

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LILIJANA LAZAR ŠULIGOJ

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI IN ŠTEVILA *ESCHERICHIA COLI* IN
KOLIFORMNIH BAKTERIJ V VZORCIH PITNIH VOD Z DVEMA METODAMA**
**DETECTION AND ENUMERATION OF *ESCHERICHIA COLI* AND COLIFORM
BACTERIA IN DRINKING WATER WITH TWO METHODS**

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo sem opravljala v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano lokacija Nova Gorica pod mentorstvom prof. dr. Miroslava Petrovca in somentorstvom Judite Vidrih.

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pomagali pri nastajanju diplomske naloge, mentorju in somentorici za pomoč in svetovanje. Zahvaljujem se tudi sodelovkam v laboratoriju, kjer sem opravljala praktični del naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Miroslava Petrovca dr. med. in somentorstvom Judite Vidrih univ. dipl. biolog, spec. medicinske mikrobiologije.

Lilijana Lazar Šuligoj

VSEBINA

POVZETEK.....	4
SEZNAM OKRAJŠAV.....	6
1 UVOD	7
1.1 ZGODOVINSKI PREGLED RAZVOJA PRIPRAVE VODE	7
1.2 OKUŽBA Z VODO – HIDRIČNA EPIDEMIJA.....	8
1.3 MIKROORGANIZMI INDIKATORJI ONESNAŽENJA VODE.....	11
1.4 VELJAVNA ZAKONODAJA NA PODROČJU PITNIH VOD	13
1.5 METODA MEMBRANSKE FILTRACIJE	15
1.6 METODA S FERMENTACIJO V VEČ EPRUVETAH	16
1.7 KONTROLA KVALITETE	17
2 NAČRT ZA DELO	18
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 POGOJI MERITEV- METODA MEMBRANSKE FILTRACIJE	19
3.2 POGOJI MERITEV- METODA S FERMENTACIJO V VEČ EPRUVETAH.....	24
3.3 UPORABLJENE STATISTIČNE METODE	27
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	19
4.1 PRIMERJAVA REZULTATOV PRESKUŠANJ Z IZRAČUNOM VREDNOSTI RELATIVNE RAZLIKE	31
4.2 PRIMERJAVA REZULTATOV PRSKUŠANJ Z POISSONOVIM INDEKSOM SIPANJA REZULTATOV	35
4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV PRESKUŠANJ Z OCENO USTREZNOSTI VZORCA Z UPOŠTEVANJEM PARAMETROV <i>E. COLI</i> IN KOLIFORMNE BAKTERIJE	39
4.4 PRIMERJAVA REZULTATOV PRESKUŠANJ S TESTOM χ^2	44
5 SKLEP.....	53

POVZETEK

Mikrobiološko onesnaženje vodnih virov je običajno posledica onesnaženja z iztrebki živali in/ ali ljudi. Eden od osnovnih ukrepov v smislu preprečevanja okužb z vodo je, poleg ustrezne strokovne priprave pitne vode, tudi stalen, sistematičen nadzor nad mikrobiološko neoporečnostjo pitnih vod. Pri tem nadzoru potrjujemo prisotnost indikatorskih mikroorganizmov, ki jih lažje identificiramo kot patogene mikroorganizme. Prisotnost indikatorskih mikroorganizmov pomeni, da so lahko prisotni tudi patogeni mikroorganizmi.

V diplomski delu smo primerjali dve metodi za mikrobiološko preskušanje pitne vode. To sta metoda membranske filtracije in kultivacije na selektivnih gojiščih (MF) ter metoda fermentacije v več epruvetah (metoda MPN). Kot testno skupino smo izbrali vzorce pitnih vod iz istih vodnih virov, ki smo jih tedensko dobivali v naš laboratorij. Primerjali smo rezultate preskusov za parametra *E. coli* in koliformne bakterije v 100 mL vzorca. Pričakovali smo, da bo MF bolj občutljiva in da bomo z njo hitreje dobili delne in končne rezultate preskusa. Pričakovali smo tudi, da bo metoda MPN za izvedbo manj zahtevna.

Ugotovili smo, da rezultate, ki jih dobimo z primerjanima metodama, zaradi različnega načina podajanja rezultatov, težko primerjamo s statističnimi metodami. Kljub temu smo naredili nekaj statističnih primerjav. Ovrednotili smo rezultate preskušanj s postopkom dvostranskega vrednotenja rezultatov z izračunom vrednosti relativne razlike, ločeno za parametra *E. coli* in koliformne bakterije. V obeh primerih smo ugotovili, da imamo nezadostno število podatkov za dvostransko vrednotenje rezultatov. Pri izračunu Poisson-ovega indeksa sipanja rezultatov primerjave metod preskušanja, za vsak parameter ločeno, ter za vzorce kot celoto, smo metodi ovrednotili kot različni. Primerjali smo tudi odstotek neustreznih vzorcev, ki smo ga dobili z vsako od primerjanih metod. Ugotovili smo, da je odstotek neustreznih vzorcev, pri metodi MF višji kot pri metodi MPN. Za test χ^2 smo ugotovili, da kot statistična metoda ni primeren za statistično obdelavo take vrste vzorcev.

Opazovali smo tudi izvajanje postopkov v laboratoriju. Primerjali smo čas, potreben za primarno nacepljanje, identifikacijo, potrebno opremo, gojišča in usposobljenost osebja, ter drugačno organizacijo dela. Ugotovili smo, da porabimo za izvajanje metode MPN manj časa. Za izvajanje MF potrebujemo zahtevnejšo opremo, pa tudi zahtevnejša in dražja

gojišča. Nekatera gojišča, ki smo jih uporabili za potrditev, so enaka za obe metodi. Izvedba postopka MF je zahtevala dodatno usposabljanje osebja. Pri pregledu nacepljenih gojišč, je pri obeh metodah potrebno običajno znanje analitika v laboratoriju. Za primarno nacepljanje z metodo MPN smo porabili manj časa, to pa je za organizacijo laboratorijskega dela pomembno, saj so vzorci prispeli v laboratorij popoldan. Pomembno je, da vzorce čim prej nacepimo, saj moramo upoštevati čase inkubacije določene v metodi. Tako smo ugotovili, da je metoda MPN iz vidika izvedbe v laboratoriju manj zahtevna in cenejša kot izvedba MF.

Ob upoštevanju vseh ugotovitev, smo se odločili, da bomo metodo MPN zamenjali z MF. Za to smo se odločili, ker želimo naročnikom zagotoviti rezultate v čim krajšem času. Menimo tudi, da bodo rezultati, ki jih bomo dobili z novo metodo primernejši za interpretacijo. Uvedba nove metode bo zahtevala tudi spremembo organizacije dela v laboratoriju, zato bomo spremembo uvedli postopoma.

SEZNAM OKRAJŠAV

E. coli- *Escherichia coli*

C. perfringens- *Clostridium perfringens*

P. aeruginosa- *Pseudomonas aeruginosa*

MF- metoda membranske filtracije s kultivacijo na selektivnih gojiščih

metoda MPN- metoda fermentacije v več epruvetah

MPN indeks- *Most Probable Number index*- najbolj verjetno število

cfu- colony forming units

gojišče 1x LPV in 2x LPV- laktoza peptonska voda z Andreadejevim indikatorjem, enojne ali dvojne koncentracije

agar VRBA- violet red bile agar

gojišče BGGB- briljantno zeleno bile broth

SIST- Slovenski inštitut za standardizacijo

EN- evropski standard (angl. European standards)

ISO- International organization of standardization

PHLS- Public Health Leadership Society

1 UVOD

1.1 ZGODOVINSKI PREGLED RAZVOJA PRIPRAVE VODE

Sledovi civilizacije, kot jo razumemo danes, so tesno vezani na vire pitne vode, kjer je bila gradnja naselij vezana na bližino tekoče površinske vode, npr. Babilon, Perzija, Maji (1). Zavedanje o sanitarnih pogojih prehrane in bivanja se je začelo že v bronasti dobi (Mikene), kjer so še vidni sledovi javnega vodovoda, urejenih kopalnic, odvajanja odpadne vode. Že v Egiptu so znali očistiti vodo tako, da so kalno vodo nalili v vrče iz porozno žgane gline, vodo ki je skozi pore iztekala so zbirali, mulj pa se je ustavil v notranjosti vrča. Iz dobe Rimljanov je poznana gradnja vodovodov in akvaduktov, ohranjeni so predpisi o izvajanju dobave pitne vode iz javnih vodovodov. Zapisi v sanskrtu iz leta 200 pr.n.š. natančno navajajo, kako je potrebno čistiti vodo z vretjem v bakrenih posodah, izpostavljanju soncu, filtriranju skozi oglje, hlajenju v poroznih glinenih posodah, itd.

V srednjem veku je prišlo do zatona higiene in s tem skrbi za zdravo pitno vodo. Iz tega časa skoraj ni poznanih ohranjenih vodovodnih sistemov, čistilnih naprav ali postopkov za pripravo čistejše vode (2).

Šele z renesanso se v Evropi spet počasi pojavijo posamezniki, ki eksperimentirajo z vodo in njeno kakovostjo (2). Sir F. Bacon (1627) je eksperimentiral tako s fizikalnimi postopki (filtracijo, vretjem, destilacijo), kot tudi s kemijskimi postopki (koagulacija). Opazil je, da čiščenje vode izboljšuje zdravje in naredi vodo »očesu bolj prijetno«. Prvo ilustracijo peščenega filtra je prikazal v knjigi L. A. Porzio (1685). Opiral se je na filtre, ki so jih razvili Benečani za kapnico. V Angliji je leta 1856 H. Darcy patentiral peščene filtre. Prve peščene filtre so zgradili za vodopreskrbo v Glasgowu (1807) in Londonu (1829- 1839). V ZDA so se peščeni filtri pojavili šele okrog 1890.

L. Pasteur in R. Koch, sta odkrila vzročno povezavo med boleznijo in mikroorganizmi v vodi (2). Leta 1842 je E. Chadwick postavil hipotezo, da je vzrok za epidemijo kolere treba iskati v oskrbi z okuženo pitno vodo. Konkretno povezavo mikrobiologije in kvalitete pitne vode je pokazal dr. J. Snow 1849 s poskusom ustavitve prenosa kolere z vodo. Leta 1881 je Koch dokazal, da klor pomori bakterije. Z izgradnjo elektrolitskega pridobivanja klora se je začela uporaba plinskega klora kot dezinfekcijskega sredstva v Nemčiji (1890),

Angliji (1905) in ZDA (1908). Sledila je prva uporaba ozona za dezinfekcijo pitne vode Nici (1910). Do 1930 so v razvitem svetu z uporabo kloriranja in filtracije praktično zatrli hidrične bolezni, javno zdravje se je izredno izboljšalo. V letih 1970- 1980 so se pojavili problemi pri določanju največje dopustne koncentracije mikropolutantov in stranskih produktov kloriranja in ozoniranja vode (trihalometani, bromati). Po letu 1980 je prišlo do izbruha nekaterih parazitskih okužb (*Giardia lamblia* in *Cryptosporidium sp.*) za katere se je izkazalo, da so, v primerjavi z bakterijami, veliko bolj odporni na klor, na ozon pa nekoliko manj. Zvišanje potrebnih odmerkov klora in ozona so znova povečali skrbi zaradi stranskih produktov dezinfekcije.

Moderne tehnike priprave pitnih vod kažejo na povečano uporabo tehnično, tehnološko in ekonomsko učinkovitih (so)naravnih postopkov, to je fizikalnih metod brez dodajanja kemikalij in ostankov kemikalij v prečiščeni vodi (2).

1.2 OKUŽBA Z VODO– HIDRIČNA EPIDEMIJA

Voda predstavlja veliko tveganje za prenos patogenih bakterij, virusov, praživali in parazitov (3). Za hidrično epidemijo je značilen nenaden porast obolenj med prebivalci na območju, ki imajo skupno oskrbo z vodo. Število obolelih običajno ne presega polovice izpostavljenih. Za pojav obolenja je poleg prisotnosti patogenih mikroorganizmov pomemben tudi infektivni odmerek in dovzetnost izpostavljenih oseb. Do okužbe lahko pride neposredno, zaradi pitja okužene vode ali pa posredno, z živali ki prihajajo v stik z onesnaženo vodo ali pri uporabi okužene vode pri osebni higieni.

Vir okužb so običajno človeški in živalski izločki, predvsem iztrebki (3). Do vdora teh v vodooskrbni sistem lahko pride zaradi neugodnih vremenskih razmer, posegov v okolje, poškodb na vodovodnem omrežju, znižanju pozitivnega pritiska v omrežju, popravil na omrežju ipd.

V predelih sveta, kjer primanjkuje zdravstveno ustrezne pitne vode, je do 80 % vseh obolenj in do ene tretjine vseh smrti posledica uživanja onesnažene vode (7). Vsako leto umre v svetu 3 milijone ljudi zaradi uživanja zdravstveno neustrezne pitne vode. Tudi v Evropi 120 milijonov ljudi še vedno ne uživa varne pitne vode.

MIKROORGANIZMI POVZROČITELJI OKUŽB Z VODO

Med patogenimi bakterijami, ki se prenašajo s pitjem onesnažene vode, predstavljajo največje tveganje za zdravje ljudi *Shigella spp.*, patogena *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella spp.* Nekatere bakterije se lahko vnesejo v organizem v obliki aerosola, kot na primer *Legionella spp.*(3). Kljub temu, da se patogene bakterije v vodah v glavnem ne razmnožujejo, novejša raziskava kažejo, da se nekatere vrste v vodah, ob ugodnih pogojih zadržujejo dalj časa, kar pomeni, da se razmnožujejo, za to pa potrebujejo ugodno temperaturo in hranilne snovi. Tvorba biofilmov omogoča razmnoževanje in zaščito mnogim vrstam bakterij.

