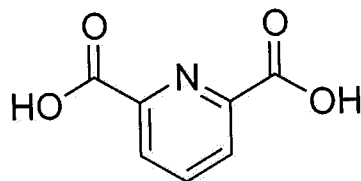


Sposób wyznaczania obecności mikroorganizmów w pierwotnie odwodnionych osadach zwłaszcza w instalacjach wodociągowych

Przedmiotem wynalazku jest sposób wyznaczania obecności mikroorganizmów w pierwotnie odwodnionych osadach wytworzonych w instalacjach zwłaszcza wodociągowych.

Dotychczas znane są z literatury sposoby oznaczania obecności życia biologicznego w osadach polegają na skomplikowanych, wieloodczynnikowych i czasochłonnych zabiegach związanych z izolacją mikroorganizmów lub DNA, namnażaniem, posiewami itp. Wykorzystywana jest skomplikowana aparatura pomiarowa.

W literaturze patentowej i naukowej analizy FTIR posłużyły do zbudowania modelu regresyjnego służącego do szybkiego przewidywania zawartości kwasu pirydyno-2,6-dikarboksylowego uwalnianego podczas obróbki termicznej pod ciśnieniem endospor bakterii z rodzaju *Bacillus* (Prabhakar, 2009). Ponadto były prowadzone badania rozróżnienia kwasu pirydyno-2,6-dikarboksylowy od kwasu dinikotynowego, co jest istotne przy wykrywaniu obecności węgla. Prabhakar (2009) w swojej pracy jako pasma absorpcyjne charakterystyczne dla kwasu pirydyno-2,6-dikarboksylowego podaje pasma położone przy liczbach falowych: 1570 cm^{-1} przypisane wiązaniu C-N w pierścieniu i 1439 cm^{-1} – pasmo odpowiadające drganiom pierścienia pirydynowego. Goodacre i in. (2000) przeprowadzili analizę komórek zarówno wegetatywnych jak i endospor 36 szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* za pomocą spektroskopii mas z pirolizą w punkcie przemiany magnetycznej oraz spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera, w wyniku czego stwierdzili, że drgania pierścienia pirydynowego ($1447\text{--}1439\text{ cm}^{-1}$) budującego kwas dipikolinowy są wysoce charakterystyczne dla spor i mogą być wykorzystywane jako ich biomarker.



Kwas dipikolinowy (kwas pirydyno-2,6-dikarboksylowy), wzór sumaryczny $C_7H_5O_4N$ lub $(C_5H_3N)(COOH)_2$

W literaturze dotyczącej badania osadów powstałych we wnętrzu rur wchodzących w skład układów dystrybucji wody pitnej niewiele uwagi poświęcono badaniu osadów „pierwotnie odwodnionych”, a gdy badano już osady odwodnione, to pobieżnie traktowano interpretację otrzymanych wyników pod kątem obecności biofilmu (Echeverría i in. 2009; Chawla i in. 2012). Analizę osadów powstałych we wnętrzu magistrali wodociągowej pod kątem obecności biofilmu, z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR) – przeprowadzili Echeverría i in. (2009). Przeprowadzali oni analizę fizykochemiczną osadów utworzonych na powierzchni różnych elementów złożonej magistrali wodociągowej takich jak: rurociągi wykonane ze stali, zbiorniki wykonane z betonu oraz rury żelbetowe. Analiza FTIR osadów charakteryzujących się brązową barwą wykazała obecność pasm absorpcyjnych charakterystycznych dla biofilmu (w zakresie liczb falowych: 2950 cm^{-1} oraz 2880 cm^{-1}). Chawla i in. (2012) badali natomiast skład chemiczny osadów utworzonych we wnętrzu trzech różnych rur wchodzących w skład układu dystrybucji wody pitnej. Widma FTIR uzyskane dla badanych próbek wskazywały zarówno na obecność substancji nieorganicznych, jak i organicznych, w tym materiału biologicznego, co sugerowały pasma absorpcyjne przypisane amidom.

