

Anna Gacek
Przemysław Szopa
Jacek Czerniak

Katedra Metrologii i Analizy Instrumentalnej
Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie

Zanieczyszczenia zbiorników wodnych bakterią *Pseudomonas aeruginosa* na obszarze Krakowa

Streszczenie

Prezentowane badania zostały przeprowadzone w celu oceny występowania bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (pałeczki ropy błękitnej) w wodzie pochodzącej ze zbiorników wodnych użyteczności publicznej oraz studni artezyjskich zlokalizowanych na terenie miasta Krakowa. Pobranie próbek nastąpiło dla każdego z wybranych miejsc dwukrotnie: w sezonie letnim i zimowym 2012 r. Obecność *Pseudomonas aeruginosa* stwierdzono w kąpieliskach, nie stwierdzono natomiast obecności bakterii w wodach przeznaczonych do spożycia. Skażenie było uzależnione od terminu poboru próbki – wykazywało sezonowe zmiany.

Słowa kluczowe: *Pseudomonas aeruginosa*, zbiornik wodny, studnia artezyjska, kąpielisko.

1. Wprowadzenie

Pseudomonas aeruginosa należące do rodziny *Pseudomonadaceae* są tlenowymi, Gram-ujemnymi bakteriami, osiągającymi wielkość 0,8–3,0 μm . Posiadają jedną rzęskę umieszczoną biegunowo, która sprawia, że są one bardzo ruchliwe. Nie wytwarzają otoczki ani przetrwalników, jednak mogą powodować ostre i prze-

wlekłe zakażenia. Drobnoustroje te mogą być wyizolowane ze źródeł środowiskowych, szczególnie z wód słodkich, gleb, ścieków, powietrza i powierzchni roślin, pojawiają się również jako organizmy komensalne u zwierząt i ludzi (skóra, flora jelitowa) [Lavoie, Wangdi i Kazmierczak 2011]. Pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*, zwane pałeczkami ropy błękitnej, wytwarzają niebieskozieloną piocyjaninę (1-hydroksy-5-metylofenazynę), która wykazuje właściwości antybiotyczne, oraz rozpuszczalną w wodzie fluoresceinę, powodującą fluorescencję w świetle nadfioletowym. Chorobotwórczość pałeczek ropy błękitnej jest związana z wytwarzaniem przez nie różnych metabolitów (takich jak egzotoksyna A, enterotoksyna, endotoksyna, hemolizyna, leukocydyna, enzymy proteolityczne i zewnątrzkomórkowy śluz). W patogenezie zakażeń tymi pałeczkami dużą rolę odgrywa też piocyjanina, która ze względu na swoje antybiotyczne właściwości hamuje wzrost innych drobnoustrojów, ułatwiając jednocześnie pałeczkom *Pseudomonas aeruginosa* kolonizację osłabionego immunologicznie organizmu [Pariser, Caserio i Eaglstein 1986; Białyński-Birula i Gutfreund 2008]. Powodują one ponadto ciężkie powikłania po oparzeniach i powikłania pooperacyjne oraz zakażenia ran. W następstwie zanieczyszczenia żywności (głównie mleka i jego przetworów) bakteriami *Pseudomonas aeruginosa* rozwijają się również zakażenia płodów i noworodków, zakażenia układu oddechowego, zakażenia dróg moczowych, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie ucha środkowego i zatok, zapalenie kości i szpiku kostnego, zapalenie wsierdza i osierdza, zakażenia oczu, zakażenia ośrodkowego układu nerwowego, zakażenia skóry oraz zatrucia pokarmowe [Mena i Gerba, 2009]. Leczenie zakażeń na tle *Pseudomonas aeruginosa* jest trudne, gdyż omawiane drobnoustroje są odporne na liczne antybiotyki stosowane w terapii antybakteryjnej. Lekooporne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* powstają na drodze mutacji i przeniesienia materiału genetycznego. Co istotne, pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* nie są wrażliwe na stosowane powszechnie środki dezynfekcyjne, a nawet mogą je wykorzystywać jako źródło węgla i energii do budowy własnych komórek. Niektórzy autorzy twierdzą, że odporność na środki dezynfekcyjne determinuje wyższą zjadliwość [Todar 2004, Lavoie, Wangdi i Kazmierczak 2011, Trautmann, Lepper i Haller 2005, Rice i in. 2012]. Do czynników fizycznych działających letalnie na pałeczki ropy błękitnej należą niskie pH oraz wysuszenie, wykazują one natomiast dużą tolerancję na działanie ekstremalnych warunków środowiska – *Pseudomonas aeruginosa* mogą wzrastać w przedziale temperatur 4–43°C. Optymalnym pH dla tego szczepu bakterii jest pH obojętne lub lekko zasadowe [Beck-Sague, Banerjee i Williams 1994].