Najpomembnejši virusi, ki se prenašajo s pitno vodo so: rotavirusi, virusa hepatitisa A in E, adenovirusi, enterovirusi, virusi Norwalk (3).

Praživali, ki se prenašajo z vodo so: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*.; med drugimi paraziti pa je najpogostejši *Dracunculus medinensis* (3).

Pitne vode lahko predstavljajo tudi vir pogojno patogenih bakterij, ki so naravno prisotne v okolju (3). Te bakterije lahko povzročajo obolenja pri ljudeh z oslabeлим imunskim sistemom. Če voda vsebuje večje število pogojno patogenih bakterij, lahko pride pri teh ljudeh do infekcij kože in sluznic. Primeri takih bakterij so: *Pseudomonas aeruginosa* in rodovi *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Aeromonas* ter nekatere počasi rastoče mikobakterije.

Poleg mikroorganizmov lahko v pitnih vodah najdemo tudi toksine (hepatotoksine, nevrotoksine), ki jih proizvajajo modrozelenke alge (*Cyanobacteria*). Te se lahko pojavijo v jezerih in rezervoarjih, ki se uporabljajo za zajem pitnih vod (3).

MIKROBIOLOŠKI NADZOR

Eden izmed osnovnih ukrepov za preprečevanje okužb z vodo je stalen in sistematičen mikrobiološki nadzor nad pitnimi vodami neposredno iz vodnega vira, po pripravi in obdelavi vode v zajetju, ter iz omrežja (4). Globalen pristop k oblikovanju osnov nadzora in standardov, s katerimi zagotavljamo zadostne količine zdrave pitne vode za vsakogar, je postal nujno potreben. Odločilen vpliv na oblikovanje standardov in zakonodaje ima Svetovna zdravstvena organizacija, na lokalni ravni pa zakonodaja posamezne države.

Mikrobiološki nadzor nad pitnimi vodami ima več nalog, med katerimi sta najpomembnejši naslednji (4):

- ugotavljanje zdravstvene ustreznosti (npr. ugotavljanje fekalnega onesnaženja od zajetja do vstopa v razdelilni sistem, ugotavljanje vzdrževanja ustreznosti v razdelilnem sistemu, ugotavljanje ustreznosti obdelave in priprave vode);
- ugotavljanje kakovosti (npr. ugotavljanje splošne mikrobiološke slike vode, ugotavljanje vzdrževanja kakovosti vode v razdelilnem in polnilnem sistemu)

Z mikrobiološko preiskavo vzorcev vode ugotovimo stopnjo onesnaženosti vode (4).

Običajno ne ugotavljamo prisotnosti patogenih mikroorganizmov, ker so te vrste preiskav zamudne in drage, in se jih opravlja samo med epidemijami in v raziskovalne namene. Za oceno onesnaženosti vode uporabljamo indikatorske mikroorganizme, ki imajo podobne lastnosti, kot jih imajo patogeni mikroorganizmi (so prisotne v velikem številu v iztrebkih ljudi in živali, njihovo prisotnost ugotavljamo z enostavnimi metodami, v naravi v čistih vodah jih ni, na postopke obdelave pa se odzivajo podobno kot patogeni mikroorganizmi). Velika večina vodnih patogenih organizmov je fekalnega izvora, zato temelji nadzor na ugotavljanju prisotnosti tistih organizmov, ki so v primeru fekalne kontaminacije najbolj značilni.

1.3 MIKROORGANIZMI INDIKATORJI ONESNAŽENJA VODE

SKUPNE KOLIFORMNE BAKTERIJE (SKUPNI KOLIFORMI)

To je skupina po gramu negativnih, fakultativno anaerobnih, nesporogenih bacilov, ki v prisotnosti žolčnih soli v 48 urah pri temperaturi inkubacije 37 °C fermentirajo laktozo do kisline in plina. V to skupino prištevamo rodove *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Rahnella* (4).

Te bakterije so prisotne v iztrebkih ljudi in živali, pa tudi v okolju, zato jih ne moremo z gotovostjo uporabiti za dokaz fekalnega onesnaženja. Uporabljamo jih za presojo ustreznosti priprave vode, onesnaženja po pripravi, poškodb in napak v omrežju. Njihova prisotnost kaže tudi na prisotnost organskih snovi v vodi. Če jih najdemo v vodi, moramo izključiti prisotnost *E. coli*. V omrežju lahko tvorijo biofilme (4).

TERMOTOLERANTNE KOLIFORMNE BAKTERIJE

Termotolerantne koliformne bakterije so bakterije, ki imajo fermentativne in biokemične lastnosti skupnih koliformov, pri temperaturi inkubacije $44 \pm 0,5$ °C (4). Poleg *E. coli* v to skupino prištevamo še nekatere vrste iz rodov *Klebsiella*, *Enterobacter* in *Citrobacter*. Prisotne so v iztrebkih ljudi in živali, lahko jih najdemo tudi v zemlji in pri razkrajanju rastlinskih odpadkov. V omrežju se lahko razmnožujejo, če je prisotnih dovolj organskih snovi in če je temperatura vode višja od 13 °C, lahko tvorijo biofilme. Njihovo prisotnost še ne moremo označiti kot fekalno onesnaženje. Z dodatnimi testi moramo preveriti prisotnost termotolerantne *E. coli*. Tako kot skupne koliformne bakterije, tudi ta skupina kaže na neustrezno pripravo vode, onesnaženje po pripravi ali poškodbe in napake v omrežju. Prisotnost termotolerantnih koliformov je večinoma povezana s prisotnostjo *E. coli*.

ESCHERICHIA COLI

Prištevamo jo med koliformne bakterije (4). V velikem številu je normalno prisotna v človeškem in živalskem prebavnem traktu, vendar samo nekateri patogeni sevi povzročajo obolenja in so znani kot povzročitelji hidričnih epidemij. Prisotnost *E. coli* v vodi zanesljivo kaže na fekalno onesnaženje.

ŠTEVILO MIKROORGANIZMOV PRI TEMPERATURI INKUBACIJE 22 °C IN 37 °C

Pitne vode lahko vsebujejo veliko število različnih vrst mikroorganizmov (4). Njihovo število uporabljamo kot podatek za oceno kakovosti vode, saj so indikatorji kakovosti vode. Mikroorganizmi, ki so običajno prisotni v pitnih vodah, dobro rastejo pri temperaturi 22 °C. Njihovo število uporabljamo za oceno čistosti in stabilnosti distribucijskega sistema, kaže pa tudi na uspešnost obdelave in priprave vode, zlasti ko si preiskave sledijo redno in skozi daljše časovno obdobje. Število teh mikroorganizmov po Pravilniku o pitni vodi ni kriterij za oceno ustreznosti. Mikroorganizmi, ki običajno prihajajo v vodo iz zunanjih virov, najbolje rastejo pri temperaturi 37 °C. Visoko število teh mikroorganizmov je lahko znak zunanjega onesnaženja in se po Pravilniku o pitni vodi uporablja kot kriterij za oceno ustreznosti.

FEKALNI STREPTOKOKI

To so streptokoki, ki so prisotni v iztrebkih ljudi in živali, imenujemo jih tudi intestinalni streptokoki, uvrščamo jih v rodova *Enterococcus* in *Streptococcus*, so nosilci antigena D (4). Njihova prisotnost zanesljivo kaže na fekalno onesnaženje. V vodah se običajno ne razmnožujejo, so pa manj občutljivi za vplive iz okolja kot koliformi in *E. coli* in ostanejo v sistemu dalj časa. Ker so neobčutljivi za izsuševanje, jih lahko uporabljamo za rutinski nadzor po menjavi oziroma popravih distribucijskega sistema. Lahko so pomemben pokazatelj uspešnosti dezinfekcije sistema.

SULFITREDUCIRAJOČI KLOSTRIDIJI

To je rod anaerobnih spороgenih bakterij, najbolj tipičen predstavnik je *C. perfringens* (4). Prisotni so v iztrebkih ljudi in živali, vendar v manjših količinah kot *E. coli*. Nahajajo se tudi v okolju, predvsem v zemlji. Spore preživijo v okolju veliko dlje kot koliformne bakterije, odporne so tudi proti razkužilom. Prisotnost *C. perfringens* v vodi skupaj z indikatorji fekalnega onesnaženja lahko kaže na sveže fekalno onesnaženje. Če smo ugotovili samo prisotnost klostridijev, obstaja možnost starega fekalnega onesnaženja, saj spore klostridijev lahko ostanejo dalj časa v omrežju, kjer se v manj pretočnih delih kopičijo in občasno prihajajo v vodo. Če ugotovimo *C. perfringens* v filtrirani vodi, to kaže na napake v postopku filtracije. Prisotnost spor *C. perfringens* kaže na možnost prisotnosti cist praživali.

1.4 VELJAVNA ZAKONODAJA NA PODROČJU PITNIH VOD

Glavni zakoni, ki trenutno urejajo nadzor nad pitnimi vodami in pogoje za zagotavljanje zdravstvene ustreznosti, so (6):

Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilo (Uradni list RS, št. 52/00, 42/02, 47/04)

Zakon o vodah (Uradni list RS, št. 67/02, 110/02, 2/04, 41/04, 57/08)

Pravilnik o pitni vodi (Uradni list RS, št. 19/04, 35/04, 26/06, 92/06, 25/09)

Pri sumu na epidemijo veljajo določila *Pravilnika o posebnih ukrepih pri zastrupitvah in infekcijah oseb s hrano in o njihovem preprečevanju* (Uradni list SRS, št. 24/81 in 35/82).

Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilo (ZZUZIS).

Direktiva Sveta Evropske unije 98/83/ES z dne 3. 11. 1998 o kakovosti vode, namenjene za prehrano ljudi

MIKROBIOLOŠKE ZAHTEVE IN NORMATIVI DOLOČENI S PRAVILNIKOM O PITNI VODI

Pravilnik o pitni vodi predpisuje zahteve za zdravstveno ustreznost pitne vode in pogoje za njeno zagotavljanje zaradi varovanja zdravja ljudi. Zdravstveno ustreznost ugotavljamo z odvzemom in preiskavami vzorcev vode. Preiskave so mikrobiološke, fizikalne, kemijske, biološke in radiološke. Glede mikrobioloških zahtev pravilnik določa, da pitna voda ne sme vsebovati mikroorganizmov in parazitov ter njihovih razvojnih oblik, ki so lahko nevarne za zdravje (23- 27).

Obseg mikrobiološkega preskusa določi vzorčevalec ali naročnik kot reden ali občasen (23- 27). V prilogah A in C Pravilnika o pitni vodi so navedene mikrobiološke zahteve za pitne vode iz javne oskrbe in vode za embaliranje na mestu polnjenja in za embalirano vodo v prometu.

Preglednica 1: Redne preiskave vode iz javne vodooskrbe

Parameter	Vrednost	Enota
<i>Escherichia coli</i>	0	število/ 100 mL ali MPN indeks / 100 mL
skupne koliformne bakterije ⁽¹⁾	0	število/ 100 mL ali MPN indeks / 100 mL
<i>Clostridium perfringens</i> (s sporami) ^{*(1)}	0	število/ 100 mL
skupno število mikroorganizmov pri 22 °C ⁽¹⁾	brez sprememb	število/ 1 mL
skupno število mikroorganizmov pri 37 °C ⁽¹⁾	manj kot 100	število/ 1 mL

* če je voda glede na izvor površinska ali nanjo vpliva površinska voda

⁽¹⁾ parametri iz tabel se pri ocenjevanju obravnavajo kot indikatorski parametri

INTERPRETACIJA REZULTATOV MIKROBIOLOŠKEGA PRESKUSA

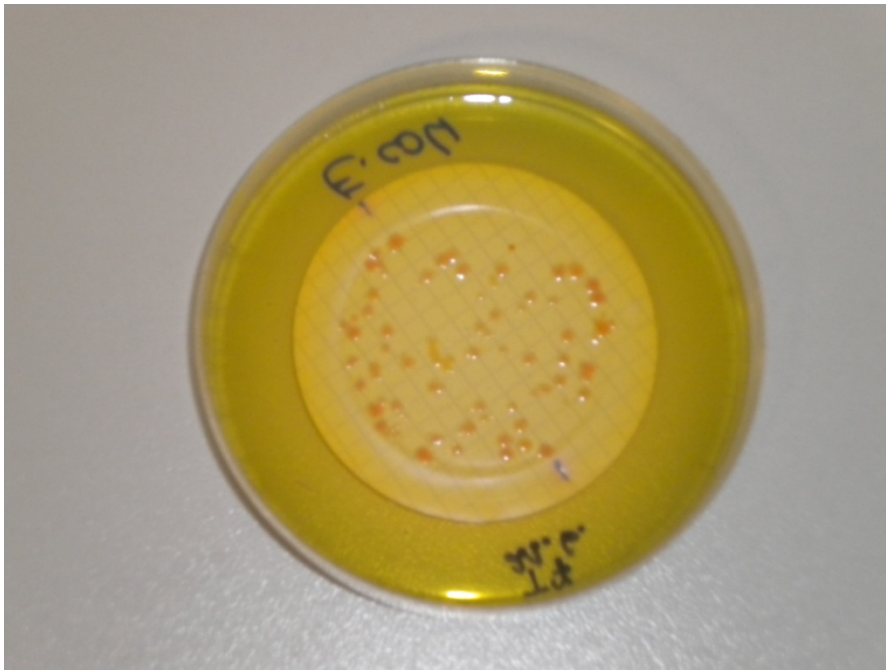
Pri interpretaciji rezultatov mikrobiološkega preskusa moramo vedeti, da nam rezultati enega preskusa pokažejo samo trenutno stanje vzorca vode (5). Ocena, ali je voda iz nekega zajetja zdravstveno ustrezna, ne more biti podana na podlagi enega rezultata, ampak moramo rezultat interpretirati na podlagi vrste preiskav, ki so si sledile skozi določeno časovno obdobje, pa tudi v luči sanitarnih pogojev v okolici vodnega vira.