Stwierdzono nieoczekiwanie podczas prowadzonych prac badawczych, że możliwe jest wykrycie bakterii w pierwotnie odwodnionych osadach powstałych we wnętrzu rur, którymi transportowana jest ciecz na przykład woda wodociągowa za pomocą kwasu pirydyno-2,6-dikarboksylowy (kwasu dipikolinowego, DPA). Kwas dipikolinowy DPA stanowi specyficzny składnik endospor bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Clostridium* stanowi 2-15% suchej masy endospor (Navarro i in., 2008). Ponadto kwas DPA jest zaangażowany w stan uśpiania mikroorganizmów, odporność na ciepło oraz germinację przetrwalników (Kort i in. 2005). Jako charakterystyczne pasma odpowiadające obecności kwasu dipikolinowego w próbkach osadów przyjąć można między innymi pasma przy liczbach falowych: 2800 cm^{-1} (przypisane drganiom

rozciągającym wiązania O-H), 3113 cm^{-1} (odpowiadające drganiom rozciągającym wiązania C-H w płaszczyźnie pierścienia), 3070 cm^{-1} (odpowiadające drganiom rozciągającym wiązań C-H), 1640 cm^{-1} (odpowiadające drganiom rozciągającym wiązania C=O), 1645 cm^{-1} (odpowiadające drganiom rozciągającym wiązania C=O w bezwodnym DPA w postaci kryształu), 1580 cm^{-1} (odpowiadające drganiom rozciągającym pierścienia aromatycznego), 1447 cm^{-1} (przypisane drganiom rozciągającym pierścienia aromatycznego) oraz 1423 cm^{-1} (przyporządkowane drganiom rozciągającym pierścienia aromatycznego) (McCann & Laane, 2008).

Celem wynalazku jest opracowanie prostego i ogólnego sposobu pozwalającego na wykrycie obecności mikroorganizmów w pierwotnie odwodnionych osadach powstałych we wnętrzu rur dystrybucji cieczy.

Cel ten osiągnięto poprzez wykorzystanie kwasu dipikolinowego jako wskaźnika obecności przetrwalników bakterii techniką spektroskopii w podczerwieni (IR) zwłaszcza w metodzie odbicia rozproszonego (DRIFT).

Sposób według wynalazku polega na tym, że zebrany osad zwłaszcza z instalacji wodociągowej suszy się w temperaturze pokojowej, poddaje homogenizacji korzystnie poprzez rozdrobnienie i rozcieńcza z czystym bromkiem potasu (KBr) w stężeniu masowym od 1% do 10%, korzystnie 5% próbki, następnie rejestruje się widmo IR próbki w zakresie podczerwieni 4000 – 400 cm^{-1} , wyznacza się maksima w widmie próbki i oblicza co najmniej trzy ilorazy intensywności wybranych maksimów, korzystnie $KM_{3114/3071}$, $KM_{1580/3114}$, $KM_{1447/3114}$, po czym wykrywa się obecność kwasu pirydyno-2,6-dikarboksylowego (kwas dipikolinowy, DPA).

Zaletą rozwiązania według wynalazku jest prosty sposób oznaczenia obecności bakterii w osadów w rur wodociągowych. Obecność bakterii w skorodowanych rurach dystrybucji wody może być oznaczana w oparciu o oznaczenie kwasu dipikolinowego, który jest związkiem swoistym dla przetrwalników i nie występuje w komórkach wegetatywnych. Analizuje się cały zakres pasm intensywności kwasu dipikolinowego. Szczególnie korzystne jest stwierdzenie maksimów przy 3114, 3071, 1580 oraz 1447 cm^{-1} w widmie IR osadów.

Przedmiot wynalazku objaśniono w poniższym przykładzie wykonania.

