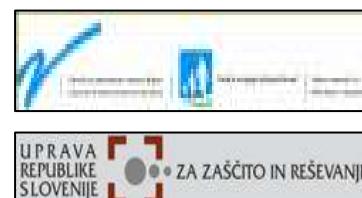


jinij 2013

Standardni projekt
»Skupni geoinformacijski sistem (GIS) za varovanje virov pitne vode
v izrednih dogodkih«

z akronimom
»GEP«

sofinanciran v okviru Programa čezmejnega sodelovanja
Slovenija-Italija 2007-2013 iz sredstev Evropskega sklada za
regionalni razvoj in nacionalnih sredstev



UVEDBA COLILERT IN ENTEROLERT METODE ZA HITRO MIKROBIOLOŠKO TESTIRANJE VOD



Projekt GEP Sofinanciran v okviru Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija-Italija 2007-2013 iz sredstev
Evropskega sklada za regionalni razvoj in nacionalnih sredstev.

Progetto GEP finanziato nell'ambito del Programma per la Cooperazione Transfrontaliera Italia-Slovenia 2007-2013,
dal Fondo europeo di sviluppo regionale e dai fondi nazionali.



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA GOSPODARSKI
RAZVOJ IN TEHNOLOGIJO



Ministero dell'Economia
e delle Finanze



Projekt cofinanziato dal Fondo europeo di sviluppo regionale
Projekt avviato dalla Comunità europea di sviluppo regionale

UVOD

Varna pitna voda nam omogoča življenje in predstavlja enega izmed osnovnih pogojev zdravja. Čeprav je pitna voda tako dragocena dobrina, jo prepogosto dojemamo kot nekaj danega. Tudi pomen stalnega nujnega preventivnega delovanja za zagotavljanje njene količine in kakovosti neredko spregledamo.

V formalnem smislu je voda določena kot pitna z namenom uporabe: voda, namenjena pitju, kuhanju, pripravi hrane ali za druge gospodinjske namene in vsa voda, ki se uporablja v proizvodnji in prometu živil. Ustrezati mora minimalnim predpisanim zahtevam. Potrebna pa nam je še za marsikaj drugega, ne nazadnje za zabavo, kot okras, ustvarja nam razpoloženje. Pri vsakem srečanju z vodo se moramo zavedati, da je njena trenutna funkcija le del kroženja vode v naravi. Del tega kroženja poteka tudi v našem telesu, naših domovih, tovarnah... S kroženjem voda prenaša in razširja po živem in neživem svetu tudi nevarne snovi; tako prihajamo v stik z mikroorganizmi, kemikalijami ipd.

Javno zdravstvene zahteve v zvezi s pitno vodo so: vedno, vsem, kjerkoli, zadosti kakovostno in poceni. Za dosego teh ciljev je treba oblikovati sistematičen pristop v vseh fazah od načrtovanja, zagotavljanja in spremeljanja oskrbe s pitno vodo. Elemente teh načel je treba vgraditi tudi v pravne predpise.

Pri spremeljanju kakovosti pitne vode razdelimo parametre na mikrobiološke, kemijske in fizikalne. Zaradi najpogostejših akutnih posledic je največja pozornost posvečena mikrobiološkim parametrom. V Sloveniji imamo za oskrbo s pitno vodo preko 1000 vodovodnih sistemov, ki skupaj oskrbujejo preko 90 % prebivalcev. Kot značilnost lahko navedemo veliko število majhnih vodovodov, ki pa oskrbujejo v celoti majhen delež prebivalcev. Mali vodovodi imajo pogosto pomanjkljivosti, ki se odražajo na slabši kakovosti vode.

MIKROBIOLOŠKE METODE

ZZV Nova Gorica je od leta 2008 vključen v algoritem ukrepanja Civilne zaščite občin Goriške statistične regije v primeru ogroženosti virov pitne vode v izrednih dogodkih in razmerah.

