**Identyfikacja zagrożeń dla bezpieczeństwa zdrowotnego wody podczas zdarzeń wyjątkowych**

**F. Pistelok, B. Wiera, T. Stuczyński**

Streszczenie

Zagadnienia poruszone w artykule koncentrują się na omówieniu dostępnych szybkich testów ATP umożliwiających identyfikację w czasie rzeczywistym zagrożeń zdrowotnych związanych z zanieczyszczeniem mikrobiologicznym wody do picia oraz ciepłej wody użytkowej. W ostatnich latach obserwowany jest dynamiczny rozwój metod przeglądowych, takich jak na przykład pomiar stężenia ATP w wodach (adenozynotrójfosforan), wykorzystywanych do opracowania map obrazujących przestrzenne zróżnicowanie biomasy drobnoustrojów w wodzie wodociągowej. Przedstawienie przestrzenne wartości ATP stanowi dobrą podstawę do wskazania punktów ryzyka, jak również umożliwia podejmowanie szybkich działań naprawczych w czasie rzeczywistym.  Przeprowadzone badania pilotażowe wskazują na przydatność metody ATP w szybkiej diagnostyce wody wodociągowej oraz ciepłej wody użytkowej, a także wody  gromadzonej w cysternach i zbiornikach retencyjnych, co ma szczególne znaczenie w sytuacji katastrof żywiołowych (powodzie), ataków terrorystycznych oraz w czasie dużych zgromadzeń sportowych czy artystycznych. Szersze wdrożenie szybkich metod diagnostycznych ma duże znaczenie praktyczne dla prawidłowego zarządzania obiektami użyteczności publicznej, takich jak szpitale, hotele, obiekty sportowe, itp.

Wstęp

W ostatniej dekadzie ma miejsce intensywny rozwój metod umożliwiających szybką identyfikację zagrożeń mikrobiologicznych zanieczyszczenia środowisku [12]. Mankamentem klasycznych metod badań mikrobiologicznych opartych na posiewach jest ich czasochłonność i brak możliwości uzyskania wyniku w czasie rzeczywistym jako podstawy do podejmowania decyzji i zarządzania ryzykiem. W latach dziewięćdziesiątych XX wieku zaczęto do tego celu wykorzystywać oznaczenie adenozynotrójfosforanu (ATP), substancji stanowiącej składnik każdej żywej komórki. Oznaczenia ATP są coraz częściej stosowane do oceny zanieczyszczenia bakteryjnego wody do picia wody technologicznej, żywności, kosmetyków, farb, itp. Mogą one być także przydatne w technologii oczyszczania ścieków - do określenia kondycji osadu czynnego oraz toksycznego oddziaływania ścieków przemysłowych na mikroorganizmy biorące udział w procesach oczyszczania [2].

Szczególnego znaczenia nabiera możliwość wykorzystania pomiarów ATP do oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego wody wodociągowej oraz oceny rozwoju biomasy drobnoustrojów w sieciach wodociągowych, sieciach wewnętrznych budynków, studniach i zbiornikach retencyjnych, oraz systemach klimatyzacyjnych. Oznaczanie normowanych w obowiązujących przepisach wskaźników mikrobiologicznych jest czasochłonne - związane jest to jest z koniecznością prowadzenia długotrwałej inkubacji prób na pożywkach w określonej temperaturze. Przykładem są wszystkie oznaczenia mikrobiologiczne stosowane w ocenie jakości wody - ogólna liczba bakterii w temperaturze 22oC, bakterii grupy coli, *Echerichia coli* oraz enterokoków kałowych [9, 10]. Uzyskane w ten sposób wyniki są stosunkowo mało przydatne do prowadzenia bieżących działań operacyjnych i rozwiązywania sytuacji kryzysowych. Przy stosowaniu konwencjonalnych badań mikrobiologicznych wyłączenie ujęcia wody, stacji uzdatniania lub wodociągu z eksploatacji nastąpi dopiero po upływie 3 – 4 dni od momentu wystąpienia zagrożenia, zaś przerwa w dostawie wody, ze względu na konieczność sprawdzenia jakości wody, jest z reguły wielodniowa. Dodatkowo, brak jest jakiejkolwiek możliwości sprawdzenia jakości wody po usunięciu awarii sieci. Zastosowanie w takich przypadkach testu ATP mogłoby znacząco ułatwiać podejmowanie decyzji oraz umożliwiać podjęcie odpowiednich działań profilaktycznych i naprawczych.

Wykonanie analizy ATP daje ponadto możliwość oceny stanu higienicznego sieci wodociągowych zewnętrznych i wewnętrznych. Dotyczy to zwłaszcza możliwości występowania biofilmu na ściankach wewnętrznych przewodów. Znaczący wpływ na to zjawisko wywiera materiał z jakiego wykonane zostały przewody. 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 [2, 4, 8, 11].

Przeprowadzone badania pilotażowe wskazują na przydatność metody ATP do szybkiej oceny wody zimnej i cieplej wody użytkowej   w sieciach zewnętrznych i wewnętrznych, cysternach i zbiornikach, co ma szczególne znaczenie w sytuacjach awaryjnych – uszkodzenia i awarie sieci, powodzie, zgromadzenia ludności, ataki terrorystyczne. Uzyskane doświadczenia wykazały, że wdrożenie tej metody diagnostycznej może być wykorzystane dla prawidłowego zarządzania obiektami użyteczności publicznej, takich jak: szpitale czy hotele, w tym także w kontekście identyfikacji zagrożeń bakteriami z rodzaju *Legionella* [2].

