

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Špela KOŽELJ

**VALIDACIJA METODE ZA DOLOČEVANJE
KOLIFORMNIH BAKTERIJ IN VPLIV POVRŠINE
NA NJIHOVO ADHEZIJO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij 2. stopnja

Ljubljana 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Špela KOŽELJ

**VALIDACIJA METODE ZA DOLOČEVANJE KOLIFORMNIH
BAKTERIJ IN VPLIV POVRŠINE NA NJIHOVO ADHEZIJO**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij 2. stopnja

**VALIDATION OF METHOD FOR DETECTION OF COLIFORM
BACTERIA AND THE INFLUENCE OF SURFACE ON THEIR
ADHESION**

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa druge stopnje Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Mikrobiološke kontrole kakovosti Lek d.d. in na Katedri za mikrobiologijo na Biotehniški fakulteti. Meritve lastnosti površin so bile izvedene na Inštitutu Jožef Štefan na odseku za tehnologijo površin in optoelektroniko ter odseku za nanostrukturne materiale, ter na Fakulteti za strojništvo v Laboratoriju za tribologijo in površinsko nanotehnologijo.

Po sklepu Komisije za študij 1. in 2. stopnje je bil za mentorja imenovan prof.dr. David Stopar, za somentorico dr. Mateja Kramer in za recenzenta prof. dr. Aleš Podgornik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. David Stopar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: dr. Mateja Kramer
Farmacevtska družba Lek d.d., Ljubljana

Član: prof. dr. Aleš Podgornik
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Špela Koželj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 57.083:606:62:576.6(043.2)
KG	koliformne bakterije/kromogeni koliformni agar/validacija metod/membranska filtracija/adhezija bakterij/fluorescenčna mikroskopija/površina materialov
AV	KOŽELJ, Špela, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	STOPAR, David (mentor) / KRAMER, Mateja (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2016
IN	VALIDACIJA METODE ZA DOLOČEVANJE KOLIFORMNIH BAKTERIJ IN VPLIV POVRŠINE NA NJIHOVO ADHEZIJO
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij 2. stopnja)
OP	XI, 53, [11] str., 14 pregl., 19 sl., 6 pril., 60 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Koliformne bakterije so skupina enterobakterij, katerih glavna metabolna značilnost je predvsem fermentacija laktoze in β -galaktozidazna aktivnost. So indikatorski organizmi za fekalno kontaminacijo vode. V magistrskem delu smo testirali in validirali metodo membranske filtracije v kombinaciji s kromogenim koliformnim agarjem za dokazovanje koliformnih bakterij. Dobljeni validacijski parametri so v skladu z zahtevami. V primerjavi z obstoječo MPN metodo je nova metoda pokazala boljše rezultate. Sklepamo, da je metoda ustrezna za dokazovanje koliformnih bakterij v vzorcih vode in primerna za uvedbo v rutinsko testiranje tehnološke vode v farmacevtskem obratu. Dodatno smo preverili vpliv površine na adhezijo bakterij, kar lahko moti rezultate analize koliformnih bakterij v vodnem vzorcu. Testirali smo titanove diske brez in z hidrotermalno obdelavo, nerjaveče jeklo, steklo in pleksi steklo. Ugotovili smo, da je delež pritrjenih bakterij na hidrotermalno tretiranih diskah nižji od diskov brez hidrotermalne obdelave. Pri obdelavi diskov s plazmo smo opazili dodatno znižanje deleža pritrjenih bakterij na obeh tipih diskov. Rezultati kažejo, da se je delež pritrjenih bakterij po hidrotermalni obdelavi in plazmi znižal za dva velikostna reda. Delež pritrjenih bakterij je bil najvišji pri jeklu, medtem ko je bil delež pritrjenih bakterij na steklo in pleksi značilno nižji.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND	Du2
DC	UDK 57.083:606:62:579.6(043.2)
CX	coliform bacteria/chromogenic coliform agar/method validation /membrane filtration/ bacterial adhesion /fluorescent microscopy/surface of material
AU	KOŽELJ, Špela
AA	STOPAR, David (supervisor) / KRAMER, Mateja (co-advisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme Biotechnology
PY	2016
TI	VALIDATION OF METHOD FOR COLIFORM BACTERIA DETECTION AND THE INFLUENCE OF SURFACE ON THEIR ADHESION
DT	M.Sc.Thesis (Master Study Programmes)
NO	XI, 53, [11] p., 14 tab., 19 fig., 6 ann., 60 ref.
LA	sl
AI	sl/en
AB	Coliform bacteria are a group of enterobacteria, whose main metabolic characteristic are fermentation of lactose and β -galactosidase activity. They are indicator organisms for faecal contamination of water. In this thesis we tested and validated the membrane filter method in combination with chromogenic coliform agar for detection of coliform bacteria. The resulting validation parameters are within the requirements. Compared with the existing MPN method the new method leads to better results. We conclude that the method is adequate for coliform detection in water samples and suitable for the introduction in routine testing of process water in the pharmaceutical plant. Further, we have examined the impact of surface adhesion of bacteria, which can interfere with the results of the analysis of coliform bacteria in the water sample. We have tested the titanium disks with and without hydrothermal treatment, stainless steel, glass and plexiglass. We have found that the percentage of attached bacteria to the hydrothermally treated disks is lower than on discs, without hydrothermal treatment. On plasma treated titanium discs we observed further reduction of the bacteria attached on both types of discs. The results show that the percentage of attached bacteria after the hydrothermal treatment and the plasma decreased by two orders of magnitude. The proportion of attached bacteria was the highest on steel, while the proportion of bacteria attached to glass and plexiglass was significantly lower.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
 1 UVOD	 1
1.1 NAMEN	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 KONTROLA KAKOVOSTI VODE V FARMACIJI	2
2.2 KOLIFORMNE BAKTERIJE	2
2.3 METODE ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI KOLIFORMNIH BAKTERIJ	3
2.4 ADHEZIJA BAKTERIJ NA POVRŠINO IN NASTANEK BIOFILMA	6
2.3 MEHANIZEM VEZAVE BAKTERIJ NA POVRŠINO	8
3 MATERIALI IN METODE	10
3.1 PREIZKUŠANJE METODE ZA DOKAZOVANJE KOLIFORMNIH BAKTERIJ	10
3.1.1 Material	10
3.1.2 Gojišča	11
3.1.3 Priprava testnih mikroorganizmov	12
3.1.4 Primerjava membranske filtracije ob uporabi CCA in mEndo LES agarja....	13
3.1.5 Filtracija vode pred kontaminacijo	13
3.1.6 Preverjanje koncentracije suspenzij.....	14
3.1.7 Vzoredno testiranje okuženih vzorcev z metodo MPN in membransko filtracijo v kombinaciji z CCA	14
3.1.8 Primerjava rezultatov pridobljenih na rednih vzorcih	15
3.2 VALIDACIJSKI PARAMETRI:	16

3.2.1 Točnost	16
3.2.2 Natančnost.....	16
3.2.3 Specifičnost in selektivnost	17
3.2.4 Meja detekcije in kvantifikacije.....	18
3.2.5 Linearnost	18
3.2.6 Robustnost	18
3.3 ADHEZIJA BAKTERIJ	19
3.3.1 Materiali.....	19
3.3.2 Gojišča, pufri in kemikalije.....	20
3.3.3 Testni mikroorganizmi	21
3.3.4 Testne površine.....	21
3.3.5 Čiščenje in obdelava diskov	22
3.3.6 Postopek testiranja adhezije na titanovih diskih	22
3.3.7 Postopek testiranja adhezije na steklu, pleksi steklu in jeklu.....	23
3.3.8 Mikroskopiranje in analiza slik.....	23
3.3.9 Delež pritrjenih bakterij.....	24
3.3.10 Karakterizacija površin.....	24
4 REZULTATI.....	25
4.1 PRIMERJAVA UPORABE CCA IN M-ENDO LES AGARJA	25
4.2 VALIDACIJSKI PARAMETRI	27
4.2.1 Točnost	27
4.2.2 Natančnost	27
4.2.3 Linearnost.....	28
4.2.4 Meja detekcije in kvantifikacije.....	29
4.2.5 Specifičnost in selektivnost.....	29
4.2.6 Analiza vzorcev v proizvodnem obratu.....	30
4.2.7 Vzporedno testiranje kontaminiranih vzorcev z MPN in membransko filtracijo z uporabo CCA.....	31
4.2.8 Robustnost metode.....	34
4.3 VPLIV MATERIALOV NA ADHEZIJO BAKTERIJE <i>E. coli</i>	36
4.3.1 Delež pritrjenih bakterij.....	36
4.3.2 Vpliv obdelave diskov s plazmo na delež pritrjenih bakterij.....	36

4.3.3 Adhezija bakterij na netitanove površine	38
4.3.4 Površina diskov	38
5 DISKUSIJA	42
5.1 PREIZKUŠANJE IN VALIDACIJA METODE ZA DOKAZOVANJE KOLIFORMNIH BAKTERIJ	42
5.2 VPLIV POVRŠINE NA ADHEZIJO BAKTERIJ	43
6 SKLEPI	46
7 POVZETEK	47
8 VIRI	48
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljeni reagenti	10
Preglednica 2: Uporabljen potrošni material	10
Preglednica 3: Uporabljene naprave.....	11
Preglednica 4: Uporabljeni reagenti za testiranje adhezije bakterij	19
Preglednica 5: Uporabljen potrošni material za testiranje adhezije bakterij	19
Preglednica 6: Uporabljene naprave za testiranje adhezije bakterij	20
Preglednica 7: Izplen metode (%) glede na redčitev suspenzije za preverjanje točnosti. ...	27
Preglednica 8: Parametri natančnosti za vzorce okužene z neredčeno suspenzijo bakterij.	28
Preglednica 9: Parametri linearnosti za posamezen mikroorganizem.	28
Preglednica 10: Izkoristek (%) CCA metode za določevanje števila bakterij ob uporabi pripravljenega gojišča v petrijevih ploščah proizvajalca Biolife za posamezen mikroorganizem.	34
Preglednica 11: Izkoristek števila bakterij ob uporabi Cromocult coliform agarja proizvajalca Merck za posamezen mikroorganizem	34
Preglednica 12: Rezultati XPS analize.	36
Preglednica 13: Koti omočitve za hidrotermalno odelane diske (HT diski) v odvisnosti od časa po obdelavi s plazmo.	37

