

# **METODY NA TESTOVÁNÍ PODPORY MIKROBIÁLNÍHO RŮSTU U MATERIÁLŮ VE STYKU S PITNOU VODOU**

**RNDr. Jaroslav Šašek**

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10; jaroslav.sasek@szu.cz

Testovací metody k určení podpory rozvoje mikrobiálního růstu mají prokázat, zda se z materiálů v kontaktu s pitnou vodou mohou nějaké látky uvolňovat do vody a zda jsou využitelné mikroorganismy. Nadměrný rozvoj těchto mikroorganismů mohou pak zhoršovat organoleptické, fyzikální i mikrobiologické vlastnosti vody, která je s materiálem v kontaktu. Materiály s potenciálem podpory růstu mikroorganismů nemusí nutně vést ke zhoršení kvality vody za každé situace. Záleží i na dalších faktorech, zejména na biostabilitě vody samotné, přítomnosti reziduálních biocidních látek, teplotě vody, průtočných poměrech apod.

Naše legislativa testování materiálů na podporu mikrobiálního růstu v současnosti nepožaduje. Vyhláška MZ č. 409/2005 Sb. o hygienických požadavcích na výrobky přicházející do přímého styku s vodou a na úpravu vody (vztahuje se na pitnou i teplou vodu) se o těchto testech ani nezmiňuje. Vyhláška č. 238/2011 Sb. o hygienických požadavcích na koupaliště a bazény sice deklaruje v § 19, že materiály přicházející do styku s bazénovou vodou nesmějí ovlivnit jakost vody ani podporovat růst mikroorganismů, ale nestanoví žádnou povinnost materiály testovat, nespécifikuje ani metody testování ani žádné limity.

Jednotný předpis EU na testování a posuzování výrobků ve styku s pitnou vodou dosud neexistuje. Z podnětu EK byla sice zpracována studie EAS/CPDW [1], porovnávající 4 národní metody testování materiálů (Německo, V. Británie, Rakousko a Holandsko), nevedla však ke zpracování EAS (European Acceptance Scheme). Byla však užitečná, neboť později vedla ke zpracování evropské normy EN 16421:2014 [2], jejíž česká verze vyšla 1.6.2015 jako ČSN EN 16421.

I přesto někteří naši výrobci armatur, přicházející do kontaktu s pitnou vodou, používají nad rámec české legislativy pouze certifikované materiály [3]. Ty jsou testovány dle německé metody W 270, vydané DVGW (Německý spolek pro plynárenství a vodovodní instalace), viz dále. Certifikát daného materiálu má stanovenou platnost několik let, pokud nedojde ke změně jeho receptury ve výrobním procesu.

Evropská norma EN 16421 specifikuje postupy testování materiálů na vodu pro lidskou spotřebu. Obsahuje 3 metody testování podpory mikrobiálního růstu, vycházející z národních postupů Německa, V. Británie a Holandska.

Německá metoda [4] vychází z německého standardu DVGW W 270, 1990 (měření objemu biomasy) a představuje volumetrické měření biomasy vytvořeného biofilmu za definovaných podmínek testu.

Britská metoda [5] vychází z britského standardu BS 6920/2.4., British Standard, 2000 (měření průměrné spotřeby rozpuštěného kyslíku – metoda MDOD (mean dissolve oxygen demand)). Základem jsou práce Burmana, Colbournové a Browna z let 1979 a 1985.

Holandská metoda [6] vychází z prací van der Kooije a Veenendaala z let 1995, 2001 a 2003. Je založena na měření nukleotidu ATP (adenosintrifosfátu) – metoda měření ATP, jehož stanovená koncentrace nahrazuje měření mikrobiální aktivity.

Jednotlivé metody nelze použít na všechny materiály, pro některé jsou nevhodné nebo mají určitá omezení. Např. metody měření ATP a MDOD nelze použít pro testování materiálů typu mnohvrstevnatého potrubí, nebo metody ATP a metody měření objemu nelze použít pro tuky a maziva.

Metody nejsou proporcionální, vztah mezi metodou MDOD a metodou ATP je přímka, až když vyneseme hodnoty BPP v logaritmické stupnici a hodnoty MDOD v lineární stupnici. Směrodatnější je zatím porovnání „hraničních“ hodnot/ limitů, tzv. pass/fail limit value (PFL), která označují hranici mezi vyhovujícími a nevyhovujícími hodnotami pro danou metodu testování.

