

Savremeni pristupi mikrobiološkom kvalitetu vode za piće

docent dr Dragana Tamindžija (PMF, UNS)

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,

kontakt: dragana.tamindzija@dbe.uns.ac.rs

18-20. septembar 2024. Novi Sad

Savremeni pristupi mikrobiološkom kvalitetu vode za piće

- **Ključni koncepti** savremenog pristupa mikrobiološkom kvalitetu vode za piće (biostabilnost vode, koncept K-R strategista)
- Pregled aktuelnih **mikrobioloških parametara** u evropskoj regulativi i metoda za njihovo praćenje
- Pregled **savremenih metoda za monitoring mikrobioloških parametara** u vodi za piće (protočna citometrija, ATP analize, PCR, next generation sequencing)
- Pregled **savremenih metoda za uklanjanje mikroorganizama** u pripremi vode za piće



Biostabilnost

- SZO u svojim dokumentima navodi da: „voda koja ulazi na u distributivni sistem treba da bude mikrobiološki bezbedna i idealno bi trebala da bude **biološki stabilna**“.
- Biološka stabilnost je prvobitno definisana kao „**nemogućnost vode ili materijala u kontaktu sa vodom da podrže mikrobni rast u odsustvu dezinficijensa**“ (Rittmann & Snoeyink, 1984).
- Takvo idealizovano stanje nemoguće je postići
- Nove direktne i osetljive metode kao što su protočna citometrija i metode sekvenciranja mikrobioma su omogućile bolji uvid u većinski nekultivabilni deo mikrobne zajednice koji je do sada bio „nevidljiv“.
- Takvim novim pristupima postalo je evidentno da iako broj mezofila ostaje isti, ipak dolazi do značajnih promena u brojnosti i strukturi mikrobene zajednice.
- To sve je uslovalo da se i definicija biostabilnosti mora korigovati, te definicija biostabilnosti mora obuhvatiti i „**stepen prihvatljive promene**“.

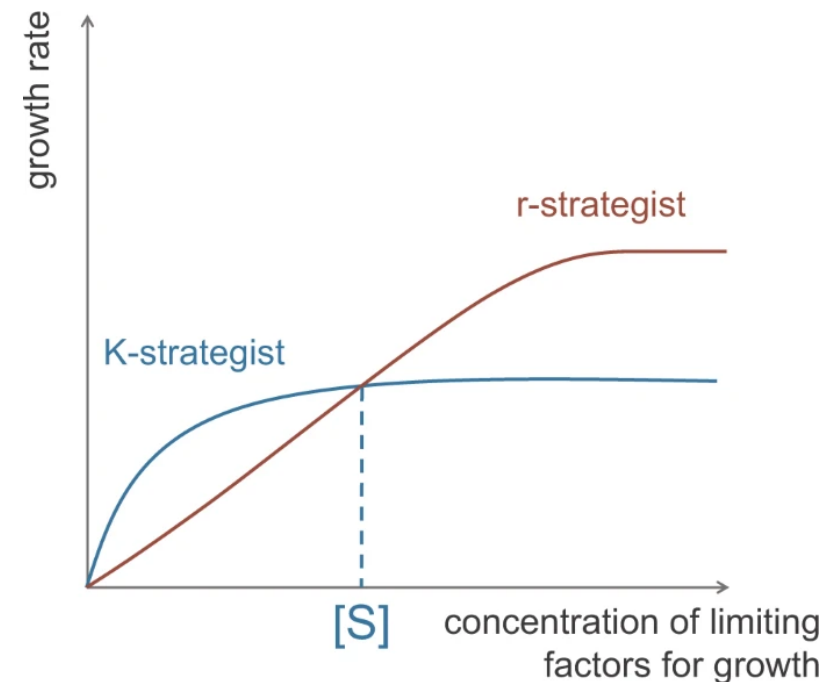
Koncept K-R strategista

K-stratezi (prirodno prisutne bakterije)

Sporo se umnožavaju, rastu pri niskim koncentracijama nutrijenata, čine stabilnu zajednicu dominirajuće zajednicom na koncentracijama nižim od kritične koncentracije K/r praga [S] (plava isprekidana linija)

