

# VODA Z KOHÚTIKA A *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

**RNDr. Miloslava Prokšová, CSc., RNDr. Marianna Cíhová**

Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábr. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava  
proksova@vuvh.sk

## Súhrn

Podľa Smernice rady 98/83/ES, 1998 o kvalite pitnej vody je medzi požadovanými parametrami pre mikrobiologickú kvalitu vody zahrnuté stanovenie *Pseudomonas aeruginosa* len v prípade vzoriek balenej vody. Tohto patogéna však na našom pracovisku opakovane nachádzame aj počas stanovenia indikátorov znečistenia pitnej vody ako sú koliformné baktérie a *Escherichia coli*, a to najmä vo vzorkách vody priamo z kohútika u spotrebiteľa. Zamerali sme sa na prípad, kde sme mali potvrdený vznik infekcie, spôsobenej *P. aeruginosa*. Cieľom našej práce bolo potvrdiť jeho prítomnosť a zistiť konkrétny zdroj, prípadne miesto výskytu v testovanom distribučnom systéme. Detekciu a identifikáciu sme robili kultivačnou metódou podľa platnej normy STN EN 16266 pre stanovenie *P. aeruginosa*, a odskúšali sme aj PCR metódu so zameraním na stanovenie génu pre produkciu exotoxínu A. Na základe našich skúseností vidíme potrebu stanovovania tohto druhu v širšom rozsahu a nie len vo vzorkách balenej vody.

## Úvod

Vzhľadom na to, že pitná voda je pre život nevyhnutná, zásobovanie spotrebiteľa musí byť adekvátne a dodávateľ musí zabezpečiť vodu najlepšej kvality za daných okolností. V tomto kontexte prvou líniou ochrany je zhodnotenie kvality vody po stránke fyzikálnej, chemickej a mikrobiologickej. Takéto vyhodnotenie je možné urobiť na základe vykonaných analýz a dohľadu na proces úpravy pitnej vody [1].

Voda po úprave vstupujúca do distribučnej siete je zvyčajne vhodná pre konzumáciu, ale vplyvom distribučnej siete budov, môže dôjsť k zhoršeniu jej kvality. Celý povrch distribučného systému, ktorý je v kontakte s vodou môže byť kolonizovaný mikroorganizmami, ktoré vytvoria biofilm. Biofilm reprezentuje špecifickú formu bakteriálnej kolonizácie distribučného systému vody. Táto špecifická forma zabezpečuje biostabilitu mikrobiálnych komunití, ich pretrvávanie a uvoľňovanie planktonických buniek mikroorganizmov do tečúcej vody. V práci [2] autor uvádza, že 95 % všetkých baktérií je v biofilme a 5 % vo vodnej fázi. Biofilm vo vodnom systéme je prevažne tvorený autochtónnou vodnou mikroflórou, ktorá nemá vplyv na zdravie spotrebiteľov, ale môžu sa tu vyskytovať podmienené patogénne a patogénne mikroorganizmy. K zhoršeniu vody v distribučnom systéme a jej kontaminácii vody mikroorganizmami môže dôjsť z viacerých príčin: krížové prepojenie, spätná nasatie vody, prerazenie potrubí, požiarne hydranty, domové pripojenia, poškodené vodojemy, kontaminácia pri kladení nových potrubí alebo počas opravných prác, nesprávne nainštalované zariadenia, zle udržiavané akumuláčny zariadenia. Mikroorganizmy prítomné v biofilme sú chránené pred stresom a dezinfekciou. *Pseudomonas aeruginosa* je navyše schopný sa zúčastňovať priamo pri tvorbe biofilmov v potrubí a preto môže ľahšie prežívať v nepriaznivých podmienkach [4, 5, 6]. Najmä mukoidné kmene tejto baktérie sú charakteristické svojou nadprodukciou extracelulárneho polysacharidu alginátu, ktorý môže tvoriť základ biofilmu [7]. Niektoré mikroorganizmy ako *Legionella* spp. a *Pseudomonas* spp. sa rozmnožujú vo vode a môžu teda predstavovať hygienicky významné zdravotné riziko [3].