1.5 METODA MEMBRANSKE FILTRACIJE

Testirani volumen vzorca pitne vode z uporabo negativnega tlaka prefiltriramo skozi membranski filter, ki zadrži morebitne mikroorganizme na površini (8). Membrano položimo na površino selektivnega agarja in inkubiramo pri pogojih, predpisanih v metodi za posamezen mikroorganizem. Sumljive bakterijske kolonije nato preštejemo in jih identificiramo s potrditvenimi testi (9).

MF uporabljamo za ugotavljanje prisotnosti koliformnih bakterij, *E. coli*, enterokokov, *C. perfringens*, sulfid reducirajočih klostridijev in *P. aeruginosa* (10).

MF je po različnih pravilnikih predpisana metoda za pitne, kopalne in površinske kopalne vode.



Slika 1: Kolonije *E. coli* in koliformnih bakterij na gojišču T7

1.6 METODA S FERMENTACIJO V VEČ EPRUVETAH

Vzorec nacepimo v eno ali več serij petih epruvet s tekočim gojiščem, ki vsebuje laktozo in indikator kislosti (11). V epruveti je nameščena Durhamova cevka. Po 48 urah opazujemo fermentacijo laktoze. To opazimo zaradi spremembe pH gojišča (spremeni se obarvanost gojišča) in zbiranja plina v cevki. Take epruvete ocenimo za sumljive in v njih potrjujemo iskane organizme.

Z metodo MPN ugotavljamo prisotnost koliformnih bakterij, *E. coli*, enterokokov in *P. aeruginosa*.

Metoda MPN je primerna za preskušanje vzorcev pitnih vod, kjer je prisotno veliko spremljevalne flore ter vzorcev odpadnih vod in vod za namakanje.



Slika 2: Epruvete z gojiščem LAP po fermentaciji

1.7 KONTROLA KVALITETE

Kontrola kvalitete zajema vzpostavitev sistema kontrole kvalitete v laboratoriju in med več laboratoriji, standardizacijo postopkov in načine upravljanja v formalen, natančno dokumentiran program, ki ima jasno določene odgovornosti in dolžnosti. Tako zagotovimo kvalitetne rezultate ustreznega tipa (12).

Sistem kakovosti v preskuševalnih laboratorijih je vzpostavljen na osnovi SIST EN ISO/IEC 17025:2005 *Splošne zahteve za usposobljenost preskuševalnih in kalibracijskih laboratorijev*

Primerjava laboratorijev med seboj zajema (13):

- enotne kriterije za delo laboratorijev- postopki dela v laboratoriju se uskladijo z veljavnimi predpisi,
- zunanji nadzor sistema kontrole kvalitete- delovanje sistema preverjajo zunanji usposobljeni presojevalci,
- zunanje preverjanje usposobljenosti- kakovost rutinskih preskušanj laboratorija primerjamo z drugimi laboratoriji z neznanimi vzorci, hkrati tako preverimo analitsko metodo.

2 NAČRT ZA DELO

V nalogi bomo primerjali dve različni metodi za mikrobiološko preskušanje vzorcev pitnih vod: metodo MF in metodo MPN. Potrjevali bomo prisotnost indikatorskih mikroorganizmov *E. coli* in koliformnih mikroorganizmov. Obe metodi sta veljavni. Kot testni vzorec bomo uporabili vzorce pitnih vod, ki jih tedensko dobivamo v mikrobiološko preskušanje v okviru monitoringa pitnih vod iz sedmih, vedno istih vodnih virov iz področja Vipavske doline.

Pričakujemo, da bo MF primernejša za preskušanje vzorcev pitnih vod z nižjim številom mikroorganizmov. Metoda bo najverjetneje bolj občutljiva, saj omogoča detekcijo že enega mikroorganizma v preiskanem volumnu. Z MF bomo hitreje postavili sum na onesnaženje in dobili končni rezultat. Rezultati preizkusa vzorcev z MF bodo primernejši za statistično obdelavo, saj bo rezultat preskusa točno določena številka.

Pričakujemo tudi, da bo metoda MPN tehnično manj zahtevna za izvedbo, saj je primarno nacepljanje hitrejše in zahteva manj opreme in manj zahtevna gojišča. To je pomembno, saj prispejo vzorci v laboratorijsko obdelavo včasih zelo pozno. Metoda MPN je manj občutljiva zaradi narave metode, zato je večja možnost, da pri vzorcih z nizkim številom mikroorganizmov dobimo negativen rezultat.

Če se bodo predvidevanja izkazala za pravilna, bomo metodo MPN, ki je trenutno v uporabi, zamenjali z novo metodo, z MF. Naročnikom želimo zagotoviti rezultate v čim krajšem času, zato upamo, da bo to mogoče z metodo, ki jo primerjamo. Pričakujemo tudi, da bodo rezultati, ki jih bomo dobili z novo metodo primernejši za interpretacijo.

3 MATERIALI IN METODE

PRIPRAVA VZORCEV

Testirali smo 106 vzorcev vod, ki jih tedensko dobivamo v mikrobiološko analizo iz sedmih, vedno istih vodnih virov, v okviru monitoringa pitnih vod na področju Vipavske doline. Pri teh vzorcih je zahtevan redni obseg mikrobioloških preiskav po *Pravilniku o pitni vodi*. Vzorci vod prihajajo iz manjših vodooskrbnih sistemov. Preskušanja so potekala od marca 2003 do julija 2003.

Vzorci so bili odvzeti v plastično embalažo brez dodanega Na- tiosulfata. Količina je bila 500 mL.

Ko je bila zunanja temperatura višja od 13 °C so bili vzorci med transportom ustrezno hlajeni, takoj po odvzemu. Tudi po dostavi vzorcev v laboratorij do začetka preskusa smo jih shranjevali pri 2 do 8 °C. Maksimalni čas od odvzema vzorca do začetka preiskave, je bil štiriindvajset ur.

Pred preskusom smo vzorce dobro premešali tako, da smo nekajkrat hitro obrnili embalažo. Iz vzorcev nismo pripravljali redčin.

3.1 POGOJI MERITEV- METODA MEMBRANSKE FILTRACIJE

REAGENTI IN RAZTOPINE

- tergitol 7 agar (Biokar-diagnostics, Pantin, Francija), pripravljen po internem navodilu NLZOH z oznako NAV OMA 528
- gojišče Triptonska voda (Merck, Darmstadt, Nemčija), pripravljen po internem navodilu NLZOH z oznako NAV OMA 519
- agar VRBA- violet red bile agar (Oxoid, Hampshire, Velika Britanija), pripravljen po internem navodilu NLZOH z oznako NAV OMA 509
- Krvni agar (KA) kot neselektivno gojišče, pripravljen po internem navodilu NLZOH z oznako NAV OMM 421
- TBX agar (Tryptone Bile X-glucoronide medium) (Oxoid, Hampshire, Velika Britanija), pripravljen po internem navodilu NLZOH z oznako NAV OMA 565
- reagent Kovacs (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Reagent za oksidazni test (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA), pripravljen po internem navodilu NLZOH z oznako NAV OMA 558

APARATURE

- sistem sestavljen iz stojala za membranske filtre, ki nosi porozne diske (frite), vakuumsko črpalko, erlenmajerico za zbiranje vzorca, sistem povežemo s silikonskimi cevkami (Merck Millipore, Billerica, ZDA)
- graduirani liji za vzorec (Merck Millipore, Billerica, ZDA)
- membrane- sterilne, posamično pakirane, iz celuloznih estrov, premera 47 mm s porami $0,45\mu\text{m}$ z mrežo (Merck Millipore, Billerica, ZDA)
- pinceta z ravno konico (Merck Millipore, Billerica, ZDA)
- inkubatorji s temperaturo $36 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $44 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Heraeus, Hanau, Nemčija)
- petrijevke in epruvete za gojišča, filter papir, cepilne zanke

PRINCIP METODE

Testirani volumen vzorca pitne vode z uporabo negativnega tlaka prefiltriramo skozi membranski filter, ki zadrži mikroorganizme na površini. Membrano položimo na površino selektivnega agarja in inkubiramo pri pogojih, predpisanih v metodi za posamezen mikroorganizem. Sumljive bakterijske kolonije nato preštujemo in jih identificiramo s potrditvenimi testi .

OPIS POSTOPKA

- Nastavek za filter obrišemo z gazo omočeno z 96 % alkoholom in obžgemo s plamenom, pustimo, da se nastavek ohladi.
- Pinceto pomočimo v alkohol in obžgemo nad plamenom. Primemo filter za rob in ga položimo na nastavek tako, da je mreža obrnjena navzgor.
- Namestimo lij za vzorec, vanj nalijemo 100 mL vzorca.
- Odpremo ventil na nosilcu in vklopimo podtlak, da se vzorec počasi prefiltrira. Takoj, ko je vzorec prefiltriran izklopimo črpalko, da se filter ne osuši preveč.
- Odstranimo lij, filter s pritiskom na vzvod dvignemo od nosilca in ga primemo s pinceto za rob, namestimo na pripravljeno gojišče T7, tako da je stran, kjer smo filtrirali vzorec, obrnjena navzgor. Pazimo da pod filtrom ne ostanejo zračni mehurčki. Inkubiramo v 20 minutah.
- Pred filtriranjem naslednjega vzorca nastavek ponovno obžgemo.
- Ko nosilci niso v uporabi, jih pokrijemo z ustreznim pokrovčkom, da se ne prašijo.

- Petrijevke s filtrom inkubiramo, za koliforme na 36 ± 2 °C in za *E. coli* na $44 \pm 0,5$ °C.
- Značilne kolonije na filtru preštejemo pri dobri osvetlitvi. Štejemo v 30 minutah odkar smo petrijevke vzeli iz inkubatorja, ker se sicer barva kolonij lahko spremeni.
- Rezultat preračunamo in podamo kot število mikroorganizmov v volumnu vzorca (cfu/ mL).

ODČITAVANJE REZULTATOV

Za potrditev izberemo tipične kolonije. Če smo filtrirali več kot en volumen, izberemo filter, kjer je poraslo med 10 in 100 kolonij. Naredimo subkulturo posameznih kolonij, tako, da dobimo posamezne kolonije. Iz nje potrjujemo koliformne bakterije in *E. coli*. Če smo inkubirali vzorec pri obeh temperaturah, naredimo subkulture sumljivih kolonij in potrditvene teste iz vsakega filtra posebej. Če izoliramo *E. coli* iz membran inkubiranih na 37 °C in 44 °C, podamo v poročilu višje število.

Če je na filtru poraslo 5 ali manj kolonij, naredimo subkulturo iz vseh kolonij. Če je poraslo več kot 5 tipičnih kolonij, zabeležimo število in naredimo subkulturo iz najmanj 5 kolonij. Če sta porasli dve ali več vrst morfološko različnih sumljivih kolonij, preštejemo in zabeležimo število vsake vrste, naredimo subkulturo vsake vrste.

Zaradi neenakomerne razporeditve mikroorganizmov v vzorcu je število kolonij na membrani podvrženo statističnim nihanjem. Ponovni testi na istem vzorcu zelo verjetno ne bi dali popolnoma istega števila kolonij.

Če je nacepljena razredčina vzorca moramo rezultat množiti s faktorjem redčenja. Rezultat izrazimo kot število mikroorganizmov v določenem volumnu vzorca.

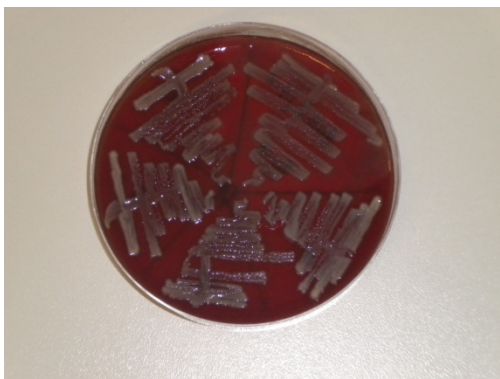
Potrjevanje *E.coli* v skladu z SIST EN ISO 9308-1:200, SIST EN ISO 9308-1:2001/AC:2009

Naredimo subkulturo sumljivih kolonij na krvnem agarju (KA), agarju VRBA, agarju TBX in v triptonski vodi. KA in agar VRBA inkubiramo pri 36 ± 2 °C, agar TBX in triptonsko vodo inkubiramo pri $44 \pm 0,5$ °C, vse za 21 ± 3 ure. Izvedemo test na prisotnost indola tako da triptonski vodi dolijemo reagent Kovacs, *E. coli* tvori indol iz triptofana, kar vidimo kot pojav rdečega obroča na površini gojišča. Fermentira laktozo, kar vidimo kot rožnate kolonije s halojem na agarju VRBA in ima encim β -glukuronidazo, kar vidimo kot

modre kolonije na agarju TBX. Test na oksidazo, ki ga izvedemo iz krvnega agarja je negativen.