Neželjeni rast R-stratega (oportunističkih patogena i indikatorskih organizama)

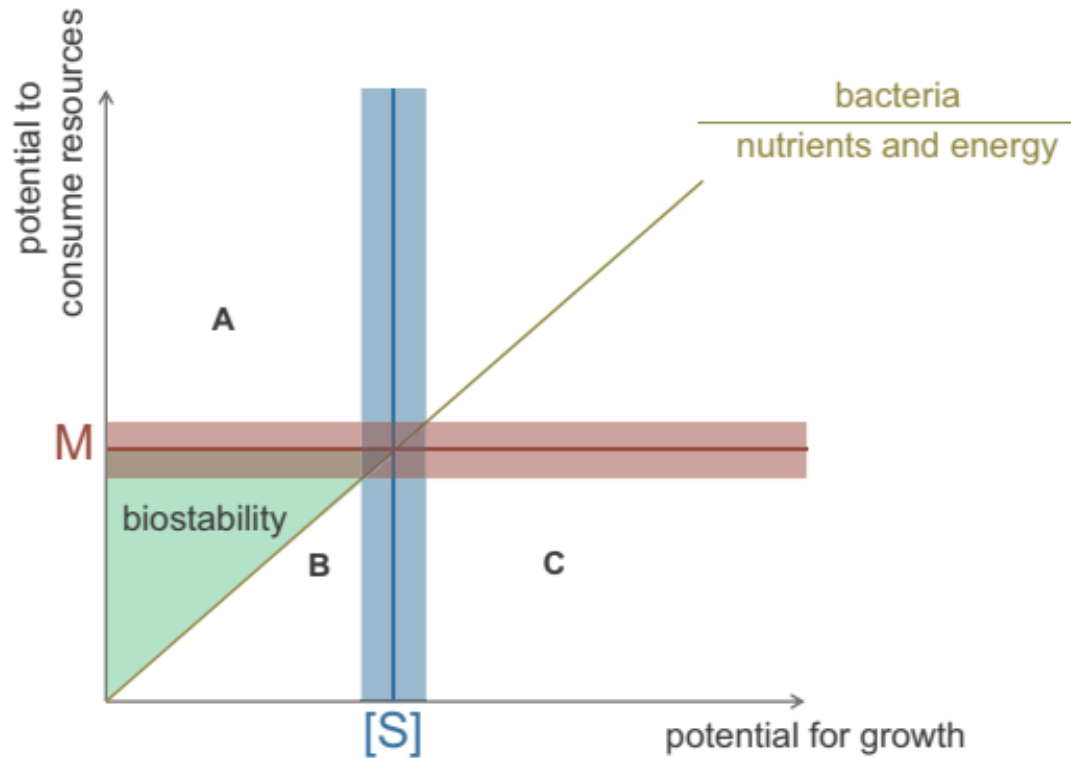
Brzorastući organizmi koji se umnožavaju pri višim koncentracijama faktora rasta.