Występujący w wodzie ATP można podzielić na: cATP - adenozynotrójfosforan wewnątrzkomórkowy, oraz dATP – adenozynotrójfosforan rozpuszczony, pochodzący głównie z obumarłych komórek bakteryjnych. Oznaczenie wykonywane jest metodą bioluminescencji. Polega na wykrywaniu fotonów światła wytwarzanych podczas enzymatycznej reakcji przekształcania ATP w AMP (adenozynomonofosforan) w obecności kompleksu lucyferyna-lucyferaza (enzymów wytwarzanych przez świetlika świętojańskiego) [2].

Do zalet wykonania oznaczenia ATP należy zaliczyć łatwość wykonania testu, możliwość uzyskania wyników w ciągu kilku minut od pobrania próbki oraz możliwość przedstawienia stanu zanieczyszczenia wody w układzie przestrzennym w postaci mapy sieci. Pozwala więc na ogólną, sumaryczną ocenę zagrożenia mikrobiologicznego związanego z wodą do picia. Wszystko to sprawia, że oznaczenie to jest coraz częściej stosowane w praktyce, szczególnie w Holandii, Francji, Kanadzie [4, 6, 7]

**Materiały i metody**

**Próbkobranie**

Próbki wody w przeprowadzonych badaniach pilotażowych były pobierane z ujęć wody, stacji uzdatniania oraz sieci wodociągowych zewnętrznych i wewnętrznych na terenie całego kraju. Do tego celu wykorzystywano sterylne pojemniki o pojemności 500 ml zawierające tiosiarczan sodu (w celu neutralizacji zawartego w wodzie chloru). Do osobnych pojemników pobierano wodę do oznaczeń na zawartość bakterii metodami płytkowymi. Badania ATP przeprowadzano w terenie, do 3 godzin od pobrania próbki. Pojemniki do badań laboratoryjnych transportowano do laboratorium, a badania metodami klasycznymi rozpoczynano najpóźniej do 12 godzin od pobrania. Łącznie zbadano 176 próbek wody uzdatnionej oraz 77 próbek wody surowej.

**Pomiar ilości ATP**

Badania wykonywano zgodnie z instrukcją producenta, wykorzystując gotowy zestaw QGA (Quench Gone Aqueous) oraz luminometr firmy Berthold [2]. Próbkę wody o objętości 50 ml filtrowano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,7µm, na którym zatrzymywane były żywe mikroorganizmy. Filtr z zatrzymanymi mikroorganizmami przemywano 1ml roztworu UltraLyse (zawierającym lizynę), w celu uwolnienia zawartości komórek, w tym ATP wewnątrzkomórkowego (cATP). Uzyskaną zawiesinę rozcieńczano dziesięciokrotnie przy użyciu roztworu UltraLute. Tak przygotowana próbka była gotowa do badań.

Pomiar ATP rozpoczynano od wyznaczenia aktywności używanej luminazy (kompleks lucyferyna-lucyferaza); aktywność ta bezpośrednio wpływa na późniejszy odczyt bioluminescencji, a więc na wynik. Pomiar aktywności luminazy polegał na zakropleniu probówki do luminometru dwoma kroplami luminazy oraz dwoma kroplami odczynnika kontrolnego UltraCheck. Zbadana na luminometrze mieszanina powinna dać wynik luminescencji >5000 RLU (Relative Light Unit), świadczący o prawidłowej kondycji luminazy. Znana wartość aktywności luminazy pozwala na przeliczenie wyniku z jednostek RLU na ilość ATP w mililitrze próbki.

Pomiar zawartości cATP w próbce wody przebiegał w analogiczny sposób: probówki do luminometru zakraplano dwoma kroplami luminazy, a następnie dodawano 100µl przefiltrowanej i rozcieńczonej próbki i odczytywano w ciągu kilkunastu sekund.

Odczyty bioluminescencji, uzyskiwane w jednostkach RLU, były ostatecznie przeliczane na zawartość cATP wyrażoną w pikogramach/mililitr za pomocą dostarczonego do zestawu arkusza kalkulacyjnego, proporcjonalnie do aktywności użytej luminazy oraz ilości przefiltrowanej próbki.

**Oznaczanie ogólnej liczby mikroorganizmów**

W próbkach dostarczonych do laboratorium analizowano ogólną liczbę mikroorganizmów rosnących w warunkach tlenowych wg normy PN-EN ISO 6222:2004. Badania rozpoczynano od razu po dostarczeniu próbek. W przypadku spodziewanej znacznej ilości drobnoustrojów, próbki rozcieńczano dziesięcio- i stukrotnie. Po 1ml próbki lub jej rozcieńczenia przenoszono na dwie szalki Petri’ego, zalewano agarem odżywczym z ekstraktem drożdżowym i inkubowano w temperaturze 22±2°C. Wyrosłe kolonie zliczano po upływie 68±4 godzin. Wyniki uzyskane z pary szalek uśredniano.

**Ocena wyników**

W ocenie mikrobiologicznego zanieczyszczenia wody wykorzystywane jest badanie cATP. Dla stosowanych w praktyce testów ATP opracowanych przez LuminUltra Technologies Ltd. (Canada), producent proponuje stosunkowo prostą ocenę wyników dla potrzeb podejmowania decyzji operacyjnych (Tab. 1) [2].