Potrjevanje koliformnih bakterij v skladu z SIST EN ISO 9308-1:200, SIST EN ISO 9308-1:2001/AC:2009

Naredimo subkulturo sumljivih kolonij na krvnem agarju in agarju VRBA. Inkubiramo pri 36 ± 2 °C za 44 ± 4 ure. Iz čiste kulture na krvnem agarju izvedemo oksidazni test, ki mora biti za negativen. Na agarju VRBA vidimo, ali kultivirana bakterija fermentira laktozo, pri čemer porastejo rožnate kolonije s cono precipitacije.



Slika 3: Kolonije *E. coli* na krvnem agarju.



Slika 4: kolonije *E. coli* na agarju TBX.



Slika 5: kolonije *E. coli* in koliformnih bakterij na agarju VRBA.

BELEŽENJE REZULTATOV IN IZRAČUN POTRJENEGA ŠTEVILA (8)

Če je na membrani prisoten en sam morfološki tip kolonij, število pozitivnih kolonij potrdimo z enačbo:

$$X = \frac{C \times A}{B}$$

- število tipičnih kolonij na membrani (A)
- število kolonij, ki smo jih subkultivirali s segmenta filtra (B)
- število kolonij, ki smo jih potrdili kot pozitivne (C)

Če je na membrani prisotnih več morfoloških tipov kolonij, ki so sumljive, število pozitivno potrjenih kolonij na segmentu membrane potrdimo z enačbo:

$$Y = \frac{(C_S \times S)}{B_S} + \frac{(C_L \times L)}{B_L}$$

Število potrjenih kolonij na membrani potrdimo z enačbo:

$$X = \frac{Y \times A}{N}$$

- število tipičnih kolonij na membrani (A)
- skupno število tipičnih kolonij na izbranem segmentu membrane (N)
- število posameznih morfološko tipičnih kolonij na izbranem segmentu membrane (S), (L), itd.
- število kolonij posameznega morfološkega tipa, ki smo jih subkultivirali (B_S), (B_L), itd.
- število kolonij posameznega morfološkega tipa, ki smo jih subkultivirali in potrdili kot pozitivne (C_S), (C_L), itd.

OPOZORILA

Pri delu v laboratoriju uporabljamo zaščitno opremo (obleka, obutev), zaradi dela z bakterijskimi kulturami, skrbimo za higieno. Pri izvajanju metod obstaja, zaradi dela ob plamenu, možnost opeklin. Pri delu uporabljamo 96 % alkohol, ki je lahko vnetljiv. Kovacs reagent, ki ga uporabljamo pri identifikaciji je lahko vnetljiva, jedka kemikalija, zato pri delu z njo uporabljamo zaščitne rokavice in postopek izvajamo v digestoriju.

3.2 POGOJI MERITEV- METODA S FERMENTACIJO V VEČ EPRUVETAH

REAGENTI IN RAZTOPINE

- 2x LPV, pripravljen po navodilu internem navodilu NLZOH z oznako NAV OMA 502
- 2x LPV (kot neselektivno gojišče), pripravljen po internem navodilu NLZOH z oznako NAV OMM 421
- agar VRBA- violet red bile agar (Oxoid, Hampshire, Velika Britanija), pripravljen po internem navodilu NLZOH z oznako NAV OMA 509
- gojišče BGGB- briljantno zeleno bile broth (Oxoid, Hampshire, Velika Britanija), pripravljen po internem navodilu NLZOH z oznako NAV OMA 505
- gojišče Triptonska voda (Merck, Darmstadt, Nemčija), pripravljen po internem navodilu NLZOH z oznako NAV OMA 519
- reagent Kovacs (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- reagent Kovacs (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA), pripravljen po internem navodilu NLZOH z oznako NAV OMA 558

APARATURE

- Inkubatorji s temperaturo 36 ± 2 °C in $44 \pm 0,5$ °C (Heraeus, Hanau, Nemčija)
- Petrijevke in epruvete za gojišča, Durhamove cevke, filter papir, cepilne zanke

PRINCIP METODE

Vzorec nacepimo v serijo petih epruvet s tekočim gojiščem, ki vsebuje laktozo in indikator kislosti, v epruveti je nameščena Durhamova cevka. Če v 48 urah pride do fermentacije laktoze se zaradi spremembe pH gojišča, spremeni obarvanost gojišča in v cevki se nabere plin. V takih epruvetah potrjujemo iskane mikroorganizme.

OPIS POSTOPKA

- Gojišče je nalito v epruveto, ki vsebujejo Durhamovo cevko, tekočina mora segati čez cevko. Pred uporabo mora biti ogreto na sobno temperaturo.
- Pripravimo medij take koncentracije, da ga dodatek vzorca ne razredči pod koncentracijo standardnega medija.
- Pri testiranju pitnih vod nacepimo set petih epruvet po 10 mL. Epruvete inkubiramo pri 36 ± 2 °C za 48 ± 3 ure.
- Epruvete, kjer opazimo nastajanje kisline in plina, uporabimo za potrditvene teste.
- Pri tej metodi podamo rezultat kot MPN indeks, to je najbolj verjetno število prisotnih mikroorganizmov.

ODČITAVANJE REZULTATOV

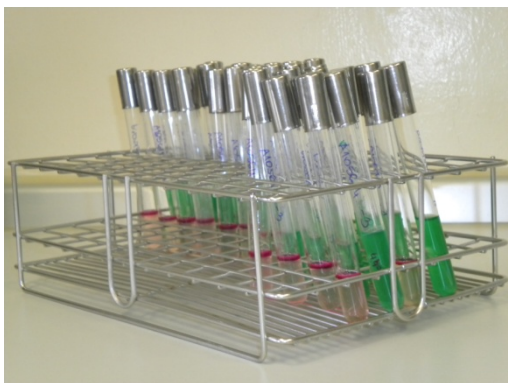
Epruvete, kjer opazimo nastajanje kisline in plina, uporabimo za potrditvene teste. Za potrditev uporabimo gojišče BGGB (briljantno zeleno bile broth) s cevko. Primarno epruveto nežno pretresemo, da resuspendiramo bakterije in prenesemo eno cepilno zanko tekočine v dve epruveti z gojiščem BGGB, triptonsko vodo, krvni agar in agar VRBA. Eno epruveto gojišča BGGB, agar VRBA in krvni agar inkubiramo 48 ± 3 ure pri 36 ± 2 °C. Drugo epruveto gojišča BGGB in triptonsko vodo inkubiramo 24 ± 3 ure pri $44 \pm 0,5$ °C. Tvorba plina in zamotnitev gojišča BGGB pomeni fermentacijo laktoze. Triptonski vodi dodamo reagent Kovacs, pojav rdečega obroča na površini gojišča pomeni nastajanje indola. Opazujemo prisotnost značilnih kolonij na agarju VRBA in izvedemo oksidazni test iz krvnega agarja.

Prisotnost koliforma označimo kjer imamo značilno reakcijo na gojišču BGGB pri 37 °C in pozitiven oksidazni test. Kjer je prisotna *E. coli* imamo značilno reakcijo na gojišču BGGB pri 44 °C, pozitiven test na tvorbo indola in negativen oksidazni test.

Število epruvet s potrjeno prisotnostjo indikatorskih mikroorganizmov uporabimo za odčitavanje MPN indeksa. MPN indeks je izračunan matematično, temelji na verjetnostnih izračunih, ki so ocena gostote organizmov v vzorcu.

Natančnost testa je odvisna od števila nacepljenih epruvet. Najboljše rezultate dobimo, ko pri največjih inokulih vzorca dobimo pozitivno reakcijo v večini ali v vseh epruvetah in pri najmanjših inokulih negativno reakcijo pri večini oziroma vseh epruvetah. Tabela temelji

na predpostavki, da so bakterije enakomerno razporejene v vzorcu, zato moramo vzorec in vse redčine pred nacepljanjem dobro pretresti. Gostoto bakterij odčitamo iz tabele, kjer upoštevamo pozitivne epruvete iz vseh redčenj. Vrednosti MPN in interval zaupanja odčitamo iz tabele za katerokoli kombinacijo pozitivnih in negativnih epruvet. Vsaka vrednost odčitana iz tabele ima dodan 95 % interval zaupanja.



Slika 6: Potrditev pozitivnih epruvet s testom prisotnosti indola in fermentacije laktoze v gojišču BGGB.

BELEŽENJE REZULTATOV IN IZRAČUN POTRJENEGA ŠTEVILA

Število epruvet s potrjeno prisotnostjo koliformnih bakterij in *E. coli*, uporabimo za odčitanje MPN indeksa iz tabele (11). Rezultat podamo kot MPN indeks, to je najbolj verjetno število prisotnih mikroorganizmov (MPN- *most probable number*).

Preglednica 2: Tabela za odčitavanje MPN indeksa, pri seriji petih epruvet

Število epruvet s pozitivno reakcijo	MPN indeks/ 100 mL	95 % interval zaupanja	
		Nižja meja	Višja meja
0	<2,2	0	6,0
1	2,2	0,1	12,6
2	5,1	0,5	19,2
3	9,2	1,6	29,4
4	16	3,3	52,9
5	>16	8,0	neskončno

3.3 UPORABLJENE STATISTIČNE METODE

Rezultate preskušanj, ki smo jih dobili z različnima metodama, smo primerjali z štirimi statističnimi metodami:

- z izračunom vrednosti relativne razlike
- s Poissonovim indeksom sipanja rezultatov
- z oceno ustreznosti vzorca z upoštevanjem parametrov *E. coli* in koliformne bakterije
- s testom χ^2

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V nalogi smo potrjevali prisotnost indikatorskih mikroorganizmov *E. coli* in koliformnih bakterij v 106 vzorcih pitnih vod, z dvema različnima metodama. Metodi smo izvajali na isti dan z opisanimi materiali in po opisanih postopkih.

Rezultate preskušanj smo ovrednotili s štirimi metodami statistične obdelave rezultatov in primerjali zaključke.

Preglednica 3: Rezultati preskušanj vzorcev po metodi MPN in MF

Protokolna številka vzorca	<i>E. coli</i>		Koliformne bakterije		Datum konca analize
	MPN	MF	MPN	MF	
A 632	<2,2	0	2,2	0	27.3.03
A 633	<2,2	0	<2,2	1	27.3.03
A 634	<2,2	0	2,2	5	27.3.03
A 635	<2,2	0	<2,2	0	27.3.03
A 636	<2,2	0	<2,2	0	27.3.03
A 637	<2,2	0	2,2	2	27.3.03
A 638	<2,2	0	<2,2	0	27.3.03
A 670	<2,2	0	<2,2	0	1.4.03
A 671	<2,2	0	<2,2	0	1.4.03
A 672	<2,2	0	<2,2	9	1.4.03
A 673	<2,2	0	<2,2	0	1.4.03
A 674	<2,2	0	<2,2	0	1.4.03
A 675	<2,2	0	<2,2	0	1.4.03
A 676	2,2	2	5,1	5	1.4.03
A 742	<2,2	0	<2,2	5	8.4.03

Protokolna številka vzorca	<i>E. coli</i>		Koliformne bakterije		Datum konca analize
	MPN	MF	MPN	MF	
A 743	<2,2	0	<2,2	0	8.4.03
A 744	2,2	1	2,2	3	8.4.03
A 745	<2,2	0	<2,2	0	8.4.03
A 746	<2,2	0	<2,2	0	8.4.03
A 747	<2,2	0	<2,2	4	8.4.03
A 748	<2,2	1	<2,2	1	8.4.03
A 805	<2,2	0	<2,2	0	15.4.03
A 806	<2,2	0	2,2	14	15.4.03
A 807	<2,2	0	<2,2	0	15.4.03
A 808	<2,2	0	<2,2	0	15.4.03
A 809	<2,2	0	<2,2	0	15.4.03
A 810	<2,2	0	<2,2	1	15.4.03
A 811	<2,2	0	<2,2	6	15.4.03
A 866	<2,2	0	<2,2	0	22.4.03
A 867	<2,2	0	<2,2	0	22.4.03
A 868	<2,2	0	<2,2	0	22.4.03
A 869	<2,2	0	<2,2	0	22.4.03
A 870	<2,2	0	<2,2	0	22.4.03
A 871	<2,2	0	<2,2	0	22.4.03
A 872	>16	>80	>16	>80	22.4.03
A 948	<2,2	0	<2,2	0	29.4.03
A 949	<2,2	0	<2,2	2	29.4.03
A 950	<2,2	0	<2,2	0	29.4.03
A 951	<2,2	0	<2,2	0	29.4.03
A 952	<2,2	0	<2,2	0	29.4.03
A 953	<2,2	0	<2,2	0	29.4.03
A954	<2,2	0	<2,2	0	29.4.03
A 972	<2,2	0	<2,2	0	6.5.03
A 973	<2,2	0	<2,2	2	6.5.03
A 974	<2,2	0	5,1	1	6.5.03
A 975	<2,2	0	<2,2	0	6.5.03
A 976	<2,2	0	<2,2	1	6.5.03
A 977	<2,2	0	2,2	1	6.5.03
A 978	5,1	7	>16	15	6.5.03
A 1066	<2,2	0	<2,2	0	13.5.03