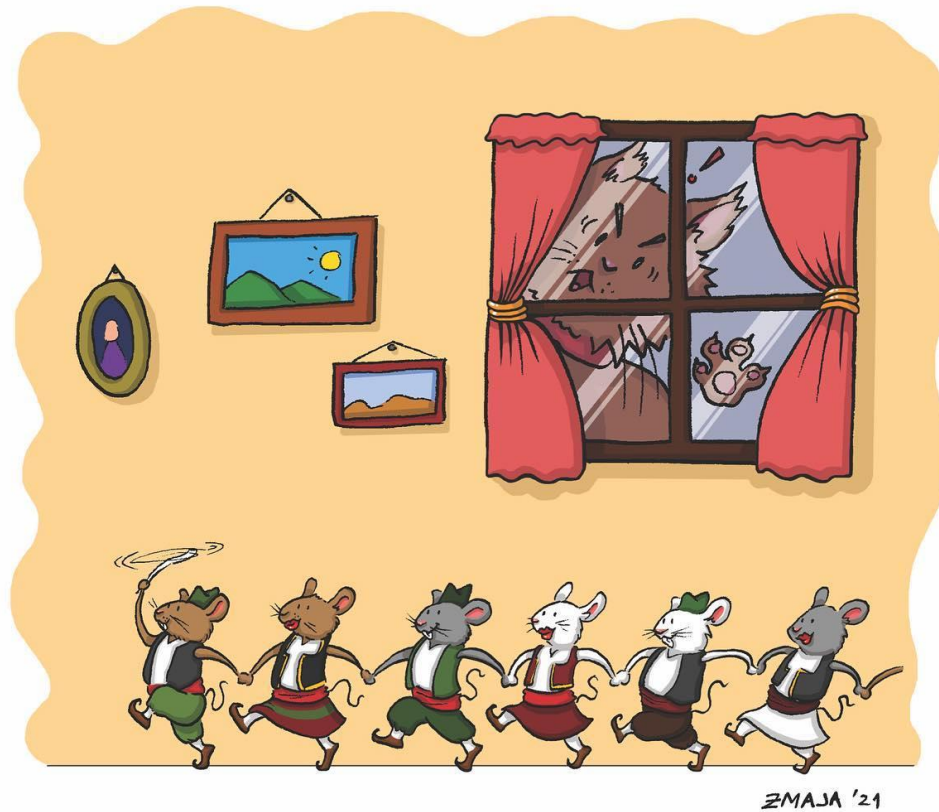
- Usmeriti bakterijsku zajednicu ka dominaciji K-strategista kroz limitaciju nutrijenata
 - Održavati brojnost K-strategista na nivou kapaciteta sredine

Ostvariti biostabilnost vode po novoj definiciji.

Cilj savremenog pristupa mikrobiološkom kvalitetu **nije da se potpuno i maksimalno eliminišu mikroorganizmi, već da se formira što stabilnija i bezbedna autohtona zajednica mikroorganizama** koja će maksimalno iskoristiti resurse, te nepoželjni R-strategisti neće imati mogućnost rasta.



- Potencijal za rast meri se koncentracijom limitirajućeg faktora (najčešće organski ugljenik) (x-osa)
- Potencijal za usvajanje resursa meri se kao mikrobna brojnost (y-osa)
- Na koncentraciji faktora koji ograničava rast ispod praga $[S]$ (plava vertikalna linija), selekcija favorizuje K-strategie
- Mikrobna brojnost treba da bude blizu kapaciteta sredine M (crvena horizontalna linija).
- Kada su ova dva uslova ispunjena, relativna količina hranljivih materija i energije dostupna po bakteriji ("po glavi") biće minimalizovana (žuta dijagonalna linija), što favorizuje K-strategiste.
- Biostabilna voda mora zadovoljiti ove tri granice (zeleno područje).
- Kada dođe do male promene u koncentraciji bakterija ili hranljivih materija, biostabilni ekosistem bi trebalo da bude otporan (plavo i crveno označeno područje oko M i $[S]$).

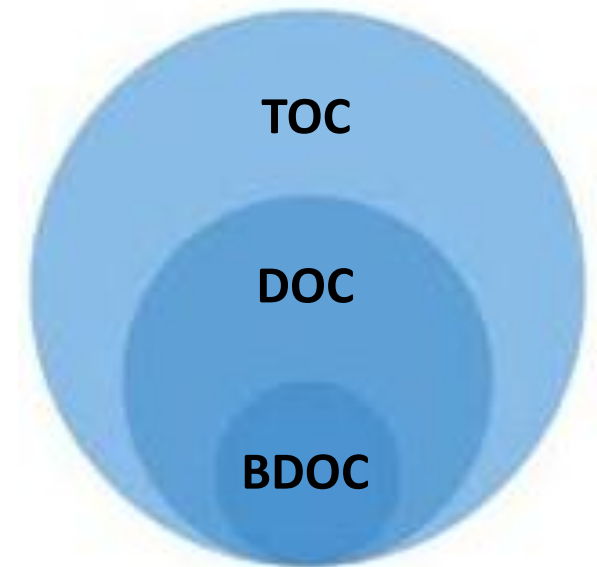


*„Kad mačke nema miševi kolo vode.“
Narodna izreka*

„**Mačke**“ su poželjni autohtono prisutni neškodljivi mikroorganizmi vode koji su dominantni pri limitiranim konstantnim resursima (**K-strategisti**)