Pro metodu MDOD lze toto kritérium (2,3 mg O<sub>2</sub>/l) aproximovat s BPP hodnotou cca 1600 pg ATP/cm<sup>2</sup>). Limit PFL pro německou metodu měření objemu činí 0,1 ml/800 cm<sup>2</sup> ev. 0,05±0,02 dle metody koncentrování biomasy slizu (koncentrační vs. centrifugační). Není však dosud dostatečný počet údajů pro různé materiály a není jasné, s jakými hodnotami metod MDOD a metody ATP by se měl německý limit aproximovat.

Rovněž pro metodu ATP není toto kritérium na evropské úrovni stanoveno, jeho určení je v kompetenci jednotlivých států EU. Je možné, že toto kritérium bude nejprve stanoveno jen pro tzv. skupinu 4/5MS, což je skupina států (Nizozemí, Německo, Velká Británie, Francie a Portugalsko), jež se dohodla na harmonizování a vzájemném uznávání národních systémů testování výrobků ve styku s vodou.

Tento limit (PFL) má např. Nizozemí nastaven na hodnotu, odpovídající hodnotě BP 20-30 ng ATP/l v BPP testu, což je původní a pak modifikovaná Nizozemská metoda testování [13]; tato jejich hodnota BP se trochu liší (není odečtena hodnota blanku) od hodnoty BPP v metodě 1- měření ATP dle evropské normy.

Většina údajů o vlivu materiálů na rozvoj mikroorganismů je v odborné literatuře dosud jen cílena na nejrozšířenější materiály ve vodárenství. Jedná se o materiály kovové nebo plastové, dále tmely, těsnící materiály a mazadla. Silikátové (cementové) materiály byly zatím předmětem testování jen okrajově; i tak lze tyto nečetné údaje použít pro hrubou orientaci ke srovnání s kovovými a plastovými materiály.

Následující porovnání různých materiálů je členěno dle jednotlivých metod testování podpory mikrobiálního růstu dle evropské normy:

### **Metoda 1– měřeno ATP (BPP test, hodnoty v pg ATP/cm<sup>2</sup>/dobu testování)**

Jak již bylo výše řečeno, limit (PFL) na evropské úrovni není stanoven. Nízkou hodnotu pod 50 pg ATP/cm<sup>2</sup> vykazují – sklo, nerez ocel, PVC-U, PVC-C. Materiály s hodnotou BPP < 100 pg ATP/cm<sup>2</sup> nepůsobí problémy s ohledem na podporu rozvoje mikroorganismů ve vodovodní síti.

Výsledky projektu EAS/CPDW [1] ukázaly hodnotu BPP (pg ATP/cm<sup>2</sup>) pro jednotlivé materiály následovně – sklo (116±41), nerezocel (142 ± 36), PVC-C (149 ± 22), silikonová pryž (555 ± 38), HDPE (608 ± 135), nitrilový kaučuk (22860 ± 9334), PVC-P (34578 ± 16094).

Tento projekt současně posloužil pro koncipování evropské normy EN 16421:2014 a byl tedy prováděn metodami současné normy.

Jiné srovnání [7] dle hodnoty BFR (biofilm formation rate, za 362 dní) uvádí v pg ATP/cm<sup>2</sup> hodnoty pro sklo (23 ± 4), pro nerez ocel (55 ± 9,5), pro PVC-U (46 ± 10), pro PE (805 ± 80). Metody stanovení biomasy byly stejné jako v evropské normě ale vyjádření výsledné hodnoty jiné.

Srovnání materiálů na bázi cementu s ostatními materiály, používanými v distribučním systému pitné vody [8] dle průměrné hodnoty biofilmové aktivity vyjádřené jako BPM (biofilm potential monitors) v pg ATP/ cm<sup>2</sup> činí u skla (136), cementových materiálů (212), MDPE (302) a PV- C (509). Použité metody jsou stejné jako v případě evropské normy, vyjádření výsledků jiné. Pro orientační srovnání mezi různými materiály údaje z výše uvedených prací postačují.

### **Metoda 2 – měřeno objemem biomasy (hodnoty v ml/800 cm<sup>2</sup>/dobu testování)**

Limit (PFL) u této metody je stanoven příslušným německým předpisem (W 270, DVGW, 1990) na 0,1 ml/800 cm<sup>2</sup>/6 měsíců; pro optimalizovanou W 270 metodu, DVGW 2007 byla použita centrifugační metoda proti sedimentační pro koncentraci biomasy, takže je limit poloviční (0,05±0,02 ml/800 cm<sup>2</sup>/dobu expozice).

