

DOI: 10.7251/VETJ1401013DJ

UDK 616.98:579.843.9

Д. Бурђевић Милошевић,¹ В. Калаба,² А. Костић,¹ А. Николић,¹ М. Стијепић,³
Ј. Глушац³*Оригинални рад*

ПРОЦЕНА ПРОШИРЕНЕ МЕРНЕ НЕСИГУРНОСТИ ПРИ ОДРЕЂИВАЊУ БРОЈА КУЛТУРАБИЛНИХ МИКРООРГАНИЗАМА У ВОДИ

Кратак садржај

Микробиолошка исправност воде за пиће је велики изазов у постојећем систему здравствене заштите и, сходно томе, микробиолошке методе су саставни део мониторинга квалитета воде.

Стандардна метода *SRPS EN ISO 6222:2010* идентична је са *EN ISO 6222:1999* и намењена је за мерење практичне делотворности поступка третирања воде за пиће за јавну употребу, а такође има општу примену за све типове воде, укључујући воде у затвореним посудама, као и природну минералну воду.

Циљ овог рада је био да се одреди проширена мерна метода *SRPS EN ISO 6222:2010* у оквиру унутарлабораторијске студије. Контаминирани су узорци стерилизоване воде суспензијом бактерије *Escherichia coli ATCC 25922* и проведена процедура процене репродукцибилности методе. Добијени резултати су коришћени за прорачун стандардне девијације репродукцибилности, и из ње изведене проширене мерне несигурности. Добијени резултати су показали да је граница репродукцибилности за инкубацију плоча на $22\pm 2^\circ\text{C}$ била 0,429, а проширена мерна несигурност 0,306. Граница репродукцибилности за инкубацију плоча на $36\pm 2^\circ\text{C}$ била је 0,321 *cfu log 10*, а проширена мерна несигурност 0,229 *cfu log 10*.

Кључне речи: културабилни микроорганизми, вода, проширена мерна несигурност.

¹ МП Лаб, МП Био д.о.о., Прокупачка 41, Београд, Србија.
MP Lab, MP, Bio doo, Prokupacka 41, Belgrade, Serbia.

² ЈУ Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“, Бранка Радичевића 18, Бања Лука, Босна и Херцеговина
PI Veterinary Institute of Republic of Srpska „Dr. Vaso Butozan” Branka Radicevica 18, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

³ Висока медицинска школа, Николе Пашића 4а, Приједор, Република Српска, Босна и Херцеговина
High Medicial School, Nikole Pasica 4a, Prijedorm, Republic of Srspska, Bosnia and Herzegovina
Адреса коресподентног аутора / Adress of the corresponding author: vesna.kalaba@virsvb.com

D. Đurđević Milošević,¹ V. Kalaba,² A. Kostić,¹ A. Nikolić,¹ M. Stijepić,³ J. Glušac³

Original paper

ESTIMATION OF EXPANDED MEASUREMENT UNCERTAINTY OF CULTURABLE MICROORGANISMS IN WATER

Abstract

Microbiological safety of water is great challenge to the existing health protection system and accordingly the microbiological methods are consistent part of water quality monitoring.

Standard method SRPS EN ISO 6222:2010 is identical to EN ISO 6222:1999 and is intended to measure the operational efficiency of the treatment process of public drinking water supplies and for general application to all types of water. It is particularly applicable to the examination of water intended for human consumption, including water in closed containers and to natural mineral waters.

The aim of this paper was to determine the levels of measurement uncertainty obtained in interlaboratory study of method SRPS EN ISO 6222:2010. Samples of sterilized water were spiked with suspension of *Escherichia coli* ATCC 25922 and applied the procedure of estimation of measurement uncertainty. The obtained data were analysed are used to determine the standard deviations of reproducibility and reproducibility limit based on log₁₀ colony count values, and thence the relative measures of expanded uncertainty. Obtained results showed reproducibility limit 0.306 cfu log₁₀, and expanded uncertainty 0.22 cfu log₁₀, based on for incubation of plate at 22±2°C, and reproducibility limit 0.321 cfu log₁₀, and expanded uncertainty 0.229 cfu log₁₀ for incubation of plate at 36±2°C.

Key words: culturable microorganisms, water, expanded measurement uncertainty.