Woda w Krakowie

Na obszarze Krakowa wody podziemne występują w obrębie piętrowych wodonośnych: paleozoicznego i jurajskiego (spękane i skrasowiałe wapienie), kredowego

(spękane margle i wapienie), trzeciorzędowego (piaskowce i piaski drobnoziarniste) oraz czwartorzędowego (piaski i żwiry). Dominującą rolę pod względem wodonośności odgrywają poziomy: górnio-jurajski, trzeciorzędowy piaszczysty (piaski boguciekie) i plejstoceński [Studium uwarunkowań... 2010].

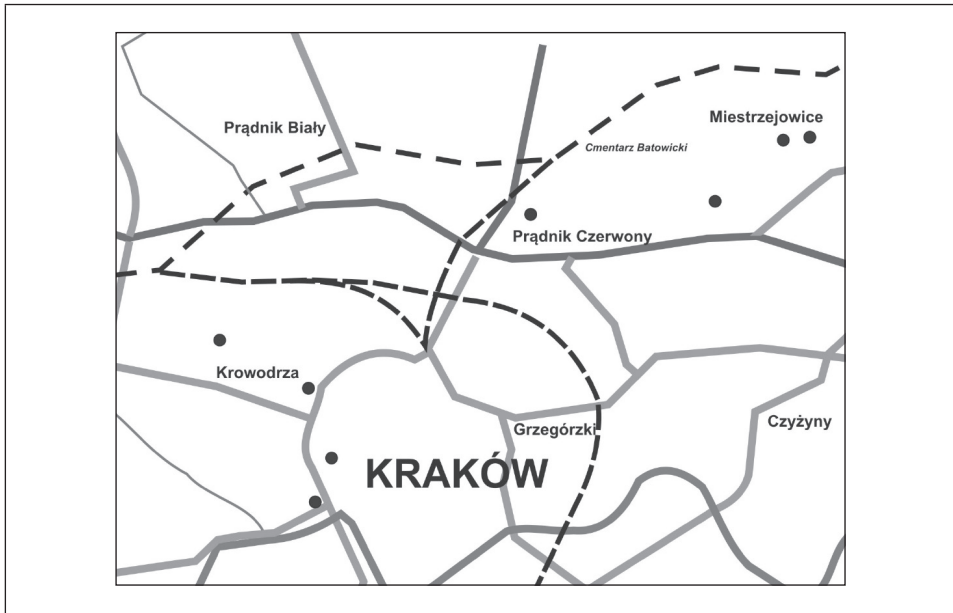
W Krakowie funkcjonuje awaryjny system zaopatrzenia w wodę obejmujący teren całego miasta. Składa się on z 355 punktów poboru wody, w tym: 4 źródeł, 3 ujęć wód z utworów jurajskich i 2 z trzeciorzędowych, 14 studni artezyjskich oraz pozostałych studni publicznych o głębokości do 30 m, z wodą o zmiennej jakości [Studium uwarunkowań... 2010].

Studnie ręczne z uwagi na jakość wody mogą stanowić źródło wody jedynie do celów niezwiązanych ze spożyciem, gdyż zgodnie z decyzją inspektora sanitarnego zostały oznakowane tabliczkami „woda niezdatna do spożycia przez ludzi”. Studnie artezyjskie podlegają bieżącej kontroli jakości wody – na podstawie wyników badań służby inspekcji sanitarnej podejmują decyzję o jej przydatności do spożycia [Raport o stanie miasta... 2012].