*Pseudomonas aeruginosa* je druh rodu *Pseudomonas*, čel'ad Pseudomonadaceae. Je to gramnegatívna, pohyblivá s polárnymi bičíkmi, nesporulujúca tyčinka, ktorá je pozitívna na oxidázu a katalázu. Vykazuje oxidačný typ metabolizmu indikovaný skúškou Hughha a Leifsona. Všeobecne redukuje dusičnany až na dusitany a rozkladom acetamidu produkuje amoniak. Väčšina kmeňov (98 %) produkuje vo vode rozpustný fluoreskujúci pigment (pyoverdín). Pigment pyocyanín (modro-zelený) produkuje viac ako 90 % kmeňov. Časť kmeňov môže produkovať ešte červený pigment pyorubín. Väčšina kmeňov je schopná rasti pri 42 °C, ale nie pri 4 °C, čo odlišuje *Pseudomonas aeruginosa* od *Pseudomonas fluorescens*, ktoré rastú pri 4 °C, ale nie pri 42 °C. *P. aeruginosa* skvapalňuje želatínu, hydrolyzuje kazeín, ale nehydrolyzuje škrob [8].

Z hygienického hľadiska je z rodu *Pseudomonas* najdôležitejší druh *P. aeruginosa*, ktorý je významne zastúpený v nozokomiálnych nákazách [9]. Pseudomonády sú metabolicky veľmi nenáročné, sú saprofytické a zúčastňujú sa pri rozklade organickej hmoty. Bežne sa vyskytujú vo voľnej prírode, v odpadovej vode, črevnom trakte živočíchov aj človeka. Významnou črtou *P. aeruginosa* je jeho schopnosť rásť v prostredí s nízkym obsahom živín. Už v roku 1971 upozornili autori [10] na skutočnosť, že *P. aeruginosa* je schopný rasti v destilovanej vode používanej pri príprave liekov. Niekoľko autorov opísalo rast *P. aeruginosa* v prirodzenom vodnom prostredí, vo vodovodnej vode a tiež na povrchu vhodného organického materiálu v kontakte s vodou [11, 12].

*P. aeruginosa* je typickým predstaviteľom podmieneného patogéna. Určité percento klonov vlastní potrebné faktory virulencie na spôsobenie infekcie. *P. aeruginosa* môže spôsobovať rôzne infekcie, ale zriedka vážne ochorenie u zdravých jedincov bez nejakej predispozície, nenapadá zdravé orgány, zvyčajne spôsobuje infekcie u orgánov, ktoré sú určitým spôsobom poškodené. Spôsobuje napríklad infekciu kože, popálenín, býva častým infekčným faktorom pri cystickej fibróze, spôsobuje pneumónie u intubovaných pacientov. Tiež môže spôsobovať infekcie močových ciest, septikémiu, osteomyelitídu, endokarditídu [13]. V niektorých prácach je uvádzaný ako pôvodca gastroenteritíd spôsobených pitnou vodou ako cestou prenosu [14]. Folikulitída a ušné infekcie sú spojené s teplou vodou a vlhkým prostredím ako sú plavecké bazény a kúpele [15]. Veľa kmeňov je rezistentných voči veľkému rozsahu antibiotík, čo môže zvyšovať význam výskytu tohto organizmu v nemocniciach [16, 17, 18, 19]. Rozmanitosť metabolizmu *P. aeruginosa*, jeho tolerancia k fyzikálnym podmienkam prostredia vrátane teploty prispela k jeho úspechu ako patogéna. Jeho výskyt vo vode umožňuje skutočnosť, že má nízke nároky na výživu, vo vode sa môže rozmnožovať, je schopný v tomto prostredí dlho prežívať a schopnosť *P. aeruginosa* spomaliť metabolizmus v nepriaznivých podmienkach.