COLILERT in ENTEROLERT metoda sta primerni za hitro laboratorijsko diagnostiko mikrobiološke onesnaženosti pitne in površinskih vod, kar je še zlasti pomembno za pridobivanje hitrih rezultatov o kakovosti vode v izrednih razmerah. Uvedba COLILERT in ENTEROLERT metode je zato nujna za hitro odzivanje in aktivnosti ZZV Nova Gorica v izrednih razmerah.

Pri obravnavi mikrobiološke kakovosti pitne vode predstavlja največje tveganje za zdravje ljudi fekalno onesnaženje pitne vode (možnost hidričnih epidemij črevesnih nalezljivih bolezni). V blatu bolnih ljudi, živali ali klicenoscev (ljudje ali živali, ki ne kažejo znakov okužbe, vendar izločajo povzročitelje bolezni v blatu) so prisotni povzročitelji črevesnih nalezljivih bolezni (virusi – npr. virus otroške paralize, virus hepatitis A,...; bakterije – npr. salmonelle, šigele,...; paraziti – npr. *Cryptosporidium parvum*, *Lamblia Giardia*,...).

V rutinskih mikrobioloških preiskavah pitne vode ne ugotavljamo prisotnosti patogenih mikroorganizmov (povzročiteljev črevesnih bolezni), saj so večinoma drage in zamudne, poleg tega pa so lahko neuspešne. Od trenutka fekalnega onesnaženja do tedaj, ko vzamemo vzorec za mikrobiološko analizo in ga analiziramo, lahko patogene bakterije pod vplivom dejavnikov iz okolja izginejo. Fekalno onesnaženje lahko dokazujemo s prisotnostjo bakterij indikatorjev fekalnega onesnaženja. Ta skupina bakterij ima namreč podobne lastnosti, kot jih imajo patogeni mikroorganizmi. Če v vodi ugotovimo prisotnost bakterij fekalnih indikatorjev, lahko pričakujemo tudi prisotnost oziroma tveganje za prisotnost patogenih mikroorganizmov. Najpomebnnejši indikatorji fekalnega onesnaženja so bakterije *E. coli* in enterokoki.

Prisotnost *E.coli* in enterokokov v vodi zanesljivo kaže na fekalno onesnaženje, zato predstavljajo tveganje za zdravje ljudi. Takšna voda ni primerna za pitje.

V nujnih primerih ogroženosti virov pitne vode (naravnih, tehnoloških nesrečah...), je zato ključnega pomena čim prej ugotoviti ali je voda fekalno onesnažena. Z običajnimi – referenčnimi metodami dobimo rezultate približno v 3 do 5 dneh. S hitrimi testi pa ta čas bistveno skrajšamo, rezultati so znani v 18 do 24 urah, kar bistveno prispeva k hitrejšemu odzivanju in ukrepanju v primeru ogroženosti virov pitne vode ter zdravju uporabnikov.

Za dokazovanje fekalne onesnaženosti pitne vode določamo oba indikatorja fekalnega onesnaženja *E. coli* in enterokoke. Z metodo Colilert določamo prisotnost *E. coli* in koliformnih bakterij, z metodo Enterolert pa enterokoke.

HITRI METODI

Metodi temeljita na patentirani definirani substratni tehnologiji (DST) in ju uvrščamo med MPN metode. Definiran substratni medij je kemijsko določena formulacija z vsebnostjo substratov za specifično določanje encimov, ki so prisotni pri skupini iskanih mikroorganizmov.

Pri metodi Colilert in Enterolert potrditveni testi niso potrebni. V primerjavi hitrih metod z referenčnima metodama smo izvedli postopek potrjevanja iskanih mikroorganizmov.

METODA COLILERT-18

Metoda Colilert-18 temelji na bakterijski encimski tehnologiji, ki signalizira prisotnost *E.coli* in koliformnih bakterij skozi hidrolizo fluorogenega in kromogenega bakterijskega diagnostičnega substrata.