УВОД/ INTRODUCTION

Према информацијама Светске здравствене организације (WHO), болести које су повезане са микробиолошки небезбедном водом, санитацијом и хигијеном изазову око 1,7 милиона смртних исхода на годишњем нивоу (Prentice, 2002). Имајући то у виду, микробиолошка исправност воде за пиће је велики изазов како за друштвене заједнице, тако и за произвођаче флаширане воде, а микробиолошке методе су неизоставан део мониторинга квалитета воде.

Одређивање броја хетеротрофних микроорганизама у води први је развио Роберт Кох 1881. године, као једну од првих техника за анализу воде (Koch, 1893). Од тада, одређивање хетеротрофа користи се и препоручује као метода за мониторинг микробиолошког квалитета воде. У принципу, ова метода открива све микроорганизме који могу да формирају видљиве колоније на хранљивој подлози на одређеним температурама инкубације, а интернационална и национална регулатива је препоручују за добијање информација о ефектима третмана воде за пиће (WHO, 2002) и променама микробиолошког квалитета воде у готовој води за пиће током њене дистрибуције и складиштења (Sartory, 2004; WHO, 2002).

Стандардна метода *SRPS EN ISO 6222:2010* идентична је са *EN ISO 6222:1999* и намењена је за мерење практичне делотворности поступка третирања воде за пиће за јавну упо-

требу. Такође, има општу примену за све типове воде, укључујући воде у затвореним посудама, као и природну минералну воду. Овом методом се одређује број културабилних микроорганизама у води рачунањем броја колонија формираних на хранљивој агар подлози за култивацију након икубације на $36\pm 2^\circ\text{C}$ и $22\pm 2^\circ\text{C}$ (Anon., 2010).

Приликом провођења метода добијају се резултати који могу бити последица и различитих систематских и случајних грешака. Због тога је пожељно извршити процену мерне несигурности методе. Мерна несигурност представља величину која карактерише расипање вредности резултата, као последица различитих извора грешака, од којих је у микробиолошким испитивањима најзначајнији сам микроорганизам због непредвидивости метаболичких процеса у различитим условима средине. Мерна несигурност се добија као стандардна девијација репродукцибилности.

Репродуцибилност представља блискост слагања између појединачних резултата испитивања на идентичном узорку, користећи исту методу од стране различитих аналитичара у различитим лабораторијама користећи различиту опрему – међулабораторијска репродукцибилност, или различитих аналитичара у истој лабораторији – унутарлабораторијска репродукцибилност.

Према *ISO/TS 19036:2006* (Anon., 2006), приоритет се даје стандардној девијацији репродукцибилности добије-

ној на основу резултата унутар лабораторије. Осим ње, може се одредити и стандардна девијација репродуцибилности изведена из међулабораторијских студија и стандардна девијација репродуцибилности изведена из међулабораторијског тестирања способности (*proficiency testing*). У овом раду, мерна несигурност је изведена из унутарлабораторијских експеримената, а тиме и на основу унутарлабораторијске репродуцибилности.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ/ MATERIAL AND METHODS

Засејавањем узорак стерилисане воде према захтевима методе SRPS EN ISO 6222 (Anon., 2010) установљено је

одсуство микроорганизама и да се узорак може користити у даљој процедури процене репродуцибилности методе и проширене мерне несигурности према ISO 16140 (Anon., 2003) и ISO/TS 19036 (Anon., 2006).

За процену репродуцибилности направљена је суспензија *Escherichia coli* ATCC 25922 у физиолошком раствору густине 3,9 McFarland скале. Направљена је серија децималних разређења до 10^{-8} . Из разређења 10^{-5} , 10^{-6} и 10^{-7} одређен је број бактерија у ml (по две плоче) према SRPS EN ISO 8199 (Anon., 2011), засејавањем 1 ml и наливањем хранљивог агара, након инкубације 72 сата на 37°C. Резултати су дати у табели 1.