KAZALO SLIK

Slika 1: Delovanje encima β -glukoronidaza.....	5
Slika 2: Shema bakterijske celice in adhezija na površino materiala	7
Slika 3: <i>Escherichia coli</i> MG 1655	21
Slika 4: Sistem za preučevanje adhezije bakterij na površino diskov	23
Slika 5: Izgled kolonij na nitroceluloznem filtru.....	25
Slika 6: Primerjava izkoristka metode ob uporabi membranske filtracije v kombinaciji s CCA in mENDO agarjem.....	26
Slika 7: Linearna regresijska krivulja za meritve <i>E. coli</i> s CCA metodo.....	28
Slika 8: Izgled kolonij na filtru.....	30
Slika 9: Izkoristek metode pri testiranju različnih kvalitiet vod ob uporabi membranske filtracije s CCA metodo.	31
Slika 10: Prikaz rezultatov dobljenih z metodo membranske filtracije z CCA.....	32
Slika 11: Prikaz rezultatov dobljenih z MPN metodo	33
Slika 12: Izkoristek CCA metode ob različnih časih inkubacije	35
Slika 13: Vpliv temperature inkubacije na izkoristek CCA metode	35
Slika 14: Delež pritrjenih bakterij glede na tip diska.	37
Slika 15: Delež pritrjenih bakterij glede na material.	38
Slika 16: Površina titanovega diska z bakterijami.....	39
Slika 17: Bakterije na površini diskov.....	39
Slika 18: Hrapavost površine različnih materialov	40
Slika 19: Topografija površin	41

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati testiranja točnosti metode

Priloga B: Parametri natančnosti za vzorce okužene z redčeno (10 %) suspenzijo bakterij

Priloga C: Linearne regresijske krivulje

Priloga D: Vzporedno testiranje z MPN in membransko filtracijo z uporabo CCA

Priloga E: Robustnost metode

Priloga F: Delež pritrjenih bakterij

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATCC	Ameriška zbirka kultur (angl. American Type Culture Collection)
CCA	kromogeni koliformni agar
CFU	število kolonijskih enot (angl. colony forming units)
CG	<i>Citrobacter gillenii</i>
EA	<i>Enterobacter asburiae</i>
EC	<i>Eschehrichia coli</i>
EPS	ekstracelularne polimerne substance (angl. Extracellular polymeric substance)
GFP	zeleni fluorescenčni protein (angl. green florescent protein)
HA	hranljivi agar
HT	Titanovi diski z hidrotermalno obdelavo
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid
J	jeklo
Kn	kanamicin
LB	Lauria bujon
LSB	Lauril sulfatni bujon
LTTC	Laktoza trifenil tetrazolijev kloridni agar (angl. Lactose Triphenyl tetrazolium chloride agar)
MPN	najbolj verjetno število (angl. most probable number)
NaCl	Natrijev klorid
NT	Titanovi diski brez hidrotermalne obdelave
OD	optična gostota (angl. Optical density)
P	pleksi steklo
PBS	fosfatni pufer (phosphate-buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)
PLD	Oznaka stoji za okrajšavo tipa diska in označuje obdelavo z daljšim programom plazme
PLK	Oznaka stoji za okrajšavo tipa diska in označuje obdelavo s krajšim programom plazme
PMMA	pleksi steklo (angl. Polymethyl methacrylate)
PVC	polivinil klorid
R2A	Reasonerjev 2A agar
Ra	povprečna hrapavost (angl. Roughness average)
rpm	obrati na minuto (angl. Revolutions per minute)
S	steklo
TSA	Trypton sojin agar
VBNC	vidno a neogljivo (angl. Viable but not culturable)
XPS	x-žarkovna fotoelektronska spektroskopija (angl. X-ray photoelectron spectroscopy)

1 UVOD

V proizvodnem procesu v farmaciji je potrebno pri vsakem koraku proizvodnje zagotoviti ustrezno kakovost vode. Glede na namen uporabe vode je potrebno zagotoviti odsotnost določenih vrst bakterij. Med drugim je potrebno zagotoviti popolno odsotnost koliformnih bakterij, ki so pokazatelj fekalne kontaminacije vode. Koliformne bakterije so nesporulirajoče, po Gramu negativne bakterije, ki fermentirajo laktozo, so oksidaza negativne in imajo β -galaktozidazno aktivnost. Tipičen predstavnik koliformnih bakterij je *Escherichia coli* (*E. coli*). Ključni metodi za dokazovanje koliformov v vodah sta MPN (angl. most probable number – metoda najbolj verjetnega števila) in membranska filtracija (Guidelines for drinking ..., 1997). V farmacevtski industriji se za določanje koliformnih mikroorganizmov veliko uporablja MPN metoda, ki pa ima številne pomanjkljivosti in se zato pojavljajo nove, ustrežnejše metode. Dodatne probleme pri zagotavljanju ustrezne kakovosti vode in določanju števila mikroorganizmov v izbranem vodnem okolju farmacevtske industrije predstavlja adhezija bakterij, ki lahko vodi v nastanek biofilma. Pred uvedbo nove metode v rutinsko analizo je potrebno le to validirati glede na predvidene vrednosti parametrov med uporabo. Z validacijo želimo dokazati, da metoda ustreza izbranim validacijskim parametrom v danih pogojih preizkušanja (Analytical procedures ..., 2015).

1.1 NAMEN

Glavni namen te naloge je izbrati in validirati metodo za določevanje koliformnih bakterij v vzorcih vode različnih kakovosti. Določiti validacijske parametre in preveriti izplen izbrane metode pod različnimi pogoji, ter jo primerjati z obstoječo MPN metodo. Dodatno želimo ugotoviti, kako različne lastnosti površine materiala vplivajo na pritrjevanje bakterije *E. coli* na površino in s tem tvorbo biofilmov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Metoda membranske filtracije z uporabo kromogenega koliformnega agarja kot medija za gojenje bakterij, je primerna metoda za rutinsko določevanje koliformnih bakterij v tehnološki vodi farmacevtske industrije.
- Obdelava materiala s plazmo spremeni karakteristike površine in s tem tudi adhezijo bakterij na površino.
- Delež bakterij, ki se pritrdijo na površino, je odvisen od materiala iz katerega je površina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KONTROLA KAKOVOSTI VODE V FARMACIJI

V farmaciji je zagotavljanje kakovosti in mikrobiološke ustreznosti vode ključnega pomena. Vodo se uporablja med in za izdelavo farmacevtskih izdelkov, intermediatov in aktivnih farmacevtskih učinkovin. Voda se uporablja za čiščenje in izpiranje proizvodnega materiala in aparatur. V farmaciji imamo več tipov vod, ki se razlikujejo glede na namen uporabe. Vode, ki so podvržene kontroli ustreznosti so: voda za injekcije, čista para, prečiščena voda, procesne vode (pretočne/obtočne), vode za izpiranje in pitna voda ter druge (United States ..., 2013). Ker voda vstopa v proizvodni proces zdravil, lahko preko nje pride do kontaminacije vmesnih izdelkov ali končnega izdelka, kar pa posledično lahko vodi do odpoklica serij.

Ker so zdravila večinoma namenjena ljudem, ki imajo različne bolezni in oslavljen imunski sistem, je lahko prisotnost mikroorganizmov v zdravilih za njih usodna. Da dosežemo ustrezno mikrobiološko kakovost vode je potrebna odsotnost potencialno patogenih bakterij. Eden od pokazateljev mikrobiološke ustreznosti vode so koliformne bakterije. Dokazujemo lahko skupno število koliformnih bakterij, termotolerantne koliformne bakterije in *E.coli*. Koliformne bakterije lahko nakazujejo fekalno kontaminacijo vode (Guidelines for drinking ..., 2011).

Mikrobiološka ustreznost vode ni pomembna le v farmaciji, ampak je ključnega pomena v vsakdanjem življenju, saj vodo pijemo, z njo peremo in jo uporabljamo tudi za druge gospodinske dejavnosti. Voda iz vodovodnih sistemov je redno kontrolirana, medtem ko vode iz vodnjakov, površinskih voda in drugih zajetij niso podvržene kontrolam. V obdobju med letom 2008 in 2009 so bili odvzeti vzorci vode iz individualnih zajetij, kjer so prevladovali vzorci iz Prekmurja. Prisotnost koliformnih bakterij je bila ugotovljena v 95% vzorcev, v 33% vzorcev pa so dokazali tudi prisotnost *E. coli*. Delež vzorcev z *E. coli* je bil v vzorcih iz Prekmurja celo 50% (Fink in sod., 2009). Medtem, ko je okoljska voda pogosto kontaminirana s koliformnimi bakterijami je prisotnost koliformov v farmacevtskih vodah razmeroma redka, vendar je ob morebitnem pojavu koliformov lahko to resen problem.

2.2 KOLIFORMNE BAKTERIJE

Koliformne bakterije so po Gramu negativne, nesporulirajoče, večinoma paličaste oblike. Sodijo v družino *Enterobacteriaceae*. So aerobne ali fakultativno aerobne bakterije, ki so sposobne fermentacije laktoze pri 37 °C v 48-ih urah. Ob fermentaciji laktoze tvorijo kislino in ogljikov dioksid. Imajo encim β -galaktozidazo in so oksidaza negativne. Večina

koliformnih bakterij je nepatogenih medtem, ko lahko nekateri predstavniki povzročijo različna bolezenska stanja. Predstavniki koliformov so predvsem iz rodov *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia* in *Yersinia* (The Microbiology ..., 2002).