Pri testu Colilert-18 sta prisotna dva indikatorja, ONPG (o-Nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) in MUG (4-Methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide)

Koliformne bakterije z encimom β -D-galaktozidaza razgradijo indikator ONPG, pojavi se rumena obarvanost vzorca v testnih poljih. Prisotnost koliformnih bakterij potrdimo po 18-urni inkubaciji pri temperaturi $36\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Escherichia coli z encimom β -D-glukuronidaza razgradi substrat MUG. Sproščeni 4-MU (4-methyl-umbelliferone) ob UV osvetlitvi modro fluorescira. Prisotnost *E.coli* potrdimo po 18-urni inkubaciji pri temperaturi $36\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Občutljivost testa: 1 mikroorganizem na 100 ml vzorca v 18 urah.

Metoda Colilert-18/Quanti-Tray je metoda za štetje *E.coli* in koliformnih bakterij iz vzorca pitne vode. Podajamo rezultate od 1 do 201 pri uporabi Quanti-Tray.

Metoda Colilert-18/Quanti-Tray/2000 se uporablja za izolacijo in štetje *E.coli* in koliformnih bakterij v vzorcih vod z visoko koncentracijo spremljevalne mikroflore. Podajamo rezultate od 1 do 2419 pri uporabi Quanti-Tray/2000.

METODA ENTEROLERT

Metoda Enterolert temelji na bakterijski encimski tehnologiji, ki signalizira prisotnost enterokokov skozi hidrolizo fluorogenega in kromogenega bakterijskega diagnostičnega substrata.

Pri testu Enterolert je prisoten substrat-indikator 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside.

Enterokoki uporabljajo encim β -glukozidazo za hidrolizo tega substrata, pri čemer se sprosti 4-methylumbelliferone ki fluorescira pod UV lučjo. Prisotnost enterokokov potrdimo po 24-urni inkubaciji pri temperaturi $41\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, kot fluorescenco luknjic pod UV lučjo.

Občutljivost testa: 1 mikroorganizem na 100 ml vzorca v 24 urah.

Metoda Enterolert/Quanti-Tray se uporablja za izolacijo in štetje enterokokov v vzorcih pitnih vod. Podajamo rezultate od 1 do 201 pri uporabi Quanti-Tray

Metoda Enterolert/Quanti-Tray/2000 se uporablja za izolacijo in štetje enterokokov v vzorcih z visoko koncentracijo spremljevalne mikroflore. Podajamo rezultate od 1 do 2419 pri uporabi Quanti-Tray/2000.

REFERENČNI METODI

Metodi temeljita na membranski filtraciji določenega volumna vzorca, inkubaciji filtra na selektivnem gojišču in biokemični identifikaciji tipičnih kolonij. Testni del vzorca prefiltriramo preko membranskega filtra z določeno velikostjo por ($0,45 \mu\text{m}$), kar nam omogoča, da bakterije prisotne v vodi, ostanejo na filtru. Filter nato položimo na ustrezno gojišče. Po inkubaciji v izbranih pogojih, preštejemo kolonije, ki zrastejo na membrani. Izberemo tako redčino vzorca, da na filtru premera 47 mm do 50 mm zraste od 10 do 100 kolonij

Pomembno je, da dobljene rezultate pregleda, interpretira ali zavrne mikrobiolog. Rezultate izračunavamo, ko je skupno število mikroorganizmov na plošči med 10 in 100 pri membranski filtraciji. Rezultat izrazimo kot CFU/ml .

SIST EN ISO 9308-1:2001

SIST EN ISO 9308-1:2001/ AC:2009 (standardni test)

Metoda se uporablja za izolacijo in štetje *E.coli* in koliformnih bakterij v vzorcih vod.

Temelji na membranski filtraciji določenega volumna vzorca, inkubaciji filtra na selektivnem gojišču Tergitol-7 agar, biokemični identifikaciji tipičnih lakoza pozitivnih kolonij z namenom ugotavljanja prisotnosti in števila koliformnih bakterij in *E.coli* v roku 2 do 3 dni.