2. Metodyka badań

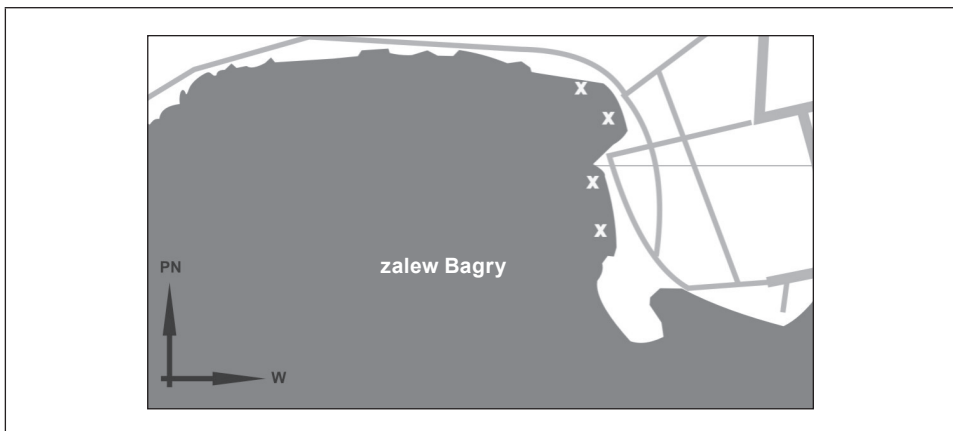
Wody wybrane do badań są wodami jurajskimi i pochodzą ze studni: „Nadzieja”, „Lajkonik”, „Królewski”, „Jagielloński”, „Dobrego Pasterza”, P-1 na os. Tysiąclecia i P-3 na os. Bohaterów Września. Studnie te zostały wykonane w latach 90. XX w. Są to studnie artezyjskie, które dostarczają wodę z warstw wodonośnych znajdujących się na głębokości 60–100 m. Studnie te posiadają dobrą izolację od warstw powierzchniowych, a ich lokalizacja została zaznaczona na rys. 1.

Zbiornikami sztucznymi (powstałymi w wyniku zalania wodą po zakończeniu eksploatacji kopalni stałych) zlokalizowanymi na terenie Krakowa są: Bagry, Staw Płaszowski, Staw Dąbski, zbiornik wodny na Zakrzówku oraz zbiornik wodny w Przylasku Rusieckim. Zbiorniki te pełnią funkcję rekreacyjną jako nieurządzone. Niektóre z nich są zarybiane i wykorzystywane do sportu wędkarskiego. Przewidziane jest także objęcie ochroną prawną w formie użytku ekologicznego Stawu Dąbskiego, zlokalizowanego przy centrum handlowym „Plaza”. Wybrane do badań zbiorniki wodne to: Bagry, Staw Płaszowski, Staw Dąbski oraz zbiornik wodny w Przylasku Rusieckim (rys. 2–5; miejsce poboru próbek oznaczono krzyżykiem). Zbiorniki kąpieliskowe są wprawdzie regularnie badane przez służby inspekcji sanitarnej, jednak nie na obecność bakterii *Pseudomonas aeruginosa* [Studium uwarunkowań... 2010].



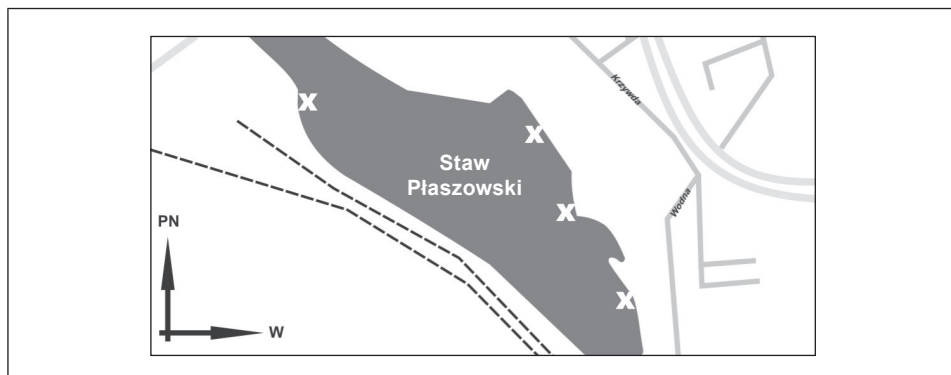
Rys. 1. Lokalizacja studni

Źródło: opracowania własne.