**Tab.1.** Ocena jakości wody wodociągowej w odniesieniu do wewnątrzkomórkowego ATP (cATP) proponowana przez LuminUltra Technologies Ltd. (Canada).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Lp.** | **Wskaźnik** | **Jednostka** | **Wartość** |
| **1** | Woda dobrej jakości | pg/ml | 0,5 |
| **2** | Woda wymagająca działań profilaktycznych | pg/ml | 0,5 do 10,0 |
| **3** | Woda złej jakości | pg/ml | powyżej 10,0 |

Przy założeniu, że 1pg ATP odpowiada 1000 komórek bakteryjnych [2, 11], można na podstawie uzyskanego wyniku oszacować liczbę występujących w badanej próbce drobnoustrojów. Należy wyraźnie zaznaczyć, że szacowana na podstawie ilości ATP liczebność drobnoustrojów jest znacznie większa od oznaczanej w klasycznych testach.

**Wyniki badań**

**Woda ujmowana**

Na ujęciach wody wykonano 77 oznaczeń ATP. Część ujęć była jednak badana wielokrotnie, w części zaś wodę do jednej stacji uzdatniania dostarczano z kilku różnych źródeł. Dla tych przypadków określono wartości średnie. W ten sposób uzyskano dane dla 21 ujęć.

ATP w wodzie surowej wykazywała wyraźne różnice w zależności od jej pochodzenia (Tab.2). Zdecydowanie najwyższe wartości wystąpiły w wodzie pochodzącej z ujęć wód powierzchniowych. Badaniami objęto dwa ujęcia brzegowe zlokalizowane na rzekach. W pobranych próbkach chwilowych wartość cATP wyniosła 66,5 pg cATP/ml i 136,9 pg cATP/ml. Oszacowane na tej podstawie ilości komórek bakteryjnych wyniosły odpowiednio 6,7∙104 komórek/ml i 1,4∙105 komórek/ml.

Zdecydowanie niższe wartości wystąpiły w wodzie pochodzącej z ujęć infiltracyjnych. Spośród trzech badanych ujęć uzyskane wartości wahały się w niewielkich granicach 3,9 – 5,0 pg cATP/ml, co odpowiada ilości 3,9∙103 – 5,0∙103 komórek/ml.

W wodzie podziemnej notowane wartości cATP były bardziej zróżnicowane. Wyniki wahały się w granicach 0,6 – 20,9 pg cATP/ml, przy czym najwyższe wystąpiły w studni ujmującej wodę z utworów czwartorzędowych, która w ostatnim okresie nie była eksploatowana.

Tab.2. Zawartość cATP w próbkach pobranych z ujęć wód zasilających wodociągi komunalne.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | Woda powierzchniowa | Zawartość ATP  pg/ml | Ilość komórek/ml |
| 1 | Ujęcie powierzchniowe | 66,5 | 6,7∙104 |
| 2 | Ujęcie powierzchniowe | 136,9 | 1,4∙105 |
| 3 | Ujęcie infiltracyjne | 3,9 | 3,9∙103 |
| 4 | Ujęcie infiltracyjne | 4,7 | 4,7∙103 |
| 5 | Ujęcie infiltracyjne | 5,0 | 5,0∙103 |
| 6 | Woda ze studni | 0,6 | 6,2∙102 |
| 7 | Woda ze studni | 0,8 | 8,0∙102 |
| 8 | Woda ze studni | 0,8 | 8,3∙102 |
| 9 | Woda ze studni | 1,1 | 1,1∙103 |
| 10 | Woda ze studni | 1,1 | 1,1∙103 |
| 11 | Woda ze studni | 1,3 | 1,3∙103 |
| 12 | Woda ze studni | 1,5 | 1,5∙103 |
| 13 | Woda ze studni | 1,8 | 1,8∙103 |
| 14 | Woda ze studni | 2,6 | 2,6∙103 |
| 15 | Woda ze studni | 4,4 | 4,4∙103 |
| 16 | Woda ze studni | 5,8 | 5,8∙103 |
| 17 | Woda ze studni | 6,4 | 6,4∙103 |
| 18 | Woda ze studni | 6,8 | 6,8∙103 |
| 19 | Woda ze studni | 12,3 | 1,2∙104 |
| 20 | Woda ze studni | 14,5 | 1,5∙104 |
| 21 | Woda ze studni (wyłączona) | 20,9 | 2,1∙104 |

Spośród 77 badanych próbek wody z ujęcia większość (56%) nie zawierała więcej niż 5 pg cATP/ml; jednocześnie 19% prób przekraczało wartość 10 pg cATP/ml (Rys.1.). Wśród wód bardzo zanieczyszczonych dominowały wody z ujęć powierzchniowych.

Rys.1. Częstotliwość występowania prób wody ujmowanej o różnym stężeniu cATP.

**n=77**

pg cATP/ml

**Zmiany zawartości cATP w wodzie podczas procesu uzdatniania wody**

W dwóch przypadkach przeanalizowano zmiany wartości wody w trakcie uzdatniania. W pierwszym przypadku procesowi poddano wodę ujmowaną ze studni, dla stacji o wydajności około 30000 m3/dobę (Tab.3). Ze względu na znaczną zawartość żelaza i manganu, ujmowana woda była poddawana procesom napowietrzania w basenie otwartym, filtracji przez złoże piaskowe oraz dezynfekcji przy użyciu podchlorynu sodowego. Przed wtłoczeniem do sieci, po dozowaniu chloru, woda była przetrzymywana w zbiorniku kontaktowym. Analiza zawartości cATP w wodzie po poszczególnych procesach wykazała, że w wyniku napowietrzania i filtracji spadek ilości biomasy wyniósł około 41,5 %; znaczące ograniczenie jej wartości nastąpiło później, w wyniku dezynfekcji i odpowiedniego przetrzymania wody w zbiorniku kontaktowym. Sumarycznie po całym procesie uzdatniania ilość cATP spadła o 86,2 %.

