tych bakterii. Jonowa forma srebra (w postaci AgNO₃) przy 8-godzinnym czasie kontaktu w 50% ograniczała wzrost bakterii *Vibrio fischeri* już przy stężeniu 0,29 µg/l.

Obecność w wodach substancji o charakterze humusowym wpływa na efekty toksyczne wywoływane przez metale u bakterii *Vibrio fischeri*. Wartości EC50 po 15 min kontakcie z solami miedzi i cynku były 5-25% wyższe w obecności 10 mg/l kwasów humusowych niż w próbach niezawierających tych naturalnych składników próchnicy. W przypadku ołowiu zaobserwowano efekt odwrotny – toksyczność tego metalu wzrosła o ok. 40% w porównaniu z próbami bez dodatku humusu.

Wykonane badania nad wpływem modyfikowanych chitozanów na toksyczność wody przeznaczonej do spożycia pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Nie stwierdzono uwalniania metali z kolumny chitozanowej w ilościach wpływających na toksyczność wody w stosunku do bioindykatorów.
2. Obserwowane efekty toksyczne wywoływane przez wodę po przejściu przez kolumnę chitozanową były w przypadku chitozanu modyfikowanego zarówno miedzią, jak i srebrem na zbliżonym poziomie jak w próbce kontrolnej, uzdatnionej jedynie metodami fizycznymi (aeracja, filtracja przez złożę piaskowe).

3. Czas kontaktu wody w procesie uzdatniania z biopolimerem nie powodował istotnych zmian w toksyczności próbek.
4. Zaobserwowano przyrost intensywności świecenia bakterii wraz z wydłużeniem czasu inkubacji organizmów bakterii z próbkami po przejściu przez filtr zawierający chitozan modyfikowany miedzią, jednakże efekt ten wynika prawdopodobnie z obecności w wodzie surowej substancji odżywczych stymulujących metabolizm bakterii, a nie z oddziaływania zmodyfikowanego biopolimeru.

Spis literatury do rozdziału 9

1. Behrouzfar, 2014. *Effect of individual toxicants and their mixtures to the marine bacterium Vibrio fisheri*, praca magisterska, University of Gothenburg.
2. Hsieh C.Y., Tsai M.-H., Ryan D.K., Pancorbo O.C., Sci. Total Environ. 2004, 320, 37-50.
3. Binaeian E., Rashidi A.M., Attar H., World Academy of Science, Engineering and Technology 2012, 6, 1010-1016.
4. Kalinowski R., Kaźmierczuk M., Paczkowski Sz., Trzcińska M., Tomczyk B., Tórz A., Eymontt A., Wierzbicki K., 2016. Ocena uwalniania toksycznych metali w procesie uzdatniania wody przy zastosowaniu modyfikowanych chemicznie chitozanów. Przemysł Chemiczny, 95/3: 420-424.
5. Kaźmierczuk M., Kalisz L., 2008. A Proposal for Extending Biological Criteria Applied In Sanitary Control of Sewage Sludge Intended for Agricultural Use. Polish J. of Environmental Studies, 17 (5), 721-726.
6. Kungolos A., Samaras P., Tsiridis V., Petala M., Sakellaropoulos G., 2007. Toxicity and Bioavailability of Heavy Metals (In Single and Combined Metal Solutions) in the Presence of Humic Acids., [in:] Proceedings of 10th International Conference on Environmental Science and Technology (CEST2007). Kos Island, Greece, 5-7 September 2007, vol. 1/3, 1427-1435, [dostępne: <http://toc.proceedings.com/18230webtoc.pdf>; data dostępu: 11.02.2021].
7. Leszczyńska M., Sozański M.M. 2009. Szkodliwość i toksyczność osadów i popłuczyn z procesu uzdatniania wody. Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych, nr 40/2009, 575-585.
8. Petala M., Tsiridis V., Kyriazis S., Samaras P., Kungolos A., Sakellaropoulos G.P., 2005. Evaluation of Toxic Response of Heavy Metals and Organic Pollutants Using the Microtox Acute Toxicity Test, [in:] Proceedings of 9th International Conference on Environmental Science and Technology. Rhodes, Greece, 1-3 September 2005, vol. 1/3; 224-229 [dostępne: <http://toc.proceedings.com/18231webtoc.pdf>; data dostępu: 11.02.2021].
9. Rinaudo M., 2006. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. Progress in Polymer Science, 31, 603-632.