Materiály s vyšší hodnotou nejsou vhodné pro styk s vodou pro lidskou spotřebu. Údajů pro porovnání různých materiálů mezi sebou je ale minimum. V projektu EAS/CPDW byly stanoveny hodnoty jen několik druhů etylen-propylen (EPDM) pryží; ty se pohybovaly v rozmezí 0,2-9,3 ml bez vztahu k hodnotám, získaným ostatními metodami normy, tj. metodou měření ATP či MDOD.

### **Metoda 3 – měřeno průměrnou spotřebou rozpuštěného kyslíku (hodnoty v mg O<sub>2</sub>/l/dobu testování)**

Limit (PFL) je stanoven na hodnotu 2,3 mg O<sub>2</sub>/l. Materiály s hodnotou > 2,3mg O<sub>2</sub>/l nejsou vhodné pro kontakt s pitnou vodou. Tato hodnota by měla zhruba odpovídat dle projektu EAS/CPDW hodnotě BPP (měření ATP) cca 1600 pg ATP/cm<sup>2</sup> a v případě metody měření objemu biomasy (vyprodukovaného slizu) hodnotě biomasy 0,1 ml/800 cm<sup>2</sup>/26 týdnů.

Limit splňují z plastů poly(akrylonitril-butadien-styren) (ABC), poly(etylen-vinylacetát), fenolové pryskyřice, polyakryláty, polyamidy (nylon), polybutylentereftalát, polykarbonáty, polyethylen, polyformaldehyd (acetal), polyolefiny, polyfenylenoxid, polyfenylsulfid, polypropylen, polystyren, polysulfon, polytetrafluoroethylen (PTFE), polyuretan, neměkčený polyvinylchlorid (PVC); elastomery typu butyl, chlorobutyl, fluoro, ebonit, chloresulfonovaný polyethylen (CSM), olefinické, polyesterové, silikonové; nátěry a barvy akrylátové, polyuretanové; tmely epoxidové, polyuretanové, silikonové; těsnění- adheziva, některé azbesty, cementu-podobné materiály ve 100 % testovaných, některá maziva (57 %), grafit (100 %).

Limit nesplňují z plastů některé estery celulózy, sklem vyztužené polyester, většina PVC-P; elastomery na bázi polyethylenu, polypropylenu, poly(styren-butadien)u, polychloroprenu, poly-cis-izoprenu(syntetického); barvy a nátěry bituminové, epoxydové, polyesterové, polyuretanové; tmely bituminové, polysulfidové, polyuretanové; některé azbesty, většina maziv [9].

## **Silikátové / cementové materiály a jejich vliv na rozvoj mikroflóry**

O vlivu cementovaných materiálů na rozvoj mikroflóry je k dispozici minimum údajů, do evropského projektu CPDW nebyly vůbec zařazeny. Následující práce [10] poskytuje jisté srovnání na základě stanovení rozvoje biofilmu dle biomasy v  $\mu\text{g C/cm}^2$  v potrubí z různého materiálu v distribučním systému pitné vody – nejnižší hodnoty vykazují plastová potrubí (PVC, PE), jež tak limitují rozvoj biofilmů a korozi; *cementované potrubí (cementovaná ocel, azbestocement, cementovaná litina) vykazují hodnoty 2,6 x vyšší než u plastu (PVC, PE) a kovová potrubí (šedá litina, asfaltovaná ocel) vykazují 10 - 40 x vyšší hodnoty než u plastu.*

### Vliv dalších faktorů na podporu mikrobiálního růstu

Pro testování materiálů na podporu růstu mikrobů je významný též vliv anorganických nutrientů (živin) na rozvoj mikrobiální biomasy. Na tuto skutečnost reaguje norma přesným složením testovací vody, testy dostatečnosti nutrientů v této vodě (Annex A) a tedy případné potřeby dotace vody těmito nutrienty.

Pro orientaci lze uvést data z práce [11], zabývající se vlivem základních biogenních prvků (N, P) na rozvoj organotrofní mikroflóry v distribučním systému pitné vody. Efekt přidání ammonia či nitrátů na formaci biofilmů je nevýznamný na úrovni pod 0,1 mg N/l; při zvýšení na 0,5 mg N/l se toto zvýšení již projeví. Analogicky v případě fosfátů se tyto na rozvoj biofilmu neprojeví pod hladinou 0,005 mg P/l, naopak při úrovni vyšší než 0,01 mg P/l se již projeví.