Tab.3. Usunięcie cATP w trakcie uzdatniania wody podziemnej w wyniku procesu napowietrzania, filtracji i dezynfekcji.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Lp. | Punkt poboru | Wartość cATP  [pg cATP/ml] | Ilość komórek [liczba/ml] | Efektywność procesu  [%] |
| 1 | Woda ujmowana | 6,8 | 6,8∙103 | - |
| 2 | Woda po napowietrzaniu i filtracji | 4,0 | 4,0∙103 | 41,5 |
| 3 | Woda po dezynfekcji | 0,9 | 9,4∙102 | 86,2 |

W przypadku mniejszych ujęć podziemnych woda z reguły poddawana jest jedynie procesom napowietrzania i filtracji pospiesznej. Dezynfekcja wody stosowana jest w tym przypadku stosunkowo rzadko. Analiza uzyskanych wyników wskazuje na występowanie w większości stacji uzdatnia podwyższonych wartości cATP w wodzie po procesie uzdatniania w stosunku do wody surowej (Tab.4).

Tab.4. Zmiany stężenia cATP w wodzie w wyniku uzdatniania wody podziemnej w układach bez dezynfekcji.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Lp. | Punkt poboru | Wartość cATP  pg cATP/ml |
| 1 | Woda surowa | 15,0 |
|  | Woda uzdatniona | 29,4 |
| 2 | Woda surowa | 14,5 |
|  | Woda uzdatniona | 13,5 |
| 3 | Woda surowa | 0,8 |
|  | Woda uzdatniona | 5,0 |
| 4 | Woda surowa | 12,4 |
|  | Woda uzdatniona | 3,3 |
| 5 | Woda surowa | 1,1 |
|  | Woda uzdatniona | 2,8 |

Przeanalizowano również zmiany stężenia cATP podczas uzdatniania wody powierzchniowej. Testowana stacja miała wydajność około 32000 m3/dobę, zaś proces technologiczny obejmował następujące procesy technologiczne: osadzanie, wstępne ozonowanie, koagulację objętościową, filtry żwirowe, ozonowanie pośrednie, filtry węglowe, dezynfekcję wody chlorem gazowym z zapewnieniem odpowiedniego czasu kontaktu. Przy analizie tego systemu próbki zostały pobrane z 5 punktów.

Analiza zawartych w tabeli danych wykazała, że po przeprowadzeniu całego procesu uzdatniania, włącznie z filtracją przez węgiel aktywny zawartość cATP w wodzie wynosiła około 5,6 pg cATP/ml (redukcja około 91,6 %) i dopiero dezynfekcja przy użyciu chloru i zapewnienie odpowiedniego czasu kontaktu pozwoliło na ograniczenie do 0,6 pg cATP/ml, a więc do wartości zbliżonej do akceptowalnej (Tab.5).

Tab.5. Redukcja ilości cATP w trakcie uzdatniania wody powierzchniowej w stacji uzdatniania o pełnym schemacie technologicznym.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Nr  próbki | Punkt poboru | Wartość cATP  [pg cATP/ml] | Ilość komórek  [liczba/ml] | Efektywność procesu w stosunku do wody ujmowanej [%] |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | Woda ujmowana | 66,5 | 6,7∙104 |  |
|  | Osadniki |  | | |
| Wstępne ozonowanie |
| Koagulacja objętościowa |
| 2 | Woda po koagulacji | 31,6 | 3,2∙104 | 52,5 |
|  | Filtracja przez żwir |  | | |
| 3 | Woda po filtracji pospiesznej | 10,7 | 1,1∙104 | 83,9 |
|  | Ozonowanie pośrednie |  | | |
| Filtracja przez złoże węglowe |
| 4 | Woda po filtracji przez węgiel | 5,6 | 5,6∙103 | 91,6 |
|  | Chlorowanie |  | | |
| Zbiorniki kontaktowe |
| 5 | Woda uzdatniona | 0,6 | 6,0∙102 | 99,1 |

**Jakość wody w sieci wodociągowej**

Łącznie w badaniach pilotażowych przeanalizowano 176 próbek wody pobieranej bezpośrednio z sieci wodociągowej. Tylko w dwóch przypadkach zbadana woda spełniała rygorystyczne założenia proponowane przez LuminUltra Technologies Ltd. Zdecydowana większość uzyskanych wartości mieściła się w przedziale od 0,5 do 10 pg cATP/ml (80%), a ponad połowa wyników (53%) była niższa od 4 pg cATP/ml (Rys.2.). Niestety, prawie 20% zbadanych wód dostarczanych do odbiorców wykazała wartość cATP powyżej 10 pg/ml, co teoretycznie oznacza około 1,0∙105 bakterii w mililitrze.

Rys.2. Częstotliwość występowanie różnych stężeń cATP w analizowanych próbkach pochodzących z sieci wodociągowej.

