

SAT-23-P-BFT(R)-06

VERIFICATION OF BDS EN ISO 9308-1:2014 WATER QUALITY. ENUMERATION OF
ESCHERICHIA COLI AND COLIFORM BACTERIA - PART 1: MEMBRANE
FILTRATION METHOD

Danka Ivanova, Galina Grigorova

ВЕРИФИКАЦИЯ НА БДС И ISO 9308-1:2014 КАЧЕСТВО НА ВОДАТА.
ОПРЕДЕЛЯНЕ БРОЯ НА *ESCHERICHIA COLI* И КОЛИФОРМНИ БАКТЕРИИ.
ЧАСТ 1: МЕТОД НА МЕМБРАННО ФИЛТРИРАНЕ

Данка Иванова, Галина Григорова

Катедра "Биотехнология"

Университет „Проф.д-р Асен Златаров” - Бургас

E-mail: dsuleva1@mail.bg, E-mail: galinakirova@abv.bg

Verification of BDS EN ISO 9308 -1: 2014 Water Quality. Determine the number of Escherichia coli and coliform bacteria. Part 1: Method of membrane filtration: Was carried out verification of BDS EN ISO 9308-1: 2014 and found that the main characteristics: relative uncertainty from counting, repeatability and reproducibility are close to the published standard. Created "budget"of uncertainty and determined expanded uncertainty, U: for E. coli - 20.12% and for coliforms -13.81%. The main parameters of the method: sensitivity, specificity, efficiency and selectivity were comparable to those at the initial validation.

Key words: Verification, Water Quality, Escherichia coli, coliform bacteria

ВЪВЕДЕНИЕ

Най- удобен и икономичен метод за микробиологичен анализ на води е методът на мембранна филтрация. Новият референтен метод за определяне броя на *Escherichia coli* и колиформни бактерии - ISO 9308-1:2014 г има редица предимства пред прилагания досега: използване на селективна хромогенна среда - Chromocult® Coliform Agar (CCA) за едновременно откриване на колиформи и *E. Coli*; ниски граници на откриване; кратко време за получаване на резултат; широко приложение в различни водни матрици.

Верификацията е задължителен етап при въвеждане на нов метод за изпитване. Тя е потвърждаване чрез изследване на стандартизирани методи и предоставяне на обективни доказателства, че са изпълнени отделните изисквания за определено предвидено използване.

ИЗЛОЖЕНИЕ

След запознаване с ISO 9308-1:2014г [1] и разработване на алгоритъм за верификация се пристъпва към нейната реализация, която се осъществява на следните етапи:

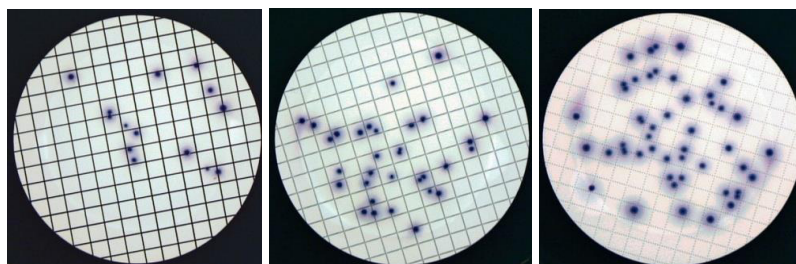
Оценяване на качеството на необходимите средства за верификация

Оценено е качеството на три марки мембранни филтри, съгласно ISO 7704 [2].