Rys. 2. Miejsce poboru próbek – Bagry

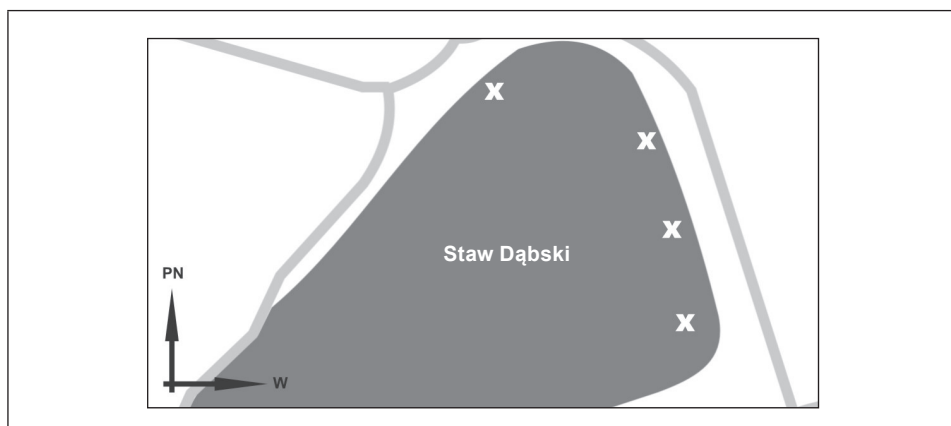
Źródło: opracowania własne.



Rys. 3. Miejsce poboru próbek – Staw Płaszowski

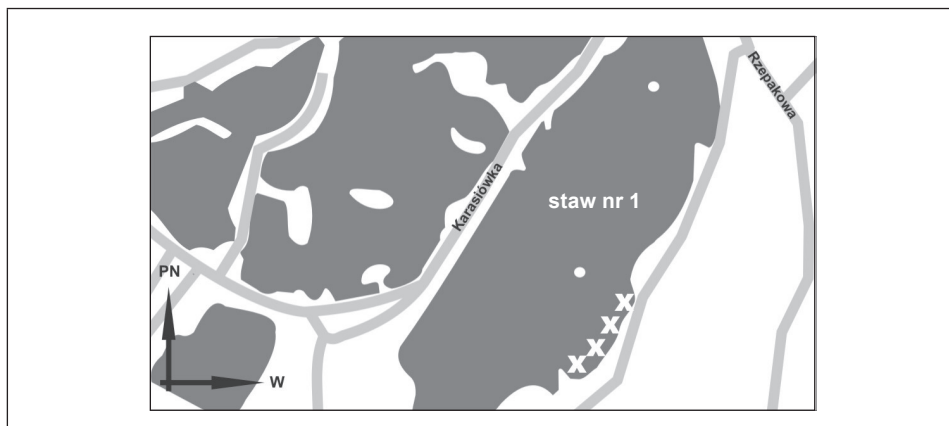
Źródło: opracowania własne.

Na potrzeby niniejszej pracy przebadane zostały 4 zbiorniki wodne użyteczności publicznej, w tym dwa kąpieliska (zbiornik wodny w Przyłasku Rusieckim i zalew Bagry), oraz wody z 7 studni artezyjskich na terenie miasta Krakowa na obecność bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Dla każdego ze zbiorników wodnych próbki zostały pobrane dwukrotnie (w sezonie letnim i zimowym). Wodę pobrano z warstw przypowierzchniowych na głębokości 10 cm, w oddaleniu od linii brzegowej o około 1 m, w różnych miejscach zbiorników zgodnie z zaznaczeniem na rys. 2–5. Dla studni próbki zostały pobrane jednorazowo w sezonie letnim zgodnie z zaznaczeniem na rys. 1.



Rys. 4. Miejsce poboru próbek – Staw Dąbski

Źródło: opracowania własne.



Rys. 5. Miejsce poboru próbek – zbiornik wodny w Przylasku Rusieckim

Źródło: opracowania własne.

Próbki do badań mikrobiologicznych zostały pobrane do sterylnych butelek o pojemności 100 ml zawierających specjalne podłoże do wzrostu bakterii chronione w Europie tajemnicą handlową (Pseudalert®). Wodę ze studni pobrano dodatkowo do butelek PET o pojemności 1,5 l i przechowywano w miejscu zacienionym w temperaturze pokojowej przez okres 7 dni.

W ciągu 3 godzin od momentu pobrania badane próbki o objętości 100 ml zostały poddane inkubacji w temperaturze $38,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ na czas 24 godzin. Próbki wód z butelek PET poddano ponadto takiej samej procedurze inkubacji na takim samym podłożu, jak to miało miejsce w przypadku pozostałych próbek, po 1, 2, 3, i 7 dniach.