E. coli je indikator fekalne kontaminacije. Nahaja se v fekalijah ljudi in toplokrvnih živali. Večina sevov je nepatogenih. Poznamo več tipov patogenih *E. coli*, katere lahko pri ljudeh povzročajo zdravstvene težave, z najpogostejšim sindromom diarejo. Patogene *E. coli* ločimo glede na njihov pojav in obolenja, ki jo povzročajo v več skupin: enteropatogene *E. coli* (EPEC), enterotoksigene *E. coli* (ETEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC), enterohemoragične *E. coli* (EHEC), enteroagregativne *E. coli* (EAEC) in difuzno adherentne *E. coli* (DAEC) (Guidelines for drinking ..., 2011).

2.3 METODE ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI KOLIFORMNIH BAKTERIJ

Na voljo je veliko metod s katerimi lahko zaznamo koliformne bakterije v vzorcih vode. Standardne metode za dokazovanje koliformnih bakterij v vzorcih vode vključujejo MPN metodo in metodo membranske filtracije ob uporabi različnih gojišč. Na voljo je tudi veliko drugih metod, katere pa so označene kot alternativne metode za dokazovanje koliformov v vodah (Rompere in sod., 2002).

V laboratorijih po svetu se uporablja več različic MPN metode. Na voljo so različna tekoča gojišča, s katerimi lahko obogatimo rast željenih mikroorganizmov, ter selektivna gojišča s pomočjo katerih potrdimo prisotnost koliformnih bakterij. V primeru uporabe MPN metode v epruvetah, se za opazovanje nastajanja plina, v epruvete doda tudi Durhamove cevke, kjer se nabere plin ob fermentaciji laktoze. Uporaba MPN metode zahteva ponavadi daljši čas inkubacije, do 48ur, v primeru potrditvenih testov se lahko ta čas podaljša tudi do nekaj dni. Za izvedbo testa je pomemben tudi volumen gojišča in primeren volumen vzorca (Guidelines for drinking ..., 1997).

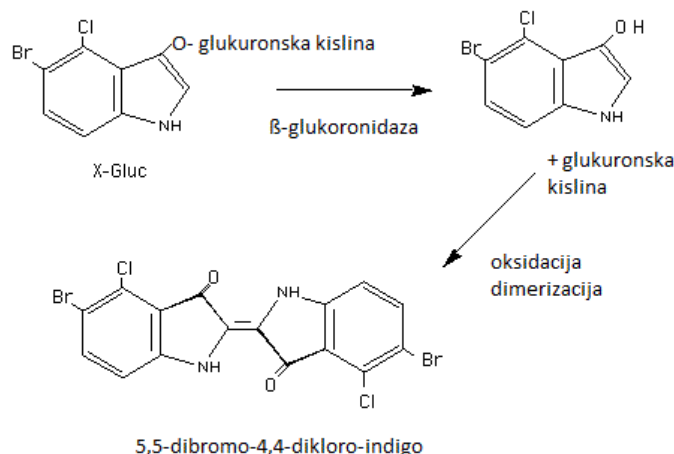
Colilert 18 je MPN metoda, ki se od klasičnih MPN metod za ugotavljanje koliformov (tvorba kisline iz laktoze) razlikuje po tem, da selektivnost temelji na β -galaktozidazi (ISO 9308, 2012). V primerjavi s temi metodami je bilo ob preverjanju vzorcev veliko večji delež pozitivnih vzorcev kot pri klasičnih metodah (Kämpfer in sod. 2008). Visoke vrednosti lažno pozitivnih rezultatov so dokazali tudi pri testiranju tropske vode, kjer je bil delež lažno pozitivnih rezultatov za *E. coli* 36.4 %, lažno negativnih pa 11 %. Delež lažno pozitivnih vrednosti za ostale koliforme je znašal 10.3 % (Chao in sod., 2006). Višja števnost koliformnih bakterij ob uporabi Colilert 18 je bila dokazana v več študijah (Hörman in Hänninen, 2006).

Preprosta in preizkušena metoda je metoda membranske filtracije, kjer skozi filter prefiltriramo ustrezno količino vode. Filter pa namestimo na ustrezno, ponavadi trdno

agarno gojišče. Filter pa lahko inkubiramo tudi na vpojnih blazinicah prepojenih s tekočim gojiščem (Clesceri in sod., 1998). V primeru, ko nas zanimajo izključno koliformne bakterije je smiselna uporaba selektivnih gojišč. Membranska filtracija ima kar nekaj prednosti pred MPN metodo, kot so hitrejša analiza, potrebnega je manj materiala, potrebna je manjša količina gojišča in steklovine. Rezultate lahko ovrednotimo s štejem kolonij, pri MPN pa je možen samo kvalitativen rezultat ali pa približek prave vrednosti. Vendar pa metoda ni primerna za motne vzorce in vzorce z veliko obremenitvijo mikroorganizmov. Metoda je tudi manj občutljiva (Guidelines for drinking ..., 1997).

V preteklosti se je kot standardno gojišče za potrjevanje prisotnosti koliformnih bakterij ob uporabi membranske filtracije uporabljal LTTC (Laktoza Trifenil tetrazolijev kloridni agar) agar (ISO 9308, 2000). Občutljivost metode z uporabo LTTC medija je visoka, medtem ko je selektivnost slabša, saj na gojišču zraste tudi veliko mikroorganizmov, ki niso predstavniki koliformov. Tako se lahko pojavi velik delež lažno pozitivnih rezultatov (Pitkänen in sod., 2007). Predvsem v Ameriki se za dokazovanje koliformov v vodah uporablja tudi dvostopenjska metoda z uporabo mEndo LES agarja z vmesno inkubacijo na LSB (lauril sulfatni bujon). MEndo agar LES metoda je statistično primerljiva s številom *E.coli* ugotovljenih s pomočjo LTTC (Hörman in Hänninen, 2006). Princip delovanja mEndo agarja je v tem, da koliformne bakterije ob fermentaciji laktoze tvorijo kisline, kar povzroči spremembo pH v gojišču. Bazični fuksin služi kot pH indikator. Laktoza pozitivne bakterije se obarvajo rdeče vijolično zaradi bazičnega fuksina in aldehidne reakcije z natrijevim sulfitom. Kovinski lesk se pojavi, ko organizem proizvaja aldehide ob fermentaciji laktoze. Laktoza negativne bakterije tvorijo brezbarvne kolonije (MEndo ..., 2014). Slabost uporabe mEndo agarja je v tem, da je potrebno filter skozi katerega smo prefiltrirali vodo, pred nanosom na mEndo agar inkubirati na LSB gojišču. Dodaten korak v analizi podaljša čas potreben za analizo in tudi zviša nevarnost sekundarne kontaminacije. Dodatna inkubacija je potrebna za boljši izplen oslabljenih mikroorganizmov.

Leta 2014 odobrena standardna metoda ISO 9308-1 (2014) je metoda membranske filtracije v kombinaciji z kromogenim koliformnim agarjem (CCA). Prednost tega gojišča je v tem, da omogoča razlikovanje *E. coli* od ostalih koliformov. Kromogeni koliformni agar vsebuje dva kromogena substrata: Salmon GAL, za zaznavanje skupnega števila koliformov z proizvodnjo β -galaktozidaze. Za razlikovanje *E. coli* pa je dodan še X-glukoronid, ki temneje obarva kolonije zaradi proizvodnje β -glukoronidaze. Po Gramu pozitivne bakterije in nekatere ne-enterobakterije (npr. *Bacillus spp.*) bakterije so inhibirane s pomočjo dodatka Tergitol-7 (Finney in sod., 2003). Da je reakcija ob delovanju β -glukoronidaze intenzivnejša je gojišču dodan IPTG (Chromogenic ..., 2015).



Slika 1: Delovanje encima β -glukoronidaza, ki x-glukoronid pretvori v 5,5-dibromo-4,4-dikloro-indigo, kateri obarva kolonije *E. coli* na kromofenem koliformnem agarju modro (Karcher, 2002: 34).

Kromogeni koliformni agar ni primeren samo za preverjanje ustreznosti vodnih vzorcev ampak tudi vzorcev hrane (González in sod., 2003). Prednost uporabe metode s kromogenim koliformnim agarjem je tudi v manj delovnih korakih potrebnih za analizo. S tem se zmanjša tudi verjetnost kontaminacije.

Poleg kromogenega koliformnega agarja so selektivna gojišča, katera se uporabljajo v kombinaciji z membransko filtracijo za določevanje mikrobiološke kakovosti vod tudi MI agar, kromogeni koliformni agar, DC (angl. Deoxycholate Citrate agar, deoksiholat citratni agar), BCIG(angl. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- b-D-glucuronide) agar in drugi. (Maheux in sod., 2014) Nobeno selektivno gojišče ne omogoča izključno samo rast koliformnih bakterij. Bakterije imajo velik nabor mehanizmov in metabolnih poti s katerimi lahko preživijo v nekem mediju. Lahko pa z izbiro pravega medija omejimo število lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Negativna stran gojitvenih tehnik je njihova nezmožnost zaznavanja bakterij v VBNC (iz angl. Viable but not culturable, vidno a negojljivo) stanju, ali močno poškodovanih bakterij (McDougald in sod., 1998).

Za potrditev koliformnih bakterij v vzorcih lahko uporabljamo tudi metode, ki temeljijo na encimskih tehnikah. Te tehnike so načeloma dražje, potrebujemo več različnih reagentov in pogosto ne omogočajo dovolj hitro diagnostiko ali pa se pojavi velik delež lažno pozitivnih rezultatov. Lahko pa na encimskih lastnostih temeljijo nekatera selektivna gojišča. Metode, ki temeljijo na β -galaktozidazi in β -glukoronozidazi so Colilert, Readycult, kromogeni koliformni agar in MI agar (Maheux in sod., 2008).

