



Charakterystyka mikroorganizmów biofilmów pochodzących z punktów czerpalnych wody do picia

Izabela Biedroń^{}, Teodora M. Traczewska^{**}, Grażyna Płaza^{*}*
^{}Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych*
*^{**}Politechnika Wroclawska*

1. Wstęp

Sieć wodociągową zawiera mikroorganizmy zarówno swobodnie pływające jak i osiadłe na powierzchniach ciał stałych. Błona biologiczna nie tworzy jednorodnej warstwy na wewnętrznych powierzchniach rur (Paris i in. 2009). Jest ona stosunkowo cienka oraz nierównomierna (Abe i in. 2012). W zależności od warunków hydraulicznych błona biologiczna może przybierać dwie formy. Przy stałym przepływie wody tworzy warstwę na powierzchni materiałów, natomiast w przypadku stagnacji lub przy bardzo niskich wartościach przepływu wody tworzy przestrzenną strukturę z licznymi kanałami (Boe-Hansen i in. 2002). Biofilm pojawia się w systemach dystrybucji już po kilku tygodniach jej użytkowania, a tempo jego wzrostu zależne jest od charakterystyki danej sieci dystrybucji. Średnio około 76% powierzchni rur jest pokrytych błoną biologiczną (Lehtola i in. 2004, Martiny i in. 2005). Czynniki wpływające na rozwój błony biologicznej to, m.in., jakość mikrobiologiczna, temperatura i odczyn wody, warunki hydrauliczne, rodzaj materiałów, z jakich wykonana jest sieć, dostępność składników odżywczych oraz oporność mikroorganizmów na dezynfekcję.

Do tej pory niewiele wiadomo na temat bioróżnorodności mikroorganizmów tworzących błonę biologiczną w systemach dystrybucji wody do picia. Wynika to przede wszystkim z utrudnionym poborem próbek

(czasami wręcz niemożliwym) oraz z faktu, że standardowe badania błony biologicznej ograniczane są do identyfikacji obecności mikroorganizmów potencjalnie patogennych (mikrobiologiczne wskaźniki jakości wody). Błona biologiczna jest w dużej mierze tworzona przez mikroorganizmy autochtoniczne sieci wodociągowej, wśród których rzadko występują organizmy wskaźnikowe. Obserwacje na podstawie laboratoryjnych modeli systemów dystrybucji wody wskazują, że w miarę dojrzewania błony biologicznej, zagęszczenie komórek ulega stabilizacji i wzrasta różnorodność gatunkowa.

Każdy system dystrybucji charakteryzuje się własnym składem gatunkowym mikroorganizmów, dlatego też niemożliwe jest wyciągnięcie ogólnych wniosków odnośnie bioróżnorodności błony biologicznej (Nevel i in. 2013).

Celem pracy było scharakteryzowanie flory bakteryjnej tworzącej błonę biologiczną w sieci wodociągowej miasta Wrocławia oraz dobór metod mikrobiologicznych adekwatnych dla wskazanie gatunków charakteryzujących badany układ.

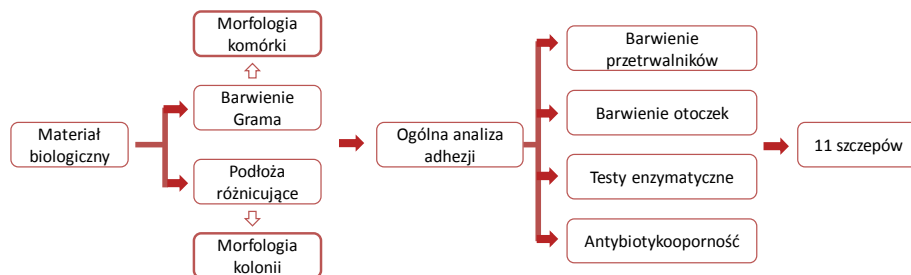
2. Materiał i metody

2.1. Materiał biologiczny

Materiałem badawczym były próbki wymazów błon biologicznych pobranych w 17 wybranych punktach czerpalnych na terenie Wrocławia. Z pobranego materiału wyizolowano metodami hodowlanymi czyste szczepy bakteryjne. W wyniku czego wybrano grupę mikroorganizmów, na której prowadzono dalsze badania. Na rysunku 1 przedstawiono ogólny schemat procesu izolacji i charakterystyki wybranych szczepów bakteryjnych o cechach predysponujących do tworzenia obrotów biologicznych.