Protokolna številka vzorca	<i>E. coli</i>		Koliformne bakterije		Datum konca analize
	MPN	MF	MPN	MF	
A 1067	<2,2	0	<2,2	1	13.5.03
A 1068	<2,2	0	<2,2	0	13.5.03
A 1069	<2,2	0	<2,2	0	13.5.03
A 1070	<2,2	0	<2,2	0	13.5.03
A 1071	<2,2	0	<2,2	0	13.5.03
A 1072	<2,2	2	2,2	2	13.5.03
A 1139	<2,2	0	<2,2	0	28.5.03
A 1140	<2,2	1	<2,2	1	28.5.03
A 1141	<2,2	3	2,2	4	28.5.03
A 1142	2,2	2	2,2	2	28.5.03
A 1143	<2,2	0	<2,2	0	28.5.03
A 1144	<2,2	0	<2,2	0	28.5.03
A 1145	<2,2	3	>16	11	28.5.03
A 1146	<2,2	1	<2,2	1	28.5.03
A 1179	9,2	8	>16	11	3.6.03
A 1180	<2,2	0	<2,2	1	3.6.03
A 1181	<2,2	0	>16	18	3.6.03
A 1182	>16	13	>16	17	3.6.03
A 1183	<2,2	0	16	1	3.6.03
A 1184	<2,2	0	<2,2	0	3.6.03
A 1185	>16	45	>16	45	3.6.03
A 1266	<2,2	0	<2,2	1	10.6.03
A 1267	2,2	0	2,2	0	10.6.03
A 1268	<2,2	3	<2,2	9	10.6.03
A 1269	5,1	11	5,1	11	10.6.03
A 1270	<2,2	0	2,2	0	10.6.03
A 1271	<2,2	0	<2,2	0	10.6.03
A 1272	>16	67	>16	67	10.6.03
A 1349	5,1	1	5,1	5	17.6.03
A 1350	<2,2	0	<2,2	1	17.6.03
A 1351	<2,2	1	<2,2	1	17.6.03
A 1352	>16	43	>16	86	17.6.03
A 1353	<2,2	0	<2,2	0	17.6.03
A 1354	<2,2	0	<2,2	0	17.6.03
A 1355	>16	12	>16	32	17.6.03

Protokolna številka vzorca	<i>E. coli</i>		Koliformne bakterije		Datum konca analize
	MPN	MF	MPN	MF	
A 1454	<2,2	0	5,1	0	26.6.03
A 1455	>16	29	>16	29	26.6.03
A 1456	<2,2	1	2,2	9	26.6.03
A 1457	>16	>80	>16	>80	26.6.03
A 1458	<2,2	0	2,2	0	26.6.03
A 1459	<2,2	0	<2,2	0	26.6.03
A 1460	5,1	18	>16	48	26.6.03
A 1499	<2,2	0	5,1	7	1.7.03
A 1500	<2,2	2	9,2	19	1.7.03
A 1501	<2,2	0	9,2	7	1.7.03
A 1502	>16	>80	>16	>80	1.7.03
A 1503	<2,2	0	<2,2	0	1.7.03
A 1504	<2,2	0	5,1	0	1.7.03
A 1505	>16	20	>16	20	1.7.03
A 1590	<2,2	0	>16	21	8.7.03
A 1591	<2,2	5	2,2	7	8.7.03
A 1592	2,2	6	16	6	8.7.03
A 1593	>16	71	>16	>80	8.7.03
A 1594	<2,2	0	<2,2	0	8.7.03
A 1595	<2,2	0	<2,2	0	8.7.03
A 1596	<2,2	0	>16	>80	8.7.03

4.1 PRIMERJAVA REZULTATOV PRESKUŠANJ Z IZRAČUNOM VREDNOSTI RELATIVNE RAZLIKE

S statistično metodo primerjave metod, ki smo jo povzeli po SIST EN ISO 17994:2004 *Kakovost vode - Merila za ugotavljanje enakovrednosti mikrobioloških metod (ISO 17994:2004)* smo primerjali razlike v absolutnem številu mikroorganizmov, ki smo jih dobili s primerjanima metodama.

Metoda določa, da moramo iz izračunov izločiti rezultate preskusov za vzorce, pri katerih z obema metodama dobimo rezultat »0« ali ko katera od metod da rezultat, ki ni število (na primer »več kot«, »manj kot«).

Pri rezultatih preskusov za vzorce, kjer z eno od metod dobimo rezultat 0, z drugo metodo pa število, lahko par rezultatov uporabimo, če obema rezultatoma dodamo 1. Take pare smo v tabeli izpisali s krepko pisavo.

Najprej smo metodi primerjali za parameter *E. coli*. Imeli smo 10 primernih parov rezultatov.

Preglednica 4: Primerjava rezultatov preskušanja, dobljenih s primerjanima metodama za parameter E. coli.

Št. vzorca	Protokolna št. vzorca	Potrjeno število kolonij		Relativna razlika
		MPN	MF	
1	A 676	2,2	2	9,53
2	A 744	2,2	1	78,85
3	A 978	5,1	7	-31,67
4	A 1142	2,2	2	9,53
5	A 1179	9,2	8	13,98
6	A 1267	3,2	1	116,32
7	A 1269	5,1	11	-76,87
8	A 1349	5,1	1	162,92
9	A 1460	5,1	18	-126,11
10	A 1592	2,2	6	-100,33

Po predpisanem postopku smo izvedli izračun primerljivosti metod tako, da smo izračunali srednjo vrednost relativne razlike in določili spodnjo in zgornjo mejo. Odločili smo se, da je maksimalni sprejemljivi odklon 20, kot se običajno uporabi. Dobili smo naslednje rezultate:

Srednja vrednost relativne razlike (X): 5,614733

Standardni odmik (s):	93,82823
Razširjena negotovost (U):	59,34218
Spodnja meja (X_L):	-53,7274
Zgornja meja (X_H):	64,95691

Maksimalni sprejemljivi odklon (D)= 20

Po kriterijih za dvostransko vrednotenje rezultatov smo srednjo vrednost relativne razlike lahko uvrstili v skupino, kjer nam izračun pokaže, da imamo nezadostno število podatkov za dvostransko vrednotenje rezultatov.

1. $-D \leq X_L \leq 0$ in $0 \leq X_H \leq +D$

2. $X_L > 0$ ali $X_H < 0$

3. $X_L < -D$ in $X_H > 0$ ali

$X_L < 0$ in $X_H > +D$

4. $X_L > -D$ in $X_H < 0$ ali

$X_L > 0$ in $X_H < +D$

Legenda: Metodi se: 1.razlikujeta/ 2.ne razlikujeta/ 3.nezadostni podatki/ 4.neopredeljeno
Metodi smo nato primerjali še za parameter koliformne bakterije. Imeli smo 25 primernih parov rezultatov.

Preglednica 5: Primerjava rezultatov preskušanja, dobljenih z primerjanima metodama za parameter koliformne bakterije.

Št. vzorca	Protokolna št. vzorca	Potrjeno število kolonij		Relativna razlika
		MPN	MF	
1	A 632	3,2	1	116,32
2	A 634	2,2	5	-82,10
3	A 637	2,2	2	9,53
4	A 676	5,1	5	1,98
5	A 744	2,2	3	-31,02
6	A 806	2,2	14	-185,06
7	A 974	5,1	1	162,92
8	A 977	2,2	1	78,85
9	A 1072	2,2	2	9,53
10	A 1141	2,2	4	-59,78
11	A 1142	2,2	2	9,53
12	A 1183	16	1	277,26
13	A 1267	3,2	1	116,32
14	A 1269	5,1	11	-76,87
15	A 1270	3,2	1	116,32
16	A 1349	5,1	5	1,98
17	A 1454	6,1	1	180,83
18	A 1456	2,2	9	-140,88
19	A 1458	3,2	1	116,32
20	A 1499	5,1	7	-31,67
21	A 1500	9,2	19	-72,52
22	A 1501	9,2	7	27,33
23	A 1504	6,1	1	180,83
24	A 1591	2,2	7	-115,75
25	A 1592	16	6	98,08

Po predpisanem postopku smo izvedli izračun primerljivosti metod tako, da smo izračunali srednjo vrednost relativne razlike in določili spodnjo in zgornjo mejo.

Odločili smo se, da je maksimalni sprejemljivi odklon 20, kot se običajno uporabi.

Dobili smo naslednje rezultate:

Srednja vrednost relativne razlike (X):	28,33109
Standardni odmik (s):	113,7737
Razširjena negotovost (U):	45,50948
Spodnja meja(X_L):	-17,1784
Zgornja meja (X_H):	73,84057

Maksimalni sprejemljivi odklon(D)= 20

Po kriterijih za dvostransko vrednotenje rezultatov smo srednjo vrednost relativne razlike lahko uvrstili v skupino, kjer nam izračun pokaže, da imamo nezadostno število podatkov za dvostransko vrednotenje rezultatov.

1. $-D \leq X_L \leq 0$ in $0 \leq X_H \leq +D$
2. $X_L > 0$ ali $X_H < 0$
3. $X_L < -D$ in $X_H > 0$ ali

$X_L < 0$ in $X_H > +D$

4. $X_L > -D$ in $X_H < 0$ ali
 $X_L > 0$ in $X_H < +D$

Legenda: Metodi se: 1.razlikujeta/ 2.ne razlikujeta/ 3.nezadostni podatki/ 4.neopredeljeno

S postopkom dvostranskega vrednotenja rezultatov preskušanj z izračunom vrednosti relativne razlike smo ovrednotili rezultate preskusov, ki smo jih dobili s primerjanimi metodami za parameter *E. coli* in koliformne bakterije. Primerjavo smo izvedli ločeno za vsak parameter. V obeh primerih smo dobili rezultat, ki pove, da imamo nezadostno število podatkov za dvostransko vrednotenje rezultatov. Za primerjavo, ki bi dala podatek o različnosti metod, bi morali vključiti več vzorcev, ki bi dali rezultate primerne za tako statistično obdelavo. Opazili smo, da je pri metodi MPN zbiranje podatkov, primernih za to statistično obdelavo nekoliko težavno saj moramo večino podatkov izločiti zaradi omejitev podajanja rezultatov pri tej statistični metodi. Zbiranje rezultatov bi bilo zato lahko dolgotrajno.

4.2 PRIMERJAVA REZULTATOV PRESKUŠANJ S POISSONOVIM INDEKSOM SIPANJA REZULTATOV

Rezultate preskušanj primerjanih metod smo nato primerjali s statistično metodo z Poissonovim indeksom sipanj rezultatov (X^2) (14).

Pri tej statistični metodi rezultate preskušanj primerjanih metod podajamo kot ustrezne/neustrezne in primerjamo neujemanje rezultatov za isti vzorec. Pri tem izračunamo indeks, ki nam pove, ali sta metodi statistično različni ali ne.

To statistično metodo smo povzeli po SIST EN ISO 17994:2004 *Kakovost vode - Merila za ugotavljanje enakovrednosti mikrobioloških metod (ISO 17994:2004)*.

Rezultate preskušanja ovrednotimo kot »ustrezne« (U) in »neustrezne« (NU). Pri tem »ustrezen« pri metodi MPN pomeni < 2,2, pri MF pa 0. »Neustrezen« pri metodi MPN pomeni 2,2 in več, pri MF pa število večje od 0.

Indeks izračunamo po formuli:

$$X^2 = \frac{(n_A - n_B)^2}{(n_A + n_B)}$$

Legenda:

n_A - število vzorcev, kjer je metoda A neustrezna, metoda B pa ustrezna

n_B - število vzorcev, kjer je metoda A ustrezna, metoda B pa neustrezna

Ko je vrednost Poissonovega indeksa sipanje rezultatov $X^2 \geq 4$, ovrednotimo metodi kot »različni«, ko je rezultat $X^2 < 4$, metodi ovrednotimo kot »nista različni«.

Preglednica 6: Primerjava obeh metod preskušanja za parameter *E. coli*, uporabimo vzorce, kjer se rezultati preskušanj za metodi ne ujemajo.

Protokolna številka vzorca	Rezultat z metodo MPN	Rezultat z MF	Ustrezni/ neustrezeni z metodo A (MPN)	Ustrezni/ neustrezeni z metodo B (MF)	metoda A neustrezna - metoda B ustrezna	metoda A ustrezna - metoda B neustrezna
A 748	<2,2	1	U	NU		+
A 1072	<2,2	2	U	NU		+
A 1140	<2,2	1	U	NU		+
A 1141	<2,2	3	U	NU		+
A 1145	<2,2	3	U	NU		+
A 1146	<2,2	1	U	NU		+
A 1267	2,2	0	NU	U	+	
A 1268	<2,2	3	U	NU		+
A 1351	<2,2	1	U	NU		+
A 1456	<2,2	1	U	NU		+
A 1500	<2,2	2	U	NU		+
A 1591	<2,2	5	U	NU		+
					$\Sigma 1$	$\Sigma 11$

Podatke vstavimo v formulo, in pridemo do naslednjega rezultata:

$$X^2 = \frac{(n_A - n_B)^2}{(n_A + n_B)} = \frac{(1 - 11)^2}{(1 + 11)} = \frac{100}{12} = 8,3$$

S to statistično metodo primerjave metod preskušanja za parameter *E. coli* smo dobili indeks 8,3, in metodi ovrednotili kot »različni«.

Preglednica 7: Primerjava obeh metod preskušanja za parameter koliformne bakterije, uporabimo vzorce, kjer se rezultati preskušanj za metodi ne ujemajo.