**n=176**

pg cATP/ml

**Porównanie wyników testu ATP z oznaczeniem ogólnej liczby mikroorganizmów metodą płytkową**

Pomimo dość wysokiej ilości biomasy stwierdzanej poprzez oznaczenie cATP, większość zbadanych próbek wody uzdatnionej spełniała kryteria dla wód przeznaczonych do spożycia [9,10]. Poza pojedynczymi próbkami nie stwierdzono obecności bakterii grupy coli, *E. coli* i enterokoków kałowych. Tam, gdzie było to badane, nie stwierdzono także nadmiernej liczby drobnoustrojów rosnących w temperaturze 36°C. Jednak w 30% zbadanych próbek wykryto podwyższoną ilość (>100jtk/ml) bakterii rosnących w temperaturze 22°C (Rys.3.). Można było też zauważyć bardzo dobrą korelację między ilością wykrytego cATP a częstotliwością wystąpienia wysokiej liczby bakterii rosnących w temperaturze 22°C. Poniżej 1 pg cATP/ml w żadnym przypadku nie wykryto podwyższonej liczby drobnoustrojów, a poniżej 4 pg cATP/ml taka sytuacja miała miejsce tylko w 5,7% wód. Wzrostowi stężenia cATP towarzyszyła zwiększona ilość wykrywanych mikroorganizmów. Zwiększało się też prawdopodobieństwo wykrycia >100jtk mikroorganizmów w mililitrze. Przy wartościach powyżej 15 pg cATP/ml we wszystkich badanych próbkach stwierdzono przekroczenia tej wartości.

Rys.3. Ryzyko wystąpienia nadmiernego wzrostu mikroorganizmów wraz ze wzrostem wartości wykrytego cATP.

pg cATP/ml

**n=161**

**Instalacje wewnętrzne**

W ramach badań nad wykorzystaniem testu ATP drugiej generacji przeprowadzono również kontrolę stanu jakości wody zimnej oraz ciepłej wody użytkowej w jednym z budynków użyteczności publicznej (Tab.6). Do poboru wytypowano punkty czerpalne zlokalizowane na poszczególnych piętrach. Z tego samego punktu pobierano próbkę wody zimnej oraz wody ciepłej.

Tab.6. Wartości ATP w wodzie zimnej i ciepłej w budynku użyteczność publicznej.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Nr  próbki | Punkt poboru | Rodzaj wody | Wartość cATP  [pg cATP/ml] | Ilość komórek  [liczba/ml] |
| 1 | Punkt czerpalny na parterze | woda zimna | 0,37 | 3,7∙102 |
| woda ciepła | 2,63 | 2,6∙103 |
| 2 | Punkt czerpalny na pierwszym piętrze | woda zimna | 0,39 | 3,9∙102 |
| woda ciepła | 2,76 | 2,8∙103 |
| 3 | Punkt czerpalny na drugim piętrze I | woda zimna | 0,39 | 3,9∙102 |
| woda ciepła | 2,17 | 2,2∙103 |
| 4 | Punkt czerpalny na drugim piętrze II | woda zimna | 0,37 | 3,7∙102 |
| woda ciepła | 3,28 | 3,3∙103 |

Instalacja wewnętrzna testowanego budynku jest w bardzo dobrym stanie. Woda zimna zawiera śladowe ilości komórkowego ATP. Nawet po cyrkulacji przez całą instalację zmierzone wartości cATP są niższe niż 0,5 pg/ml.

Woda ciepła zawiera większe ilości żywych mikroorganizmów. Jednak różnice w ilości drobnoustrojów na początku obiegu i na końcu nie są duże, co świadczy o dobrym stanie technicznym instalacji.

**Dyskusja**

Producent testu ATP drugiej generacji określił normy na zawartość wewnątrzkomórkowego ATP (cATP) w wodzie wodociągowej. Przyjął, że za dobrą i bezpieczną pod względem mikrobiologicznym uznać należy wodę, w której ilość cATP jest niższa niż 0,5 pg cATP/ml; przy zawartościach 0,5 – 10,0 pg cATP/ml należy podjąć działania profilaktyczne; zaś przekroczenie progu 10 pg/ml należy uznać za wystąpienie stanu alarmowego. Omawiając przedstawione normy producent widzi możliwość stosowania innych wartości progowych [2]. Wydaje się, ze takie działanie jest uzasadnione, szczególnie w odniesieniu do wartości granicznej 0,5 pg cATP/ml. Zgodnie z prezentowanymi wynikami, w wodach, w których wykryto poniżej 1,0 pg cATP/ml, nie stwierdzono przekroczeń pozostałych wskaźników mikrobiologicznych: bakterii grupy coli, *Escherichia coli* i enterokoków; zaś w wodach, w których cATP było niższe od 4,0 pg cATP/ml nadmierną ilość mikroorganizmów wykryto zaledwie w 5,7 % badanych próbek. Wartość cATP dla wód dobrej jakości – wartość tła - należałoby wówczas określić na podstawie szeregu testów i uznać za wartość odniesienia.

Analiza cATP określa całkowitą ilość żywych mikroorganizmów w wodzie i w porównaniu z metodami hodowli na płytkach dawać będzie wartości wyższe [4, 6, 8, 11]. Przyczyny takiego stanu są różne. W przypadku wody podziemnej, nawet uzdatnionej, przy braku dezynfekcji mogą występować bakterie autotroficzne (bakterie nitryfikacyjne, żelaziste, manganowe) [1, 5], które nie będą wykrywane w rutynowych testach związanych z oceną stanu sanitarnego wody (hodowla na agarze z ekstraktem drożdżowym). Z drugiej strony, wiele mikroorganizmów może występować w stanach nie tworzących kolonii (VBNC, viable but noncultureable state) [8, 14], ze względu na stres jakiemu zostały poddane (chlorowanie, temperatura itp.). Obecność w próbce wielu gatunków mikroorganizmów, takich jak bakterie beztlenowe, grzyby, glony, ze względu na warunki inkubacji (zbyt ubogą pożywkę, temperaturę, czas lub obecność tlenu), pomijając przejście ich w stan VBNC, też nigdy nie zostanie ujawniona podczas rutynowej kontroli [4, 11]. Jednocześnie wiele wcześniejszych badań pokazało, że pomimo nie wykrycia mikroorganizmów na agarze odżywczym, żywe komórki występują i można je wykryć poprzez zastosowanie bogatszej pożywki, cytometrii przepływowej lub właśnie ATP [4, 11].