*P. aeruginosa* produkuje niekoľko virulentných faktorov, patrí sme niekoľko extracelulárnych produktov, ktoré sa zúčastňujú na poškodzovaní tkaniva po jeho preniknutí do organizmu. Extracelulárne virulentné faktory sú: exoenzým A, exoenzým S, elastáza, alkalická proteáza, hemolyzín, fosfolipáza C. Exoenzým A je produkovaný väčšinou kmeňov izolovaných z klinických vzoriek a je zodpovedný za poškodenie tkanív. Prítomnosť génu kódujúceho produkciu exotoxínu A je využívaní pri identifikácii izolátov *P. aeruginosa* pomocou PCR metódy [19].

Napriek tomu, že stanovenie *P. aeruginosa* vo vzorkách pitnej vody nie je predpísané v legislatívne [20], možnosť jeho prítomnosti vo vode z distribučnej siete je publikovaná vo viacerých prácach [21, 22, 23]. Po úpravách použitých na dezinfekciu pitnej vody sa v tomto prostredí zvyčajne vyskytuje len v malom množstve. Pri prežívaní v chlóranej vode tomuto organizmu pomáha aj schopnosť produkovať

polysacharidové púzdra. Mukoidné formy *P. aeruginosa* vykazujú vyššiu rezistenciu voči chlóru [24]. V práci [25] autori urobili prehľad z výsledkov hygienického dohľadu sledovania kvality pitnej vody v distribučných systémoch budov zo 419 lokalít v Nemecku. Najvyššie percento vzoriek s prekročenými limitmi bolo pri sledovaní mikrobiologických ukazovateľov, ako *Legionella* spp. (12,8 %) a *P. aeruginosa* (2,9%). Obidva tieto mikroorganizmy predstavujú priame zdravotné riziko pre ľudí s oslabenou imunitou. Autori z Brazílie [26] uvádzajú až 28 % pozitívnych vzoriek na prítomnosť *P. aeruginosa*, zároveň vyslovujú odporúčanie pridať *P. aeruginosa* jako parameter pri pravidelnej kontrole pitnej vody z kohútika.

## Metódy

### *Kultivačné stanovenie*

Stanovenie *Pseudomonas aeruginosa* bolo robené kultivačne podľa normy [27]. Použité testy na confirmáciu získaných izolátov: produkcia pyocianínu, fluorescencia na King B médiu, produkcia amoniaku z acetamidu, oxidáza, rast pri teplote 44 °C a 4 °C. Na potvrdenie identifikácie confirmačných testov uvedených v norme boli prezumpatívne kolónie ďalej potvrdzované pomocou komerčných biochemických testoch NEFERMTEST24 (Erba-Lachema).

### *Použité metódy pre izoláciu DNA*

Pre izoláciu DNA z bakteriálnych kultúr boli použité dva spôsoby izolácie kit ZyGEM DNA Extraction kit Using forensicGEM Saliva (Ecoli) a jednoduchá izolácia DNA povarením.

### *PCR reakcia*

Pre stanovenie druhu *Pseudomonas aeruginosa* sme použili PCR reakciu podľa autorov [19] s primermi pre *exoA* gén, ktorý kóduje produkciu exotoxínu A *exoAf* (5' GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC 3') a *exoAr* (5' CGCTGGCCCATCCGCT-CCAGCGCT 3') a výsledným produktom amplifikácie s veľkosťou 396 bp. PCR reakčná zmes (20µl) obsahovala: 5xGoTaq pufor, 1,25U GoTaq DNA Polymerázy (Promega), 0,2 mM dNTP, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, primery s výslednou koncentráciou 0,1 µM a 5 µl izolovanej DNA. Amplifikácia prebiehala v termocykléry Mastercycler<sup>®</sup>ep (Eppendorf, Hamburg) s teplotným programom: úvodná denaturácia 95°C 5 min. + 40 x (95°C 60s, 55°C 60s, 72°C 1 min.) + 72°C 10 min. Výsledný produkt (10µl) bol detekovaný pomocou elektroforetickej separácie v 1,5 % agarózovom gély (70 V; 1,5 hodiny) v UV-svetle po farbení s Gold View<sup>™</sup> prípadne s etídiumbromidom s výslednou koncentráciou 0,25µg/ml.