Protokolna številka vzorca	Rezultat z metodo MPN	Rezultat z MF	Ustrezen/ neustrezen z metodo A (MPN)	Ustrezen/ neustrezen z metodo B (MF)	metoda A nestrezna- metoda B ustrežna	metoda A ustrežna - metoda B neustrežna
A 632	2,2	0	NU	U	+	
A 633	<2,2	1	U	NU		+
A 672	<2,2	9	U	NU		+
A 742	<2,2	5	U	NU		+
A 747	<2,2	4	U	NU		+
A 748	<2,2	1	U	NU		+
A 810	<2,2	1	U	NU		+
A 811	<2,2	6	U	NU		+
A 949	<2,2	2	U	NU		+
A 973	<2,2	2	U	NU		+
A 976	<2,2	1	U	NU		+
A 1067	<2,2	1	U	NU		+
A 1140	<2,2	1	U	NU		+
A 1146	<2,2	1	U	NU		+
A 1180	<2,2	1	U	NU		+
A 1266	<2,2	1	U	NU		+
A 1267	2,2	0	NU	U	+	
A 1268	<2,2	9	U	NU		+
A 1270	2,2	0	NU	U	+	
A 1350	<2,2	1	U	NU		+
A 1351	<2,2	1	U	NU		+
A 1454	5,1	0	NU	U	+	
A 1458	2,2	0	NU	U	+	
A 1504	5,1	0	NU	U	+	
					Σ 6	Σ 18

Podatke vstavimo v formulo, in pridemo do naslednjega rezultata:

$$X^2 = \frac{(n_A - n_B)^2}{(n_A + n_B)} = \frac{(6 - 18)^2}{(6 + 18)} = \frac{144}{24} = 6$$

S to statistično metodo primerjave metod preskušanja za parameter koliformne bakterije smo dobili indeks 6, in metodi ponovno ovrednotili kot »različni«.

Nato smo z isto statistično metodo primerjali rezultate preskušanj še tako, da smo vzeli vzorec kot celoto, in ga ocenili kot ustrezen (U) oziroma neustrezen (NU). Pri tem smo vzorec označili kot neustrezen, če je bil rezultat preskušanja z primerjano metodo neustrezen za vsaj en parameter.

Preglednica 8: Primerjava obeh metod preskušanja za vzorec, uporabimo vzorce, kjer se rezultati preskušanj za primerjani metodi ne ujemajo.

Protokolna številka vzorca	Vzorec ustreza/ ne ustreza z metodo MPN	Vzorec ustreza/ ne ustreza z MF	metoda A pozitivna- metoda B negativna	metoda A negativna- metoda B pozitivna
A 632	NU	U	+	
A 633	U	NU		+
A 672	U	NU		+
A 742	U	NU		+
A747	U	NU		+
A 748	U	NU		+
A 810	U	NU		+
A 811	U	NU		+
A 949	U	NU		+
A 973	U	NU		+
A 976	U	NU		+
A 1067	U	NU		+
A 1140	U	NU		+
A 1146	U	NU		+
A 1180	U	NU		+
A 1266	U	NU		+
A 1267	NU	U	+	
A 1268	U	NU		+
A 1350	U	NU		+
A 1351	U	NU		+
A 1504	NU	U	+	
			Σ 3	Σ 18

Podatke vstavimo v formulo, in pridemo do naslednjega rezultata:

$$X^2 = \frac{(n_A - n_B)^2}{(n_A + n_B)} = \frac{(3 - 18)^2}{(3 + 18)} = \frac{225}{21} = 11$$

S to statistično metodo primerjave metod preskušanja za vzorec smo dobili indeks 11, in metodi ponovno ovrednotili kot »različni«.

4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV PRESKUŠANJ Z OCENO USTREZNOSTI VZORCA Z UPOŠTEVANJEM PARAMETROV *E. coli* IN KOLIFORMNE BAKTERIJE

Želeli smo ugotoviti s katero metodo dobimo višji odstotek neustreznih vzorcev. Pri tem smo vzorec označili kot »neustrezen«, če je bil rezultat preskušanja z primerjano metodo neustrezen za najmanj en parameter.

Preglednica 9: vzorci z rezultati preskušanj in oceno ustrezno (U)/ neustrezno (NU).

Protokolna številka vzorca	MPN <i>E. coli</i>	MPN koliformne bakterije	Ustrezno/ neustrezno z metodo MPN	MF <i>E. coli</i>	MF koliformi	Ustrezno/ neustrezno z MF
A 632	<2,2	2,2	NU	0	0	U
A 633	<2,2	<2,2	U	0	1	NU
A 634	<2,2	2,2	NU	0	5	NU
A 635	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 636	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 637	<2,2	2,2	NU	0	2	NU
A 638	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 670	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 671	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 672	<2,2	<2,2	U	0	9	NU
A 673	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 674	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 675	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 676	2,2	5,1	NU	2	5	NU
A 742	<2,2	<2,2	U	0	5	NU
A 743	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 744	2,2	2,2	NU	1	3	NU

Protokolna številka vzorca	MPN <i>E. coli</i>	MPN koliformne bakterije	Ustrezno/ neustrezno z metodo MPN	MF <i>E. coli</i>	MF koliformi	Ustrezno/ neustrezno z MF
A 745	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 746	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 747	<2,2	<2,2	U	0	4	NU
A 748	<2,2	<2,2	U	1	1	NU
A 805	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 806	<2,2	2,2	NU	0	14	NU
A 807	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 808	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 809	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 810	<2,2	<2,2	U	0	1	NU
A 811	<2,2	<2,2	U	0	6	NU
A 866	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 867	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 868	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 869	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 870	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 871	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 872	>16	>16	NU	>80	>80	NU
A 948	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 949	<2,2	<2,2	U	0	2	NU
A 950	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 951	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 952	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 953	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 954	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 972	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 973	<2,2	<2,2	U	0	2	NU
A 974	<2,2	5,1	NU	0	1	NU
A 975	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 976	<2,2	<2,2	U	0	1	NU
A 977	<2,2	2,2	NU	0	1	NU
A 978	5,1	>16	NU	7	15	NU
A 1066	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1067	<2,2	<2,2	U	0	1	NU
A 1068	<2,2	<2,2	U	0	0	U

Protokolna številka vzorca	MPN <i>E. coli</i>	MPN koliformne bakterije	Ustrezno/ neustrezno z metodo MPN	MF <i>E. coli</i>	MF koliformi	Ustrezno/ neustrezno z MF
A 1069	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1070	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1071	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1072	<2,2	2,2	NU	2	2	NU
A 1139	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1140	<2,2	<2,2	U	1	1	NU
A 1141	<2,2	2,2	NU	3	4	NU
A 1142	2,2	2,2	NU	2	2	NU
A 1143	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1144	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1145	<2,2	>16	NU	3	11	NU
A 1146	<2,2	<2,2	U	1	1	NU
A 1179	9,2	>16	NU	8	11	NU
A 1180	<2,2	<2,2	U	0	1	NU
A 1181	<2,2	>16	NU	0	18	NU
A 1182	>16	>16	NU	13	17	NU
A 1183	<2,2	16	NU	0	1	NU
A 1184	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1185	>16	>16	NU	45	45	NU
A 1266	<2,2	<2,2	U	0	1	NU
A 1267	2,2	2,2	NU	0	0	U
A 1268	<2,2	<2,2	U	3	9	NU
A 1269	5,1	5,1	NU	11	11	NU
A 1270	<2,2	2,2	NU	0	0	U
A 1271	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1272	>16	>16	NU	67	67	NU
A 1349	5,1	5,1	NU	1	5	NU
A 1350	<2,2	<2,2	U	0	1	NU
A 1351	<2,2	<2,2	U	1	1	NU
A 1352	>16	>16	NU	43	86	NU
A 1353	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1354	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1355	>16	>16	NU	12	32	NU
A 1454	<2,2	5,1	NU	0	0	U
A 1455	>16	>16	NU	29	29	NU

Protokolna številka vzorca	MPN <i>E. coli</i>	MPN koliformne bakterije	Ustrezno/ neustrezno z metodo MPN	MF <i>E. coli</i>	MF koliformi	Ustrezno/ neustrezno z MF
A 1456	<2,2	2,2	NU	1	9	NU
A 1457	>16	>16	NU	>80	>80	NU
A 1458	<2,2	2,2	NU	0	0	U
A 1459	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1460	5,1	>16	NU	18	48	NU
A 1499	<2,2	5,1	NU	0	7	NU
A 1500	<2,2	9,2	NU	2	19	NU
A 1501	<2,2	9,2	NU	0	7	NU
A 1502	>16	>16	NU	>80	>80	NU
A 1503	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1504	<2,2	5,1	NU	0	0	U
A 1505	>16	>16	NU	20	20	NU
A 1590	<2,2	>16	NU	0	21	NU
A 1591	<2,2	2,2	NU	5	7	NU
A 1592	2,2	16	NU	6	6	NU
A 1593	>16	>16	NU	71	>80	NU
A 1594	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1595	<2,2	<2,2	U	0	0	U
A 1596	<2,2	>16	NU	0	>80	NU

Število ustreznih vzorcev z metodo MPN: 63

Število neustreznih vzorcev z metodo MPN: 43

Število ustreznih vzorcev z MF: 51

Število neustreznih vzorcev z MF: 55

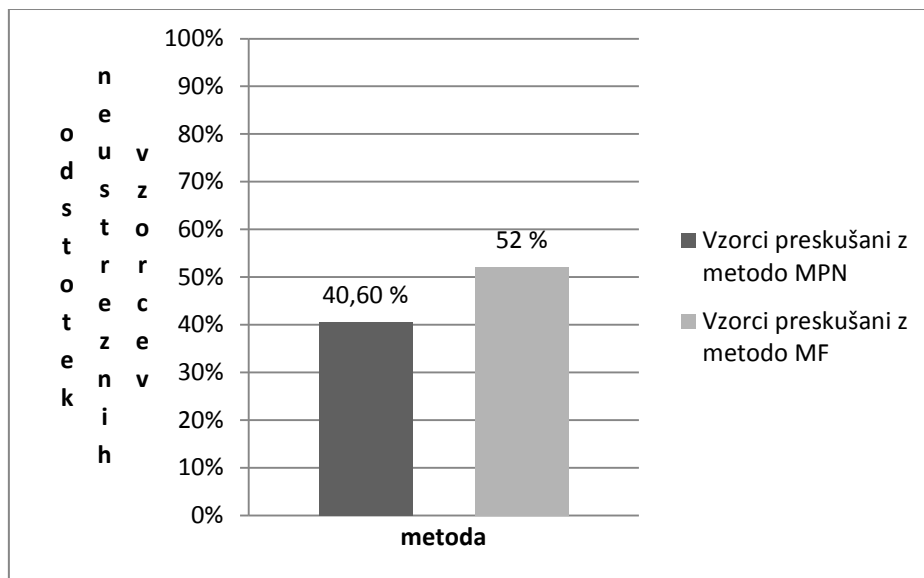
Odstotek neustreznih vzorcev z metodo MPN: 40,6 %

Odstotek neustreznih vzorcev z MF: 52 %

Primerjali smo odstotek neustreznih vzorcev, ki smo ga dobili z vsako od primerjanih metod. Ugotovili smo, da je odstotek neustreznih vzorcev, ko uporabimo MF, nekoliko višji kot takrat, ko uporabimo metodo MPN, vendar razlika ni signifikantno velika.

Razliko med odstotkom neustreznih vzorcev, ki jo dobimo pri preskušanju z metodo MPN in MF, smo prikazali grafično.

Slika 7: Odstotek neustreznih vzorcev pri preskušanju z metodo MPN in MF.



Sklepamo, da dobimo z uporabo metode MPN nižji odstotek neustreznih rezultatov, saj je ta metoda manj občutljiva. Pri MF lahko izoliramo že eno kolonijo na membrani.

Sklepamo, da z metodo MPN lahko dobimo ustrezen rezultat tudi pri vzorcih, v katerih je prisotno nizko število iskanih mikroorganizmov. Ugotovili smo, da smo pri naših vzorcih prišli do takega rezultata, ko je bilo v istem vzorcu z MF ugotovljeno število mikroorganizmov manjše kot 10. Sklepamo, da je, ko je koncentracija bakterij v vzorcu nizka, večja možnost, da za preskušanje zajamemo delež vzorca, ki ne vsebuje iskanega mikroorganizma .

4.4 PRIMERJAVA REZULTATOV PRESKUŠANJ S TESTOM χ^2

Želeli smo ugotoviti, ali obstajajo statistično značilne razlike v rezultatih preskušanja pri uporabi primerjanih metod, zaradi katerih izbira metode preskušanja vpliva na rezultat preskusa. Za primerjavo metod smo uporabili statistično metodo primerjave s testom χ^2 . Primerjali smo rezultate preskušanja s primerjanima metodama za parameter *E. coli*.

Preglednica 10: Primerjava rezultatov preskušanja za parameter *E. coli* s testom χ^2 .

<i>E. coli</i> MPN	<i>E. coli</i> MF			
	0		1	
	število	%	število	%
<2,2	74	69,8	11	10,4
2,2	3	2,8	2	1,9
5,1	0	0	4	3,8
9,2	0	0	1	0,9
>16	0	0	11	10,4
skupaj	77	72,6	29	27,4

Rezultate preskusa z metodo MPN smo razvrstili v razrede na osnovi MPN indeksa.

Rezultate preskusa z MF smo razdelili v dva razreda . V enem razredu so rezultati z vrednostjo 0, v drugem pa rezultati z vrednostmi od 1 do 101.

Po obdelavi podatkov s testom χ^2 je program podal rezultat signifikance 0,00, vendar je dodal opozorilo, da je bilo 70 % celic s pričakovano frekvenco manj kot 5. Zato smo podali ugotovitev, da ta statistična metoda, ni primerna za obdelavo podatkov, kot jih imamo na voljo.

Nato smo primerjali rezultate preskušanja s primerjanima metodama za parameter koliformne bakterije.

Preglednica 11: Primerjava rezultatov preskušanja za parameter koliformne bakterije s testom χ^2 .