W badaniu wykorzystano technologię wykrywania enzymów bakteryjnych, która sygnalizuje obecność *Pseudomonas aeruginosa* poprzez hydrolizę substratów w zastosowanej pożywce. Komórki *Pseudomonas aeruginosa* szybko rosną i namnażają się, wykorzystując źródło bogate w aminokwasy, witaminy i inne składniki odżywcze zawarte w zastosowanym podłożu. Aktywnie rosnące szczepy *Pseudomonas aeruginosa* posiadają enzymy rozkładające substraty podłoża – uwalniają się wówczas cząstki, które pod wpływem promieniowania ultrafioletowego objawiają się w formie niebieskiej fluorescencji. Intensywność fluorescencji została zbadana na modułowym spektrofluorymetrze MSF 101 i MSF 102. Długość fali wzbudzenia wyniosła 365 nm. Podane w artykule parametry wód ze studni zaczerpnięto z badań Wojewódzkiej Stacji Sanitarно-Epidemiologicznej w Krakowie.

3. Wyniki badań

W momencie pobierania próbek temperatura wód w sezonie letnim wynosiła 18–22°C w przypadku zbiorników wodnych oraz 8–10°C w przypadku studni, natomiast w sezonie zimowym 4–5°C w przypadku zbiorników wodnych. Odczyn pH wszystkich badanych wód mieścił się w przedziale 6,8–8,5.

Studnie

Zgodnie z informacjami Miejskiego Przedsiębiorstwa Wodociągów i Kanalizacji SA oraz Wojewódzkiej Stacji Sanitarно-Epidemiologicznej w Krakowie wody ujęte z tych źródeł na ogół spełniają kryteria przydatności wody do spożycia pod względem fizykochemicznym, jednakże pod względem bakteriologicznym charakteryzują się zmiennością [Wesołowski 2011]. W tabeli 1 zaprezentowano wyniki badań wód ze studni: „Nadzieja”, „Lajkonik”, „Królewski”, „Jagielloński”, „Dobrego Pasterza”, P-1 na os. Tysiąclecia oraz P-3 na os. Bohaterów Września. Badania nie wykazały obecności zanieczyszczeń bakteriologicznych szczepami *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 1. Odczyn pH i zanieczyszczenia bakteriologiczne szczepami *Pseudomonas aeruginosa* w badanych studniach

Wyszczególnienie	Odczyn pH	Obecność <i>P.a.</i>
Studnia „Nadzieja”, ul. Podchorążych	7,5	–
Studnia „Lajkonik”, ul. Kościuszki	7,6	–
Studnia „Królewski”, pl. Inwalidów	7,5	–
Studnia „Jagielloński”, pl. Sikorskiego	8,5	–
Studnia „Dobrego Pasterza”, ul. Łepkowskiego	7,6	–
Studnia P-1, os. Tysiąclecia	7,2	–
Studnia P-3, os. Bohaterów Września	7,7	–
Norma dla wody pitnej	6,5–9,5	–

Źródło: opracowania własne.

Zbiorniki wodne

Badania przeprowadzone przez Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska, mające na celu ocenę przydatności zasobów wodnych analizowanych zbiorników do celów rekreacyjnych i kąpielowych, wykazały, że poziom czystości wód mieści się corocznie w granicach I i II klasy czystości [Raport o stanie środowiska... 2002]. W tabeli 2 zaprezentowano wyniki badań wód z następujących zbiorników wodnych: stawu nr 1 w Przylasku Rusieckim i zalewu Bagry (kapieliska) oraz

Stawu Dąbskiego i Stawu Płaszowskiego (zbiorniki nieprzeznaczone do kąpiel). Odczyn pH mierzono w temperaturze pobrania próbki. Badania wykazały obecność zanieczyszczeń bakteriologicznych szczepami *Pseudomonas aeruginosa* w przebadanych kąpieliskach oraz brak tych zanieczyszczeń w zbiornikach nieprzeznaczonych do kąpiel.