Табела 1. Резултати засејавања разблажења суспензије за контаминацију

Разблажење	x_1 (cfu/ml)	x_2 (cfu/ml)
10-6	220	281
10-7	22	18
10-8	1	1
Пројектовани број <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922: $2,5 \times 10^8$ cfu/ml суспензије		

Узорак стерилне воде (100 ml) контаминиран је са 0,5 ml из разблажења 10^{-4} припремљене суспензије за контаминацију. Контаминирани узорак је хомогенизован и из хомогената је одмерено по 1 ml у два пута по 14 петри шоља. Петри шоље су наливене отопљеним и на од 45°C до 47°C охлађеним Квашчевим екстракт агаром за одређивање укупног броја културабилних микроорганизама у води према методи SRPS EN ISO 6222:2010. После завршене инкубације 14 петри плоча на $36 \pm 2^\circ\text{C}$ у трајању од $44 \pm 4\text{h}$,

пребројане су колоније, а добијени резултати коришћени за процену критеријума прецизности.

Критеријум прецизности је израчунат према формули:

$$R_{sr} = \frac{\sum R}{n},$$

где је

n – број анализираних узорак,

R – апсолутна вредност разлике логаритама резултата.

$$R = \left| \log x_1 \text{ i } \log x_2 \right|$$

x_1 i x_2 – резултати два техничара

Ако је $R < R_{sr} \times 3,267$, резултат је прихватљив. Ако је $R > R_{sr} \times 3,267$, резултат је неприхватљив, тј. постоји више од 99% вероватноће да је варијабилност прекомерна. Ако се установи неприхватљив критеријум прецизности, потребно је идентификовати и решити аналитички проблем, а резултати добијени за репродукцибилност не могу се користити за процену мерне несигурности.

Након одређивања критеријума прецизности, контаминирани су узорци и урађени по двадесет понављања у дупликату, за сваку од тражених температура инкубације, од стране сваког од аналитичара који изводе испитивање, по истој процедури као за одређивање репродукцибилности. Резултати су презентовани у табелама 4. и 5, а на основу њих је одређена стандардна девијација репродукцибилности, граница репродукцибилности и проширена мерна несигурност.

Прорачун мерне несигурности је извршен према ISO 19036 (Anon., 2006):

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}$$

где су:

y_{ij} – резултати трансформисани у логаритме, тј. $\log_{10} (cfu/g)$ или $\log_{10} (cfu/ml)$,

i – индекс узорка, $i = 1$ до n , при чему је $n^3 \geq 10$,

j – индекс услова репродукцибилности $j = A$ или B ,

A и B – ознаке за аналитичаре.

Проширена мерна несигурност се добија као вредност стандардне девијације репродукцибилности помножена корекционим фактором 2, за ниво поверења од 95%.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА/ RESULTS AND DISCUSSION

Приликом осмишљавања експеримента коришћена је стерилисана вода, да би се избегао позадински раст, за контаминацију суспензија комерцијалне културе *Escherichia coli* ATCC 25922. Иако је препорука ISO/TS 19036 (Anon., 2006) да се приликом дизајна експеримената користе природно контаминирани узорци, будући да се на такав начин добија реалистичнија вредност мерне несигурности, на овакав начин је избегнута варијација у броју и врсти микроорганизама.

Након експерименталне процедуре наведене у методама рада, пребројане су колоније са инкубираних петри плоча и подаци су презентовани у табелама 2. и 3, а на основу њих је одређен критеријум прецизности за репродукцибилност на $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и $36 \pm 2^\circ\text{C}$.

Табела 2. Резултати процене критеријума прецизности за репродукцибилности на 22 ± 2 оС

Број мерења	Резултати мерења		$\log X_1$	$\log X_2$	$ \log X_1 - \log X_2 $	Прихватљивост
	X_1 (cfu)	X_2 (cfu)				
1.	166	90	2,220	1,954	0,266	П
2.	195	101	2,290	2,004	0,286	П
3.	172	100	2,236	2,000	0,236	П
4.	113	134	2,053	2,127	0,074	П
5.	165	149	2,217	2,173	0,044	П
6.	111	110	2,045	2,041	0,004	П
7.	105	171	2,021	2,233	0,212	П

П – прихватљиво Н – неприхватљиво

Према прорачуну из поглавља Материјал и методе, средња вредност апсолутних разлика је 0,160, а $3,267R_s$

је 0,523, па се резултати за репродукцибилност могу користити за процену проширене мерне несигурности.