2.2. Badanie wrażliwości antybiotykowej metodą dyfuzyjno-krążkową

Wrażliwość badanych szczepów na poszczególne antybiotyki badano metodą dyfuzyjno-krążkową zgodnie z metodyką (Fiebelkorn i in. 2003). Do analiz użyto krążków bibułowych nasączonych antybiotykami firmy Bio-Rad. Płytki z hodowlą bakteryjną oraz naniesionymi krążkami inkubowano w temperaturze 22°C. Po 48 godzinach zmierzono wielkość strefy zahamowania wzrostu.



Rys. 1. Schemat procesu izolacji i charakterystyki wybranych szczepów

Fig. 1. Scheme of the isolation and characterization of selected strains

Wartości graniczne przyjęto zgodnie z zaleceniem producenta: odporne < 15 mm, średniowrażliwe 16-25 mm, wrażliwe > 25 mm. Stosowano następujące grupy antybiotyków: penicyliny (amoksycylina (25 µg), ampicylina (25 µg)), cefulosporyny (ceftazydym (30 µg), cefalotyna (30 µg), cefuroksym (30 µg)), chinoliny (kwas nalidyksowy (30 µg)), aminoglikozydy (amikacyna (30 µg), doksylicyna (30 µg), erytromycyna (30 µg), gentamycyna (30 µg), kanamycyna (30 µg), neomycyna (30 µg), streptomycyna (25 µg), tobramycyna (10 µg)), tetracykliny (tetracyklina (30 µg)), sulfonamidy (trimetoprim (5 µg)), rifampicyny (rifampicyna (30 µg)), inne (chloramfenikol (30 µg), nitrofurantoina (200 µg), novobiocyna (30 µg)).

2.3. Izolacja i charakterystyka chemiczna zewnątrzkomórkowych polimerów (EPS)

Ekstrakcja zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (EPS) wykonano zgodnie z metodą opisaną przez Bala (Bala i in., 2010). W wyizolowanych EPS oznaczono zawartość polisacharydów z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody opracowanej wg. Dubois i Masuko (Dubois i in., 1956, Masuko i in., 2005) Pomiarów dokonywano spektrofotometrycznie przy długości fali 490 nm. Jako wzorca użyto glukozy. Natomiast zawartość protein oznaczono zmodyfikowaną metodą Bradforda (Bradford, 1976; Beech i in., 1998). Pomiarów dokonywano spektrofotometrycznie przy długości fali 595 nm Jako wzorca użyto surowiczą albuminą wołową (BSA).

2.4. Ocena zdolności bakterii do adhezji

Do oznaczenia adhezji zastosowano metodę mikroplótkową z wykorzystaniem fioletu krystalicznego. Zastosowano procedurę opisaną przez Anderssona (Andersson i in., 2009). Mikroplótki inkubowano w temperaturach 4, 22 i 37°C. Pomiarów dokonywano spektrofotometrycznie przy długości fali 590 nm. Szczepy klasyfikowano do 4 kategorii wg. Zhanga (Zhang i in., 2014):

- (1) = Ac – brak zdolności tworzenia błony biologicznej,
 - (2) $Ac \leq (2xAc)$ – słaba zdolność tworzenia błony biologicznej,
 - (3) $(2xAc) \leq (4xAc)$ – średnia zdolność tworzenia błony biologicznej,
 - (4) $(4xAc) \leq$ silna zdolność do tworzenia błony biologicznej,
- gdzie Ac jest średnią absorbancji próbki negatywnej.