Těžké kovy, biocidní látky anorganické či organické povahy mohou testy materiálů na podporu mikrobiálního růstu podstatným způsobem ovlivnit. Proto je vhodné v odůvodněných případech příslušné materiály testovat na přítomnost bakteriocidních či bakteriostatických látek, což norma ukládá u metody č. 3 (metoda MDOD). Riziko vlivu těžkých kovů po jejich případném vyloužení z materiálu do vody je možné orientačně posoudit z následujících dat – u vod, obsahujících těžké kovy v koncentracích vyšších než 0,01 mg/l se přidává do vzorkovnice 0,3 ml 15% NTA na 100 ml vzorku vody pro eliminaci tohoto nežádoucího vlivu dle bývalé ČSN EN ISO 5667-3:1996 pro konzervaci vzorků vody pro mikrobiologický rozbor [12]. Výluhy z testovaných materiálů by měly ukázat, zda tyto látky mohou ovlivnit vlastní testovací proceduru stanovenou normou.

Zvýšení hodnoty pH vody materiály ve styku s pitnou vodou – po jejich ponoření do testovací vody mohou dočasně zvýšit hodnotu pH nad stanovené rozpětí hodnot pH pro testování materiálů dle normy. Postup před-úpravy cementových materiálů před testováním je normou stanoven jen pro metodu č. 3 (MDOD).

## **Závěry pro silikátové materiály**

Údajů pro silikátové/cementové materiály je minimum, neboť většina prací včetně výše uvedeného CPDW projektu, cíleného na koncipování evropské normy pro testování vlivu materiálů na mikrobiální rozvoj, se zabývá jen materiály, používanými ve vodárenství (potrubí, armatury, těsnění, tmely, nátěry, barvy, maziva atd). Jen výjimečně se objeví do testů a srovnání zařazené materiály na bázi cementu (cementitious materials). Ty nám mohou orientačně pomoci porovnat silikátové materiály (materiály na bázi cementu) s materiály kovovými, plastovými a jinými. Dle těchto srovnání plyne, že cementované materiály jsou s ohledem na podporu rozvoje

mikroorganismů blíže těm plastům, jež vykazují nízkou podporu rozvoje, než kovovým materiálům a těm plastům, jež vykazují vysokou podporu rozvoje mikroflóry ve vodě, viz konkrétní hodnoty červeně vyznačené v textu výše.

### **Výběr metody pro účely projektu**

Pro účely řešeného projektu byly všechny tři metody normy EN 16421 podrobeny kritickému rozboru a nakonec byla za základní metodu zvolena metoda č. 1 uvedené normy – měření ATP. Důvodem je, že např. metoda č. 3 normy (měření MDOD) není všeobecně akceptována ve všech státech EU (Německo, Holandsko), protože se dle mínění zmíněných zemí nezdá být dostatečně přesná. Metoda č. 2 je relativně jednoduchá (objemové stanovení vyprodukovaného slizu), ale její technické provedení – testování ve tmě při teplotě  $12 \pm 5$  °C za neustálého průtoku vody (rychlost  $20 \pm 2$  l/h) v nádrži objemu cca 100 l se spodním vtokem vody a horním odtokem vody – je náročné na technické zázemí a vlastní provedení.

Měření ATP se jeví jako dobře propracovaná metoda, dlouhodobě vyvíjená v Holandsku, s řadou experimentálních údajů, bohužel však především pro jiné materiály než cementové.

### Specifikace pro zavádění testovací procedury pro materiály dle normy

Postup testování materiálů dle normy ČSN EN 16421 je sice v normě popsán, ale detaily provedení je nutno při jejím zavádění do praxe získat z vlastní zkušenosti. Další možností je čerpat zkušenosti z výše uvedené evropské studie EAS/CPDW.

Před vlastním testováním příslušných materiálů norma uvádí nutnost provedení předběžných testů. Prvním a klíčovým z nich je stanovení vhodnosti testované vody pro vlastní testy materiálů. Požadavky na testovací vodu jsou přísné z hlediska koncentrace hlavních biogenních prvků – C, N, P (tj. koncentrace dusičnanů, fosforečnanů a TDOC – celkový rozpuštěný organický uhlík); dále je nutná absence biocidních látek, volného chloru při použití pitné vody a limitované koncentrace Ag a Cu.