Табела 3. Резултати процене критеријума прецизности за репродукцибилности на 36 ± 2 оС

Број мерења	Резултати мерења		$\log X_1$	$\log X_2$	$ \log X_1 - \log X_2 $	Прихватљивост
	X_1 (cfu)	X_2 (cfu)				
1.	123	152	2,090	2,182	0,092	П
2.	194	134	2,288	2,127	0,161	П
3.	151	146	2,179	2,164	0,015	П
4.	145	141	2,161	2,149	0,012	П
5.	152	120	2,182	2,079	0,103	П
6.	212	166	2,326	2,220	0,106	П
7.	251	167	2,400	2,223	0,177	П

П – прихватљиво Н – неприхватљиво

Према прорачуну из поглавља Материјал и методе, средња вредност апсолутних разлика је 0,118, а $3,267R_s$ је 0,387, па се резултати за репродукцибилност могу користити за проце-

ну проширене мерне несигурности. У табелама 3. и 4. су презентовани резултати за процену репродукцибилности два аналитичара унутар лабораторије.

Табела 4. Резултати за репродукцибилности на 22 ± 2 оС

Број мерења	Резултати мерења		$\log X_1$	$\log X_2$	$ \log X_1 - \log X_2 $
	X_1 (cfu)	X_2 (cfu)			
1.	124	185	2,093	2,267	0,174
2.	204	167	2,310	2,223	0,087
3.	222	77	2,346	1,886	0,460

4.	194	100	2,288	2,000	0,288
5.	170	83	2,230	1,919	0,311
6.	196	112	2,292	2,049	0,243
7.	190	127	2,279	2,104	0,175
8.	205	205	2,312	2,312	0,000
9.	84	215	1,924	2,332	0,408
10.	162	169	2,210	2,228	0,018
11.	190	212	2,279	2,326	0,048
12.	106	195	2,025	2,290	0,265
13.	184	193	2,265	2,286	0,021
14.	109	83	2,037	1,919	0,118
15.	129	72	2,111	1,857	0,253
16.	139	173	2,143	2,238	0,095
17.	138	206	2,140	2,314	0,174
18.	164	214	2,215	2,330	0,116
19.	132	180	2,121	2,255	0,135
20.	174	116	2,241	2,064	0,176

X_1 – број колонија, аналитичар А X_2 – број колонија, аналитичар В

На основу прорачуна презентова-
 ног у поглављу Материјали и методе
 добијено је да је на температури инку-
 бације $22\pm 2^\circ\text{C}$:

- стандардна девијација репродукци-
 билности $0,153 \text{ cfu log } 10$,
- граница репродукцибилности $0,429$
 $\text{cfu log } 10$, а
- проширена мерна несигурност $0,306$
 $\text{cfu log } 10$,

док је за температуру инкубације
 $36\pm 2^\circ\text{C}$:

- стандардна девијација репродукци-
 билности $0,115 \text{ cfu log } 10$,
- граница репродукцибилности $0,321$
 $\text{cfu log } 10$, а
- проширена мерна несигурност $0,229$
 $\text{cfu log } 10$.

Табела 5. Резултати за репродукцибилности на $36\pm 2^\circ\text{C}$

Број мерења	Резултати мерења		$\log X_1$	$\log X_2$	$ \log X_1 - \log X_2 $
	X_1 (cfu)	X_2 (cfu)			
1.	93	183	1,968	2,262	0,294
2.	165	90	2,217	1,954	0,263
3.	144	70	2,158	1,845	0,313
4.	123	67	2,090	1,826	0,264
5.	168	91	2,225	1,959	0,266
6.	117	112	2,068	2,049	0,019

7.	156	106	2,193	2,025	0,168
8.	104	91	2,017	1,959	0,058
9.	99	107	1,996	2,029	0,034
10.	161	156	2,207	2,193	0,014
11.	198	216	2,297	2,334	0,038
12.	128	117	2,107	2,068	0,039
13.	134	146	2,127	2,164	0,037
14.	122	133	2,086	2,124	0,037
15.	198	161	2,297	2,207	0,090
16.	73	105	1,863	2,021	0,158
17.	111	73	2,045	1,863	0,182
18.	96	91	1,982	1,959	0,023
19.	78	86	1,892	1,934	0,042
20.	89	128	1,949	2,107	0,158