Przykład

Z rury wodociągowej pobrano pierwotnie odwodniony, samoistnie utworzony osad, który wysuszono w temperaturze pokojowej, uzyskując powietrznie suchy osad. Powietrznie suchy osad rozdrobniono używając moździerza. Zaleca się użycie młynka do homogenizacji próby w celu zwiększenia spójność cząstek i zniwelowania udziału szumów w widmie IR.

Rozdrobniony osad mieszamy ze spektralnie czystym bromkiem potasu (KBr) w stężeniu masowym od 1% do 10%, korzystnie uzyskując 5% stężenie osadu w próbce czyli zmieszać 50 mg osadu z 950 mg bromku potasu (KBr). Bromek potasu KBr jest używany w spektroskopii IR do wytwarzania elementów optycznych i jako ośrodek dla próbek, tzw. pastylki KBr, proszku, ze względu na niską absorpcję promieniowania IR. Optymalna ilość osadu zależy od procentu transmisji najsilniejszego pasma w otrzymanym spektrum, która powinna mieścić się w zakresie od 10% do 50%. Próbkę z KBr ponownie dokładnie roztało w moździerz. Korzystne jest użycie młynka do dokładnej homogenizacji próbki z KBr. Ujednorodnioną próbkę umieszczono w dołku przystawki PIKE, Easi Diff Diffuse Reflectance Accessory do ciał stałych (PIKE Technologies, Madison, USA) w transparentnej matrycy solnej z bromku potasu (KBr, spektralnie czysty). Za pomocą spektrometru 135 (Bio-RAD, Warszawa, Polska) wyposażonego w detektor piroelektryczny DTGS w zakresie liczb falowych $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, z rozdzielczością 4 cm^{-1} i oprogramowania Win-IR Foundation (Bio-RAD, Warszawa, Polska), rejestrowano widmo próbki w formacie Kubelka-Munk w odniesieniu do widma czystego KBr jako tła. Wykorzystano technikę FTIR-DRIFT do analizy ciała stałego (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform*) polegającą na pomiarze rozproszonego odbicia od warstwy powierzchniowej badanej, sproszkowanej próbki, umieszczonej w transparentnej matrycy solnej z bromku potasu (KBr spektralnie czysty).

Metodyka została opracowana w oparciu o instrukcję producenta przystawki do rejestracji widm FT-IR DRIFT (PIKE, 2009) i polegała na rejestracji widm ujednorodnionych próbek stałych wysuszonych w temperaturze pokojowej o stężeniu 5% w KBr (w/w). Ponadto możliwa jest także analiza widm absorbancji i transmitancji, jednak korzystniejsze jest wykorzystanie funkcji Kubelka-Munk do analiz próbek stałych, gdyż uzyskuje się redukcję szumów. Badano zakres podczerwieni od $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Dla każdej próbki wykonano 64 skany, przy opóźnieniu początkowym 300s, które było niezbędne do wyrównania warunków po umieszczeniu próbki w komorze pomiarowej. Do obróbki danych wykorzystano oprogramowanie Win-IR (BIO-RAD). Uzyskiwano uśrednione widma w formacie Kubelka-Munk (KM) w odniesieniu do widma spektralnie czystego KBr jako tła. Stwierdzono obecność kwasu dipikolinowego w osadzie pobranym z wnętrza skorodowanych rur wodociągowych w oparciu o badanie całego zakresu absorpcji tego związku i wystąpienie maksimum przy $3114, 3071, 1580$ oraz 1447 cm^{-1} .

Zastosowano analizę porównawczą osadu i osadu z dodatkiem wzorca wewnętrznego. Wzorzec wewnętrzny stanowił spektralnie czysty kwas dipikolinowy wprowadzony do próbki

osadu w stężeniu 2%. Stwierdzenie obecności kwasu DPA w osadach w oparciu o podobieństwo widm oraz oznaczenie maksimum KM przy wybranych długościach fali potwierdziło wystąpienie bakterii przetrwalnikujących.