## Výsledky

### Monitorovanie prítomnosti *P. aeruginosa*

V našej práci počas mikrobiologických analýz pitnej vody odobratej z kohútika sa stretávame s výskytom popísanej patogénnej baktérie. V jednom prípade bola prítomnosť *P. aeruginosa* spojená s preukázanou gastroenterídou u dieťaťa. Dieťa trpelo opakovaným výskytom akútnej gastroenteritídy s potvrdením prítomnosti tohto patogénu vo výteroch zo stolice. Cieľom našej práce bolo potvrdiť prítomnosť a zistiť konkrétny zdroj *P. aeruginosa* na rôznych miestach distribučného systému.

Testované miesta boli rozdelené na viaceré úrovne:

- testovanie v rámci bytovej jednotky kde sa vyskytla nákaza (kuchyňa, kúpeľňa umývadlo, kúpeľňa sprcha),
- testovanie na úrovni viacerých bytových jednotiek na jednom podlaží,
- testovanie na úrovni viacerých bytových jednotiek nad sebou
- prívod vody pred vstupom do budovy.

Prvotné testovanie bolo robené v troch po sebe idúcich mesiacoch, pričom posledný odber bol urobený po sanačných opatreniach zo strany prevádzkovateľa vodovodnej siete.

Záchyt *P. aeruginosa* vo vzorkách pitnej vody, pri prvom odbere odobrané vzorky studenej a teplej vody v kuchyni aj kúpeľni. Pri podozrení na epidémiu spôsobenú vodou je podľa normy [27] potrebné odoberať pitnú vodu z kohútika bez predchádzajúcej dezinfekcie a odpúšťania vody. Preto sme pre odber volili dva spôsoby, a to odber priamo z kohútika bez odpúšťania pre kontrolu kvality vody, ktorá je určená priamo na spotrebu. Druhá vzorka bola odobratá po dezinfekcii odberového miesta a krátkom odpúšťaní za účelom kontroly kvality vody nachádzajúcej sa v miestnej distribučnej sieti. Vo všetkých takto odobratých vzorkách bola zistená prítomnosť fluorescenčných pseudomonád, ktoré boli následne identifikované ako *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* a *P. putida*. Detekované počty fluorescenčných pseudomonád na príslušných odberových miestach bytu sú uvedené v tabuľke č. 1.

**Tabuľka 1. Počty pseudomonád s pozitívnou fluorescenciou (KTJ) v 500 ml vzorkách vody odobraných na príslušných odberových miestach bytu s detekovanou nákazou v troch po sebe idúcich mesiacoch (1,2,3).**

	Kuchyňa		Kúpeľňa	
	Odber priamo z kohútika	Odber po dezinfekcii kohútika	Odber priamo z kohútika	Odber po dezinfekcii kohútika
	KTJ/500 ml	KTJ/500 ml	KTJ/500 ml	KTJ/500 ml
1	98	100	57	60
2	70	50	80	25
3	5	2	3	0

Analýza vody v ostatných bytových jednotkách v rámci budovy jednak na rovnakom poschodí a aj na rôznych poschodiach, v rámci jednej stúpačky, všetky vzorky vyhovovali požiadavkám pre kvalitu pitnej vody a pseudomonády neboli detekované. Analýzou vody na odberovom mieste pred vstupom do budovy bola zistená prítomnosť druhu *Pseudomonas fluorescens* na koncentračnej úrovni 50 KTJ/100 ml. Prítomnosť iného druhu pseudomonád nebola detekovaná.