Koliformne bakterije so bakterije sposobne tvorbe kolonij aerobno pri $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ v 21 ± 3 urah na selektivnem in diferencialnem gojišču z lakozo s tvorbo kisline in ki so oksidaza negativne

E. coli so koliformne bakterije, ki tvorijo indol iz triptofana pri $44,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ v 21 ± 3 urah in ki tvorijo encim β -glukuronidaza.

Porasle kolonije na Tergitol-7 precepimo na neselektivni KA, triptonsko vodo, VRBA in TBX.

Iz kolonij na KA inkubiranem pri $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ za 21 ± 2 ure izvedemo oksidazni test.

Za indol test po inkubaciji pri $44,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ za 21 ± 3 ure dodamo Kovacs' reagent. Pojav češnjevo rdeče barve na površini gojišča potrjuje tvorbo indola.

Gojišče VRBA uporabljamo z namenom potrditve lakoza pozitivnih kolonij, ki so okrogle kolonije roza barve lahko obdane z roza cono.

Na TBX agarju inkubiranem pri $44,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ za 21 ± 3 ure izvajamo β -glukuronidazni test.

Pri primerjavi metode COLILERT z referenčno metodo smo dodatno potrdili prisotnost koliformnih bakterij z gojiščem ONPG, s katerim potrdimo prisotnost β -galaktozidaze. ONPG gojišče inkubiramo pri temperaturi $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ od 18-22 ur. Pozitivna reakcija je rumenaobarvanost gojišča.

METODA SIST EN ISO 7899-2:2000

Metoda se uporablja za izolacijo in štetje enterokokov v vzorcih vod. Metoda temelji na membranski filtraciji določenega volumna vzorca, inkubaciji filtra na selektivnem gojišču, ki vsebuje natrijev azid in 2,3,5 – trifeniltetrazolium klorid, potrditvi tipičnih kolonij s prenosom filtra na eskulin žolč azidni agar – ABBA ter identifikaciji tipičnih kolonij z namenom ugotavljanja prisotnosti in števila enterokokov.

Enterokoki so bakterije, ki reducirajo 2,3,5-trifeniltetrazolium klorid-brezbarvno barvilo v rdeč formazan na gojišču Membrane-filter Enterococcus selective agar according to Slanetz and Bartley (m-enterococcus) in hidrolizirajo eskulin pri 44°C na gojišču Eskulin žolč azidni agar (ABAA).

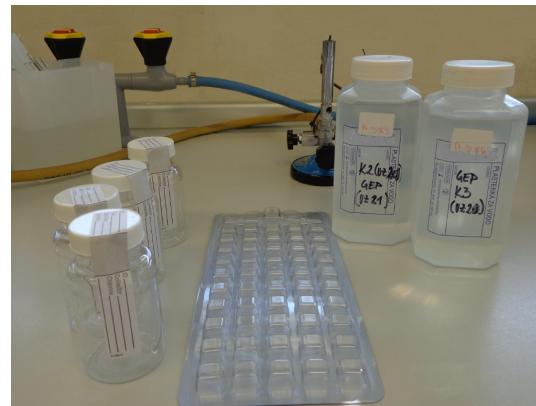
Prikaz postopka preskušanja vzorcev pitnih in površinskih vod s hitrima metodama in primerjava z referenčnima metodama

1. DAN

Hitri metodi COLILERT in ENTEROLERT

Za preskušanje vzorcev potrebujemo:

Vzorec pitne ali površinske
IDEXX graduirano stekleničko
IDEXX Colilert reagent ali IDEXX Enterolert reagent
Quanti-Tray/2000 za vzorce površinskih vod oziroma
Quanti-Tray za vzorce pitne vode
Gumijasto podlogo za Quanti-tray
IDEXX Quanty Tray Sealer
Inkubator- delovanje pri $36\pm 2^\circ\text{C}$ (Coliert)
Inkubator- delovanje pri $41\pm 0,5^\circ\text{C}$ (Enterolert)
Gorilnik