Марка 1

Марка 2

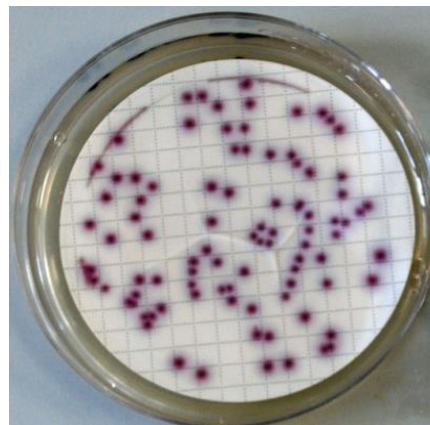
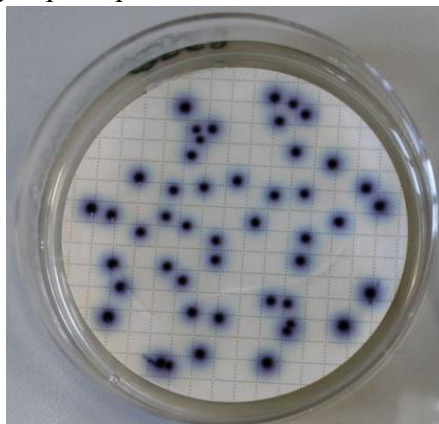
Марка 3



Фиг. 1. Растеж на *E. coli* върху изследваните филтри

Изчислена е степента на възстановяване (R) на целевите микроорганизми. За филтрите от марка 3 тя е 94% за *E. coli* и 95% за *E. aerogenes*, а при останалите две марки - под 70%. Това е основателна причина за следващите анализи да бъдат избрани филтрите от марка 3.

Оценено е качеството на хранителните среди и реактиви в съответствие с ISO 11133 [3]. Физичният контрол на качеството на средите включва показателите: рН стойност, цвят, прозрачност, дебелина на слоя, устойчивост на гела, др. Микробиологичният контрол се състои в изпитване за стерилност и микробен растеж - продуктивност, селективност и специфичност. За определяне продуктивността на средата са филтрувани паралелни проби, съдържащи определено количество на целевите микроорганизми. Единият филтър се поставя върху изпитваната среда (ССА), а вторият – върху референтна среда (Tryptic soy agar - TSA) и се инкубират при $36 \pm 2^\circ\text{C}$ за 21 ± 3 часа.



Фиг.2. Растеж на *E. coli* в/у ССА

Фиг.3. Растеж на *E. aerogenes* в/у ССА

Коефициентът на продуктивност, P_R се изчислява по формулата:

$$P_R = N_s / N_o, \text{ където:}$$

N_s - брой колонии върху хранителната среда, която се тества;

N_o - брой колонии върху референтна хранителна среда.

P_R за *E. coli* е 0,90, а за *E. aerogenes* - 0,92 (по правило P_R на дадена хранителна среда трябва да е най-малко 0.7).

Селективността на една хранителна среда се изразява в частичното или тотално инхибиране на растежа на нецелеви микроорганизми върху нея. При посевка на *Enterococcus faecalis* върху ССА е налице пълно инхибиране на растежа.

Специфичността на хранителната среда се демонстрира с това, че нецелевине микроорганизми не показват същите визуални характеристики, както целевите. Върху ССА *E. coli* образува синьо-виолетови колонии (разградени са и двата субстрата Salmon-GAL и X-глюкуронид), а *Enterobacter aerogenes* -розово-червени колонии (разграден е само субстратът Salmon-GAL). При посевка на *P. aeruginosa* на ССА, той образува безцветни колонии.

Проведения тест за оксидаза потвърждава литературните данни според които колиформените бактерии са оксидазо-отрицателни, а *Ps. aeruginosa* – оксидазо-положителни и доказва качеството на реагента за оксидаза.

Верификация на БДС EN ISO 9308-1:2014

Методът се основава на мембранно филтруване. Анализирана е проба стерилна морска вода, изкуствено контаминирана със сертифицирани референтни материали (CRM) на фирма Microbiologics - щам *Escherichia coli*, кат.№ 0495 или щам *Enterobacter aerogenes*, кат.№ 0306. Пробата е разработена в 10 паралелни варианта. Мембранните филтри са инкубирани върху ССА при температура $36 \pm 2^\circ\text{C}$ за 21 ± 3 часа. Всички колонии, оцветени тъмно-синьо до виолетово, които дават позитивни β -D-галактозидазна и β -D-глюкуронидазна реакция се определят като *E. coli*. Всички розово-червени колонии, които дават позитивна β -D-галактозидазна реакция се изброяват като предполагаеми колиформени бактерии, които не са *E. coli*. За потвърждаването им се провежда оксидазен тест поне с 10 избрани колонии.