Na voljo so tudi različne molekularne metode kot je npr. PCR (iz angl. Polymerase chain reaction, verižna reakcija s polimerazo), s katerimi lahko dokažemo tudi bakterije v VBNC stanju. Zaznavanje temelji na *lacZ* in *uidA* genih (Fateme in sod., 2014). Te metode so hitrejše, saj omogočajo pridobitev rezultatov po nekaj urah. Interlaboratorijske raziskave kažejo, da so testi ponovljivi, vendar pa se med različnimi laboratoriji pokažejo

variabilnosti pri rezultatih, kljub uporabi istega protokola. To je lahko posledica dejstva, da je za molekularne metode potrebno bolj izobraženo in izkušeno osebje (Shanks in sod., 2012). Tudi standardna napaka metode je lahko ponekod med paralelkami v primerjavi z gojitvenimi metodami večja (Whitman in sod., 2010). Problem predstavlja tudi reprezentativnost vzorca, saj se običajno pri molekularnih metodah uporabljajo manjše količine vzorca.

Katero metodo za preverjanje kakovosti vode, se bo uporabljalo v določenem laboratoriju, je odvisno od več dejavnikov. Ob izbiri metode je potrebno biti pozoren na razpoložljivost laboratorijskih pripomočkov, izvajalca analize, kakšne so meje ustreznosti vode, priporočila institucij, katere se ukvarjajo z zagotavljanjem ustrezne kakovosti vod in regulativ na tem področju, cena analize in časovno območje v katerem se pričakuje rezultat (PDA ..., 2000).

Vsako metodo je potrebno validirati preden se jo uvede v rutino za izvajanje rednih analiz. Ob validaciji metode je potrebno preveriti ali je nova metoda po rezultatih primerljiva s prejšnjo ali celo boljša. Dokazati moramo, da lahko z novo metodo pridobimo rezultat, ki nas zanima (PDA ..., 2000). V primeru dokazovanja koliformnih bakterij moramo biti sposobni dokazati prisotnost/odsotnost koliformov. Odvisno od tega ali je metoda kvalitativna ali kvantitativna so za validacijo metode potrebni različni kriteriji. Kriteriji zahtevani za validacijo kvantitativne metode so točnost, natančnost, specifičnost, limita detekcije in kvantifikacije, linearnost, območje, robustnost in ekvivalenca. Izkoristek metode mora biti znotraj kriterija 70-200 % (United States ..., 2013). Izkoristek testnega organizma je odvisen od izbranega mikroorganizma, stanja inokuluma, gojišča in inkubacijskih parametrov. Napake, ki lahko nastanejo ob izvedbi analize so lahko povezane z vzorčenjem, redčenjem, inkubacijo, štetjem in izračuni (PDA ..., 2000).

2.4 ADHEZIJA BAKTERIJ NA POVRŠINO IN NASTANEK BIOFILMA

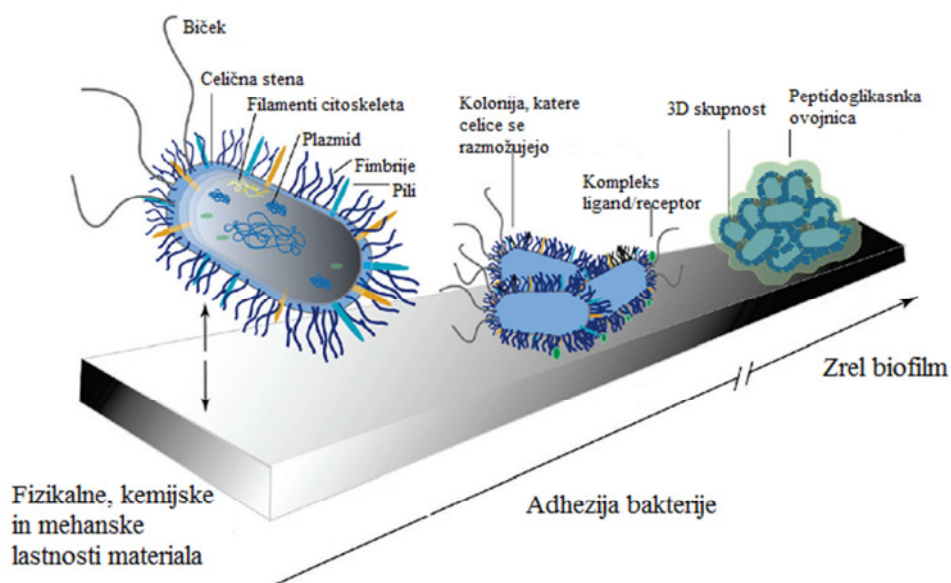
Bakterije se v tekoči vodi nahajajo v planktonskem stanju. V primeru, da najdejo nišo za pritrnitev lahko pride do adhezije bakterij in nastanka biofilma, kar lahko povzroči resne probleme pri zagotavljanju mikrobiološko ustreznosti vode. Bakterije v biofilmu so odpornejše na temperaturo in dezinfekcijo, zato lahko povzročajo kronične okužbe vode. Poleg značilnosti vode in njenega toka po ceveh in značilnosti seva bakterije, na adhezivnost vpliva tudi lastnost materiala s katerim so v stiku.

Biofilm je združba mikroorganizmov pritrjenih na neko površino. Za nastanek biofilma je potreben prehod mikroorganizmov iz planktonskega stanja v stanje, kjer se pritrdijo na površino in tvorijo združbo z drugimi mikroorganizmi. Sestojijo lahko iz enega tipa mikroorganizma ali pa iz več različnih vrst. Za nastanek biofilma so potrebni različni signali iz okolja (O'Toole in Kaplan, 2000). Bakterije tvorijo biofilm kot odgovor na signale okolja. Mikroorganizmu v zanj stresnem okolju kot so naprimer pomanjkanje

hranil, antibiotiki, neustrezna temperatura, anerobioza in drugi za mikroorganizmu škodljivi faktorji, tvorba biofilma služi kot prilagoditev na tako okolje. Združbe v biofilmih se morfološko razlikujejo od planktonskih bakterij. Morfologija celic se lahko tako spremeni, da so sposobne razviti odpornost proti škodljivim dejavnikom (De la Fuente-Núñez in sod., 2013).

Razvojni cikel biofilma je sestavljen iz štirih faz: iniciacija nastanka biofilma, zorenje, vzdrževanje in odstranjevanje. Iniciacija biofilma se začne, ko se planktonski mikroorganizmi pritrdijo na neko površino (Van Houdt in Michielis, 2005). Do stika bakterije s površino lahko pride zaradi mehanskega transporta bakterije (npr. tok vode ali pa s pomočjo gibanja z bički). Del celic se pritrdi reverzibilno. Na pritrditev vplivajo tudi različne mehanske sile, ki lahko odstranijo rahlo pritrjene bakterije. Fizikalne sile vključene pri adheziji bakterij zajemajo van der Waalsove sile, sterične interakcije in elektrostatske sile med dvoslojem (Garrett in sod., 2008). Vpliva lahko tudi temperatura okolja, pri čemer je lahko hidrofilnost površine bakterije ob različnih temperaturah različna (Di Bonaventura in sod., 2008).

Sledi ireverzibilna pritrditev bakterij ob proizvodnji ekstracelularnih polimerov ali specifičnih adhezinov. Pri *E. coli* je za vezavo pomembna udeležba fimbrij in pilov. Tip1 pili so pomembni pri začetni fazi nastanka biofilma (Pratt in Kotler, 1998). Na tvorbo vplivajo tudi interakcije z drugimi vrstami bakterij. Predvsem bakterije, izolirane iz vodnih medijev, ki so znane po njihovih sposobnostih tvorbe biofilma, lahko sinergistično vplivajo na tvorbo biofilma pri *E. coli* (Castonguay in sod., 2006).



Slika 2: Shema bakterijske celice in adhezija na površino materiala, ki vodi v nastanek zrelega biofilma. (Lichter in sod., 2009: 8575).

Po ireverzibilni vezavi celic se začne formirati zgodnja faza biofilma. Med zorenjem biofilma nastanejo mikrokolonije, ki se razvijajo v zrel biofilm. Pri tem se poveča

proizvodnja EPS (Ekstracelularne polimerne substance), ki pri tem služi kot matriks za pritrjevanje, v njem se ujamejo tudi hranila iz okolja. Struktura biofilma je različna in se od bakterije do bakterije razlikuje. Zadnja faza je odcep bakterij iz biofilma v okolje, kjer spet preidejo v planktonsko stanje. S tem lahko spet zasedejo novo nišo (Van Houdt in Michielis, 2005).

Najpomembnejše za nastanek biofilma je prvi stik s površino. Različni materiali imajo različne karakteristike in posledično se bakterije različno pritrjujejo na material in tvorijo biofilm. Ob preučevanju formiranja biofilma na polietilenu, polivinil kloridu (PVC), jeklu in bakru so ugotovili, da bakterije hitreje kolonizirajo umetne materiale kot kovine. Najnižje število bakterij je bilo ugotovljeno pri bakru (Schwartz in sod., 1998). Druge študije pa nakazujejo, da se bakterije slabše pritrldijo na PVC. Prednost PVC-ja je tudi večja odpornost na korozijo (Niquette in sod., 2000).

2.3 MEHANIZEM VEZAVE BAKTERIJ NA POVRŠINO

Vezavo bakterij na površino lahko opišemo s pomočjo DLVO teorije, ki opisuje interakcijo med celico in ravno površino kot razmerje med van der Waalsovimi interakcijami in repulzivnimi interakcijami zaradi prekrivanja električnega dvosloja celice in substrata. (Hermansson, 1999). Večja ionska jakost poveča adhezijo na različne substrate (Katsikogianni in Missirlis 2010). Naboj površine in bakterije določamo z Zeta potencialom. Zeta potencial površine in bakterije je odvisen od okolja v katerem se nahaja. Pri tem ločimo permanentni naboj površine in naboj odvisen od pH. Vrednosti Zeta potenciala bakterije so pri večini fizioloških pH vrednosti negativne. Zeta potencial pada od -5 mV do -15mV, ko preidemo iz kislega v bolj bazično okolje. Na Zeta-potencial bakterije lahko vplivajo tudi proteini, fosfolipidi, teihojska kislina in lipopolisaharidi, ki se nahajajo na celični steni in membrani (Jastrzębska in sod., 2015). S pomočjo kapilarne elektroforeze so določili Zeta potencial bakterij v različnih stanjih, gojenih v revnih in bogatih gojiščih. Stradajoče *E. coli* so imele nižji Zeta potencial kot *E. coli* gojene v bogatem gojišču. Zato se lahko pojavi velika heterogenost med bakterijami, odvisno od tega kakšno je njihovo okolje (Soni in sod., 2008).