2.5. Ocena aktywności enzymatycznej szczepów metodą ApiZYM

Do oznaczenia aktywności enzymów hydrolitycznych został użyty test paskowy API ZYM (bioMerieux). Jest to półilościowa metoda umożliwiająca ocenę 19 enzymów hydrolitycznych: fosfatazy zasadowej, esteraza C-4, lipazy esterazowej C-8, lipazy C-10, arylamidazy leucynowej, arylamidazy walinowej, arylamidazy cysteinowej, trypsyny, α -chymotrypsyny, kwaśnej fosfatazy, fosfohydrolazy naftolowej AS-BI, α -galaktozydazy, β -galaktozydazy, β -glukuronidazy, α -glukozydazy, β -glukozydazy, N-acetylo-beta-glukozominidazy, α -mannozydazy, α -fukozydazy. Procedurę przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta. Paski ApiZYM inkubowano w temperaturze 22°C.

2.6. Identyfikacja szczepów

Izolacja genomowego DNA z bakterii przeprowadzono z użyciem zestawu Extractme DNA bacteria (DNA-Gdańsk), wg dostarczonego protokołu. Amplifikacja produktu w rejonie genu kodującego podjednostkę rybosomalną 16S przeprowadzono z wykorzystaniem odczynników do reakcji PCR. Mieszanina reakcyjna miała objętość 50 μ l i zawierała: DNA – 30 ng/ μ l, 5 μ l 2 mM 10 \times buforu reakcyjnego, 2,5 mM dNTP, po 10 pM każdego startera, 0,25 U polimerazy. Wykorzystano startery o sekwencjach:

27F 5'-CACCAGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG-3',
1492R 5'-GGC/TTACCTTGTTACGACTT-3'.

Mieszaniny po reakcji PCR zostały rozdzielone elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym w celu kontroli jakości amplifikowanych produktów. Produkty PCR zostały wycięte z żelu i oczyszczone z wykorzystaniem zestawu EXTRACTME DNA GEL-OUT, a ich czystości sprawdzone za pomocą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym (40 minut, 90V) zawierającym 5 μ l bromku etydyny (0,5 μ l/ml) (Moss i in. 2006). Produkty PCR zostały zsekwencjonowane przy użyciu 3730 XL DNA Analyzer firmy Life Technologies (sekwencjonowanie dwukierunkowe). Wyniki zostały zanalizowane z wykorzystaniem bazy danych NCBI oraz oprogramowania BLAST. Do analizy niektórych sekwencji zostało zastosowane porównanie typu 'alignment' regionu 16S wybranych gatunków z otrzymanymi sekwencjami z wykorzystaniem programu CLC DNA Workbench 6.

3. Wyniki i dyskusja

Selekcja mikroorganizmów wyizolowanych z próbek błony biologicznej opierała się na rozpoznaniu drobnoustrojów o wysokiej zdolności do adhezji oraz charakteryzujących się jednocześnie opornością w stosunku do antybiotyków. Ogółem wyizolowano 1376 szczepów psychrofilnych, 463 mezofilnych oraz 181 szczepów o optimum wzrostowym w temperaturze 26°C. Na podstawie analizy morfologii kolonii oraz komórek (barwienie Grama, wstępna analiza enzymatyczna) wytypowano 178 szczepów, które zostały pogrupowane w 3 zespoły funkcyjne w zależności od optymalnej temperatury wzrostu. W wyniku ostatecznej selekcji wybrano 11 szczepów, z których co najmniej 8 było obecnych w każdym punkcie poborowym. Założono, że są to szczepy wskaźnikowe dla błony biologicznej wrocławskiej sieci wodociągowej.

Wyniki analizy sekwencji 16S rDNA dla 11 szczepów zestawiono w tabeli 1. Tak jak przedstawiono w tabeli 1, na podstawie sekwencji 16S rDNA, trudno było jednoznacznie zakwalifikować wybrane szczepy do określonych gatunków. Uzyskane wyniki potwierdzają, że identyfikacja mikroorganizmów pochodzących z środowisk skrajnych, takich jak biofilm utworzony w sieci wodociągowej, który dodatkowo został poddany czynnikom stresowym jest zadaniem złożonym i trudnym. W celu dokładniejszej identyfikacji takich szczepów należy korzystać z technik

molekularnych wspartych metodami biochemicznymi oraz klasycznymi analizami mikrobiologicznymi.