Общият брой на колиформите е сумата от всички оксидазо (-) колонии с розово - червен цвят и всички тъмно сини до виолетови колонии [4], [5].

Чрез статистически анализ на получените резултати се изчисляват стандартното отклонение (SD) и относителна неопределеност от преброяването (U_1), а също така повтаряемост (r) и възпроизводимост (R). При микробиологичните изпитвания е общоприето оценяването на неопределеността да се основава изключително на данните от тях [7].

Както се вижда на табл. 1. за *E. coli*, по показателите повтаряемост (r) и възпроизводимост (R), са постигнати резултати 7% и 9%, които са близки до тези, публикувани в стандарта – 4,6% и 12,7%. Подобна е картината и при колиформните бактерии: r – 4,9% и R- 11% (табл.4.), срещу 3,5% и 11,4% при първичното валидиране.

Относителната неопределеност от преброяването, U_1 (неопределеност Тип А) обаче е само един от компонентите на общата неопределеност.

Създаден е “бюджет” на неопределеността, като са оценени всички входящи величини от Тип А и Тип В (приноси от неопределеностите на броене - U_1 , дистрибуция на Поасон – U_2 , на разреждане, пипетиране, ССМ и ТС), табл.2. и 3. Става ясно, че най-голям принос при съставяне на комбинираната неопределеност има неопределеността от броенето (изпитването), следвана от неопределеностите от разсейването на Poisson и ССМ. Макар и да не влияят съществено върху резултата останалите компоненти на неопределеността трябва да се идентифицират и да се потвърди, че са под контрол, както и, че се извършва оценка на техния принос към промяната на резултатите.

Общата /комбинирана/ неопределеност на резултатите, U_c е положителен квадратен корен на сумата от квадратите на тези приноси.

$$U_c = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2 + \dots}$$

Чрез умножаване на комбинираната неопределеност с фактор на покриване k (2) ($k=2$ отговаря на доверително ниво от 95 %) се получава разширената неопределеност U , която се представя като полуинтервал, (в плюс, минус) до приписаната стойност на величината: Стойност \pm неопределеност (мерни единици).

Оценяване на неопределеността при изпитване на стерилна морска вода, изкуствено заразена с щам *E. coli* ATCC 35218

Табл.1. Определяне на U_1 , R, r

i	x_{iA}	x_{iB}	x_{cp}	S	U rel	U ² rel	$U_{1,RSD}, \%$	R	r	средна стойност, cfu
1	50	52	51	1,414214	0,027729	0,000769	5,38	9	7	50
2	52	50	51	1,414213	0,027729	0,000769				долен лимит
3	50	53	51,5	2,121320	0,041191	0,001697				43
4	46	50	48	2,828427	0,058925	0,003472				горен лимит
5	48	45	47	2,121320	0,045619	0,002081				57
6	54	52	53	1,414214	0,026683	0,000712				
7	50	54	52	2,828427	0,054392	0,002959				
8	48	52	50	2,828427	0,056568	0,003200				
9	46	44	45	1,414214	0,031426	0,000988				
10	47	55	51	5,656854	0,110918	0,012303				
		998	49,9			0,029				

$$U_2 = 1/\sqrt{998} = 0,03165447$$

$$U_c = \sqrt{5,38^2 + 3.16^2 + 4.40^2 + 0.08^2 + 0.41^2 + 0.20^2 + 0.20^2}$$

Комбинирана неопределеност, $U_c = 7,65\%$

Разширена неопределеност, $U = 15,31\%$

Изразяване на резултата: $50 \pm 15,31\%$ или 50 ± 7 cfu/100ml

Табл.2. Приноси към неопределеността

	V, ml	$\pm\Delta$	U _{ск}	U _x
ССМ			440	220
термостат			0,06	0,03
Цилиндър	1000	10		4,082483
Цилиндър	100	1		0,408248
Пипета	10	0,05		0,020412
Пипета	1	0,006		0,002449