Tabela 2. Wyniki badań wód ze zbiorników wodnych

Wyszczególnienie	Zbiornik wodny			
	Staw nr 1 w Przy- lasku Rusieckim	Staw Dąbski	Bagry	Staw Płaszowski
Odczyn pH (sezon letni)	7,1	6,9	7,1	6,8
Odczyn pH (sezon zimowy)	8,0	7,5	8,2	7,9
Obecność <i>P.a.</i>	+	-	+	-

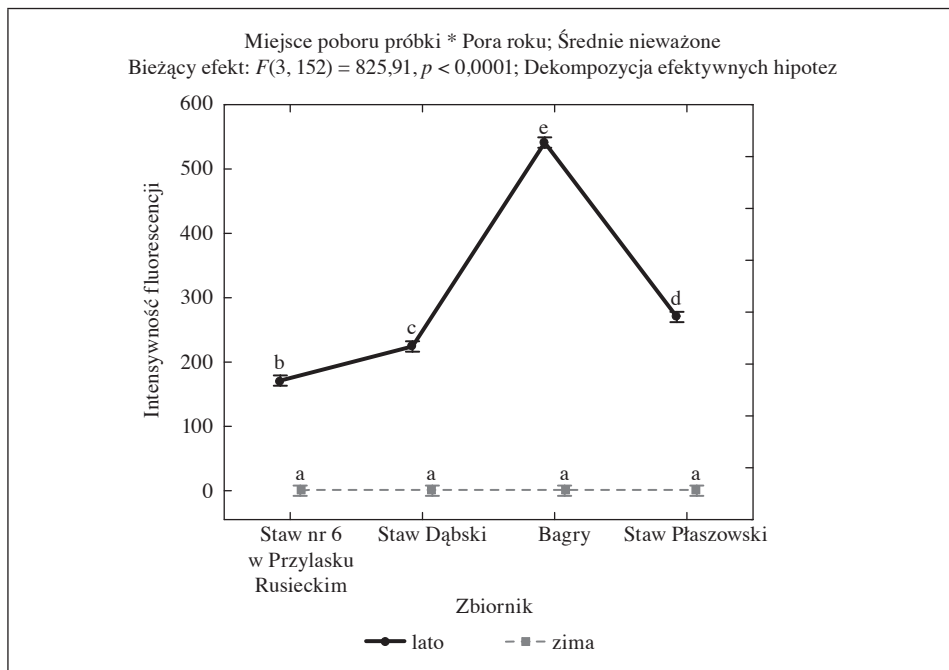
Objaśnienie – odczyn pH mierzono w temperaturze pobrania próbki.

Źródło: opracowania własne.

4. Analiza statystyczna badań

Do badań pobrano po 20 próbek z czterech zbiorników wodnych (10 latem i 10 zimą). Dwa spośród badanych zbiorników pełnią rolę kąpielisk, w dwóch pozostałych obowiązuje zakaz kąpiel.

Z wykorzystaniem programu STATISTICA PL wykonano dwuczynnikową analizę wariancji [Stanisz 2007, s. 307–314] zmiennej „intensywność fluorescencji” (reprezentowanej przez maksymalne wartości fluorescencji dla każdej próbki), biorąc pod uwagę miejsce poboru próbki (4 zbiorniki wodne) oraz porę roku, w jakiej próbkę pobrano. Przyjęto hipotezy zerowe: o braku różnic w intensywności fluorescencji w próbkach pochodzących z różnych zbiorników (efekt czynnika „miejsce poboru próbki”), o braku zróżnicowania intensywności fluorescencji między próbkami pobranymi w różnych porach roku (efekt czynnika „pora roku”) oraz o braku interakcji między tymi czynnikami. Wyniki pozwoliły odrzucić wszystkie hipotezy zerowe, otrzymano bowiem efekty główne obu czynników istotne statystycznie na poziomie $p < 0,0001$ oraz efekt interakcyjny $F(3, 152) = 825,91$; $p < 0,0001$, gdzie F oznacza statystykę Fishera-Snedecora, a p – poziom prawdopodobieństwa omyłkowego odrzucenia hipotezy zerowej [Stanisz 2007, s. 282]. Wyniki przedstawiono na rys. 6.



Objaśnienie: różne oznaczenia literowe oznaczają istotne statystycznie różnice między poszczególnymi średnimi przy $p < 0,05$ według testu LSD Fishera.