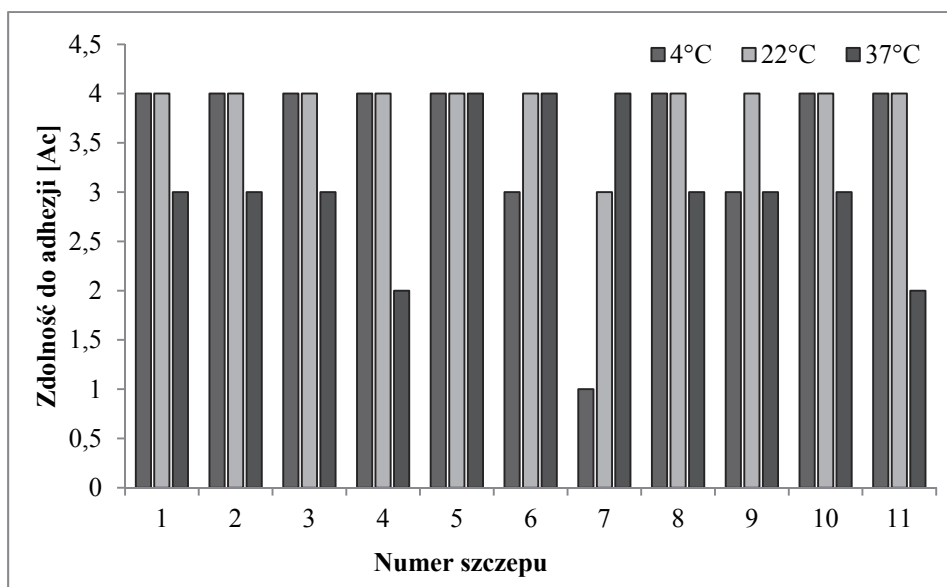
Tabela 1. Identyfikacja szczepów metodą 16S rDNA

Table 1. Strains identification by 16S rDNA

Numer	Gatunek	Prawdopodobieństwo identyfikacji (%)
1	<i>Advenella incenata</i>	99
2	<i>Moraxella osloensis</i> lub <i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	98
3	<i>Kocuria rhizophila</i> lub <i>Psychrobacter sp.</i>	95
4	<i>Microbacterium oxydans</i>	97
5	<i>Bacillus thuringiensis</i>	96
6	<i>Advenella incenata</i>	98
7	rodzaj <i>Advenella</i>	99
8	<i>Micrococcus luteus</i>	96
9	rodzaj <i>Micrococcus</i>	98
10	rodzaj <i>Micrococcus</i>	99
11	rodzaj <i>Pseudomonas</i>	99

Ocenę adhezji 11 szczepów przeprowadzono w temperaturze 4°C. Uwzględniono w ten sposób możliwość obecności mikroorganizmów autochtonicznych, pochodzących z wody surowej (infiltracyjnej lub podziemnej). W 4°C, 8 z 11 szczepów wykazywało silne zdolność do adhezji, natomiast jeden szczep oznaczony jako 7 (rodzaj *Advenella*) wykazywał w tych warunkach brak zdolności do aktywnego przylegania do podłoża. Analiza adhezji w temperaturze optymalnej dla rozwoju mikroorganizmów psychrofilnych (22°C) wykazała, że 10 szczepów posiadało silne zdolności do przylegania, natomiast wspomniany szczep 7 wykazywał średnie zdolności do tworzenia błony biologicznej. Analiza adhezji w temperaturze sprzyjającej rozwojowi mikroorganizmów mezofilnych (37°C) wykazała, że wśród większości szczepów nastąpiło obniżenie zdolności przylegania do podłoża podczas gdy dla szczepu 7 była to temperatura optymalna dla uruchomienia procesu adhezji. *Bacillus thuringiensis* (szczep 5) wykazał wysoką zdolność do tworzenia biofilmu we wszyst-

kich testowanych temperaturach. Na rysunku 2 przedstawiono zdolności adhezyjne wybranych szczepów bakteryjnych. Simoes i in. (Simoes i in. 2007) uważają, że zdolność do adhezji jest rzeczywistą reakcją mikroorganizmu na warunki panujące w środowisku. Wysokie właściwości adhezyjne są wynikiem nie tylko mechanizmów fizykochemicznych, ale zależą również od obecności wici, fimbrii lub produkcji zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych. Autorzy twierdzą, że mikroorganizmy o wysokim powinowactwie do powierzchni mogą odgrywać decydującą rolę w początkowych fazach tworzenia błony biologicznej.