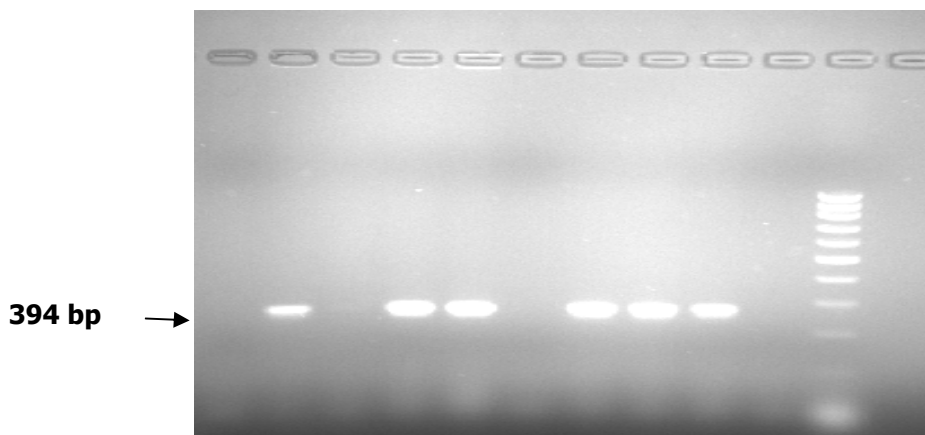
Prítomnosť pseudomonád v bytovej jednotke ako aj na mieste vstupu do budovy po sanačných opatreniach (zvýšená koncentrácia chlóru v distribučnej sieti) nebola síce úplne odstránená, ale počty boli radikálne znížené na úroveň < 10 KTJ/500 ml.

Po konzultácii s majiteľom bytovej jednotky boli následne odstránené všetky vodovodné batérie v byte a boli nahradené novými. Mesiac po inštalácii nových vodovodných batérií bol urobený opakovaný odber v bytovej jednotke ako aj kontrolný odber na vstupe do budovy. Odberové miesto na vstupe do budovy vykazovalo negatívitu prítomnosti pseudomonád, na rozdiel od bytovej jednotky, kde bol opäť pozorovaný nárast počtu pseudomonád a navyše s potvrdenou prítomnosťou druhu *Pseudomonas aeruginosa*.

Z doterajších výsledkov predpokladáme možnú kontinuálnu kolonizáciu týmito baktériami vo vodovodnej sieti kontrolovanej bytovej jednotky. Predpokladáme, že príslušné miesto môže byť v dôsledku nedostatočnej lokálnej chlorácie kolonizované biofilmom, ktorý je samotným rezervoárom *Pseudomonas aeruginosa* ako aj iných

druhov pseudomonád. V nasledujúcom roku plánujeme pokračovať v kontrolných analýzach z príslušnej vodovodnej siete.

Konfirmácia získaných izolátov bola urobená podľa testov predpísaných v norme [27] plus vybrané pridané biochemické testy. Zároveň sme pre potvrdenie izolátou otestovali prítomnosť génu *exoA*, ktorý kóduje tvorbu exotoxínu A, ktorý patrí medzi virulentné faktory *P. aeruginosa*. Podľa zdroja [19] až 95 % kmeňov *P. aeruginosa* produkuje tento toxín.



**Obrázok 1. PCR amplifikácia *exoA* génu**, v dráhe 1 referenčný kmeň *Pseudomonas aeruginosa*, dráha 2 negatívna kontrola, dráhy 3 až 9 izoláty zo vzoriek vody v sledovanej domácnosti, dráha 10 DNA marker 100 bp.

## Záver

Na základe našich skúseností a publikovaných informácií patogénna baktéria *Pseudomonas aeruginosa* sa vyskutojuje vo vode z kohútika u spotrebiteľa, môže ohroziť zdravie najmä osôb s oslabenou imunitou, detí a starších osôb. Viacero autorov odporúča zaradiť stanovenie tejto baktérie medzi kritéria pre stanovenie kvality pitnej vody.