**Zawartość cATP w wodzie wodociągowej**

Zawartość cATP w wodzie wodociągowej u odbiorcy usług uzależniona jest od trzech podstawowych czynników: zawartości cATP w wodzie uzdatnionej zasilającej sieć, stanu sieci wodociągowej oraz od stanu sanitarnego przyłącza.

Analiza wartości cATP występujących w wodzie ujmowanej wykazuje znaczne zróżnicowanie. Zdecydowanie wyższe wartości tego wskaźnika obserwowane są w wodzie pochodzącej ze źródeł powierzchniowych. Ilość komórkowego ATP wód pochodzących bezpośrednio z ujęć brzegowych zlokalizowanych na rzekach mieściła się w granicach 66 – 136 pg/ml. Do ciekawych wniosków prowadzi analiza wartości cATP uzyskanych w trakcie procesu uzdatniania wody powierzchniowej. Po sedymentacji, wstępnym ozonowaniu oraz koagulacji spadek cATP wyniósł około 52%, zaś po filtracji pospiesznej 84%. Dalsze zabiegi - ozonowanie pośrednie oraz filtracja przez złoże z węgla aktywowanego - zmieniła stosunkowo niewiele. Znaczącą poprawę przyniosła dopiero dezynfekcja wody chlorem. Wydaje się, że przy uzdatnianiu wody powierzchniowej, szczególnie dla dużych ujęć wody, dezynfekcja wody jest konieczna dla zapewnienia wody bezpiecznej pod względem mikrobiologicznym [13].

Wyraźne zróżnicowanie cATP wystąpiło także w przypadku ujęć wody podziemnej. W przypadku ujęć wód z utworów trzeciorzędowych wartości te są stosunkowo niskie. Woda ta jest bezpieczna pod względem mikrobiologicznym i może być stosowana do zasilania sieci wodociągowych bez żadnego uzdatniania. Wyższe wartości występują w ujęciach z utworów czwartorzędowych, w których oddziaływanie antropogeniczne jest zdecydowanie silniejsze. Wysoka wartość cATP występująca w wodzie w studniach nieeksploatowanych wskazuje na konieczność przeprowadzenia (przy ich ponownym wykorzystaniu) odpowiednich zabiegów pozwalających na obniżenie zanieczyszczenia wody pod względem mikrobiologicznym polegających na dezynfekcji studni oraz początkowym skierowaniu wody ujmowanej do kanalizacji [1, 5].

Uzyskane wyniki pomiarów ATP wskazują na konieczność przeanalizowania pracy stacji uzdatniania wody podziemnej pod kątem zanieczyszczenia mikrobiologicznego wody wprowadzanej do sieci. W wielu przypadkach wartości komórkowego ATP w wodach uzdatnionych były wyższe niż w wodach ujmowanych, przy utrzymywaniu się innych wskaźników mikrobiologicznych w normie. Zjawisko to wymaga przeprowadzenia analizy działania poszczególnych stacji. Może być ono spowodowane występowaniem w wodzie uzdatnionej mikroflory autotroficznej biorącej udział w usuwaniu azotu amonowego, żelaza i manganu, rozwijającej się na wypełnieniu złoża filtra [5]. Wydaje się, że w niektórych przypadkach można osiągnąć znaczną poprawę jakości wody uzdatnionej poprzez stosowanie odpowiedniej procedury spuszczania pierwszego filtratu do kanalizacji [1, 5].

Przeprowadzone badania wykazały, że w przypadku ujmowania wody surowej o wysokiej wartości komórkowego ATP, niezależnie od tego, czy pochodzi ona z ujęć powierzchniowych, infiltracyjnych czy podziemnych, celowe jest prowadzenie końcowej dezynfekcji związkami chloru, przy zapewnieniu odpowiedniego czasu kontaktu przed wprowadzeniem wód do sieci.

**Transport wody**

Jednym z zagrożeń zdrowotnych związanych z korzystaniem z wody wodociągowej jest wtórne zanieczyszczenie wody mikroorganizmami pochodzącymi z biofilmu rozwijającego się na wewnętrznych ściankach przewodów wodociągowych. Zagrożenie to występuje przede wszystkim przy transporcie wody na znaczne odległości. Możliwość rozwoju biofilmu uzależniona jest od rodzaju materiału, z jakiego wykonane są przewody, okresu eksploatacji wodociągu, a także od własności wody. Prowadzone w tym zakresie badania wykazały, że szczególnie korzystne warunki do rozwoju biofilmu występują w przewodach stalowych i stalowych ocynkowanych. Korzystniejsze pod tym względem są ciągi wykonane z PCV i PEHD [2, 15].

W literaturze występują pozytywne praktyczne przykłady wykorzystania testu ATP do działań ograniczających możliwość negatywnego wpływu biofilmu rozwijającego się w sieci na jakość wody. Testy ATP z powodzeniem stosowano m.in. w Belgii, Francji czy Holandii. Dały one możliwość podjęcia działań profilaktycznych, polegających m.in. na wymianie części wodociągów, stosowaniu miejscowej dezynfekcji itp. [4, 6, 7].Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania testu ATP w warunkach polskich. Jednocześnie, stężenia cATP większości próbek znaczenie przekraczały wartość 0,5 pg cATP/ml. Przyczyną tej sytuacji mogą być wcześniej wymienione błędy popełniane w trakcie uzdatniania wody podziemnej (brak spustu pierwszego filtratu, zbyt krótkie płukanie złoża, zbyt krótki cykl filtracji). Po ich eliminacji należy podjąć decyzję o ewentualnych dalszych działaniach, jakie należy przedsięwziąć w stosunku do poprawy jakości w sieci. Celowe jest także przeanalizowanie konieczności prowadzenia dezynfekcji wody związkami chloru.