10. Struszczyk M.H., 2002. Chitin and Chitosan. Part I. Properties and production. *Polimery*, 47, 316-325.
11. Majeti N.V., Kumar R., 2000. A Review of Chitin and Chitosan Applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
12. Lankinen P., Kahkonen M.A., Rajasarkka J., Virta M., Hatakka A. 2011. The effect of nickel contamination on the growth of litter-decomposing fungi, extracellular enzyme activities and toxicity in soil. *Boreal Environment Research*, 16(3): 229-239.
13. Burczyk B., 2005. Zielona chemia – zrównoważona chemia: perspektywy rozwoju. *Przem. Chem.*, 84/3, 162-166.
14. Rak J., Pietrucha K., 2008. Ryzyko w kontroli jakości wody do spożycia. *Przem. Chem.*, nr 87/5, 554-556.
15. Carrington E.G., 2001. Evaluation of Sludge Treatments for Pathogen Reduction – Final Report, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

10. PODSUMOWANIE

Monografia przedstawia wyniki oryginalnych badań nad innowacyjnymi technologiami dezynfekcji wody, które potencjalnie mogą być wdrożone w układach uzdatniania wód podziemnych przeznaczonych na cele wodociągowe.

Poszukiwanie nowych technologii uzdatniania wód jest uzasadnione faktem zwiększającego się ich zanieczyszczenia pod względem parametrów fizyczno-chemicznych spowodowanego bezpośrednio lub pośrednio działalnością człowieka. Pogorszenie jakości wód czyni te wody znacznie mniej przydatnymi dla jednego lub wszystkich celów, którym by mogły służyć w stanie naturalnym. Innowacyjność badanej technologii manifestuje się możliwością uzyskania wody o właściwościach zbliżonych do naturalnych. Ponadto jest ona alternatywą do stosowanych obecnie metod uzdatniania. Dotychczasowe metody nie zawsze są obojętne dla zdrowia człowieka, zwierząt hodowlanych, a także przydatności dla przemysłu rolno-spożywczego, choćby ze względu na stosowanie silnych utleniaczy w celu dezynfekcji wody

Jedną z przyczyn niezdatności wody do celów spożywczych jest powstawanie w instalacji wodociągowej biofilmu, jako następstwa zachodzących procesów biochemicznych i przemian fizycznych. Biofilm umożliwia gromadzenie się m.in. chorobotwórczych bakterii a ich skuteczna eliminacja wymaga użycia środków chemicznych lub zmian w natężeniu przepływu wody. Na te niedogodności w uzdatnianiu wody zwrócono uwagę w przeglądzie literatury. Aby pogłębić rozeznanie obecności chorobotwórczych bakterii w wodzie i ich wpływu na proces oczyszczania ścieków, postawiono hipotezę, że na skład mikrobiologiczny wody mogą mieć wpływ bakteriofagi. W celu potwierdzenia tej tezy przeprowadzono badania wody z 14 ujęć głębinowych, 2 ujęć wód powierzchniowych (bezpośrednio z Wisły oraz ze stacji uzdatniania „Gruba Kaśka”) a także z rzek Kaczawy oraz Łachy (Wińsko).

W badaniach tych udokumentowano zróżnicowane właściwości biologiczne bakteriofagów i ich różną wrażliwość na czynniki środowiskowe. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że obecność bakteriofagów wykazano zarówno w badanych próbkach ścieków surowych i oczyszczonych w jak i, próbkach wody wodociągowej. Proces oczyszczania ścieków nie eliminuje więc obecności bakteriofagów w odpływie z oczyszczalni, co może wpływać na dalszą ich aktywność bakteriobójczą w środowisku wód powierzchniowych. Również proces uzdatniania wody w badanej technologii nie wpływał na eliminację bakteriofagów, ani też nie oddziaływał ujemnie na przydatność wody do celów spożywczych. W kilku przypadkach

stwierdzono zawartość bakteriofagów w ujęciach głębinowych i wykazano wyeliminowanie szkodliwych bakterii na odpływie wody w badanych stacjach.

Powyższe przesłanki pozwoliły sformułować założenia do kontynuacji badań w kierunku opracowania nowych technologii wykorzystujących naturalne procesy do poprawy stabilności składu mikrobiologicznego wód wodociągowych. W celu potwierdzenia tych odkryć wystąpiono o finansowanie projektu badawczego pt. „Badania stabilizacji wody przeznaczonej do spożycia” i uzyskano je (projekt NCBiR K2/IN2/7/18/844/NCBiR/13).