Slika 1: graduirane stekleničke, Quanti-Tray in vzorca vode



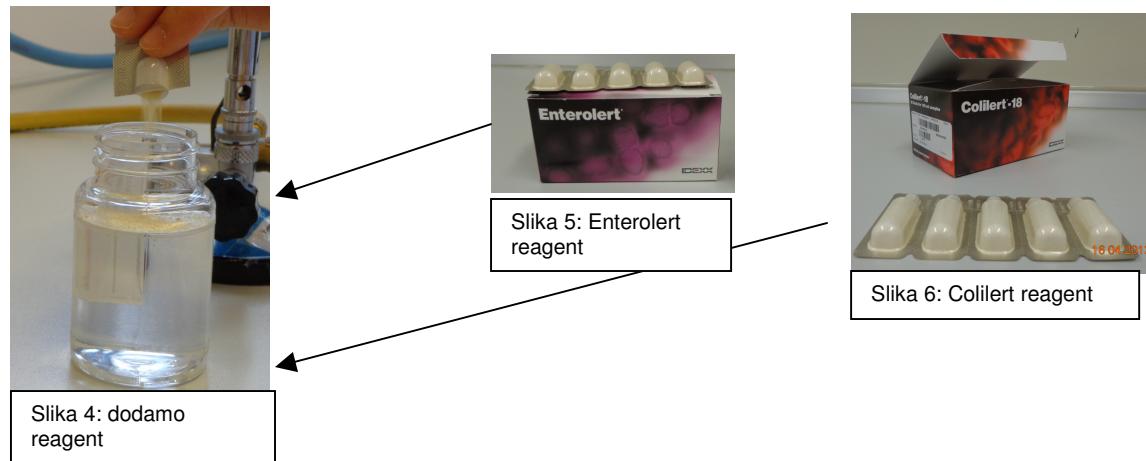
Slika 2: Reagent Colilert in Enterolert, stekleničke, Quanti-Tray in vzorca vode

Vzorec vode dobro premešamo. Odlijemo 100 ml vzorca v sterilno graduirano stekleničko in dobro premešamo. Za določitev višjega števila bakterij v vzorcu, nalijemo v stekleničko 10 ml ali 1 ml vzorca ter dopolnimo do 100 ml z deionizirano vodo.



Slika 3: nalivanje vzorca v graduirano stekleničko

Dodamo IDEXX Colilert ali IDEXX Enterolert reagent ter mešamo dokler se ne raztopi



Suspenzijo prelijemo iz stekleničke v Quanti-Tray/2000 za vzorce površinskih vod oziroma v Quanti-Tray pri vzorcih pitnih vod.



Slika 7: dobro premešamo



Slika 8: Prelivanje suspenzije v Quanti-Tray

Narahlo, 2-3 krat pritisnemo manjša testna polja, da iztisnemo ujete zračne mehurčke ter Quantitray vstavimo v gumijasto podlogo in zavarimo v Quantitray Sealer.



Slika 9: Quantitray vstavimo v gumijasto podlogo



Slika 11: gumijasta podlaga za Quanty Tray/2000 in Quanty Tray/2000

Slika 10: Quanty Tray Sealer in gumijasta podlaga za Quanty Tray



Slika 12, 13, 14: Quanti-tray zavarimo

Zavarjen Quanti-Tray Colilert inkubiramo 18-22 ur pri temperaturi $36\pm 2^{\circ}\text{C}$, Enterolert pa 24 ur pri temperaturi $41\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ in inkubacijo lahko podaljšamo za 4 ure.