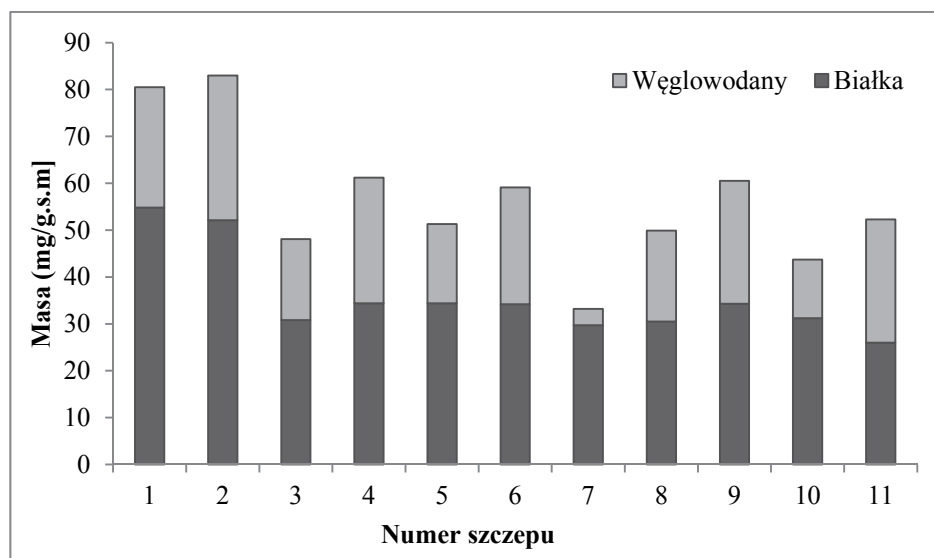


Rys. 2. Analiza zdolności do adhezji wybranych szczepów

Fig. 2. Adhesion of selected strains

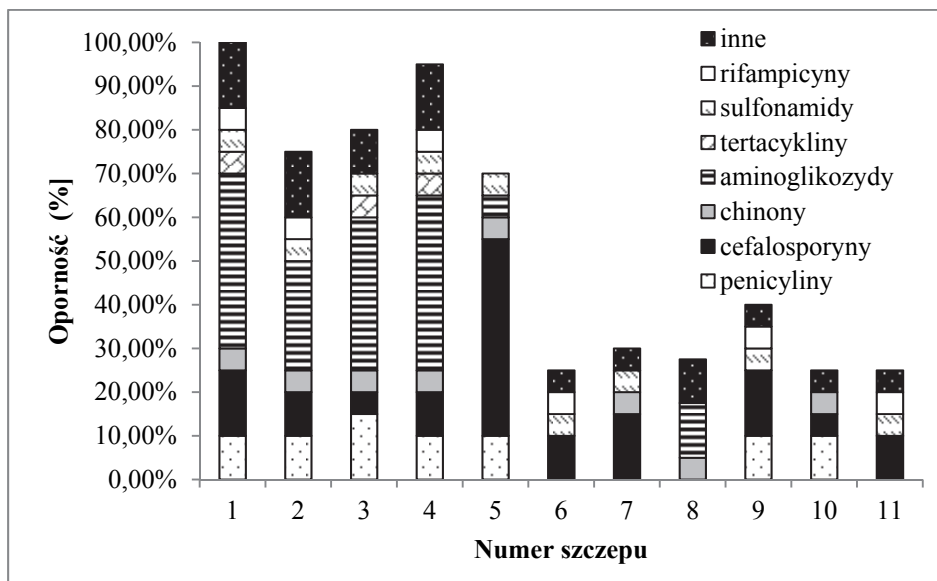
Charakterystyka wyizolowanych ze szczepów zewnątrzkomórkowych polimerów (EPS) wykazała, przewagę związków białkowych (rysunek 3). W przypadku szczepu 7 (rodzaj *Advenella*) EPS charakteryzowały się wysoką zawartością białek (29,7 mg/g.s.m.) w porównaniu do węglowodanów (3,5 mg/g.s.m.), zawartość białek była aż ośmiokrotnie większa niż węglowodanów. W przypadku dwóch szczepów oznaczonych jako 1 (*Advenella incenata*) i 2 (*Moraxella osloensis* lub *Enhydrobacter aerosaccus*) stwierdzono najwyższą zawartość białek w strukturze