Na pritrditev vplivata tako naboj kot prosta energija površine. Za pritrditev je pomembno, da bakterije preidejo energijsko bariero in preidejo v primarni energijski minimum na površini (Wang in sod., 2011). Pritrditev je povezana s spremembo površinske napetosti površine, kot tudi površinske napetosti bakterije. V nekaterih primerih pa so ugotovili, da površinska napetost bakterije ne vpliva na adhezijo (Li in Logan, 2004). Da ni korelacije med adhezijo in hidrofobnostjo površine so ugotovili ob preučevanju vpliva EPS bakterij na adhezijo na steklo (Tsuneda in sod., 2003). Kljub temu, da nekatere študije ne potrjujejo vpliva hidrofobnosti na pritrjevanje bakterij, drugi raziskovalci razvijajo super hidrofobne površine, katere naj bi močno zmanjšale adhezijo bakterij (Zhang in sod., 2013).

Eden od pomembnih faktorjev, ki lahko vpliva na adhezijo bakterij je hrapavost površine. Bakterije se preferenčno vežejo na mesta kjer so vdolbine, zareze in podobne nepravilnosti na površini. Na avstenitnem jeklu z različnimi stopnjami hrapavosti so ugotovili, da je adhezija bakterij na materialu s hrapavostjo $Ra=0,08 \mu m$ najnižja, medtem ko je bila pri nižjih ali višjih vrednosti višja. Vendar so bile razlike med vzorci z različno hrapavostjo majhne (Hočevár, 2013). Bakterije morajo imeti za adhezijo na voljo dovolj prostora, zato se vežejo v vdolbine takih velikosti, da se lahko mednje zasidrajo. Če ima površina poleg mikrohrapavosti tudi nanohrapavost, ki zmanjša kontaktni kot omočenja, lahko pride do zmanjšanja adhezije bakterij na tak material. S hidrotermalno obdelavo titanovih ploščic in nastankom mikrokristalov so Lorenzetti in sod. pokazali, da je prišlo do zmanjšanja adhezije bakterij na površino, tudi za več kot 50 % (Lorenzetti in sod., 2015).

V primeru poškodovanih cevi lahko pride do pojava niš v katerih se lahko naberejo bakterije. Razpoke povečajo hrapavost materiala in zavetje v katero se lahko pritrdijo bakterije. Podobno kot razne zareze in hrapavost materiala, ponujajo površino za pritrditev bakterij tudi mrtvi koti, kateri nastanejo v ceveh in služijo kot zavetje. Tako kot v vdolbinah so mrtvi koti zaščiteni pred tokom vode, ki preprečuje, da bi se bakterije pritrdile. Nevarnost nastanka biofilma v ceveh za distribucijo vode ni samo v samih ceveh, ampak tudi na ventilih. Ob ponavljajočih kontaminacijah vode, je potrebno poleg cevi preveriti tudi ventile. Biofilm se lahko tvori na ventilih obdanih z gumo (Kilb in sod. 2003). Hrapavost površine vpliva na to kako uspešno bomo odstranili bakterije iz površine (Ortega in sod., 2010).

Merjenje adhezije bakterij je zaradi velikega spektra faktorjev, ki vplivajo na adhezijo, zahtevno. Kljub pomembnosti poznavanja mehanizmov adhezije bakterij je na voljo relativno malo metod s katerimi lahko učinkovito preučujemo adhezijo. Metode, ki so na voljo za merjenje adhezije večinoma niso ali pa so slabo validirane. Bakterije vezane na površino lahko označimo z različnimi označevalci ali pa jih pobarvamo (Vesterlund in sod., 2005). Pri merjenju in karakterizaciji adhezije so nam na voljo različne oblike mikroskopije kot naprimer AFM (mikroskopija atomskih sil) in TIRM (mikroskopija z uporabo totalnega odboja) (Camesano in sod., 2007). Različni metodološki pristopi lahko privedejo k različnim rezultatom. Način izpostavitve bakterij površini, čas inkubacije, spiranje in metode zaznavanja bakterij so od študije do študije različni. Posledica tega so tudi različni rezultati ob preučevanju vpliva nekega faktorja na adhezijo. Za primerljive rezultate bi morala biti metoda standardizirana (Zhang in sod., 2013). Ker pa se lahko materiali med sabo močno razlikujejo ni vsaka metoda primerna za vsak material.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREIZKUŠANJE METODE ZA DOKAZOVANJE KOLIFORMNIH BAKTERIJ

3.1.1 Material

Pri delu smo uporabili reagente, potrošni material in naprave navedene v preglednicah 1-3.

Preglednica 1: Uporabljeni reagenti

Reagent	Proizvajalec
glicerol	Merck, Nemčija
Etanol(absolutni)	J.T. Baker
NaCl-peptonski pufer	Heipha diagnostika

Preglednica 2: Uporabljen potrošni material

Material	Proizvajalec
Eze	Goliaz, Slovenija
Filterski lončki	Millipore, Nemčija
Mrežasti filtri Whatman	Whatman,
Razmazovalne palčke	Wipak, Finska
Sterilne pincete	Bastos Viegas, Portugalska
Brisi	Golias, Slovenija
Stericup filter(velikost por 0,22μm)	Millipore, Nemčija
Plastenke(3dcl, 1L)	Golias, Slovenija
Vpojne blazinice v petrijevih ploščah(47mm)	Merck, Nemčija
Petrijeve plošče	Golias, Slovenija
Steklovina	Scott, Duran
Sterilni tipsi	Eppendorf, Nemčija
Nastavki za pipete(15 ml)	Sterilin, Velika Britanija
Krioviale (Cryoinstant Blue)	VWR chemicals, Belgija
Krioviale(2ml)	TPP, Švica

Preglednica 3: Uporabljene naprave

Naprava	Proizvajalec
Filtracijska enota Millipore(EZ-FIT manifold base, 6 nastavkov, nerjaveče jeklo)	Merck millipore, Nemčija
MC 12-2 komora	Iskra PIO, Slovenija
M 12 komora	Iskra PIO, Slovenija
SCH 15 komora	Iskra PIO; Slovenija
Zamrzovalna komora Arctico ULT freeze	Arctico
Inkubator 30-35°C	Binder, ZDA
Inkubator 35-37°C	Kambič, Slovenija
Hladilnik Sanyo medical	Sanyo
Tehtnica za gojišča	Mettler toledo, Slovenija
pH meter (780pH meter)	Metrohm, Slovenija
Števec kolonij EŠKO	EŠKO, Slovenija
Pomožna grelna komora	Kambič, Slovenija

3.1.2 Gojišča

- Coliform cromogenic agar (CCA), Biolife (Kat. št: 491297) – pripravljeno gojišče v petrijevih ploščah (55 mm)
- Chromocult coliform agar (CCA), Merck (Kat. št: 1.10426.0500)
Priprava: 26,5 g dehidriranega gojišča smo natehtali v 1L sterilne demineralizirane vode. Steklenico z gojiščem smo segrevali do raztopitve medija. Ko se je gojišče ohladilo na primerno temperaturo (45 °C) smo ga razlili v petrijeve plošče. Ko se je gojišče strdilo smo ga uporabili v analizi ali pa do analize hranili pri + 4 °C.
- Epruvete z DEV laktoznim peptonskim bujonom, Merck
Priprava: 70 g dehidriranega pripravka smo raztopili v 1 L demineralizirane vode. Po raztopitvi smo po 10 ml gojišča natočili v epruvete z durhamovimi cevki. Epruvete smo zaprli z zamaški in sterilizirali v avtoklavu. Ko se je gojišče shladilo smo ga do analize hranili pri 20-25 °C.
- mEndo agar LES, Merck (Kat. št: 1.11277.0500)
Priprava: 51,0 g dehidriranega gojišča smo natehtali v 1L sterilne demineralizirane vode. Dodali smo 20 ml 96 % etanola. Steklenico z gojiščem smo segrevali do raztopitve medija. Ko se je gojišče ohladilo na primerno temperaturo (45 °C) smo ga razlili v petrijeve plošče. Ko se je gojišče strdilo smo ga uporabili v analizi ali pa do analize hranili pri + 4 °C.

- LSB (Lauryl sulfate broth), Merck:
V 1 L prečiščene vode smo raztopili 35,6 g dehidriranega gojišča. Gojišče smo mešali do raztopitve medija. Gojišče smo avtoklavirali in do porabe hranili na +20-25 °C.
- MacConkey agar, Heipha– pripravljeno gojišče v petrijevih ploščah (90 mm)
- TSA, Heipha diagnostika–pripravljeno gojišče v steklenici (200 ml)
Priprava: Pred uporabo smo segrevali v kopeli (100 °C) do utekočinjenja. Ko se je gojišče ohladilo na primerno temperaturo (45 °C) smo ga razlili v petrijeve plošče. Po strditvi smo ga uporabili v analizi ali pa do analize hranili pri + 4 °C.
- R2A, Heipha diadnostika- pripravljeno gojišče v steklenici (200ml)
Priprava: Pred uporabo smo segrevali v kopeli (100 °C) do utekočinjenja. Ko se je gojišče ohladilo na primerno temperaturo (45 °C) smo ga razlili v petrijeve plošče. Po strditvi smo ga uporabili v analizi ali pa do analize hranili pri + 4 °C.