Notowane wartości cATP świadczą również o znacznym zanieczyszczeniu mikrobiologicznym na końcówkach sieci wodociągowych. Występujące tu wartości przekraczają uznawane za alarmowe. Dowodzi to namnażania się mikroorganizmów w miarę oddalania się od źródła oraz zmniejszania rozbioru wody.

**Instalacje wewnętrzne**

W wytycznych producenta wskazuje się również na znaczący wpływ na wartość cATP jakości sieci wewnętrznych. W niektórych opracowaniach odróżnia się sieci wodociągowe, dla których przyjmuje się kryteria takie, jak dla wody pitnej (drinking water) od wewnętrznych (sanitary water) [2]. Takie rozróżnienie wydaje się być zasadne.

W polskim prawie uznaje się, że za jakość sieci wewnętrznej odpowiada właściciel nieruchomości. W tej sytuacji celowym wydaje się więc rozróżnienie punktów kontroli zlokalizowanych bezpośrednio na sieci wodociągowej oraz punktów zlokalizowanych w instalacja wewnętrznych budynków, co należałoby uwzględnić na etapie projektowania lub modernizacji sieci wodociągowych.

Zbadana przez nas instalacja w świeżo oddanym do eksploatacji budynku użyteczności spełniała rygorystyczne wymagania, jeśli chodzi o jakość wody zimnej. Nawet po przejściu wody przez cały obieg wewnętrzny nie zauważono zwiększenia się ilości biomasy drobnoustrojów. Dowodzi to prawidłowego zaprojektowania i założenia elementów instalacji i może być argumentem dla inwestora odbierającego budynek od wykonawcy.

Woda ciepła natomiast wykazywała zwiększoną, w porównaniu do zimnej, zawartość drobnoustrojów (2,17 – 3,28 pg cATP/ml). Nie jest to wartość alarmowa, jednak sugerująca rozpoczęcie odpowiednich działań uzdatniających, jak np. chwilowe podniesienie temperatury wody wychodzącej. Zbliżone wartości komórkowego ATP w różnych punktach sieci wody ciepłej (np. na wyjściu i powrocie) wskazują, że mikroorganizmy w niewielkim stopniu namnażają się w samej sieci, a źródłem zanieczyszczenia może być zbiornik wody ciepłej.

Taka analiza pozwala na zweryfikowanie staniu instalacji wewnętrznej; pozwala ocenić jakość jej wykonania w nowym budynku oraz szybko przejść do działań naprawczych. Wysoka ilość wewnątrzkomórkowego ATP w wodzie ciepłej nie świadczy automatycznie o występowaniu w niej bakterii *Legionella*, jednak pozwala, nie czekając na trwające do 12 dni analizy laboratoryjne, podjąć odpowiednie działania i wyeliminować zagrożenie natychmiast.

Analizując dobową zmienność cATP wody pobieranej bezpośrednio z punktu czerpalnego Siebel i in. stwierdzili, ze stosunkowo wysokie wartości występują w godzinach porannych, później wartości te spadają, by wzrosnąć wieczorem [11]. Taki rozkład, korelujący z występującymi w wodzie wartościami ogólnej liczby bakterii wyhodowanych w 22oC świadczy o bezpośrednim wpływie intensywności rozbioru wody w budynku oraz wpływie biofilmu rozwijającego się w sieci wewnętrznej na jakość wody.

Jeszcze wyraźniej zjawisko to można zauważyć w przypadku korzystania z instalacji ciepłej wody użytkowej. W prowadzonych badaniach wartość cATP jest często wielokrotnie wyższa od występujących w wodzie zimnej, ze względu na temperaturę bardziej sprzyjającą namnażaniu się drobnoustrojów [2].

**Celowość wykorzystania szybkich testów w praktyce**

Uzyskane wyniki świadczą o możliwości szerokiego wykorzystania szybkiego testu mikrobiologicznego wody – oznaczenia cATP w praktyce, m.in. w działaniach profilaktycznych przedsiębiorstw wodociągowo–kanalizacyjnych oraz do odpowiedniego utrzymania stanu sanitarnego instalacji wewnętrznych. W pierwszym przypadku ilość możliwych zastosowań jest znaczna - od określenia zasad działania stacji uzdatniania wody, sprawdzania stanu sanitarnego wody po awariach i modernizacjach, możliwości określenia odcinków sieci, na których należy prowadzić działania profilaktyczne (płukanie sieci, kwalifikowanie do wymiany starych odcinków na nowe wykonane z PCV lub PEHD, czy też wyznaczenia odcinków, gdzie celowe jest prowadzenie dezynfekcji wody). Te działania mogą przynieść szybko korzystne rezultaty przy niewielkich kosztach. Wydaje się, że istnieje możliwość wykorzystania testu ATP w przypadku konieczności podjęcia decyzji o włączeniu bądź wyłączeniu ujęcia z użytkowania w przypadku klęsk żywiołowych. Obecnie brak jest takiego narzędzia. Ważne w tym przypadku jest to, że odpowiedź dotyczącą zanieczyszczenia mikrobiologicznego wody otrzymuje się bardzo szybko, a ewentualne błędy mogą być bez zbędnej zwłoki korygowane.