EPS, kolejno 54,8 i 52,1 mg/g s.m, były to też szczepy, o największej łącznej masie EPS. Natomiast należący do rodzaju *Pseudomonas* (szczep 11) w strukturze EPS posiadał prawie takie same ilości białek (26 mg/g.s.m.) jak i polisacharydów (26,3 mg/g.s.m.).



Rys. 3. Skład zewnątrzkomórkowych polimerów
Fig. 3. Composition of the extracellular polymers

W badaniach wrażliwości na antybiotyki wykazano, że wyizolowane szczepy wykazywały zróżnicowaną oporność (rysunek 4). Dwa szczepy oznaczone jako 1 (*Advenella incenata*) i 4 (*Microbacterium oxydans*) były odporne na wszystkie antybiotyki z badanych grup (z wyjątkiem cefuroksyny w przypadku szczepu nr 4). Szczep 2 charakteryzował się średnią wrażliwością na związki z grupy aminoglikozydów (amikacyna, doksycylina, gentamycyna) oraz tetracykliny. Najbardziej wrażliwymi szczepami na działanie antybiotyków były szczepy 6 (*Advenella incenata*), 11 (szczep z rodzaju *Pseudomonas*) oraz 10 (szczep z rodzaju *Micrococcus*). Antybiotykiem w stosunku, do którego wszystkie szczepy wykazywały oporność był nitrofuranton. Natomiast 82% (9 szczepów) było opornych na trimetoprim i ceftazydim.



Rys. 4. Analiza antybiotykooporności wybranych szczepów
Fig. 4. Analysis of antibiotic resistance of the selected strains

W wodzie wodociągowej stwierdza się obecność bakterii opornych na chemioterapeutyki (Pathiak i Gopal 2008). Armstrong i in. (1981) zauważyli, że mikroorganizmy odporne na antybiotyki, wykazują również oporność na procesy chlorowania. Autor sugeruje również, że stres środowiskowy wywołany procesami dezynfekcji może w efekcie zwiększać oporność bakterii na antybiotyki. Xi i wsp. (2009) w swojej pracy wskazuje na możliwość indukcji chlorem oraz monochloraminą ekspresji białek budujących pompy wielolekowe (multidrug efflux pump) (Xi i in. 2009). Udokumentowano, że mikroorganizmy tworzące obrzości biologiczne są znacznie bardziej odporne na stres środowiska dzięki zmianom genotypu jak i fenotypu, a kluczowa wśród tych adaptacji jest oporność wielolekowa (Maria-Litran i in. 2000). Zdolność do adhezji i jednoczesna oporności na antybiotyki oraz obecność w badanych próbkach, potwierdza pochodzenie 11 wybranych szczepów z błony biologicznej jako form autochtonicznych dla badanego środowiska.

Wyizolowane bakterie charakteryzowały się również zróżnicowaną aktywnością enzymatyczną (tabela 2). Wszystkie badane szczepy wykazały aktywność fosfohydrolazy naftolowej, natomiast żaden z badanych szcze-

pów nie wykazał aktywności fosfatazy zasadowej, lipazy esterazowej, α - i β -galaktozydazy. Najwyższą aktywność enzymatyczną wykazywał szczep nr 3 (tabela 2). Wyniki wskazują, że pomimo panujących w sieci wodociągowej warunków oligotroficznych i niskiej temperatury, mikroorganizmy zachowują swą aktywność metaboliczną której wyrazem jest stwierdzona aktywność enzymatyczna.