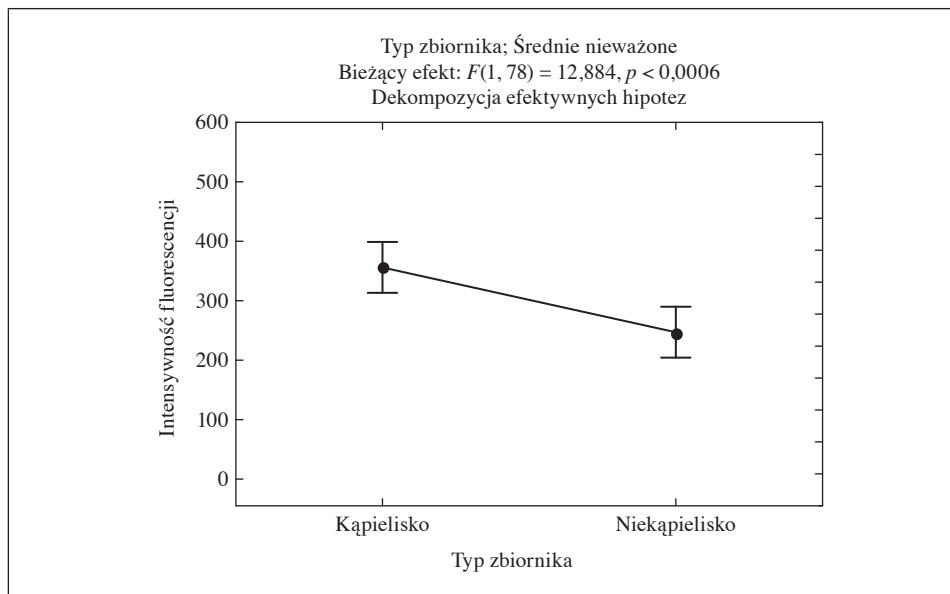
Rys. 6. Dwuczynnikowa analiza wariancji zmiennej „intensywność fluorescencji” dla czynników „miejsce poboru próbki” oraz „pora roku”

Źródło: opracowania własne.

Fluorescencję wskazującą na obecność bakterii *Pseudomonas aeruginosa* stwierdzono wyłącznie w próbkach letnich pochodzących z przebadanych kąpielisk – miejsce poboru próbki istotnie różnicowało wyniki. Szczegółowe porównania *post-hoc* [Stanisz 2007, s. 397–400] wykonano za pomocą testu najmniejszych istotnych różnic dla $p < 0,05$, a na rys. 6 wyszczególniono je poprzez oznaczenia literowe. W każdym zbiorniku stwierdzono istotnie różną od wszystkich pozostałych wartość intensywności fluorescencji – najwyższą (541,15) dla próbek letnich pochodzących z zalewu Bagry, a następnie w kolejności malejącej: dla próbek ze Stawu Płaszowskiego (intensywność fluorescencji: 270,0), ze Stawu Dąbskiego (224,2) oraz ze stawu nr 1 w Przyłasku Rusieckim (171,15). Należy odnotować ponadto, że nawet najniższy wynik letni istotnie różnił się od zimowego (0).

W dalszej kolejności, badając wyłącznie próbki letnie, przeprowadzono analizę uwzględniającą sposób użytkowania zbiornika – jako kąpieliska (zbiornik wodny w Przyłasku Rusieckim i zalew Bagry) lub z zakazem kąpieli (Staw Dąbski i Staw Płaszowski). Jednoczynnikowa analiza wariancji zmiennej „intensywność fluore-

scencji” dla czynnika „typ zbiornika” ujawniła istotny statystycznie efekt $F(1, 78) = 12,884$; $p < 0,0006$, przedstawiony na rys. 7.



Objaśnienie: pionowe słupki oznaczają 95% przedziały ufności.

Rys. 7. Jednoczynnikowa analiza wariancji zmiennej „intensywność fluorescencji” dla czynnika „typ zbiornika”

Źródło: opracowania własne.

W próbkach ze zbiorników pełniących funkcję kąpieliska stwierdzono istotnie wyższą fluorescencję (średnia: 356,15) niż w próbkach ze zbiorników niebędących kąpieliskami (średnia: 257,1). Biorąc pod uwagę wyniki poprzedniej analizy, należy jednak zaznaczyć, że główną rolę odegrały tu wysokie wartości odnotowane dla próbek z zalewu Bagry, gdyż wartości dla zbiornika w Przylasku Rusieckim były najniższe spośród wszystkich. Definitywne potwierdzenie lub odrzucenie hipotezy, że użytkowanie zbiorników wodnych jako kąpieliska sprzyja rozwojowi bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, wymaga przebadania większej liczby zbiorników z obu analizowanych kategorii.

5. Wnioski

Ocena biologiczna jakości wody za pomocą organizmów żywych wydaje się metodą najprecyzyjniejszą, gdyż organizmy i ich populacje w sposób obiektywny

odzwierciedlają zmiany zachodzące w środowisku ich życia, a także procesy degradacji i renaturyzacji ekosystemów wodnych.