Табл. 3. Относителен принос към неопределеността

Входна величина	Оценка	S _x	Относителен принос
X _{ij}	X _{ср}	U _x	U _{оc}
U1			5.38%
U2			3.16%
ССМ	5000	220	4.40%
термостат	37.00	0.03	0.08%
Цилиндър	1000.00	4.08	0.41%
Цилиндър	100.00	0.20	0.20%
Пипета	10.00	0.02	0.20%
Пипета	1.000	0.002	0.20%

Оценяване на неопределеността при изпитване на стерилна морска вода, изкуствено заразена с щам *E. aerogenes* ATCC 13048

Табл. 4. Определяне на U₁, R, r

	x _{iA}	x _{iB}	x _{ср}	S	U _{rel}	U ² _{rel}	U _{1,RS} D, %	R	r	средна стойност, cfu
1	66	68	67	1,414213	0,021107	0,000445	4,47	11,0	4,9	67
2	68	70	69	1,414213	0,020495	0,000420				долен лимит
3	70	74	72,0	2,828427	0,039283	0,001543				58
4	64	58	61	4,242641	0,069551	0,004837				горен лимит
5	66	62	64	2,828427	0,044194	0,001953				76
6	69	68	68,5	0,707106	0,010322	0,000107				
7	68	72	70	2,828427	0,04040	0,001633				
8	67	60	63,5	4,949748	0,077948	0,006076				
9	66	62	64,0	2,828427	0,044194	0,001953				
10	68	65	67	2,121320	0,031899	0,001018				
		1331	66,6			0,02				

$$U_2 = 1/\sqrt{1331} = 0,027410122$$

Табл. 5. Приноси към неопределеността от:

	V, ml	±Δ	Uск	Uх
ССМ			660	330
термостат			0,06	0,03
Цилиндър	1000	10		4,082483
Цилиндър	100	1		0,408249
Пипета	10	0,05		0,020412
Пипета	1	0,006		0,002449

Табл. 6. Относителен. принос към неопределеността

Входна величина	Оценка	Sx	Относителен принос
Xij	Xcp	Ux	Uoc
U1			4,47%
U2			2.74%
ССМ	5000	220	4.46%
термостат	37.00	0.03	0.08%
Цилиндър	1000.00	4.08	0.41%
Цилиндър	100.00	0.20	0.20%
Пипета	10.00	0.02	0.20%
Пипета	1.000	0.002	0.20%

$$Uc = \sqrt{4.47^2 + 2.74^2 + 4.46^2 + 0.08^2 + 0.41^2 + 0.20^2 + 0.20^2 + 0.20^2}$$

Комбинирана е определеност, $Uc = 6.90\%$

Разширена неопределеност, $U = 13.81\%$

Изразяване на резултата: $67 \pm 13,81\%$ или 67 ± 9 cfu/100ml

Определяне на параметрите: чувствителност, специфичност, ефективност и селективност.

За целта се подготвя проба от стерилна морска вода, изкуствено заразена с *E. coli*, *E. aerogenes* и *Ps. aeruginosa* с приблизителна концентрация 5 кл/100 ml. Следва мембранно филтруване, инкубиране и изброяване на колонииите с тъмно син до виолетов цвят като вероятни *E. coli* (А), на розово-червените – като вероятни колиформи (В) и на безцветните – като неспецифични (С). След провеждане на тест за оксидаза и индол се определя броя на потвърдените и непотвърдените *E. coli*, колиформи и неспецифични бактерии. Резултатите са представени на табл. 7.