Wyselekcjonowane mikroorganizmy były szczepami wspólnymi dla próbek pobranych z 17 punktów poborowych oraz charakteryzowały się zdolnościami do adhezji oraz opornością na antybiotyki, co może wskazywać, że prezentowane w pracy szczepy mogą być uznane jako wskaźniki tworzenia błony biologicznej wrocławskiej sieci wodociągowej. Uważa się, że mikroorganizmy o wysokim powinowactwie do powierzchni mogą odgrywać decydującą rolę w początkowych fazach tworzenia błony biologicznej. Przypuszcza się, że zwiększona oporność i zdolność do przeżycia w środowisku jest związana z obecnością wzajemnych oddziaływań między różnymi mikroorganizmami oraz zdolnością do tworzenia wielogatunkowych konsorcjów, które mogą być powiązane ze zróżnicowaną aktywnością enzymatyczną. Zróżnicowana aktywność enzymatyczna drobnoustrojów tworzących biofilm może powodować degradację biotyczną materiałów technicznych. Zmiana struktury chemicznej materiału oraz powstawanie metabolitów pośrednich skutkuje zmianami formy chemicznej uwalnianych z podłoża substratów węglowych, które stają się łatwiej przyswajalne dla mikroorganizmów (Traczewska i in. 2014).

Znajomość bioróżnorodności i strategii zachowania mikroorganizmów tworzących biofilm, dostarcza informacji, które mogą być kluczowe dla utrzymania stabilności mikrobiologicznej sieci wodociągowej. Mechanizmy odpowiedzialne za przetrwanie przez drobnoustroje procesów dezynfekcji oraz utworzenie obrostów na wewnętrznych powierzchniach rur są mało znane. Przypuszcza się, że zwiększona oporność i zdolność do przeżycia w środowisku jest związana z wzajemnych oddziaływań między różnymi rodzajami bakterii oraz tworzenia wielogatunkowych konsorcjów (Simoes i in. 2007). Żaden z wyizolowanych szczepów nie należał do gatunków potencjalnie patogennych, co nie wyklucza możliwości przetrwania naniesionych wraz z wodą form patogennych w strukturach błony biologicznej.

Tabela 2. Aktywność enzymatyczna szczepów oznaczona testem ApiZYM
Table 2. Enzyme activities of isolated strains by ApiZYM method

Enzymy	Szczepy											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>Fosfataza zasadowa</i>												
<i>Esteraza C-4</i>	+		+	+	+							+
<i>Lipaza esterazowa C-8</i>												
<i>Lipaza C-10</i>								+				
<i>Arylamidaza leucynowa</i>	+	+	+	+	+		+					+
<i>Arylamidaza walinowa</i>			+									
<i>Arylamidaza cysteinowa</i>			+									+
<i>Trypsyna</i>			+									
<i>α-chymotrypsyna</i>			+	+	+		+					+
<i>Kwaśna fosfataza</i>				+	+	+				+	+	
<i>Fosfohydrolaza naftolowa AS-BI</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>α-galaktozydaza</i>												
<i>β-galaktozydaza</i>												
<i>β-glukuronidaza</i>					+							
<i>α-glukozydaza</i>			+	+			+	+	+	+		
<i>β-glukozydaza</i>			+			+						
<i>N-acetylo-beta-glukozominidaza</i>				+				+	+			
<i>α-mannozydaza</i>			+									
<i>α-fukozydaza</i>												+
SUMA	3	2	10	7	6	3	5	3	3	3	3	7

Analiza składu zespołu mikroorganizmów wchodzących w skład biofilmu wskazuje na dominację bakterii należących do Proteobacteria. Poznanie i zrozumienie ekologii mikroorganizmów systemów dystrybucji wody do picia – biofilmu obecnego w sieci wodociągowej umożliwi opracowanie odpowiednich norm bezpieczeństwa. Jest to istotne, ponieważ dojrzała błona biologiczna może stać się rezerwuarem mikroorganizmów potencjalnie patogennych oraz intensyfikować procesy korozji w wyniku reakcji metabolicznych prowadzonych przez drobnoustroje.