W widmie IR czystego kwasu dipikolinowego występują intensywne pasma w zakresie:

- 3400 cm^{-1} – 2400 cm^{-1} , korzystnie jeśli maksima obecne są przy 3114 cm^{-1} , 3070 cm^{-1} , 2830 cm^{-1} , 2564 cm^{-1}
- 1700 cm^{-1} – 1600 cm^{-1} , korzystnie maksimum przy 1646 cm^{-1} ,
- 1600 cm^{-1} – 1500 cm^{-1} , korzystnie maksimum przy 1574 cm^{-1} ,
- 1500 cm^{-1} – 1400 cm^{-1} , korzystnie maksimum przy 1464 cm^{-1} , 1416 cm^{-1} ,
- 1400 cm^{-1} – 1200 cm^{-1} , korzystnie maksimum przy 1333 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} , 1269 cm^{-1}
- 1000 cm^{-1} – 800 cm^{-1} , korzystnie maksimum przy 929 cm^{-1} , 855 cm^{-1} ,
- 600 cm^{-1} – 400 cm^{-1} , korzystnie maksimum przy 588 cm^{-1} , 525 cm^{-1} .

Wyznaczono iloraz intensywności KM wybranych maksimum w osadach i czystego kwasu dipikolinowego: $KM_{3114/3071}$, $KM_{1580/3114}$, $KM_{1447/3114}$. Jeśli w widmach IR osadów współczynnik zmienności tych ilorazów był mniejszy niż 5% w stosunku do ilorazów maksimum czystego kwasu dipikolinowego stwierdzano uczestnictwo bakterii przetrwalnikujących w tworzeniu tego osadu. Przyjętym markerem obecności kwasu dipikolinowego było pasmo KM przy liczbie falowej 1447 cm^{-1} , które odpowiada drganiom pierścienia pirydynowego.



Literatura

- Chawla V., Gurbuxani P. G., Bhagure G. R. 2012. Corrosion of water pipes: a comprehensive study of deposits. *Journal of Mineral & Materials* 11 (105): 479–492. doi: 10.4236/jmmce.2012.115034
- Echeverría F., Castaño J. G., Arroyave C., Peñuela G., Ramírez A., Morató J. 2009. Characterization of deposits formed in a water distribution system. *Ingeniare. Revista Chilena de ingeniería*. 17 (2): 275–281.
- Goodacre, R., Shann, B., Gilbert, R. J., Timmins, E. M., McGovern, A. C., Alsberg, B. J., Kell, D. B., & Logan, N. A. (2000). Detection of the Dipicolinic Acid Biomarker in Bacillus Spores Using Curie-Point Pyrolysis Mass Spectrometry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 72 (1), 119–127. DOI: 10.1021/ac990661i.
- Kort, R., O'Brien A. C., van Stokkum, I. H. M., Oomes, S. J. C. M., Crielaard, W., Hellingwerf, K. J., Brul, S. (2005). Assessment of Heat Resistance of Bacterial Spores from Food Product Isolates by Fluorescence Monitoring of Dipicolinic Acid Release. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (7), 3556–3564. DOI: 10.1128/AEM.71.7.3556–3564.2005
- McCann, K., i Laane, J. (2008). Raman and infrared spectra and theoretical calculations of dipicolinic acid, dinicotinic acid, and their dianions. *Journal of Molecular Structure*, 890 (1–3), 346–358. DOI: 10.1016/j.molstruc.2008.05.046
- Navarro, A. K., Peña, A., & Pérez-Guevara, F. (2007). Endospore dipicolinic acid detection during Bacillus thuringiensis culture. *Letters in Applied Microbiology*, 46 (2), 166–170. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02277.x.
- Prabhakar, V. (2009). Rapid quantification of dipicolinic acid from spores treated by pressure assisted thermal processing using infrared spectroscopy. W: Materiały 2009 IFT Annual Meeting, 6–9 czerwiec, 2009 (str.1–13). Anaheim, CA, USA.