Koliformne bakterije MPN	Koliformne bakterije MF			
	0		1	
	število	%	število	%
<2,2	45	42,5	18	17,0
2,2	4	3,8	10	9,4
5,1	2	1,9	5	4,7
9,2	0	0	2	1,9
16	0	0	2	1,9
>16	0	0	18	17,0
skupaj	51	48,1	55	51,9

Rezultate preskusa z metodo MPN smo razvrstili v razrede na osnovi MPN indeksa.

Rezultate preskusa z MF smo razdelili v dva razreda. V enem razredu so rezultati 0, v drugem pa rezultati od 1 do 101.

Po obdelavi podatkov s testom χ^2 je program ponovno podal rezultat signifikance 0,00, vendar je dodal opozorilo, da je bilo 70 % celic s pričakovano frekvenco manj kot 5.

S pomočjo testa χ^2 smo ugotovili, da kljub razmeroma velikemu vzorcu in izračunu signifikance 0,00, ne moremo trditi, da na rezultate preskusa vpliva izbira metode, saj smo z obdelavo podatkov za oba parametra ugotovili, da je bilo 70 % celic s pričakovano frekvenco manj kot 5. To izpodbija trdnost statističnega testa. Ugotovili smo, da ta test ni primeren za statistično obdelavo rezultatov, kakršne smo imeli na voljo.

Dejstvo, da je preskrba z zadostno količino pitne vode ključnega pomena tako za zdravje ljudi, kot tudi za ekonomski in socialni razvoj družbe, daje velik pomen tako pripravi, kot tudi sistematičnemu spremljanju kakovosti pitne vode (3) .

Ustrezna pitna voda mora v naravnem stanju ali po pripravi ustrezati zahtevam, predpisanim v *Pravilniku o pitni vodi* (23- 27). Tako pitno vodo lahko ljudje uporabljajo za pitje, osebno higieno in pripravo hrane. Če so presežene vrednosti posameznih parametrov, ki so podane v pravilniku, jo opredelimo kot neustrezno, saj lahko ogroža zdravje ljudi. Priprava vode je obdelava vode z različnimi postopki. Tako se zagotovi njena skladnost in ustreznost s predpisi.

Zdravo pitno vodo je potrebno varovati. Pomemben del zagotavljanja čiste pitne vode je nadzor, ki ga izvajamo redno in dovolj pogosto, in sicer na različnih nivojih priprave vode- od nadzora v zajetju, do preverjanja kakovosti vode, ki prispe do končnega uporabnika.

Javni vodooskrbni sistem po *Pravilniku o pitni vodi* zajema (23- 27):

- del, s katerim neposredno upravlja upravljavec in obsega del od objekta za zajem vode (zajetje) do priključka posameznega porabnika,
- del pred zajetjem, ki vpliva na kakovost pitne vode- vodovarstveno območje.

Kontrola vodooskrbnega sistema se izvaja na več nivojih: od terenskega pregleda sistema, pogojev na terenu v danem trenutku (vremenske razmere, poškodbe sistema, vzdrževalna dela na sistemu) do mikrobiološke, fizikalne, kemijske ter radiološke preiskave (23- 27).

Zato je zelo pomembno, da vzorčevalec pozna okolje, kjer se nahaja vodooskrbni sistem, saj lahko opazi pomembne spremembe, ki bi lahko vplivale na kakovost pitne vode.

Pomembno je tudi sistematično spremljanje dogajanja na vodooskrbnem sistemu v različnih pogojih- na primer v različnih letnih časih, vremenskih razmerah, ob izrednih dogodkih, ki bi lahko ogrozili vodni vir (npr. razlitje nevarnih snovi)

Osnova za pravilen laboratorijski rezultat je pravilno vzorčenje, saj rezultat preskušanja po katerikoli metodi, ne more biti boljši kot je vzorec, na katerem se to izvaja (15, 16). Za pravilno izbiro vzorcev in pravilen odvzem, ravnanje z vzorci in transport so odgovorni pripravljavci načrtov vzorčenja in vzorčevalci. Vedeti moramo, da vzorec, ki ni bil pravilno odvzet ali transportiran, ni primeren za izvedbo preskusa, saj ne odraža dejanske slike stanja sistema. Tako tudi ne moremo podati verodostojne ocene stanja vodnega vira, ki smo ga opazovali. Tega se morajo zavedati vsi, ki so vključeni v verigo dela z vzorcem, od njegovega odvzema do končnega rezultata. Namen vzorčenja je odvzeti dovolj majhen delež materiala, da je mogoč njegov transport, hkrati pa dovolj velik, da pravilno predstavlja material, ki ga vzorčimo (13). Po odvzemu z vzorcem ravnamo tako, da do izvajanja analize, ne pride do spremembe sestave vzorca. Pri tem je pomembno število vzorcev, odvzemna mesta in izbrane preiskave oziroma parametri (14, 15).

Na trgu se pojavljajo tudi hitri testi za ugotavljanje mikrobiološke onesnaženosti pitne vode (17, 18). Test je običajno enostaven za uporabo, ekonomičen in uporabniku omogoča

hitre rezultate. Test deluje tako, da reagent zazna prisotnost ATP. Vendar tak test ne more nadomestiti neposredne osamitve mikroorganizmov in ima orientacijski pomen.

V izrednih primerih (epidemije, naravne nesreče, okvare na sistemu, stanje po adaptaciji sistema), je pomembno, da dobimo informacijo o onesnaženju čim hitreje. Pomemben je že podatek o sumu na prisotnost indikatorskih mikroorganizmov, ki ga lahko pri MF damo že v roku 21 ur po nacepljanju vzorca. Tak podatek je pomemben za upravljavca, ki lahko nemudoma ukrepa in obvesti uporabnike o uvedbi ukrepov. S sistemom hitrega obveščanja, ki je v našem laboratoriju vzpostavljen med laboratorijem in naročniki po predhodnem dogovoru, se telefonsko sporoča neskladnost takoj, ko je ta potrjena, še pred zaključkom analize. Pri tem je potrebno poudariti, da gre za delni rezultat analize. Pri nadzoru pitnih vod je poleg prisotnosti pomembno tudi število prisotnih mikroorganizmov, zato se do analize njihovo število ne sme spremeniti (16). Zato je pomembno pravilno konzerviranje in transport vzorca z dodajanjem konzervansov in transportom pri primerni temperaturi. V vodi je lahko prisotna tudi normalna vodna flora. Velikokrat je ta v neobdelanih vzorcih vode, ki jih dobimo iz majhnih vodooskrbnih sistemov, ki nimajo urejenega sistema prečiščevanja in obdelave vode, zelo številčna. Kar nekaj takih sistemov se nahaja tudi na našem območju. Ta vodna flora lahko prekrije rast indikatorskih organizmov, ki jih želimo izolirati, saj so ti običajno prisotni v nižjem številu. Zato pri vodah, za katere domnevamo, da bi lahko vsebovali večje število mikroorganizmov, filtriramo dodatno še en volumen vzorca in inkubiramo pri temperaturi 44°C, ki zavre rast spremljevalne flore (8). Pri tem ni ovirana rast *E. coli*. Po dogovoru se v našem laboratoriju za dodatno inkubacijo odločimo pri vzorcih vod, kjer ni izmerjenega rezidualnega klora. Pri metodi MPN primarno nacepljena gojišča inkubiramo na 37°C in nato izvajamo potrditvene teste.

Za filtracijo izberemo tak volumen, da bomo po filtraciji in inkubaciji na membrani imeli števno število kolonij, to je 10 do 100 kolonij (9). Če predvidimo, da bo število bakterij v vzorcu večje, lahko filtriramo redčine vzorca. V našem laboratoriju vzorce pitnih vod redčimo le izjemoma. Če predpostavimo, da je vzorec, ki ga preskušamo z metodo MPN zelo onesnažen, nacepimo več serij epruvet. Tega pri vzorcih pitnih vod običajno ne uporabljamo, nacepimo samo eno serijo petih epruvet.

Gojišče za primarno kultivacijo vsebuje laktozo, ki jo *E. coli* in koliformne bakterije uporabljajo za svoj metabolizem. Pri tem nastaja kislina, ki povzroči zakisanje gojišča, kar opazimo kot spremembo barve indikatorja, ki je dodan gojišču. To biokemijsko lastnost uporabljamo pri primarnem pregledu gojišč, da jih ločimo od ostalih mikroorganizmov. Pri MF je potrebno uporabljati agar Tergitol 7. To gojišče je predpisano v standardu, ki je osnova za našo metodo (8). Koliforme bakterije in *E. coli* rastejo na gojišču, ki smo ga mi uporabljali kot selektivno gojišče pri MF kot rumene kolonije (8). To so kolonije, ki jih pri pregledu plošč označimo kot sumljive in jih vključimo v identifikacijo. Izgled kolonij koliformnih bakterij in *E. coli* je lahko različen. Barva je lahko bolj ali manj intenzivno rumene barve, so lahko različnih velikosti. Kolonije lahko imajo različno površino (vlažne, hrapave). Spremljevalna flora na gojišču poraste kot zelene ali rožnate kolonije, lahko tudi kot zelo drobne suhe rumene kolonije. Pri pregledu nacepljenih gojišč je zato pomembna izkušnost analitika. Pri metodi MPN pride ob fermentaciji laktoze in do spremembe barve gojišča iz svetlo rožnate v intenzivno rožnato in prisotnost mehurčkov plina v Durhamovi cevki (11). Spremembo opazimo zaradi dodatka indikatorja kislosti gojišču. Taka epruveta je sumljiva za prisotnost iskanih organizmov in jo vključimo v identifikacijo.

Identifikacija poteka z biokemičnimi testi (8, 11). Pri tem opazujemo fermentacijo sumljivega mikroorganizma. Kot koliformno bakterijo oziroma *E. coli* označimo mikroorganizem, ki izraža biokemične lastnosti, ki so določene v posamezni metodi. Uporabljamo teste, ki jih izvedemo razmeroma hitro, kar je pri rutinskem laboratorijskem delu pomembno. Gojišče BGGB, ki ga uporabljamo pri identifikaciji sumljivih epruvet pri metodi MPN vsebuje barvilo Brilijantno zeleno in žolčne soli, ki omejita rast spremljevalne flore, predvsem različnih gram pozitivnih bakterij pa tudi nekaterih gram negativnih bakterij, ki so prisotne v vzorcu (21). Prisotnost Brilijantno zelenega onemogoči rast anaerobov, ki fermentirajo laktozo in prepreči lažno pozitivne rezultate. To je pomembno, ker gojišče LAP nima dodanih spojin, ki bi omejile rast spremljevalne flore, je neselektivno.

Občutljivost metode je pri MF večja, saj zaznamo že eno kolonijo, ki poraste na membrani. Pri metodi MPN pomeni ena pozitivna epruveta v setu petih epruvet rezultat indeks MPN 2,2 cfu/ 100 mL. Števnost kolonij na membrani pri MF je do 100 kolonij, medtem ko je rezultat, če imamo set petih pozitivnih epruvet, pri metodi MPN >16. V nekaj primerih

smo z metodi MPN prišli do negativnega rezultata, medtem ko je bil rezultat pri MF pozitiven. Tega lahko pripišemo neenakomerni razporeditvi mikroorganizmov v vzorcu. Ko je v vzorcu prisotno nizko število mikroorganizmov, je večja možnost, da za analizo zajamemo delež vzorca, ki ne vsebuje iskanih mikroorganizmov. Še eden od dejavnikov, ki bi lahko vplival na rast mikroorganizmov, je prisotnost snovi, ki zavirajo rast normalne vodne flore in so prisotne v selektivnem gojišču, ki ga uporabljamo pri MF. Primarno gojišče, ki ga uporabljamo pri metodi MPN pa je manj selektivno. Voda je za mikroorganizme neugodno okolje, bakterijske celice so lahko prizadete, zato se po nacepljanju na gojišče ne morejo razmnoževati in ne tvorijo vidnih kolonij. Zato je za izolacijo čim višjega števila organizmov zelo pomembna pravilna izbira gojišča. Tako gojišče mora čim bolj uspešno zavirati rast spremljevalne flore, hkrati pa ne sme ovirati rasti iskanih mikroorganizmov. Razlike v številu izoliranih koliformnih bakterij in *E. coli* s posamezno metodo pri istem vzorcu lahko pripišemo tudi nekoliko različnim potrjevalnim testom, ki jih posamezna metoda zahteva.

Priprava selektivnih in diferencialnih gojišč je pomemben del postopka, pomembna je priprava, hranjenje in rok uporabnosti (22). Kontroliramo kakovost vsake serije pripravljenih gojišč in reagentov. Za pripravo gojišč uporabljamo komercialne mešanice. Pomembno je, da se sestava in s tem učinkovitost gojišča ne spreminja. Ker je mešanica zelo higroskopska, smo pozorni na vsako spremembo izgleda mešanice. Zato tudi beležimo datum prejetja in odprtja plastenke. Če je gojišče ob odprtju ali med uporabo strjeno, razbarvano ali kako drugače spremenjeno, ga ne uporabimo. Zaprte in že odprte plastenke z mešanico za gojišče hranimo po navodilih proizvajalca. Vsak nov lot gojišča testiramo na sterilnost in selektivnost, po navodilih proizvajalca. Gojišča označimo z datumom izdelave in rokom trajanja. Plošče hranimo tako, da je gojišče obrnjeno navzgor, v plastičnih vrečkah. Gojišča hranimo v hladilniku, pred uporabo jih ogrejemo na sobno temperaturo.