Literatura

- Abe, Y., Skali-Lami, S., Block, J., Francius, G. (2012). Cohesiveness and hydrodynamic properties of young drinking water biofilms. *Water Research*, 46, 1155-1166.
- Andersson, S., Dalhammar, G., Land, C., Rajaro, G. (2009). Characterization of extracellular polymeric substances from denitrifying organism *Comamonas denitrificans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 535-543.
- Armstrong, J., Shigeno, D., Calomiris, J., Seidler R. (1981). Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 277-283.
- Beech, I., Zinkevich, V., Tapper, R., Gubner, R. (1998). Direct involvement of an extracellular complex produced by a marine sulfate-reducing bacterium in deterioration of steel. *Geomicrobiology Journal*, 15, 121-134.
- Boe-Hansen, R., Albrechtsen, H., Arvin, E., Jorgensen, C. (2002). Dynamics of biofilm formation in model drinking water distribution system. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 51, 399-406.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 28-254.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F. (1956). Colometric method for determination sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Fiebelkorn, K., Crawford, S., McElmeel, M., Jorgensen J. (2003). Practical Disk Diffusion Method for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 4740-4744.
- Lehtola, M., Miettinen, K., Keinanen, M., Kekki, T., Laine, O., Hirvonen, A. (2004). Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Research*, 38, 3769-3779.
- Maira-Litrán, T., Allison, D., Gilbert P. (2000). Expression of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 243-247.
- Martiny, A., Albrechtsten, H., Arvin, E., Molin, S. (2005). Identification of Bacteria in Biofilm and Bulk Water Samples from a Nonchlorinated Model Drinking Water Distribution System: Detection of a Large Nitrite-Oxidizing Population Associated with *Nitrospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8611-8617.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S., Lee, Y. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339, 69-72.

- Moss, J., Nocker, A., Lepo, J., Snyder R. (2006). Stability and Change in Estuarine Biofilm Bacterial Community Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5679-5688.
- Nevel, S., Roy, K., Boon, N. (2013). Bacterial invasion potential in water is determined by nutrient availability and the indigenous community. *FEMS Microbiology Ecology*, 85, 593-603.
- Paris, T., Skali-Lami, S., Block J. (2009). Probing young drinking water biofilms with hard and soft particles. *Water Research*, 43, 117-126.
- Pathak, S., Gopal, K. (2008). Prevalence of bacterial contamination with antibiotic-resistant and enterotoxigenic fecal coliforms in treated drinking water. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 71, 427-433.
- Simoës, L., Simoës, M., Oliveira, R., Vieira, M. (2007). Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. *Journal of Basic Microbiology*, 47, 174-183.
- Traczewska, T., Sitarska, M., Biedroń, I. (2014). *Ekologiczne i techniczne aspekty powstawania biofilmu w wodzie*. Wrocław: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej.
- Xi, C., Zhang, Y., Marrs, C., Ye, W., Simon, C., Foxman, B., Nriagu, J. (2009). Prevalence of Antibiotic Resistance in Drinking Water Treatment and Distribution System. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5714-5718.
- Zhang, D., Xia, J., Xu, Y., Gong, M., Zhou, Y., Xie, L., Fang, X. (2014). Biological features of biofilm-forming ability of *Acinetobacter baumannii* strains derived from 121 elderly patients with hospital-acquired pneumonia. *Clinical and Experimental Medicine*, 16, 73-80.

Characteristics of Biofilm Bacteria from Tapping Points of the Drinking Water Distribution System

Abstract

Microorganisms in the drinking water distribution system form a biofilm on the inner surfaces of the pipes. It is a life preserving strategy that provides easier access to nutrients and protects against harmful environmental factors. The biofilm is a habitat for numerous species of autochthonous microflora which contribute to the intensification of bio-corrosion and negatively affect the quality of the water supplied to the consumers. Additionally, the biofilm can consist of pathogenic species, which may pose an epidemiological hazard. Every drinking water distribution system has its own microflora, it is associated with the presence of autochthonous microorganisms that come from the raw water which despite treatment processes leaked to the network, and microbes

that entered as a result of maintenance, failures and leakages. These factors contribute to the biofilm uniqueness in each water supply system, it is associated with the lack of reproducibility of the structure.

In the present study characterized the microorganisms from biofilm of 17 tapping points of the water supply system for their ability to adhesion, resistance against selected antibiotics and rated their enzymatic activity. It is believed that the microorganisms with high surface affinity can play a decisive role in the early stages of biofilm formation.

Słowa kluczowe:

antybiotykooporność, identyfikacja, adhezja, biofilm, sieć wodociągowa

Keywords:

antibiotic resistance, identification, adhesion, biofilm, drinking water distribution system