3.1.3 Priprava testnih mikroorganizmov

Testni mikroorganizmi:

- *Escherichia coli* (ATCC 8739)
- *Citrobacter gillenii* - hišni kontaminant
- *Enterobacter asburiae* - hišni kontaminant
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

Priprava založnih koncentriranih suspenzij hišnih kontaminantov:

Mikroorganizme smo nacepili do posameznih kolonij. Iz plošče smo s cepilno zanko mikroorganizem prenesli na 5 petrijevih plošč s TSA gojiščem. Plošče smo inkubirali 18-24 ur pri 30-35 °C. Zrasle kolonije smo preverili z identifikacijo. Po inkubaciji smo s 15 ml NaCl-peptonskega pufra sprali vsako petrijevo ploščo in bakterijsko kulturo shranili v sterilno plastenko. Izpirku smo dodali 10 % glicerola, ki služi kot krioprotektant. Tako pripravljeno suspenzijo smo po 1-2 ml razdelili v krioviale. Koncentrirane suspenzije smo shranili na temperaturo -75 ± 5 °C. Koncentracijo suspenzije smo določili tako, da smo pripravili desetiške redčitvene vrste. Na TSA gojišče smo v paralelkah nanesti redčitve bakterij in po 18-24 urah pri 30-35 °C s pomočjo števnik plošč določili koncentracijo suspenzije. Za potrebe hranjenja smo kolonijo mikroorganizma nanesti v kriovialo s poroznimi kroglicami in tekočim krioprotektantom. Vrsto mikroorganizma smo potrdili z

molekularno identifikacijo MicroSeqTM (Applied Biosystems). Microbank krioviale so bile shranjene na temperaturo -75 ± 5 °C.

Uporaba Microbiologics EpowerTM:

Za potrebe testiranja smo v primeru uporabe sevov iz ATCC zbirk uporabili liofilizirane mikrobne pripravke EpowerTM (Microbiologic). Epower so liofilizirani pripravki mikroorganizmov s koncentracijami med 10^3 in 10^8 CFU/pelet testnega mikroorganizma. Iz vial s peleti testnega mikroorganizma smo s sterilno pinceto odvzeli en pelet in ga prenesli v 9 ml NaCl-peptonskega pufra. Testni mikroorganizem smo inkubirali 30-45 minut pri 30-35 °C. Po inkubaciji smo epruveto z delovno koncentracijo testnega mikroorganizma vorteksirali, da smo dobili homogeno suspenzijo. Rehidrirano suspenzijo smo porabili v roku 24 ur, če je bila shranjena v hladilniku pri 2-8 °C.

3.1.4 Primerjava membranske filtracije ob uporabi CCA in mEndo LES agarja

Testiranje smo izvedli z mikroorganizmi *E. coli*, *E. asburiae* in *P. aeruginosa* za tri različne kakovosti vod: mehko, prečiščeno (demineralizirano) in pitno vodo. Ob vsakem testiranju smo naredili negativno kontrolo vode. Vzorec vode je predstavljala plastenka z 100 ml vode, katero smo okužili s tako koncentracijo mikroorganizma, da je bilo kasneje na filtru med 10 in 100 kolonij.

Metoda membranske filtracije v kombinaciji s CCA:

100 ml okužene vode smo prefiltrirali skozi filter 0,45 µm in filter prenesli na CCA. Inkubirali smo pri 35-37 °C ter po 24-ih urah inkubacije prešteli kolonije na filtrih.

Metoda membranske filtracije v kombinaciji z mEndo LES agarjem:

100 ml okužene vode smo prefiltrirali skozi filter 0,45 µm in filter prenesli na vpojno blazinico prepojeno z 1 ml LSB. Zaprte petrijevke z vpojnimi blazinicami smo inkubirali za 1,5-2 uri pri 30-35 °C. Nato smo filter nanесли na mEndo LES agar. Inkubirali smo pri 35-37 °C ter po 24-ih urah inkubacije prešteli kolonije na filtrih.

3.1.5 Filtracija vode pred kontaminacijo

Vode različne kakovosti smo pred testiranjem filtrirali s pomočjo Stericup filtra (Millipore) z velikostjo por 0,22 µm, da smo odstranili morebitno prisotne mikroorganizme ozadja. Neoporečnost prefiltrirane vode, katera predstavlja negativno kontrolo pri testiranju, smo preverili tako, da smo 100 ml vode prefiltrirali skozi 0,45 µm filter in filter namestili na CCA. Inkubirali smo 24 ur pri temperaturi 35-37 °C. Enak postopek smo ponovili samo, da smo filter tokrat namestili na R2A in inkubirali pri 30-35 °C.

Pripravili smo tudi set petih epruvet, napolnjenih z 10 ml DEV laktoznim peptonskim bujonom z indikatorjem in durhamovo cevko. V vsako epruveto smo odpipetirali 10 ml vode, pretresli in inkubirali 24 ur pri temperaturi 35-37 °C.

3.1.6 Preverjanje koncentracije suspenzij

Ob vsakem testiranju smo preverili tudi koncentracijo suspenzije testnega mikroorganizma. 100 µl suspenzije smo nanесли na TSA in CCA in jo s sterilno spatulo razmazali po površini agarja. Plošče smo inkubirali 24 ur pri temperaturi 30-35 °C (TSA) in 35-37 °C (CCA).

3.1.7 Vzoredno testiranje okuženih vzorcev z metodo MPN in membransko filtracijo v kombinaciji z CCA

3.1.7.1 Ugotavljanje prisotnosti koliformnih bakterij z MPN metodo

Vsa testiranja navedena pod to točko smo izvedli na prefiltrirani mehki, prečiščeni (demineralizirani) in pitni vodi. Testirali smo z bakterijami *E. coli*, *E. asburiae* in *C. gillanii*.

Za vsak mikroorganizem smo pripravili set petih epruvet, napolnjenih z 10 ml DEV laktoznega peptonskega bujona z indikatorjem, ter Durhamovo cevko za opazovanje nastajanja plina.

Potek:

100 ml vzorca vode v plastenki smo inokulirali posebej z *E. coli*, *E. asburiae* in *C. gillanii* tako, da je koncentracija mikroorganizma v vzorcu vode okrog 10-100 CFU/ml. 10 ml tako okužene vode smo prenesli v 10 ml DEV laktoznega peptonskega bujona, pretresli in inkubirali 24-48 ur pri temperaturi 35-37 °C. Postopek smo ponovili za vseh pet epruvet. Pripravili smo nadaljnje redčitve vzorca, tako da smo 10 ml okužene vode prenesli v 90 ml neoporečne vode (1:10). Podobno smo pripravili tudi redčitve 1:100 in 1:1000. 10 ml vsake redčitve smo prenesli v 5 epruvet z DEV laktoznim peptonskim bujonom. V skladu s tabelo smo ovrednotili rezultat, ter ga podali kot MPN indeks. Epruvete s pozitivno reakcijo so tiste, kjer se spremeni barva indikatorja (spremembe v smeri rumene barve), kjer nastane plin ali pa pride do spremembe gojišča (motnost, usedlina, itd.).

S cepilo zanko smo prenesli kapljico iz sumljivih epruvet z laktoznim peptonskim bujonom na površino MacConkey agarja in inkubirali 24-48 ur pri 35-37 °C. Tipične laktoza fermentirajoče kolonije na MacConkey agarju so opečnato rdeče, obdane s cono oborjenega žolča. Pozitiven rezultat so predstavljali vzorci, kjer je prišlo do rasti na MacConkey agarju.

Ker smo test izvedli v treh paralelkah smo za izračun MPN vrednosti pri primerjavi z membransko filtracijo z CCA upoštevali MPN test v 15-ih epruvetah. Za izračun MPN vrednosti in intervalov zaupanja smo si pomagali z BAM-MPN delovno mapo v programu Excel (Blodgett, 2010).

3.1.7.2 Ugotavljanje prisotnosti koliformnih bakterij z metodo membranske filtracije in kromogenim koliformnim agarjem

Vsa testiranja navedena pod to točko smo izvedli na prefiltrirani mehki, demineralizirani in pitni vodi. Testirali smo z bakterijami *E. coli*, *E. asburiae* in *C. gillanii*.

Potek testa:

100 ml vode smo okužili tako, da je bilo kasneje na filtru med 10 in 100 kolonij mikroorganizma. 100 ml okužene vode smo prefiltrirali skozi filter 0,45 µm in filter prenesili na CCA. Inkubirali smo pri 35-37 °C ter po 24-ih urah inkubacije prešteli kolonije na filtrih. Kolonije koliformnih bakterij se obarvajo roza do temno vijolične barve. Upoštevali smo filtre z do 200 kolonijami. Pripravili smo še redčitve vzorca, tako da smo prvotno okuženo vodo redčili do 1:10, 1:100 in 1:1000 ter ponovili postopek filtracije ter inkubacije na CCA agarju.

Rezultat smo podali kot:

št. kolonij koliformnih bakterij (CFU) / 100 ml prefiltriranega vzorca

V primeru podajanja rezultata z 95 % intervalom zaupanja smo uporabili orodja v programu Excel (Kastelec in Košmelj, 2010).

Preverili smo tudi izkoristek metode pri testiranju različnih kvalitet vod, da bi preverili morebitne interference z vodo. Rezultat je ustrezen če je izkoristek metode med 70 in 200 %.

Izkoristek metode smo izračunali po formuli:

$$\frac{\text{število kolonij}}{\text{pričakovano število kolonij}} = \text{izkoristek metode} \quad \dots (1)$$

Število kolonij predstavlja število kolonij na filtru. Pričakovano število kolonij pa je število kolonij, ki bi jih glede na uporabljeno koncentracijo suspenzije pričakovali, je rezultat dobljen ob preverjanju koncentracije suspenzije.

3.1.8 Primerjava rezultatov pridobljenih na rednih vzorcih

Ob rednem vzorčenju vod smo poleg rednega testa ugotavljanja prisotnosti koliformnih bakterij z MPN metodo na dodatnem vzorcu izvedi tudi test z metodo membranske

filtracije in CCA na 96-ih vzorcih. Testiranje smo izvedli tako, da smo prefiltrirali 100ml vode preko membranskega filtra in filter namestili na CCA. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 35-37 °C. Z molekularno identifikacijo MicroSeq™ (Applied Biosystems) smo potrdili zrasle kolonije. V identifikacijo smo dali tudi vse pozitivne epruvete z LAP gojiščem in kolonije, ki zrastejo na MacConkey agarju.