Slika 15, 16: Inkubacija Quanti-Tray v inkubatorju

Referenčni metodi: SIST EN ISO 9308-1:2001
SIST EN ISO 9308-1:2001/ AC:2009 (standardni test)
in SIST EN ISO 7899-2:2000

Za preskušanje vzorcev potrebujemo:
Vzorec pitne ali površinske vode

Gojišča:

Tergitol-7 agar -T7
Ali Membrane-filter Enterococcus selective agar
according to Slanetz and Bartley – m-enterococcus

Aparature

Inkubator- delovanje pri $36\pm 2^{\circ}\text{C}$,
Aparat za membransko filtracijo,
Pinceta s topo konico za prenašanje filtrov
Filtri za membransko filtracijo



Slika 17: Aparat za membransko filtracijo

100 ml vzorca prefiltriramo skozi filter. Pri površinskih vodah filtriramo še 10 ml in 1 ml vzorca ter dopolnimo z deionizirano vodo do 100 ml.



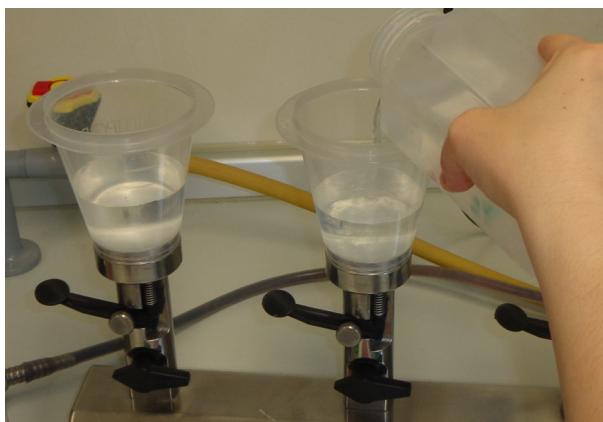
Slika 18: podajalec membran



Slika 19: filter položimo na nosilec aparata



Slika 20: lij namestimo na nosilec



Slika 21: vzorec nalijemo v lij

Filter položimo na selektivno gojišče T-7 in ga inkubiramo na temperaturi $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 21 ± 3 ure ter podaljšamo inkubacijo na 44 ± 4 ure ali na m-enterococcus ter ga inkubiramo $44\text{ur}\pm 4$ ure pri $36^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$.



Slika 22: Filter položimo na T-7



Slika 23: Filter položimo na m-enterococcus

2.DAN

Metoda COLILERT:

Aparature:

UV kabinet

Gojišča:

Violet Red Bile Laktozni agar-VRBA

TBX agar

Krvni agar -KA

igle

Metoda ENTEROLERT:

Aparature:

UV kabinet

Gojišča:

Krvni agar -KA

Eskulin žolč azidni agar - ABAA

igle

COLILERT: Prisotnost koliformnih bakterij potrdimo kot rumeno obarvanost testnih polj. *E. coli* ob UV osvetlitvi modro fluorescira.

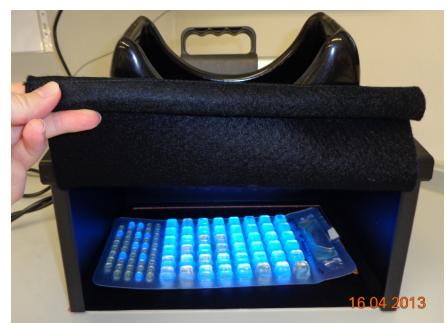
ENTEROLERT: Prisotnost enterokokov potrdimo kot fluorescenco luknjic pod UV lučjo.



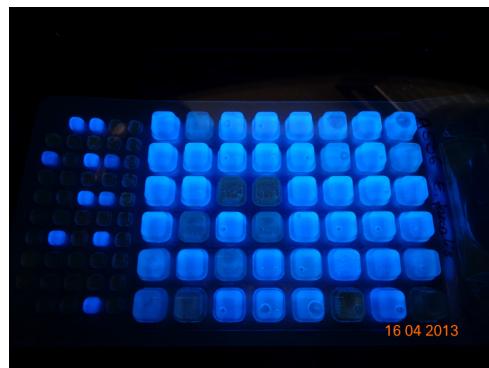
Slika 24, 25: Colilert: Quanti-Tray po inkubaciji



Slika 26, 27: Colilert: Quanti-Tray/2000 po inkubaciji



Slika 28: Colilert Quanti-Tray/2000 v UV kabinetu



Slika 29, 30: Enterolert: Quanti-Tray (levo) in Quanti-Tray /2000 (desno) po inkubaciji pod UV lučjo

S pomočjo tabele za določitev MPN odčitamo najbolj verjetno število *E.coli*, koliformnih bakterij in enterokokov.. Rezultate zabeležimo na obrazec.