„**Miševi**“ su nepoželjni brzoumnožavajući moguće patogeni mikroorganizmi oportunisti koji se javljaju kad je resursa previše (**R-strategisti**)

- Hemijske karakteristike biostabilne vode pažljivo se regulišu kako bi se smanjila dostupnost hranljivih materija koje bi mogle podstaći rast štetnih mikroorganizama.
- Pošto je ugljenik uglavnom glavni limitirajući faktor za rast mikroorganizama, ključni hemijski parametri za biostabilnost vode uključuju:
 1. Ukupni organski ugljenik (**TOC**): < 2 mg/L.
 2. Rastvoreni organski ugljenik (**DOC**): < 1-1,5 mg/l
 3. Biorazgradivi rastvoreni organski ugljenik (**BDOC**): < 0,1-0,4 mg/L.



Mikrobiološki parametri propisni prema European Union (Drinking Water) Regulations 2023:

- *Escherichia coli*, fekalne enterokoke, koliformne bakterije, broj kolonija na 22 °C, *Clostridium perfringens*
 - *E. coli* i fekalne enterokoke su "glavni" parametri - frekvencija njihove analize se ne sme umanjivati procenom rizika
- *Legionella* se analizira u distributivnim sistemima domaćinstava na tačkama rizičnim za porast legionele, reprezentativnim tačkama za sistemsko izlaganje ili na obe tačke.
- **Somatski kolifagi** se koriste kao parameter operativnog monitoringa .

Aneks I - Minimalni uslovi za parametarske vrednosti koje se koriste za procenu kvaliteta vode namenjene humanoј konzumaciji

Deo A – Mikrobiološki parametri		
<i>Escherichia coli</i>	0	Broj u 100ml
Fekalne enterokoke	0	

Deo D – Parametri relevantni za procenu rizika u distributivnim sistemima domaćinstava		
<i>Legionella</i>	1000	CFU/l

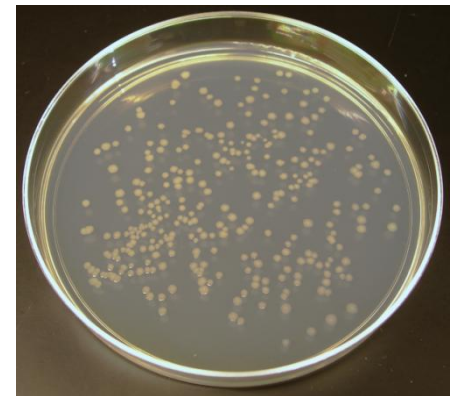
Deo C – Indikatorski parametri		
<i>Clostridium perfringens</i> including spores *	0	Broj u 100ml
Koliformne bakterije	0	
Broj kolonija na 22°C	Bez abnormalne promene	

Operativni monitoring treba takođe da uključī praćenje sledećih parametara u sirovoj vodi kako bi se kontrolisala efikasnost procesa tretmana protiv mikrobioloških rizika:		
Somatski kolifagi *	50 (u sirovoj vodi)	PFU u 100 ml

*parametar treba meriti ako procena rizika ukaže da je to prikladno.

EU regulativa propisuje i **metode za mikrobiološke parametre:**

- *E. coli* i koliformne bakterije (EN ISO 9308-1 membran filter metoda na hromogenom agaru ili EN ISO 9308-2 MPN metoda);
- Fekalne enterokoke (EN ISO 7899-2);
- Broj kolonija na 22 °C (EN ISO 6222);
- *Clostridium perfringens* including spores (EN ISO 14189);
- *Legionella* (EN ISO 11731, za monitoring zasnovan na proceni rizika dodatno uz kulturelne metode ISO/TS 12869, brze kulturelne metode, nekulturelne metode, molekularne metode, posebno qPCR
- Somatski kolifagi za operacioni monitoring - EN ISO 10705-2 i EN ISO 10705-3



Sve specificirane metode su **klasične membran filter ili MPN odgajivačke metode**, izuzev dodatnih metoda za *Legionella* sp.