## Literatúra

1. Rojas R. 2002. Guidelines for the surveillance and control of drinking water quality Ricardo. Pan American Center for Sanitary Engineering and Environmental Sciences.
2. Flemming H.C. 2002. Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures Applied Microbiology and Biotechnology, 59, 629-640.
3. Windergen J., Flemming H.C. 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 214, 417-423.
4. Drenkard E., Ausubel F.M., 2002. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. Nature 416 (6882), 740-743.
5. Hardalo C., Edberg S.C., 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. Crit. Rev. Microbiol. 23 (1), 47-75.
6. Schwartz T., Kohnen W., Jansen B., Obst U., 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiol. Ecol. 43 (3), 325-335.
7. Grobe S., Wingender J., Flemming H.C. 2001. Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. Int. J. Hyg. Environ. Health 204, 139 – 142.
8. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. 1994. Bergey's Manual of determinative Bacteriology, 9th Edition, London.
9. Bert F., Maubecb E., Bruneaua B., Berrya P., Lambert-Zechovskya N. 1998. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. Journal of Hospital Infection, 39, 53-62.

10. Favero M.S., Carson L.A., Bond W.W., Petersen N.J., 1971. *Pseudomonas aeruginosa* growth in distilled water from hospital taps. *Science* 173, 836–838.
11. Botzenhart K., Kufferath R. 1976. On the growth of various Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Alcaligenes* spec. in distilled water, de-ionized water, tap-water and mineral salt solution. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B* 163, 470–485.
12. Van Der Kooij, D., Oranje, J.P., Hijnen, W.A., 1982. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in tap water in relation to utilisation of substrates at concentration of a few micrograms per liter *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1086–1095.
13. Hardalo C., Edberg S.C. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. rev. Microbiol.* 23, p. 47-75.
14. de Victorica J., Galván M. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* as an indicator of health risk in water for human consumption. *Water Science and Technology*, 43, 49–52.
15. Zichichi L., Asta G., Noto G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis after shower/bath exposure. *International Journal of Dermatology.* 39, 270 – 274.
- [16] WHO, 2011. *Guidelines for Drinking Water Quality*, vol. 1, 4rd ed. Geneva.
- [17] Amsaveni V., Sudha S.S. 2010. Phytochemical Studies of Antibacterials for Multi-Drug Resistant Nosocomial Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Science and Technology.* 61, 1895-1905.
- [18] Wang H., Meng J., Jia M., Ma X., He G., Wang R. 2010. oprM as a new target for reversion of multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides H. Wang et al. Reversal of antibiotic resistance in MDR-PA. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 60, 275-282.
- [19] Khan A. A., Cerniglia C. E. 1994. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the Exotoxin A gene using PCR. *Applied and environmental microbiology*, 60, 3739-3745
- [20] Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *OJ L* 330, 5.12.1998, pp. 32–54.
- [21] Penna V.T.C., Martins S.A.M., Mazzola P.G. 2002. Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of typical water purification system. *BMC Public Health.* 2, 13-24.
- [22] Behrends H.B. 2003. *Pseudomonas* in a new hospital building. *Gesundheitswesen.* 65, 736-737.
- [23] Moritz M.M., Flemming H.K., Wingender, J. 2010. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 213, 190–197.
- [24] Grobe S., Wingender J., Truper H. G. 1995. Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 94-102.
- [25] Völker S., Schreiber C., Kistemann T. 2010. Drinking water quality in household supply infrastructure—A survey of the current situation in Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213, 204-209.
- [26] Zamberlan da Silva M.E., Santana R.G., Guilhermetti M., Filhoc I.C., Endoc E.H., Nakamura T.U., Nakamura C.V., Filhoc B.P.D. 2008. Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water *Int. J. Hyg. Environ. Health* 211 504–509.
- [27] STN EN 16266. 2008. Kvalita vody. Stanovenie *Pseudomonas aeruginosa* membránovou filtráciou
- [28] STN EN ISO 19458. 2007 Kvalita vody. Odber vzoriek na mikrobiologickú analýzu.