X_1 – број колонија, аналитичар А X_2 – број колонија, аналитичар В

Израчуната мерна несигурност експериментално добијених унутарлабораторијских резултата испитивања културабилних микроорганизама у води је карактеристика која се може придружити резултатима при извештавању проведених анализа. Међутим, мора се водити рачуна, с обзиром на целокупан мониторинг квалитета воде, да је метода SRPS EN ISO 6222:2010 ограничена на културабилне микроорганизме, тј. на оне микроорганизме који могу да формирају колоније на специфичном хранљивом агару. Осим њих, постоје и микроорганизми чије ћелије су способне да преживе, метаболички су активне, али не формирају колоније на подлози. Сматра се да у води из животне средине и земљишта има око 1% оваквих микроорганизама (Bracina and Arana, 2009) и да су неки од њих природни резервоар патогена за људе (del Mar Lleo и сар., 2007). Неке од патогених бактерија које могу

постићи метаболички активно стање, а да се не могу култивисати су (Oliver, 2010):

Aeromonas hydrophila, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (укључујући ЕНЕС), *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Streptococcus faecalis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, и *Vibrio vulnificus* (тип 1 и тип 2). Додатни проблем представља то што поједини патогени у већ третираној води могу да преживе као биофилм на славинама за воду, где их заштитни слој полисахарида одржава у метаболички активном стању (Keevil, 2002). Око 95% микробних ће-

лија присутних у дистрибутивном систему воде за пиће егзистира као биофилм на површини славина, а само 5% се појављује у воденој фази (Flemming, 2002).

У сваком случају, предуслов развоја добре аналитике у лабораторијама је да су резултати испитивања проведени у различитим лабораторијама уједначени, а тиме процена проширене мерне несигурности унутарлабораторијских испитивања представља незаобилазан параметар успешно уведене методе.

ЗАКЉУЧЦИ/ CONCLUSIONS

Мониторинг квалитета воде претпоставља и коришћење микробиолошких метода, од којих се метода SRPS EN ISO 6222:2010 користи за одређивање броја културабилних микроорганизама у води и није применљива на микроорганизме који су метаболички активни, али немају способност формирања колонија на подлогама.

Предуслов за увођење методе у лабораторију јесте одређивање унутарлабораторијске репродукцибилности, а самим тим и проширене мерне несигурности методе.

Наши експериментални резултати за репродукцибилност и проширену мерну несигурност методе SRPS EN ISO 6222:2010 показали су прихватљивост и уједначеност резултата без обзира на температуру инкубације засејаних плоча.

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Anon. (2003): *Microbiology of Food and Animal Feedingstuffs – Protocol for*

the Validation of Alternative Methods. ISO 16140:2003.

2. Anon. (2006): *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. ISO/TS 19036:2006.*
3. Анон. (2011): *Квалификације воде. Опште смернице за бројање културабилних микроорганизама. SRPS EN ISO 8199:2011.*
4. Анон. (2010): *Квалификације воде. Одређивање броја културабилних микроорганизама. Бројање колонија засејавањем у погодну хранливи медијум. SRPS EN ISO 6222:2010.*
5. Barcina, I. and I. Arana (2009): *The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria?*, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 8: 245–255.
6. M. del Mar Lleò; D. Benedetti; M. C. Tafi; C. Signoretto and P. Canepari (2007): *Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in Enterococcus faecalis*, *Environmental Microbiology*, 9: 2313–2320.
7. Keevil, C. W. (2002): *Pathogens in environmental biofilms. In: Bitton G., editor. The encyclopaedia of environmental microbiology. New York: Wiley Interscience, pp. 2339–2356.*
8. Flemming, H. C. (2002): *Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 629–640.

9. Oliver, J. D. (2010): *Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria*, FEMS Microbiology Reviews, 34: 415–425.
10. Prentice, T. (2002): *Overview*. In: Murray, C.; Lopez, A. editors. *The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life*. Geneva: World Health Organization, pp. 7–14.
11. Sartory, D. P. (2004): *Heterotrophic plate count monitoring of treated drinking water in the UK: a useful operational tool*. Int. J. Food Microbiol 92: 297–306.
12. WHO (2002): *Expert Consensus*. In: J. C. J. Bartram, M. Exner, C. R. Fricker and A. Glasmacher (eds.) *Heterotrophic Plate Count and Drinking-Water Safety IWA Publishing*, London.
11. Sartory, D. P. (2004): *Heterotrophic plate count monitoring of treated*



80 година