Klasične odgajivačke metode:

+ **Jeftinije.**

- **Sporo dobijanje rezultata** – od momenta pojave problema do detekcije potrebno i po nekoliko dana.
- **Nemogućnost detekcije vijabilnih ali nekultivabilnih organizama (VBNC)** (npr. *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* i *Vibrio cholerae* u VBNC formi)



Nove metode:

- + **Brže dobijanje rezultata**
- + **Visoko specifične i precizne, mogu dati podatke o poreklu kontaminacije**
- **Viša cena, nedostatak opreme, potrebno obučeno osoblje**
- Ograničena mogućnost **detekcije vijabilnosti** kod nekih metoda





Napredak kod kultivacionih metoda


- Razvijeni sistemi za brzu poluautomatsku detekciju i kvantifikaciju koliforma, *E. coli*, heterotrofnih bakterija, enterokoka,...
- Odobreni od US EPA
- ISO standard 9308-2:2012 zamenjuje klasičnu MPN metodu IDEXX-ovim fluorogenim sistemom

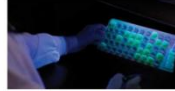


Quantification

Step 1

Add reagent to sample.

Step 2

Pour into Quanti-Tray (counts from 1-200) or Quanti-Tray/2000 (counts from 1-2,419).

Step 3

Seal in Quanti-Tray Sealer and place in 35°C ± 0.5°C incubator for 24 hours (in other countries, the temperature requirement may be different per regulatory requirements).

Step 4: Quanti-Tray

Quantify—Read results:

- Yellow wells = total coliforms
- Yellow/fluorescent wells = *E. coli*
- Count positive wells and refer to MPN table



Savremene metode monitoringa

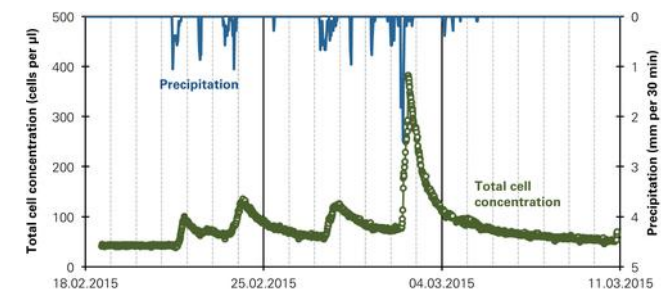
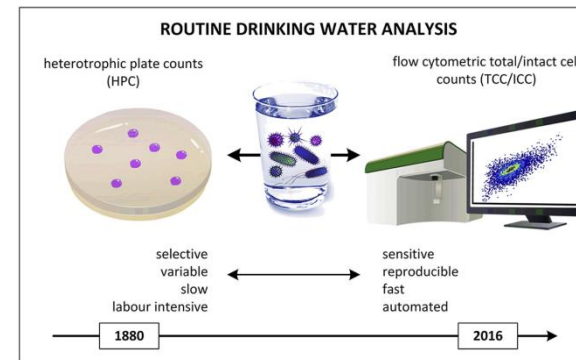
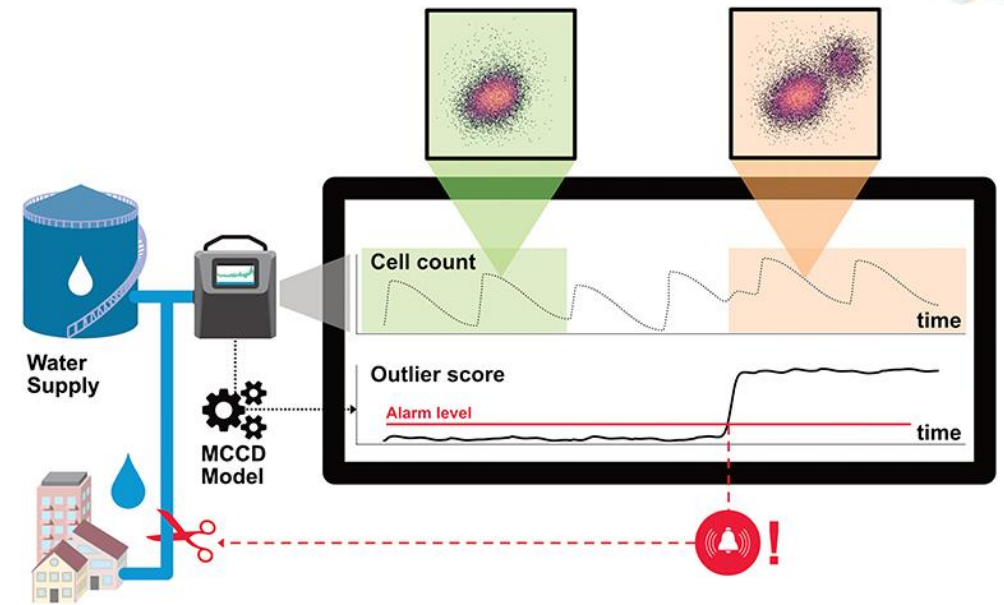