Dalším testem je pak posouzení procedury odstraňování přisedlé biomasy na testovaných materiálech (jedná se o nízko/vysoko energetickou sonikaci). Požadavek normy na detekční systém (u metody č.1 – měření ATP) na základě měření bioluminiscence je 1 ng ATP/l.

Další specifikace se týkají pozitivní a negativní kontroly, které procházejí celou testovací procedurou jako příslušné materiály. Negativní kontrola (obvykle borosilikátové sklo) musí vykazovat hodnotu vytvořené biomasy za testovací období pod 10 ng ATP/dm<sup>2</sup> povrchu. Pozitivní kontrola musí mít tuto hodnotu nad 1000 ng ATP/dm<sup>2</sup> plochy.

Přísné specifikace jsou i na laboratorní sklo a další pomůcky; ty musí být prosté látek, podporujících rozvoj biomasy mikroorganismů, tj. zejména fosfátů, organického uhlíku, přítomnost mikroorganismů či ATP samotné. Proto je třeba zajistit bezfosfátové mytí skla a dalších pomůcek, zajistit jejich sterilizaci za běžných podmínek (121°C/135 °C). Sklo a pomůcky, které jsou dlouhodobě v bezprostředním styku s testovanými materiály (zejména testovací vzorkovnice), je nutno sterilizovat (4 hod. při 550 °C) pro odstranění všech stop organického uhlíku. Podobně i sklo a pomůcky, demineralizovaná či testovací voda, které se používají pro přípravu standardů ATP, musí být prosty stop ATP, mikroorganismů.

Veškerá manipulace a příprava materiálů pro testování musí vyloučit jakoukoliv kontaminaci, která by mohla podporovat (zejména org. C, fosfáty) nebo brzdit (biocidy, těžké kovy aj. látky) rozvoj biomasy mikroflóry v testovacích lahvích a tak zkreslit informaci o možné podpoře rozvoje mikroflóry či její absenci daným materiálem.

## Poděkování

Zpracováno s podporou projektu Technologické agentury České republiky "Výzkum a vývoj procesu umělé karbonatice pro hodnocení trvanlivosti a ekologické bezpečnosti stavebních materiálů v provozní praxi" TAČR TH01031196.

## Literatura

- [1] CPDW project – Assessment of the microbial growth support potential of products in contact with drinking water. Development of harmonized test to be used in the European Acceptance Scheme concerning CPDW, July 2003, European Commission.
- [2] EN 16421: 2014 - Influence of materials on water for human consumptions – Enhancement of microbial growth (EMG).
- [3] komerční článek – Antibakteriální materiály – aby voda zůstala pitnou. SOVAK Časopis oboru vodovodů a kanalizací, č. 9, 2015, strana 27/299.
- [4] DVGW (1998). Vermehrung von Mikroorganismen auf Materialien für den Trinkwasserbereich, Prüfung und Bewertung. Technische regeln, Arbeitsblatt W270.
- [5] British Standard Institution (2000). Suitability of non-metallic products for use in contact with water intended for human consumption with regard to their effect on the quality of the water. BS 6920, part 2 (Methods of tests), section 2.4 (Growth of aquatic micro-organisms).
- [6] van der Kooij, D et al: Biofilm formation on surfaces of glass and teflon exposed to treated water. *Water Research*, 1995, 29(7): 1655-1662.
- [7] van der Kooij, D. et al: Elucidation and control of biofilm formation processes in water treatment and distribution using the unified biofilm approach. *Water Science and technology*, 2003, 47(5): 83-90-
- [8] Hallam, N.B. et al: The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Research*, 2001, 35(17): 4063-4071.
- [9] Colbourne, J.S.: Materials usage and their effects on the microbiological quality of water supplies. *Journal of Applied Bacteriology symposium Supplement* 1985, 47S-59S.
- [10] Niquette, P. et al.: Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. *Water Research*, 2000, 34(6): 1952-1956.
- [11] Chenghwa Chu et al.: Effects of inorganic nutrients on the regrowth of heterotrophic bacteria in drinking water distribution systems. *Journal of Environmental Management*, 2005, 74: 255-263.
- [12] ČSN EN ISO 5667-3:1996 Jakost vod - Odběr vzorků – Část 3: Pokyny pro konzervaci vzorků a manipulaci s nimi.
- [13] van der Kooij, D., van der Wielen Paul W.J.J.: *Microbial Growth in Drinking-Water Supplies. Problems, Causes, Control and research Needs*. IWA Publishing, London. New York, 2014, pp. 453.