Табл. 7. Вероятни, потвърдени и непотвърдени видове бактерии

Петри, N	Общ бр., N	Вероятни <i>E.coli</i> (А)	Потв. (D+H)	Непотв. (E+F)	Вероятни Колиф-ми (В)	Потв. (G)	Непотв. (H+I)	Вероятни неспец. (С)	Потв. (L+M)	Непотв. (F+I+K)
1÷10	189	54	48+3	4+2	73	65	3+2	62	54+8	2+2+3

За определяне на параметрите чувствителност, специфичност, ефективност и селективност на метода ни трябва да знаем броя на истинските (а) и фалшиви (с) положителни, както и на истинските (d) и фалшиви (b) отрицателни бактерии, които за *E. coli* и колиформените бактерии са посочени в следващата таблица:

Табл. 8. Истински и фалшиви (+) и (-) бактерии

	<i>E. coli</i>	колиформи
a	D - 48	G - 65
b	H - 3	E + F - 4 + 2
c	E + F - 4 + 2	H + I - 3 + 2
d	G + L + M - 65 + 8 + 54	D + L + M - 48 + 8 + 54

Определени са основните параметри на метода и са сравнени с работните характеристики (болд), получени при валидирането му и посочени в ISO стандарта.

Чувствителност = $a / (a + b)$

Чувствителност *E. coli* = $D / (D + H) = 48 / (48 + 3) = 0,941 = 94\%$, (94%)

Чувствителност колиформи = $G / (G + E + F) = 65 / (65 + 6) = 0,91 = 91\%$ (91%)

Специфичност = $d / (c + d)$

Специфичност *E. coli* = $(G + L + M) / (E + F + G + L + F) = (65 + 8 + 54) / (4 + 2 + 65 + 8 + 54) = 0,940 = 94\%$, (97%)

Специфичност колиформи = $(D + L + M) / (H + I + D + L + M) = (48 + 8 + 54) / (3 + 2 + 48 + 8 + 54) = 0,956 = 96\%$, (94%)

Ефективност: $E = (a + d) / N$

Ефективност *E. coli* = $(D + G + L + M) / N = (48 + 65 + 8 + 54) / 189 = 0,925 = 92\%$, (96%)

Ефективност колиформи = $(G + D + L + M) / N = (65 + 48 + 8 + 54) / 189 = 0,925 = 92\%$, (92%)

Селективност на метода: $F = \lg[(a+c)/n]$

$F_{E. coli} = \lg [(D + E + F) / n] = \lg [(48 + 4 + 2) / 189] = \lg 0,28 = -0,55$, (-0,78)

$F_{колиформи} = \lg [(G + H + I) / n] = \lg [(65 + 3 + 2) / 189] = \lg 0,37 = -0,43$, (-0,32)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резултатите показват, че получените стойности на основните параметри на метода са сравними, а някои от тях дори напълно съвпадат с тези, посочени в стандарта. Всичко това е доказателство, че са изпълнени спецификациите, установени при първичното валидиране и, че методът е подходящ за дадената област на използване.

ЛИТЕРАТУРА

[1] БДС EN ISO 9308-1:2014г. Качество на водата. Определяне броя на бактерии *Escherichia coli* и колиформни бактерии Част 1: Метод чрез мембранно филтриране.

[2] ISO 7704:1985г. Качество на водата – Оценка на мембранныя филтър за микробиологичните анализи.

[3] ISO 11133: 2014г. Микробиология на храни, фуражи и води – подготовка, получаване и съхраняване на хранителните среди и изпитване на качеството им.

[4] ISO 8199: 2005г. Качество на водата. Общо ръководство за изброяване на микроорганизмите при култивиране.

[5] ISO 7218:2007 Микробиология на храни и фуражи. Общи изисквания и ръководство за микробиологични изпитвания

[6] ISO 29201: 2012г. Качество на водата – Вариране на резултатите от изпитване и неопределеността на измерването на микробиологичните методи за изброяване.

[7] EA-4/16G:2003, EA указания за изразяване на неопределеността при количествени изпитвания

За контакти:

Доц. д-р Данка Иванова, Катедра “Биотехнология”, Университет „Проф.д-р Асен Златаров”, тел.: 0887737367, e-mail: dsuleval@mail.bg

Гл. ас. д-р Галина Григорова Катедра “Биотехнология”, Университет „Проф.д-р Асен Златаров”, тел.0898663774 e-mail: galinakirova@abv.bg