- Akcenat na **online sisteme ranog upozorenja i praćenja u realnom vremenu.**

- Protočna citometrija
- ATP analizatori
- Analize DNK

Protočna citometrija

- Brza i detaljna analizu mikrobiološkog kvaliteta vode, dajući informacije o ukupnom broju bakterija i promenama u mikrobnj zajednici.
- Može detektovati i žive i mrtve bakterije,
- Korisna za praćenje efikasnosti tretmana, identifikaciju potencijalnih problema sa ponovnim rastom mikroba, i obezbeđivanje da voda ispunjava sigurnosne standarde.
- Brza i precizna metoda, ključni alat za praćenje kvaliteta vode u realnom vremenu.
- Glavna mana: visoka cena uređaja, potrošnog materijala i održavanja



Analiza ATP

- Meri prisustvo adenozin trifosfata (ATP), koji je indikator mikrobiološke kontaminacije.
- Brza procena mikrobiološke kontaminacije.
- Metoda zasnovana na luminometriji: merenje svetlosti koju emituje reakcija ATP sa enzimom luciferazom.

Prednosti

- Brza i jednostavna.
- Ne zahteva kultivaciju.
- Osetljiva na niske nivoe kontaminacije.

Mane

- Ne razlikuje vrste mikroorganizama.
- Može biti podložna lažno pozitivnim rezultatima zbog prisustva organskih materija.
- Ograničena preciznost u poređenju sa DNK analizom.



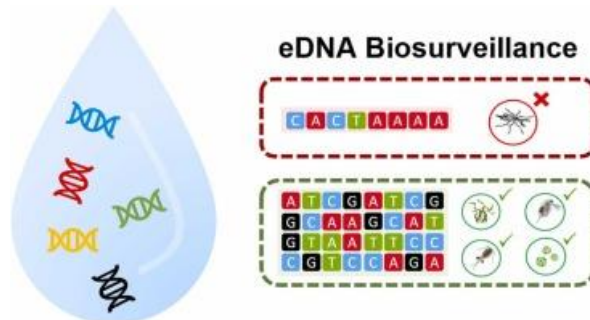
Efikasna za brzu procenu kontaminacije, ali sa ograničenjima u identifikaciji i preciznosti.

Analize DNK

- **Praćenje kvaliteta i izvora kontaminacije.**
- Detekcija i identifikacija mikrobiološke DNK u uzorcima vode kako bi se procenila prisutnost i brojnost specifičnih mikroorganizama

Metode

- **PCR:** Detekcija specifičnih DNK sekvenci.
- **qPCR:** Merenje količine DNK.
- **NGS:** Detaljno profilisanje mikrobioloških zajednica.



Prednosti

- Visoka osetljivost i preciznost.
- Brza detekcija.
- Sveobuhvatno profilisanje celokupne zajednice.
- Bez potrebe za kultivacijom.
- Kvantitativni podaci.

Mane

- Visoki troškovi.
 - Kompleksnost i potreba za obukom.
 - Potencijal za lažno pozitivne/negativne rezultate.
 - Složena interpretacija podataka.
- Napredan alat za praćenje sigurnosti pijaće vode, ali sa manama u smislu troškova i interpretacije.