Quanti-tray smo nato na zadnji strani razkužili z 70 % alkoholom

COLILERT: označimo 5 polj ki so se obarvala rumeno ter 5 polj, ki so fluorescirala pod UV. Z iglo prebodemo testno polje ter prenesemo kapljico, oziroma 30 do 50 µl suspenzije na gojišča KA ($36\pm 2^\circ\text{C}$ za 21 ± 2), VRBA in na gojišče TBX ($44,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ za 21 ± 3 ure) .

ENTEROLERT: Označimo 5 polj, ki so fluorescirala pod UV ter z iglo prebodemo testno polje ter prenesemo kapljico, oziroma 30 do 50 µl suspenzije na KA in ABAA.

ABAA inkubiramo pri $44^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ 21 ± 2 ure, KA pri $36\pm 2^\circ\text{C}$ 21 ± 2 ure.

Metoda: SIST EN ISO 9308-1:2001

SIST EN ISO 9308-1:2001/ AC:2009 (standardni test)

Gojišča:

Triptonska voda

Violet Red Bile Laktozni agar-VRBA

TBX agar

Krvni agar -KA

ONPG

Pregledamo filtre in kot lakoza pozitivne kolonije preštejemo vse rumene kolonije,. Inkubacijo vseh petrijevk podaljšamo na 44 ± 4 ure, ko filter ponovno pregledamo in preštejemo tipične kolonije.

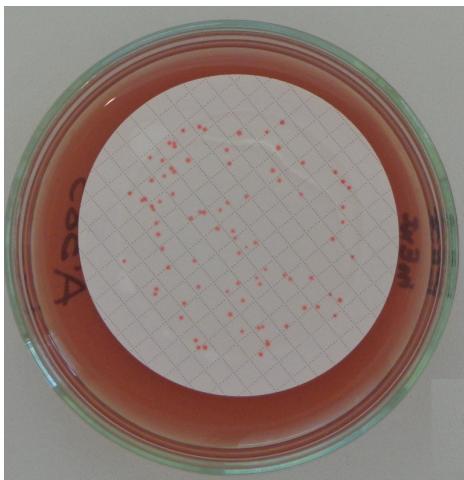


Precepimo vsaj 5 tipičnih kolonij na neselektivni KA ($36\pm 2^\circ\text{C}$ za 21 ± 2), triptonsko vodo ($44,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ za 21 ± 3 ure), ONPG ($36\pm 2^\circ\text{C}$ od 18-22 ur), VRBA ($36\pm 2^\circ\text{C}$ za 21 ± 2 ure).
in TBX ($44,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ za 21 ± 3 ure).

Slika 31: gojišče T-7 po inkubaciji

Metoda: SIST EN ISO 7899-2:2000

Pregledamo plošče ter zabeležimo okvirno število tipičnih kolonij. Plošče inkubiramo 44 ± 4 ure pri $36 \pm 2^\circ\text{C}$.



Slika 32: gojišče m-enterococcus po inkubaciji

3. DAN

Metoda COLILERT

Reagenti in gojišča:

Oksidazni reagent

Triptonska voda

ONPG

Odčitamo precepljena gojišča, iz kolonij na KA izvedemo oksidazni test, cepimo še triptonsko vodo in ONPG gojišče.