Pri mikrobiološkem preskušanju imamo opravka z živimi organizmi, zato so rezultati zelo spremenljivi (13). Postopke kontrole kvalitete, ki se uporabljajo pri kemijskih preskušanjih, na primer referenčne standarde, kontrolne karte, veliko težje uporabimo. Stabilnost pogojev zagotovimo tako, da preskus izvajamo po standardiziranih postopkih. Metodo zato izvajamo v skladu z navodili. Stabilnost pogojev preverjamo z izvajanjem različnih dnevnih kontrol kvalitete. Izvajamo kontrolo sterilnosti gojišč, kontrolo kvalitete

gojišč, kontrolo sterilnosti uporabljenega materiala in diluentov, kontrolo okolja, kontrolo sterilnosti postopka dela. Notranjo kontrolo kvalitete izvedemo tako, da filtriramo suspenzijo organizmov za pozitivno in negativno kontrolo. Postopek filtracije s kontrolami izvedemo po enakem postopku kot za vzorec, kontrole inkubiramo skupaj z vzorci in izvajamo enake potrditvene teste. Za slepo kontrolo uporabimo sterilno destilirano vodo, izvajamo jo na začetku vsake serije vzorcev.

Pri izvajanju preizkusa je zelo pomembno tudi koliko časa preteče med posameznimi postopki. Zato beležimo datum in uro nacepljanja vzorca ter datume in ure vsakega pregleda plošč in izvajanja postopkov za identifikacijo. Oseba, ki izvede posamezen postopek se podpiše, s čimer zagotovimo sledljivost nad izvajanjem postopkov. Osebe v laboratoriju, ki izvaja analize, preverjamo s sočasnimi preskušanjem vzorcev medlaboratorijskega testiranja (12). Laboratorij je vključen v medlaboratorijska testiranja pri Health Protection Agency, v shemah za različne matrikse vzorce. Ocenjevanje vključuje pravilnost posameznih rezultatov ter serije rezultatov skozi daljše časovno obdobje. Vse analize so številčno ovrednotene. Pri neustreznih rezultatih organizator poda predloge za izboljšanje dela. Priložen je tudi opis bakterijske flore, ki je sestavljala posamezen vzorec. Organizator tudi komentira možne zaplete pri izvajanju preskusa.

V nekaterih primerjavah (19), je bilo, podobno kot pri nas, ugotovljeno, da je oprema in gojišča, ki jo potrebujemo za izvedbo MF nekoliko dražja kot za metodo MPN. Tudi izvedba je nekoliko zahtevnejša. Ugotovili so, da je MF primernejša za vzorce, kjer je prisotno nizko število iskanih mikroorganizmov. Kot prednost so, podobno kot mi navedli, da z MF hitreje pridemo do delnih in končnih rezultatov, kar je pomembno za naročnike. V našem laboratoriju izvajamo metodo MPN in MF, vendar je uporaba metode MPN omejena samo na določene vzorce. Pri izboru metode za posamezen vzorec upoštevamo zakonske predpise.

Pri praktičnem delu, smo opazovali prednosti in slabosti obeh uporabljenih metod.

Ugotovili smo naslednje:

MF:

- z njo lahko preiskujemo velik volumen vzorca,
- delne in končne rezultate dobimo razmeroma hitro,
- ni primerna za vzorce z veliko spremljevalne flore,
- izvajanje metode je tehnično zahtevno.

Metoda MPN:

- primerna je tudi za zelo motne vzorce (alge, delci zemlje),
- primerna je za vzorce z veliko spremljevalne flore,
- za izvedbo je tehnično manj zahtevna,

Obe metodi sta po trenutni zakonodaji še vedno dovoljeni, čeprav se zaradi svojih prednosti v vedno večji meri uporablja metoda MF.

Opazovali smo tudi praktične razloge, ki vplivajo na samo izvajanje postopkov v laboratoriju. Primerjali smo čas, potreben za primarno nacepljanje, identifikacijo, potrebno opremo in gojišča in posebej usposobljeno osebje, oziroma drugačno organizacijo dela. Ugotovili smo, da za primarno nacepljanje vzorcev pri metodi MPN porabimo manj časa, kot za izvedbo MF. Precepljanje in identifikacija, pa smo ocenili, da sta pri obeh metodah približno enako dolgotrajni in zahtevni. Pri metodi MPN smo za primarno nacepljanje uporabili običajno laboratorijsko opremo, saj smo za primarno nacepljanje uporabili le graduirane pipete. Za MF pa potrebujemo sistem za izvedbo membranske filtracije, ki je sestavljen iz več delov, ter membranske filtre in lije. Pri precepljanju in identifikaciji pa nato pri obeh metodah uporabimo običajno laboratorijsko opremo. Gojišče 2xLPV, ki smo ga uporabljali za primarno nacepljanje pri metodi MPN je manj zahtevno za pripravo in cenovno ugodnejše. Pri MF smo za primarno kultivacijo uporabili gojišče T7, ki smo ga sami pripravili, vendar je njegova cena nekoliko višja. Za precepljanje in identifikacijo smo pri obeh metodah uporabili nekaj enakih gojišč (KA, VRBA in TV). Pri MF smo nato uporabili TBX, ki smo ga sami pripravili iz pripravljene mešanice, njegova cena pa je nekoliko višja. Pri metodi MPN pa smo uporabili BGGB, ki smo ga prav tako sami pripravili iz pripravljene mešanice. Izvedba postopka MF je zahtevala dodatno usposabljanje osebja, medtem ko izvedba metode MPN ni toliko tehnično zahtevna. Pri

pregledu nacepljenih gojišč je pri obeh metodah potrebno običajno znanje analitika v laboratoriju, ki ga pridobi pri uvajanju metode. Za primarno nacepljanje z metodo MPN smo porabili manj časa, to pa je za organizacijo laboratorijskega dela pomembno, saj so vzorci prispeli v laboratorij popoldan. Pomembno je, da vzorce čim prej nacepimo, saj moramo upoštevati določene čase inkubacije, ki jih zahteva posamezna metoda

5 SKLEP

Primerjali smo dve metodi, ki jih uporabljamo za mikrobiološko preskušanje vzorcev pitnih vod: metoda fermentacije v več epruvetah (MPN) in metoda membranske filtracije ter kulture na selektivnih gojiščih (MF) za parametre *E. coli* in koliformne bakterije.

Ugotovili smo, da je primarno nacepljanje vzorcev z metodo MPN tehnično manj zahtevno kot nacepljanje vzorcev z MF.

Za izvajanje metode MPN potrebujemo manj opreme in gojišč kot za izvajanje MF.

Z MF lahko podamo sum na onesnaženje že v 21 urah, pri metodi MPN pa šele po 48 urah.

Z MF lahko podamo končni negativni rezultat v 48 urah, končni pozitivni rezultat pa v 72 urah. Z metodo MPN podamo končni negativni rezultat v 48 urah, končni pozitivni rezultat v 96 urah.

Mejna vrednost v *Pravilniku o pitni vodi* je 1 cfu/ 100 mL. Ko je prisotno nizko število iskanih mikroorganizmov, lahko z metodo MPN dobimo negativne rezultate, saj metoda zazna vrednosti, ki so statistično večje od 2,2 cfu/ 100 mL. MF lahko zazna že 1 cfu/ 100 mL.

Občutljivost metode MPN določa MPN indeks, ki je 2,2 cfu/ 100 mL, pri MF pa je občutljivost metode 1 cfu/ 100 mL.

Rezultat pri MF je v večini primerov točno določena številka, kar je pomembno, če želimo rezultate statistično obdelati. Pri metodi MPN je rezultat pogosto v obliki intervala, zato je statistična obdelava težja.

Rezultate preskušanj smo statistično ovrednotili s postopkom dvostranskega vrednotenja rezultatov z izračunom vrednosti relativne razlike, ločeno za parametra *E. coli* in koliformne bakterije. V obeh primerih smo ugotovili, da imamo nezadostno število podatkov za dvostransko vrednotenje rezultatov. Po metodi izračuna Poisson-ovega

indeksa sipanja rezultatov primerjave metod preskušanja, za vsak parameter ločeno, ter za vzorce kot celoto, smo metodi ovrednotili kot različni. Pri primerjavi rezultatov preskušanj z oceno ustreznosti vzorca smo ugotovili, da je odstotek neustreznih vzorcev višji, ko uporabimo MF, zato smo zaključili, da je MF bolj občutljiva. Za test χ^2 smo ugotovili, da je kot statistična metoda neprimeren za obdelavo take vrste rezultatov.

LITERATURA :

1. Muževič B. Medicina skozi čas. Ljubljana: Anthes, 1994: 1- 245.
2. Borisov P: Zgodovina medicine, Ljubljana, Cankarjeva založba, 1985: 263-399.
3. Pavlica T, Seljak M: Mikrobiološki nadzor nad pitnimi vodami. Sanitarna mikrobiologija v javnem zdravstvu, Zbornik predavanj, Laško, Sekcija za klinično mikrobiologijo in hospitalne infekcije SZD, 2002: 133-41.
4. Uršič S, Petrovič A, Uršič A: Odvzem vzorcev za preiskave v sanitarni mikrobiologiji. Sanitarna mikrobiologija v javnem zdravstvu, Zbornik predavanj, Laško, Sekcija za klinično mikrobiologijo in hospitalne infekcije SZD, 2002: 190- 93.
5. http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=115&pi=5&_5_id=410&_5_PageIndex=0&_5_groupId=245&_5_newsCategory=&_5_action=ShowNewsFull&pl=115-5.0.#6, dostopno: december, 2012.
6. http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=78&pi=6&_6_id=412&_6_PageIndex=0&_6_groupId=2&_6_newsCategory=IVZ+kategorija&_6_action=ShowNewsFull&pl=78-6.0, dostopno: december, 2012.
7. Eržen I: Zdravje in okolje- izbrana poglavja, Ljubljana, Katedra za javno zdravje- oddelek za socialno medicino, 2011: 162.
8. SIST EN ISO 9308-1:2001/AC:2009 Kakovost vode - Ugotavljanje prisotnosti in števila Escherichia coli in koliformnih bakterij - 1. del: Metoda membranske filtracije - Popravek AC (ISO 9308-1:2000/Cor 1:2007).

9. PHLS standard operating procedure- General technique for the detection of bacteria by membrane filtration, issue no: 3, reference no: C:\Qualiti System\SOPs\WSOPs\wsops issued\W1i3.
10. PHLS standard operating procedure- Enumeratin of coliforms and Escherichia coli by membrane filtration, issue no: 3, reference no: C:\Qualiti System\SOPs\WSOPs\wsops issued\W2i3.
11. ISO 9308-2:1990 Water quality - Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive Escherichia coli - Part 2: Multiple tube (most probable number) method .
12. SIST EN ISO/IEC 17025:2005 Splošne zahteve za usposobljenost preskuševalnih in kalibracijskih laboratorijev (ISO/IEC 17025:2005).
13. Eaton A D, Clesceri L S, Rice E W, Greenberg A E: Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st Edition, Washington, American Public Health Association, 2005: 1-27 do 1-30; 9-1 do 9-14.
14. SIST EN ISO 17994:2004 Kakovost vode - Merila za ugotavljanje enakovrednosti mikrobioloških metod (ISO 17994:2004).
15. SIST EN ISO 5667-1:2007 Kakovost vode - Vzorčenje - 1. del: Navodilo za načrtovanje programov in tehnik vzorčenja (EN ISO 5667-1:2006).
16. SIST ISO 5667-5:2007 Kakovost vode - Vzorčenje - 5. del: Navodilo za vzorčenje pitne vode iz sistemov oskrbe z vodo (ISO 5667-5:2006).
17. http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Microbiology/FoodSafety/product-information/product-catalog/?PC_7_RJH9U523003DC023S7P92O3O87000000_nid=QQ3B1KT HFPbeJ9C52DTHJWgl, dostopno: december, 2012.

18. <http://www.rvk-jp.si/index.cgi?m=51&id=578>, dostopno: december, 2012.
19. Kluwer academic publishers: Quantitative microbiology 2 Evaluation of selected membrane filtration and most probable number methods for the enumeration of fecal coliforms, *E. coli* and enterococci in environmental waters. Manufactured in Netherlands, 2001: 129- 140.
20. SIST- TS CEN ISO/TS 11133-1:2009 Mikrobiologija živil in krme - Navodila za pripravo in izdelavo gojišča - 1. del: Splošna navodila o zagotavljanju kakovosti priprave gojišča v laboratoriju (ISO/TS 11133-1:2009).
21. Østensvik Ø: Coliform bacteria and *Escherichi coli* in Norwegian drinking water sources- Comparison of methods based on the activity of specific enzymes. American Water Works Association, Water Quality Technology Conference Proceedings 2000.
22. http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=78&pi=6&_6_id=843&_6_PageIndex=0&_6_groupId=-2&_6_newsCategory=IVZ+kategorija&_6_action=ShowNewsFull&pl=78-6.0, dostopno: december, 2012.
23. Pravilnik o pitni vodi, 2004, Uradni list Republike Slovenije, številka 19, 2155.
24. Pravilnik o spremembah in dopolnitvah pravilnika o pitni vodi, 2004, Uradni list Republike Slovenije, številka 35, 4137.
25. Pravilnik o spremembi pravilnika o pitni vodi, 2006, Uradni list Republike Slovenije, številka 26, 2751.

26. Pravilnik o spremembah pravilnika o pitni vodi, 2006, Uradni list Republike Slovenije, številka 92, 9792.
27. Pravilnik o spremembah in dopolnitvah pravilnika o pitni vodi , 2009, Uradni list Republike Slovenije, številka 25, 3356.