3.2 VALIDACIJSKI PARAMETRI:

Validacijske parametre smo testirali na mehki vodi, saj ta predstavlja največji del vzorcev, katerim je potrebno določiti odsotnost koliformnih bakterij. Vsak test je bil, če ni posebej navedeno, izveden v treh neodvisnih ponovitvah s tremi paralelkami in tremi različnimi mikroorganizmi (*E. coli*, *C. gillenii* in *E. asburiae*). Ob vsakem testiranju smo preverili koncentracijo suspenzije in naredili negativno kontrolo uporabljene vode.

3.2.1 Točnost

Točnost smo določili tako, da smo redčili suspenzijo bakterij do 75, 50, 25 in 10 %. 100 % predstavlja koncentracijo približno 10³ CFU/ml. S 100 µl tako pripravljene suspenzije smo okužili vzorce vode. Prefiltrirali smo 100 ml okužene vode in filter namestili na CCA in inkubirali 24 ur pri temperaturi 35-37 °C.

Odstotek izplena metode smo izračunali po formuli:

$$Pn = \frac{Xn * 100\%}{X_{100\%} * n} \quad \dots (2)$$

,kjer je Pn odstotek izplena metode pri koncentraciji n, Xn povprečno število kolonij pri koncentraciji n in X_{100%} povprečno število kolonij pri vrednosti 100 % koncentracije, n je koncentracija redčene suspenzije npr. 0,75 za 75 % redčen vzorec) (cit. po Kramer, 2006).

Metoda je točna, če odstotek izplena mikroorganizmov ne odstopa od teoretične vrednosti izplena za več kot ± 30 %.

3.2.2 Natančnost

Natančnost metode smo določili tako, da smo izvedli 10 meritev vzorca okuženega z 100µl suspenzije bakterij, tako da smo na filtru dobili med 10-100 kolonij. Postopek smo ponovili za koncentracijo suspenzije redčeno do 10 %.

Izračunali smo standardni odklon in relativni standardni odklon za dobljene rezultate:

$$\frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{N} = \bar{x} \quad \dots (3)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(x-x_1)^2 + (x-x_2)^2 + (x-x_3)^2 + \dots + (x-x_n)^2}{N}} \quad \dots (4)$$

$$RSD = \frac{\sigma}{x} \quad \dots (5)$$

, kjer so $x_1, x_2, x_3 \dots$ vrednosti posameznih meritev, x povprečna vrednost, N število meritev, σ standardni odklon in RSD relativni standardni odklon.

Metoda je natančna, če je relativni standardni odklon manjši od $\pm 30 \%$.

3.2.3 Specifičnost in selektivnost

Specifičnost in selektivnost metode smo določili tako, da smo vzorec okužili z naborom različnih mikroorganizmov in ugotavljali sposobnost metode, da zazna samo željene mikroorganizme. Na ta način lahko preverimo pojav lažno pozitivnih oziroma negativnih rezultatov.

Vzorec prefiltrirane mehke vode smo okužili s tremi predstavniki koliformnih bakterij (*E. coli*, *C. gilleni*, *E. asburiae*) pri čemer smo vsak vzorec okužili z enim mikroorganizmom. Vzorce smo okužili tako, da je bilo na filtru približno od 10 do 100 kolonij. Prefiltrirali smo 100 ml okužene vode in filter nanесли na CCA. Plošče smo inkubirali 24 ur pri temperaturi 35-37 °C.

Okužili smo tudi vzorce prefiltrirane mehke vode z mikroorganizmi, ki ne sodijo v skupino koliformnih bakterij: *B. subtilis*, *P. aeruginosa* in *S. aureus*.

Nato smo pripravili mešanico gornjih mikroorganizmov in sicer tako, da smo zmešali po 1 ml zgoraj navedenih mikroorganizmov s koncentracijo približno 10^3 CFU/ml in s 100 µl suspenzije okužili vzorce vode. Prefiltrirali smo 100 ml okužene vode in filter namestili na CCA. Plošče smo inkubirali 24 ur pri temperaturi 35-37 °C.

Preverili smo zmožnost razlikovanja med koliformnimi in nekoliformnimi bakterijami, ter preverili morebitne interference med mikroorganizmi. Posamezen morfološki tip kolonij smo preverili z MicroSeqTM identifikacijskim sistemom (Applied microsystems), ki temelji na molekularnih metodah.

Pravi pozitiven rezultat predstavljajo kolonije koliformnih bakterij, katere se obarvajo roza do vijolične barve. Pravi negativen rezultat predstavljajo nekoliformne bakterije, ki na gojišču ne zrastejo ali pa so kolonije brezbarvne (bele). Lažno pozitiven rezultat predstavljajo kolonije nekoliformnih bakterij, ki se obarvajo roza do vijolično. Lažno negativen rezultat pa predstavljajo koliformne bakterije, katerih kolonije se na gojišču ne obarvajo roza do vijolično oziroma na gojišču ne zrastejo.

3.2.4 Meja detekcije in kvantifikacije

Mejo smo določili tako, da smo testirali 5 različnih koncentracij kontaminacije vzorca. Najnižja testna koncentracija je imela teoretično kontaminacijo 1 CFU/100ml. Preverili smo pri kateri najnižji vrednosti kontaminacije se še pojavi rast bakterij.

3.2.5 Linearnost

Analizirali smo 100 ml vzorca okuženega s 100 μ l suspenzije z različnimi koncentracijami med 10 CFU/ml in $2 \cdot 10^3$ CFU/ml.

Rezultate smo analizirali z linearno regresijo in določili korelacijski koeficient (R^2). Metoda je linearna, če je vrednost korelacijskega koeficienta večja od 0,90 ($R^2 < 0,90$).

3.2.6 Robustnost

Testirali smo gojišče dveh proizvajalcev. Uporabili smo že pripravljeno gojišče proizvajalca Biolife in gojišče pripravljeno iz dehidriranega medija proizvajalca Merck. Vsako ponovitev testa pri že pripravljenem gojišču smo naredili z drugo šifro. Pri kuhanem gojišču pa je bilo uporabljeno gojišče, pripravljeno ob različnih dnevih.

Preverili smo tudi vpliv časa in temperature inkubacije na rezultate testa. Primerjali smo rezultate pridobljene po 18-ih, 24-ih in 48-ih urah inkubacije. Po 24-ih urah inkubacije smo preverili rezultate ob inkubaciji na 35-37 °C in 30-35 °C.

Rezultat je ustrezen če je izkoristek metode med 70 in 200 %. Izkoristek metode smo izračunali po formuli (1) navedeni zgoraj.

3.3 ADHEZIJA BAKTERIJ

3.3.1 Materiali

Preglednica 4: Uporabljeni reagenti za testiranje adhezije bakterij

Reagent	Proizvajalec
IPTG	Thermo Scientific
Kanamycin sulfat	Sigma aldrich, ZDA
Lauria broth (LB) broth with agar	Sigma aldrich, ZDA
LB broth	Sigma aldrich, ZDA
Natrijev klorid (NaCl)	Sigma aldrich, ZDA
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma aldrich, ZDA
KH_2PO_4	Sigma aldrich, ZDA
Propidijev jodid	Molecular probes
Etanol, 96%	Sigma aldrich, ZDA

Preglednica 5: Uporabljen potrošni material za testiranje adhezije bakterij

Reagent	Proizvajalec
Centrifugirke (15 ml, 50 ml)	ISO Lab, Nemčija
Eze 10mcl	Labortechnika Goliaz, Slovenija
Tipsi (100 μl , 1000 μ , 20 μl)	Saestedt, Nemčija
Mikrocentrifugirke (1,5 ml)	Brand, Nemčija
Steklovina	Simax, Češka
Pipete	Brand, Nemčija
Krovna stekla (18mmx18mm)	Brand, Nemčija
Predmetna stekla	Assistent, Nemčija

Preglednica 6: Uporabljene naprave za testiranje adhezije bakterij

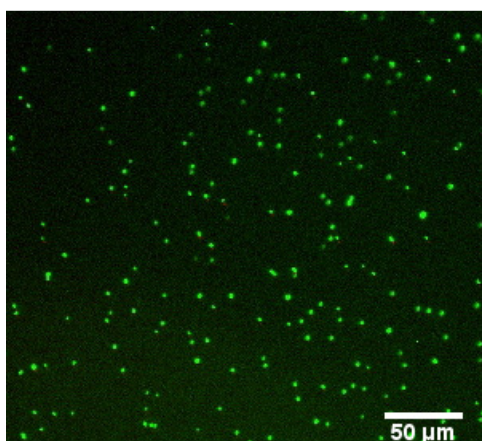
Reagent	Proizvajalec
Hladilnik	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalna skrinja	Gorenje, Slovenia
Mikroskop	Zeiss Axio Observer Z1
Vortex IKA MS3 digital	IKA works, Nemčija
Centrifuga 5424	Eppendorf, Nemčija
Fotometer MA9510	Metrel, Slovenija
Rotamix 550 MMH	Tehtnica, Slovenija
Rotamix SHP-10	Tehtnica, Slovenija
pH 720	Inolab Mikropolo, Slovenija
Tehtnica vibra	Tehtnica, Slovenija
XA 105 Dualrange	Mettler Toledo, Slovenija

3.3.2 Gojišča, pufri in kemikalije

- PBS (Fosfatni pufer iz angl. phosphate-buffered saline) pufer:
Zatehtali smo 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,81 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ter 0,24 g KH_2PO_4 . Vsako sestavino smo posamezno dodali v 800ml vode, dokler se sestavina ni raztopila. Nato smo dolili vodo do 1000 ml. Z uporabo HCl smo umerili pH pufru na 7,4. Pufer smo avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo pufer hranili v steklenici pri 20-25 °C.
Za spiranje diskov po inkubaciji z bakterijami smo PBS prefiltrirali skozi filter s porami 0,22 µm.
- LB agar z Kn (50 µg/ml):
Zatehtali smo 35g LB agarja na 1 liter demineralizirane vode. Gojišče smo raztopili in avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo gojišče ohladili na temperaturo za razlivanje (45 °C). Nato smo dodali 1 ml (50 mg/ml) kanamicin sulfata. Gojišče smo razlili v petrijevke. Po strditvi agarja smo gojišče porabili za testiranja ali pa hranili pri 4°C.
- LB bujon z kanamicinom (50 µg/ml):
20 g dehidriranega pripravka smo raztopili v 1 L vode. Gojišče smo nalili v potrebno steklovino in dali avtoklavirati. Pred uporabo smo gojišči dodali 25 µl (50 mg/ml) kanamicin sulfata na 25 ml.