Wyniki przeprowadzonych badań świadczą o tym, że występowanie szczepów bakterii *Pseudomonas aeruginosa* może być uzależnione od obecności ludzi w kąpieliskach i że to właśnie ludzie mogą przenosić tę bakterię do zbiorników wodnych.

Organizacje zdrowia publicznego powinny zwrócić uwagę na problem występowania szczepów bakterii *Pseudomonas aeruginosa* i opracować strategię mającą na celu zmniejszenie możliwości zakażenia się nimi poprzez kąpiel w zamkniętych zbiornikach wodnych. Strategia ta mogłaby obejmować:

- rutynowe monitorowanie obecności *Pseudomonas aeruginosa* w kąpieliskach,
- wykonywanie badań przed sezonem i w każdym miesiącu funkcjonowania kąpieliska,
- opracowanie broszur informacyjnych i (lub) seminariów dla osób prywatnych, które dotyczyłyby zakażeń bakteriami szczepu *Pseudomonas* oraz przeciwdziałania im.

Literatura

- Beck-Sague C.M., Banerjee S.N., Williams J.R. [1994], *Epidemiology and Control of Pseudomonas aeruginosa in U.S. Hospitals* [w:] *Pseudomonas aeruginosa: Infections and Treatment*, red. A.L. Balth, P. Smith, Marcel Dekker Inc., New York.
- Białyński-Birula R., Gutfreund K. [2008], *Zastosowanie lampy Wooda w diagnostyce dermatologicznej*, „Dermatologia Kliniczna”, t. 10, nr 3.
- Lavoie E.G., Wangdi T., Kazmierczak B.I. [2011], *Innate Immune Responses to Pseudomonas aeruginosa Infection*, „Microbes and Infection”, nr 13.
- Mena K.D., Gerba Ch.P. [2009], *Risk Assessment of Pseudomonas aeruginosa in Water*, „Reviews of Environmental Contamination and Toxicology”, nr 201.
- Pariser D., Caserio R., Eaglstein W. [1986], *Wood's Light Examination* [w:] *Techniques for Diagnosing Skin and Hair Disease*, red. D. Pariser, R. Caserio, W. Eaglstein, Thieme Inc., New York.
- Raport o stanie miasta 2011* [2012], Urząd Miasta Krakowa, Wydział Strategii i Rozwoju Miasta, Kraków.
- Raport o stanie środowiska naturalnego miasta Krakowa za lata 1999–2001 z analizą porównawczą pięciolecia 1994–1998* [2002], red. K.P. Turzański, J. Pauli-Wilga, Biblioteka Monitoringu Środowiska, Wydawnictwo Text, Kraków.
- Rice S.A. i in. [2012], *A Risk Assessment of Pseudomonas aeruginosa in Swimming Pools: A Review*, „Journal of Water and Health”, vol. 10, nr 2.
- Stanisz A. [2007], *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny*, t. 2, StatSoft, Kraków.
- Studium uwarunkowań i kierunków zagospodarowania przestrzennego Miasta Krakowa* [2010], Uchwała nr XII/87/03 z dnia 16 kwietnia 2003 r. zmieniona uchwałą nr XCIII/1256/10 z dnia 3 marca 2010 r., Załącznik nr 4 do Uchwały nr XCIII/1256/10 Rady Miasta Krakowa z dnia 3 marca 2010 r.

- Todar K. [2004], *Bacterial Pathogens and Diseases of Humans*, <http://textbookofbacteriology.net> (dostęp: 18.12.2012).
- Trautmann M., Lepper P.M., Haller M. [2005], *Ecology of Pseudomonas aeruginosa in the Intensive Care Unit and the Evolving Role of Water Outlets as a Reservoir of the Organism*, „American Journal of Infection Control”, vol. 33, nr 5.
- Wesołowski K. [2011], *Alternatywne źródła zaopatrzenia w wodę*, <http://wsse.krakow.pl> (dostęp: 21.12.2012).

Pseudomonas aeruginosa Contamination of Water in the Cracow Area

Research was done to assess the occurrence of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* in public utility surface water and artesian wells in the city area of Cracow (Poland). Samples were collected once in the summer and once in winter 2012 for each of the selected locations. While *Pseudomonas aeruginosa* was found at two public bathing beaches, it was not found in potable water. The contamination discovered was sampling time-dependent, revealing seasonal variations.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, surface water, artesian wells, bathing beaches.