Metoda SIST EN ISO 9308-1:2001

SIST EN ISO 9308-1:2001/ AC:2009 (standardni test):

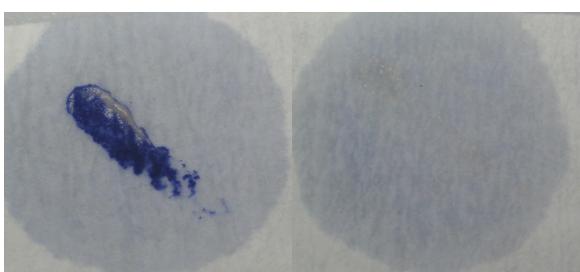
Reagenti:

Oksidazni reagent

Kovacs' reagent

Odčitamo precepljena gojišča.

Za indol test po 21 ± 3 inkubaciji dodamo 10-15 kapljic Kovacs' reagenta. Iz kolonij na KA izvedemo oksidazni test. Koliformne bakterije so oksidaza negativne. Ponovno pregledamo plošče T-7 ter ponovno preštejemo kolonije in jih po potrebi potrdimo.



Slika 33: levo-pozitiven oksidazni test; desno-negativen oksidazni test



Slika 34: Krvi agar po inkubaciji s poraslimi kolonijami *E. coli*



Slika 35: gojišče VRBA po inkubaciji s poraslimi kolonijami *E. coli*



Slika 36: gojišče TBX po inkubaciji s poraslimi kolonijami *E. coli*

Metoda ENTEROLERT: odčitamo precepljena gojišča



Slika 37: Metoda ENTEROLERT; gojišči ABBA in KA po inkubaciji s poraslimi enterokoki

Metoda SIST EN ISO 7899-2:2000:

Gojišča:

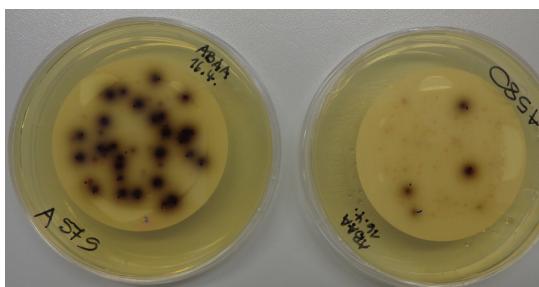
Eskulin žolč azidni agar - ABAA

Aparature:

Inkubator- delovanje pri $44,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

Filter prenesemo na

gojišče ABAA predgreto na 44°C . Inkubiramo 2 uri pri $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, odčitamo rezultat. Tipične kolonije prepoznamo po rumenorjavi- črni barvi gojišča, ki jih obdaja. Preštejemo tipične kolonije.



Slika 38: Metoda SIST EN ISO 7899-2:2000; gojišče ABAA po inkubaciji s tipičnimi kolonijami enterokokov

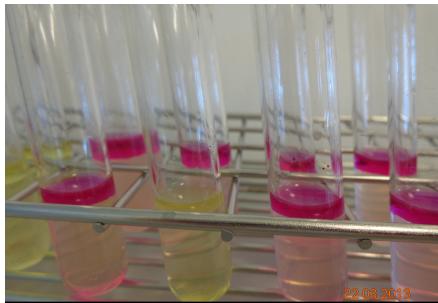
4.DAN

Metoda COLILERT:

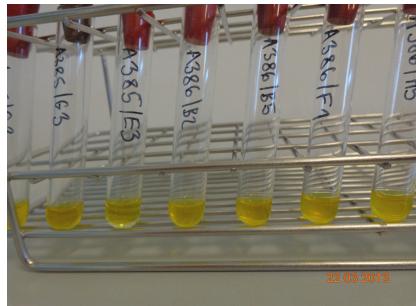
Reagenti:

Kovacs' reagent

Odčitamo triptonsko vodo in ONPG gojišče.



Slika 39: Triptonska voda po inkubaciji s pozitivno reakcijo po dodatku Kovacs' reagenta (češnjev obroč) in negativno reakcijo (brezbarvno)



Slika 40: pozitiven ONPG test (rumenoobarvano gojišče)

Viri slik: Arhiv ZZV Nova Gorica, Laboratorij za sanitarno mikrobiologijo; 2013