W przypadku instalacji wewnętrznych oznaczenie cATP znajduje coraz szersze zastosowanie, szczególnie w miejscach, gdzie w krótkim czasie znacząco zmienia się liczba mieszkańców – hotele, ośrodki wypoczynkowe. Intensywne badania prowadzone są w tym przypadku w okresie przed sezonem [2]. Coraz częściej badane są również instalacje, w których powinna znajdować się woda dobrej jakości ze względu na zapewnienie odpowiedniego stanu bezpieczeństwa zdrowotnego – szpitale, sanatoria. Uzyskane w trakcie pilotowych badań wyniki potwierdziły przydatność tego testu.

Celowe wydaje się także wykorzystanie testów ATP przy zapewnianiu odpowiedniego bezpieczeństwa osób biorących udział w zgromadzeniach publicznych – tymczasowe łaźnie, toalety publiczne wykorzystywane okresowo itp. We wszystkich tych przypadkach organizatorzy, mogąc skorzystać z szybkiego testu i porównując wyniki z tymi uzyskanymi w sieci zasilającej mają możliwość podjęcia szybkich działań przed imprezą (płukanie instalacji, wykorzystanie urządzeń do miejscowej dezynfekcji itp.).

We wszystkich tych przypadkach zastosowanie testu ATP pozwala na uzyskanie wyników w krótkim czasie, a co za tym idzie służyć one mogą do podjęcia szybkich i racjonalnych decyzji.

Wnioski

1. Przeprowadzone w warunkach polskich badania wykazały, że test ATP może być z powodzeniem wykorzystany do oceny jakości wody wodociągowej oraz cieplej wody użytkowej pod względem mikrobiologicznym. Metoda ta pozwala na określenie całkowitej ilości drobnoustrojów w badanej próbce wody w stosunkowo krótkim czasie, zaś uzyskiwane wyniki są porównywalne (CV<10% - badania własne).
2. Metoda ta może być z powodzeniem wykorzystana do prac związanych z optymalizacją działania stacji uzdatniania wody, szczególnie w przypadku uzdatniania wód podziemnych. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do podjęcia działań w zakresie stałej lub okresowej dezynfekcji wody.
3. Oznaczenie ATP może być szczególnie przydatne w działaniach związanych z oceną jakości wody w budynkach użyteczności publicznej (szpitale, hotele) czy też wykorzystywanych sezonowo (ośrodki wczasowe). Podjęte w oparciu o badania ATP działania mogą znacznie poprawić jakość wody przy minimalizacji kosztów (dezynfekcja, płukanie sieci wewnętrznych itp.).
4. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że celowe jest przeanalizowanie progu cATP dla wody uznawanej za bezpieczną pod względem mikrobiologicznym. Zgodnie z sugestią producenta wartość ta wynosi 0,5 pg cATP/ml. Dopuszcza on jednak możliwość stosowania innych wartości. W przypadku prowadzenia systematycznych badań w danym punkcie można ją wyznaczyć doświadczalnie. Odpowiada ona stężeniu, przy którym nie stwierdza się podwyższenia wartości pozostałych wskaźników mikrobiologicznych. W analizowanych doświadczeniach sytuacja taka wystąpiła dla 1,0 pg cATP/ml.

Literatura:

1. Albrechtsen H.J. i in. 2010. “Application of measurement of ATP for process and quality control in drinking water”. Nordisk Drikkenvandskonference. 2010, Copenhagen, June 7-9.
2. Aqua-tools, 2010. “Monitoring of microbial contamination using ATP-metry technology”. Maszynopis.
3. Deininger R.A., J. Lee, 2001. “Rapid determination of bacteria in drinking water using an ATP assay”. Field Analytical Chemistry and Technology, 5(4), 185 – 189.
4. Delahaye E. i in. 2003. “An ATP-based method for monitoring the microbiological drinking water quality in a distribution network”. Water research 37 (2003), 3689-3696.
5. Kowal A.L., M. Świderska – Bróż, 2009. “Oczyszczanie wody. Podstawy teoretyczne i technologiczne, procesy i urządzenia”. PWN, Warszawa.
6. Ochromowicz K., E.J. Hoestra, 2005. “ATP as an indicator of microbiological activity in tap water”. European Commision Directorate – General Joint Research Centre.
7. Odom R., K. Rotert, 2006. “System indicators of drinking water quality”. Environmental Protection Agency.
8. Oliver J.D., 2005. “The Viable but Nonculturable State in Bacteria”. The Journal of Microbiology, February 2005, 93-100.
9. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29.03.2007 w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U. 2007.61.417).
10. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 20.03.2010 zmieniające rozporządzenie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U.2010.72.466)
11. Siebel E., Y. Wang, T. Egli, F. Hammes, 2008. “Correlation between total cell concentration, total adenosine tri-phosphate concentration and heterotrofic plate counts during microbial of drinking water”. Drinking Water Engineering and Science, 1, 1-6, 2008.
12. Tworko. M, A. Markucińska, A. Węgrzynek, 2007. „Zastosowanie bioluminescencyjnego pomiaru ATP do oceny poziomu higieny w gospodarstwach domowych”. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 5 (55), 392 -399.
13. Wiera B., F. Pistelok, T. Stuczyński, J.-B. Poitelon, 2011. „Suivi de la qualité biologique de l’eau dans les réseaux de distribution : Études de 4 communes en Pologne”. Maszynopis.
14. Young J.L., R.A. Deininger, 2001, “Rapid quantification of viable bacteria in water using an ATP assay”. American Laboratory News (2001), vol. 33, issue 21, 24-26.
15. Yu J., D. Kim, T.Lee, 2010. „Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials”. Water Science and Technology, 61.1., 163 -171.