W projekcie założono wykonanie badań sprawdzających efekty eliminacji mikroorganizmów chorobotwórczych z zastosowaniem bakteriofagów oraz modyfikowanych biopolimerów chitozanowych w warunkach laboratoryjnych i w skali póltechnicznej. Celem właściwej realizacji projektu przeprowadzono szeroką analizę wyselekcjonowanego tematycznie piśmiennictwa. W wyniku tej analizy utworzono pięć zespołów badawczych, które opracowały metodyki badań stosownie do ustalonych zakresów zapewniających właściwą ciągłość tematyki.

Aby umożliwić przeprowadzenie badań w przyjętym zakresie, wykorzystano doświadczenia uczestniczących w projekcie firm: „Energoopt” Józef Wowk i Firma GUTKOWSKI Jan Gutkowski, pozyskane w wyniku kilkunastoletniej eksploatacji instalacji o innowacyjnych rozwiązaniach technologicznych zbudowanych i użytkowanych w stacjach uzdatniania wody (SUW). Posiadany know-how umożliwił zaprojektowanie i zbudowanie modelu stacji doświadczalnej o wydajności 5 m³/h, którą zlokalizowano w nieczynnej stacji zasilanej w wodę ze studni głębinowej (SUW Bronisze). Drugą stację doświadczalną zlokalizowano w nieczynnej typowej SUW, o pierwotnej wydajności 50 m³/h, ze studnią głębinową o głębokości 60 m w Grodzisku koło Pleszewa.

W obu stacjach zapewniono możliwość poboru próbek wody z każdego węzła. Istotnym etapem badawczym w stacjach był wybór i izolowanie 185 bakteriofagów doświadczalnych z posiadanych kolekcji, a następnie badanie ich właściwości biologicznych oraz skuteczności bakteriobójczej na różnych elementach modelu stacji w Broniszach. Oceniono tu skuteczność bakteriobójczą w zespole filtru bez bakteriofagów oraz z zastosowanym modyfikowanym chitozaniem i bakteriofagami. Uzyskane pozytywne rezultaty wskazują na możliwość zastosowania ww. technologii jako skutecznej metody dezynfekcji wody przeznaczonej do spożycia.

W wyniku badań opracowano skład preparatu bakteriofagowego ukierowanego przeciwko szczepom bakteryjnym, będących przyczyną skażenia wody pitnej, oraz utworzono kolekcje patogennych szczepów bakteryjnych izolowanych ze zgromadzonych próbek wody surowej pochodzących z wybranych stacji uzdatniania wody.

Ze względu na mnogość izolowanych gatunków bakterii z badanych próbek wody surowej oraz ich sezonową zmienność, uzyskane wyniki nie pozwalają na opracowanie uniwersalnego preparatu fagowego przeznaczonego do eliminacji całej flory bakteryjnej. W związku

z powyższym skoncentrowano się na opracowaniu preparatu fagowego przeciwko bakteriom zaliczanym do grupy bakterii wskaźnikowych.

Analizując i oceniając inne metody dezynfekcji wody wodociągowej w projekcie wykonano badania nad możliwością zastosowania biopolimerów uzyskiwanych na bazie chitozanu. Chitozan jest biokompatybilnym oraz nietoksycznym polimerem cechującym się aktywnością biologiczną, do której można zaliczyć działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz przeciwgrzybiczne wobec szerokiego spektrum mikroorganizmów. Jego aktywność przypisuje się obecności w łańcuchu polimerowym protonowych grup aminowych obdarzonych ładunkiem elektrostatycznym, wywołujących zmiany w strukturze i przepuszczalności ściany komórkowej, co zaburza równowagę osmotyczną komórki i tym samym hamuje jej rozwój. W literaturze opisano także mechanizm hydrolizy peptydoglikanów obecnych w ścianach komórkowych mikroorganizmów, prowadzący do utraty przez komórkę elektrolitów i jej eliminację. Te zalety chitozanu jako środka bakteriobójczego potwierdzono w licznych wykonanych badaniach. Przeprowadzono również eksperymenty z zastosowaniem zmodyfikowanych biopolimerów chitozanu, m.in. z jonami srebra i miedzi. Mając na względzie możliwość wykorzystania zarówno bakteriofagów, jak i zmodyfikowanych biopolimerów chitozanu, udokumentowano brak toksyczności chitozanu i jego bardzo dużą skuteczność do dezynfekcji wody wodociągowej skażonej wskaźnikowymi bakteriami.