Pregled glavnih metoda za uklanjanje mikroorganizama u pripremi vode za piće

Svaka metoda ima specifične prednosti i ograničenja, pa se često koriste u kombinaciji radi postizanja optimalnih rezultata.

Metoda	Opis	Efikasnost	Prednosti	Nedostaci
Hlorisanje	Dezinfekcija uz primenu hlora ili hlor-dioksida	Efikasna protiv bakterija i virusa, manje za protozoe	Jeftina i široko primenjena	Može formirati štetne nusproizvode (npr. trihalomethani)
UV zračenje	Oštećuje DNK mikroorganizama pomoću UV svetla	Efikasna protiv većine mikroorganizama	Brza, bez hemikalija, bez nusproizvoda	Nema rezidualni efekat; zavisi od čistoće vode
Ozonizacija	Dezinfekcija uz primenu ozona	Snažno protiv bakterija, virusa i protozoa	Brza i visoko efikasna	Visoki troškovi i kratko dejstvo ozona
Filtracija	Membranske tehnologije (mikro, ultra, nano filtracija)	Fizički uklanja mikroorganizme	Uklanja i bakterije, viruse i parazite	Može biti skupa i zahtevati redovno održavanje
Reverzna osmoza	Filtracija vode kroz polupropusnu membranu	Uklanja širok spektar mikroorganizama	Visoko efikasna za bakterije i viruse	Energetski intenzivna; otpadne vode u procesu
Koagulacija/Flokulacija	Dodavanje hemikalija za zgrušavanje i sedimentaciju mikroorganizama	Efikasna u uklanjanju većih čestica i mikroorganizama	Jeftina i široko dostupna	Nije dovoljna za male mikroorganizme poput virusa
Aktivni ugalj	Adsorbuje organske zagađivače	Efikasan za uklanjanje nekih mikroorganizama i organskih materija	Uklanja i organske zagađivače	Nije efikasna za viruse i bakterije bez dodatne obrade

Da sumirano, ključne tačke savremenog pristupa mikrobiološkom kvalitetu vode za piće su:

- ✓ **Postizanje biostabilnosti i primena modela K/R strategista:**
 - **Ograničavanje organskih materija** kao što su TOC (ukupni organski ugljenik) i BDOC (biorazgradivi organski ugljenik) **održava biostabilnost** i sprečava ponovni rast mikroorganizama tokom distribucije vode.
 - Primena **modela r/K-stratega** iz ekologije pomaže u usmeravanju mikrobiološke zajednice ka sporijem rastu i održavanju stabilnog mikrobioma.

- ✓ **Nadzor u realnom vremenu modernim metodama:**
 - **kontinuirano praćenje** mikrobiološkog kvaliteta vode, što olakšava brzo otkrivanje i reagovanje na kontaminaciju.
 - **Protočna citometrija, PCR, qPCR, ATP analiza za brzu detekciju; sekvenciranje sledeće generacije (NGS)** pruža detaljan pregled mikrobioloških zajednica u vodi.
 - **Integracija sa onlajn sistemima**
 - **Procena rizika**

- ✓ **Napredne tehnologije za obradu:**
 - Ultrafiltracija, reverzna osmoza, ozoniranje i UV dezinfekcija efikasno uklanjaju mikroorganizme iz vode.
 - Smanjenje upotrebe hemikalija, poput hlora, što smanjuje rizik od stvaranja toksičnih nusprodukata.
 - **Kombinacija hemijskih i bioloških metoda:** Integrisanje hemijskih (hlorisanje, ozoniranje) i bioloških tretmana pomaže u postizanju dugotrajne zaštite od patogena.

- ✓ **Poštovanje međunarodnih standarda:**
 - Pridržavanje strožih standarda kvaliteta vode kroz napredne metode i redovno testiranje.

Hvala na pažnji.

Savremeni pristupi mikrobiološkom kvalitetu vode za piće

docent dr Dragana Tamindžija (PMF, UNS)

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,

kontakt: dragana.tamindzija@dbe.uns.ac.rs