W celu pogłębienia wiedzy o chorobotwórczych bakteriach pojawiających się w wodzie wodociągowej opracowano kompendium wiedzy umożliwiające opracowanie metody oceny przy wykorzystaniu obecności bakterii hemolizujących w pobranych próbkach. Opracowana nowatorska metoda pozwala na szybką ocenę obecności w wodzie wodociągowej bakterii hemolizujących.

BADANIA NAD INNOWACYJNYMI TECHNOLOGIAMI POPRAWY SKŁADU MIKROBIOLOGICZNEGO WODY UZDATNIANEJ NA CELE WODOCIĄGOWE

Streszczenie

Monografia zawiera oryginalne wyniki badań nad możliwością zastosowania bakteriofagów wraz ze zmodyfikowanymi sorbentami chitozanowymi do zmniejszenia liczebności szkodliwych/chorobotwórczych/zjadliwych bakterii w wodzie przeznaczonej do spożycia poniżej wartości wymaganych dla wód wodociągowych określonych w obowiązujących przepisach. W rezultacie badań opracowano skuteczny skład preparatu bakteriofagowego ukierowanego na niszczenie szczepów bakteryjnych bakterii wskaźnikowych wykorzystywanych w ocenie składu mikrobiologicznego wód wodociągowych. Drugim również skutecznym preparatem okazały się zmodyfikowane biopolimery chitozanu, szczególnie zawierające jony srebra.

Wdrożenie rezultatów przedstawionych badań do praktyki inżynierskiej wymaga dalszych prac, obejmujących m.in. sposoby aplikacji opracowanego układu oraz analizę ekonomiczną, natomiast do wdrożenia zaproponowano opracowaną przez nadzór sanitarny procedurę kontroli jakości wód, opartą na ustalaniu obecności bakterii hemolizujących w badanych wodach.

W pracy przedstawiono unikalne wyniki przeprowadzonych badań terenowych, które istotnie poszerzają stan wiedzy w zakresie dezynfekcji wód wodociągowych z wykorzystaniem bakteriofagów oraz biopolimerów chitozanu.

INVESTIGATIONS OF INNOVATIVE TECHNOLOGIES IMPROVING MICROBIOLOGICAL COMPOSITION OF WATER TREATED FOR PUBLIC WATER SUPPLY SYSTEMS

Abstract

The monograph presents original results of research on the possibility of applying bacteriophages together with modified chitosan sorbents to reduce the number of harmful, pathogenic and virulent bacteria in drinking water below the values specified in appropriate regulations. As a result of undertaken investigations, the effective composition of a bacteriophage specimen was developed, that focused directly on destroying the specific bacterial strains usually used as the indicative pathogens in the assessment of the microbiological composition of a tap water. Another effective specimen developed against harmful bacteria were modified chitosan biopolymers, especially those containing silver cations and/or reduced silver.

However, the implementation of the results of the presented research into the practice still requires further efforts, including e.g. practical methods of application of the developed specimens as well as the economic assessment. The described water quality control procedure based on the determination of the presence of haemolytic bacteria in the samples of examined water was proposed by the authors for the implementation in the sanitary supervision authority practice.

The book also presents unique results of field investigations, which significantly extend the knowledge regarding the issues of tap water disinfection with the use of bacteriophages and chitosan biopolymers.

WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ
ul. Akademicka 5, 44-100 Gliwice
tel. (32) 237-13-81
wydawnictwo@polsl.pl
www.wydawnictwopolitechniki.pl

UIW 48600

Sprzedaż i Marketing
tel. (32) 237-18-48
wydawnictwo_mark@polsl.pl

Ark. wyd. 21

e-wydanie
Monografia 991

MONOGRAFIA 991

ISBN 978-83-7880-912-8

Wydawnictwo Politechniki Śląskiej

44-100 Gliwice, ul. Akademicka 5

tel. (32) 237-13-81, faks (32) 237-15-02

www.wydawnictwopolitechniki.pl

Dział Sprzedaży i Reklamy

tel. (32) 237-18-48

e-mail: wydawnictwo_mark@polsl.pl

<http://www.polsl.pl/Jednostki/RJO2-WPS>