3.3.3 Testni mikroorganizmi

Za testiranje adhezije smo uporabili sev *E. coli* MG 1655, DE3 (gfp-*E. coli*). Gen za izražanje Gfp proteina je na plazmidu za kanamicinsko rezistenco. Bakterije smo vzdrževali na LB agarju s kanamicinom (50 µg/ml). Sev z zmožnostjo izražanja Gfp proteina smo uporabili zaradi lažjega opazovanja bakterij pritrjenih na opazovano površino, saj je bilo barvanje bakterij oteženo zaradi vezave nekaterih barvil na površino opazovanih diskov.



Slika 3: *Escherichia coli* MG 1655, DE3 (gfp-*E. coli*) pod 10x povečavo, ob uporabi fluorescentne mikroskopije in GFP (38 HE, Zeiss) filtra na površini titanovega diska.

3.3.4 Testne površine

- Titanovi diski (NT): Titanovi diski so bili narejeni čistega titana (cp Ti stopnja 2, ASTM F67, Pro-Titanium, Kitajska). Diski so bili narezani krožno s premerom 15 mm in debelino 2 mm.
- Hidrotermalno tretirani titanovi diski (HT): Površina titanovih diskov (NT) je bila modificirana s hidrotermalnim tretmajem, da so na površini nastali TiO₂-anatazni sloji. (Lorenzetti in sod., 2015)
- Steklene ploščice (S): Steklo je bilo narezano iz predmetnih stekel (Deltalab, Španija) do kvadratnih ploščic z velikostjo roba 10 mm.
- Jeklene ploščice (J): Nerjaveče Jeklo (ThyssenKrupp, Nemčija) je bilo narezano na kvadratne ploščice velikostjo roba 10 mm in debelino 1 mm.
- Diski iz pleksi stekla (polimetilmetakrilat - PMMA) (P): Pleksi steklo (Pleksiglass GS, Interlux Röhm), je bilo narezano na kvadratne ploščice velikostjo roba 10 mm in debelino 5 mm.

3.3.5 Čiščenje in obdelava diskov

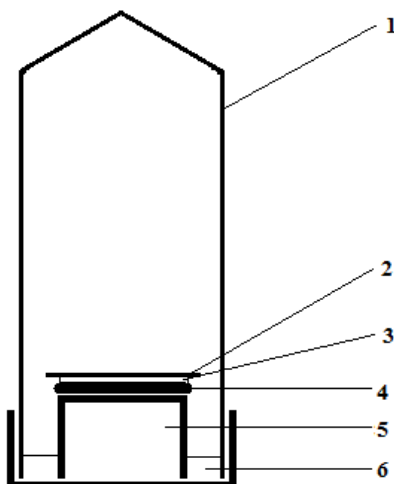
Pred uporabo smo diske očistili z etanolom in prečiščeno vodo. V primeru diskov obdelanih s plazmo so bili diski za potrebe čiščenja obdelani s plazmo in jih pred uporabo nismo dodatno čistili.

Diske so obdelali s plazmo na IJS (Odsek za tehnologijo površin in optoelektroniko). Uporabili smo dva programa plazme. Vzorce smo vstavili v razelektritveno komoro plazemskega reaktorja. Pri krajšem načinu plazemske obdelave smo uporabili radiofrekvenčni plazemski reaktor, ki deluje pri frekvenci 13,56 MHz in moči 200 W. Za generiranje plazme smo uporabili kisik, vzorci so bili obdelani 60 s pri tlaku 75 Pa. V primeru uporabe daljšega načina plazemske obdelave in za namen odstranjevanja organskih nečistoč s površine pa smo uporabili večji plazemski reaktor, ki deluje pri frekvenci 13,56 MHz in moči 500 W. V tem primeru smo za generiranje plazme prav tako uporabili kisik in vzorce obdelali 1h pri tlaku 75 Pa.

3.3.6 Postopek testiranja adhezije na titanovih diskih

1. Bakterije smo gojili na petrijevih ploščah z LB agarjem s kanamicinom (50 μ g/ml).
2. Iz plošče smo precepili približno eno kolonijo bakterij v 25 ml LB bujona z kanamicinom (50 μ g/ml). Sledila je prekonočna inkubacija pri temperaturi 37 °C in stresanje pri 200 rpm.
3. 0,5 ml prekonočne kulture smo nacepili v 25 ml svežega LB bujona s kanamicinom. Kulturo smo dali na inkubacijo pri 37 °C in 200 rpm.
4. Ko je bila optična gostota kulture okoli OD₆₅₀=0,7 smo gojišču dodali IPTG (125 μ l 100 mM IPTG/ 25 ml LBKn). Inkubacijo smo nato nadaljevali za 1 uro.
5. 1ml tako pripravljene kulture smo odpipetirali v mikrocetrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 7000 rpm.
6. Odstranili smo supernatant in bakterije resuspendirali v 1:500 v PBS redčenem LB.
7. Koncentracijo tako pripravljene suspenzije smo preverili z mikroskopiranjem.
8. Suspenzijo smo po potrebi redčili do približno 2*10⁸ bakterij/ml v 1:500 LB.
9. Pripravili smo suspenzijo bakterij, kateri smo v razmerju 1:1 dodali 500-krat redčen propidijev jodid (B dye, Live/Dead BacLight bacterial viability kit)
10. 10 μ l tako pripravljene suspenzije smo nanegli na titanov disk. V primeru stekla, pleksi stekla in jekla smo na ploščico nanegli 8 μ l bakterijske suspenzije. Preko kapljice smo dali krovno steklo. Disk smo namestili na pokrovček 15 ml centrifugirke. Pokrovček je bil nameščen v pokrovček 50 ml centrifugirke. V rob večjega pokrova smo dodali tudi 0,5 ml prečiščene vode, za ohranjanje ustrezne vlažnosti. Vse skupaj smo nato prekrili z okoli obrjeno 50 ml centrifugirko (Slika 4). Sistem smo zaprli in dali za 1 uro na inkubacijo pri 37°C.
11. Po inkubaciji so bili diski sprani z vorteksiranjem pri 1000 rpm za 1 minuto.

12. Sprani diski so bili s hrbtno stranjo s pomočjo laka pritrjeni na predmetno steklo, gornja stran pa je bila prekrita s krovnim steklom ki smo ga pritrdili z voskom.
13. Pripravljene preparate smo analizirali s pomočjo invertnega mikroskopa, pri različnih filterih. Uporabljali smo tako fluorescenco kot tudi svetlobno mikroskopijo. V povprečju smo zajeli 11,5 mm² površine diska na sliko.
14. Pridobljene slike smo analizirali s pomočjo programa ImageJ.



Slika 4: Sistem za preučevanje adhezije bakterij na površino diskov (1- 50 ml centrifugirka, 2-krovno steklo, 3-suspenzija bakterij, 4-testirani disk, 5-pokrovček 15 ml centrifugirke, 6-sterilna demineralizirana voda).

3.3.7 Postopek testiranja adhezije na steklu, pleksi steklu in jeklu

Postopek je enak gornjemu postopku za adhezijo bakterij na titanovih diskih, samo da smo na diske nanесли 8 µl suspenzije bakterije/propidijev jodid, ker je bila površina teh diskov manjša.

3.3.8 Mikroskopiranje in analiza slik

Slike površin smo naredili s pomočjo Zeiss Axio Observer Z1 invertnim mikroskopom z AxioCam MRm kamero. Slike smo posneli pod 10x povečavo pod filteri 38HE (Gfp) in 43HE (Red). Bakterije pod gfp filtrom so predstavljale žive celice, celice obarvane s propidijevim jodidom (rdeče) so predstavljale mrtve celice. Slike smo zajeli s pomočjo funkcije Mosaic v programu AxioVision (Zeiss), ki zajame večje območje opazovane površine. Za preverjanje koncentracije suspenzije bakterij, ki smo jo nanесли na diske smo uporabili fazni kontrast. Slike smo analizirali s pomočjo programa Image J.

3.3.9 Delež pritrjenih bakterij

Izračunali smo delež pritrjenih bakterij za posamezen tip diska:

$$\frac{n \cdot 100 \%}{N \cdot \left(\frac{P_v}{P_d}\right) \cdot V} = n (\%) \quad \dots (9)$$

, kjer je n št. bakterij na disku, N št. bakterij v suspenziji, P_v velikost vidnega polja, P_d velikost diska, V nanešen volumen in n (%) delež pritrjenih bakterij.

3.3.1 Karakterizacija površin

Meritev kontaktnih kotov površin in XPS analiza so bile izvedene na Inštitutu Jožef Štefan na odseku za tehnologijo površin in optoelektroniko ter odseku za nanostrukturne materiale, ter na Fakulteti za strojništvo v Laboratoriju za tribologijo in površinsko nanotehnologijo. Kontaktni koti so bili pomerjeni z Theta Lite T101 optičnim tenziometrom (Attension Biolin, Finska). Hrapavost je bila zmerjena z optičnim 3D interferometrom (Contour GT, Bruker). XPS analiza je bila izvedena spektrometrom PHI (model TFA XPS). Premer analiznega mesta je bil okoli 0,4 mm. Za vzbujanje smo uporabili rentgenske žarke iz standardnega izvira Al K_α. Analizna globina je bila nekaj nm. Fotoelektrone smo analizirali z hemisferičnim analizatorjem, ki je bil pozicioniran pod kotom 45° glede na normalo na površino vzorca. Energijska ločljivost instrumenta je bila okoli 0,5 eV. Pregledni spekter površine smo posneli v energijskem območju 0-1100 eV, z energijo prehoda elektronov 187,85 eV. Iz preglednega spektra smo izračunali sestavo površine. Spekter smo prilagajali s programom MultiPak v 7.3.1 Physical Electornics.

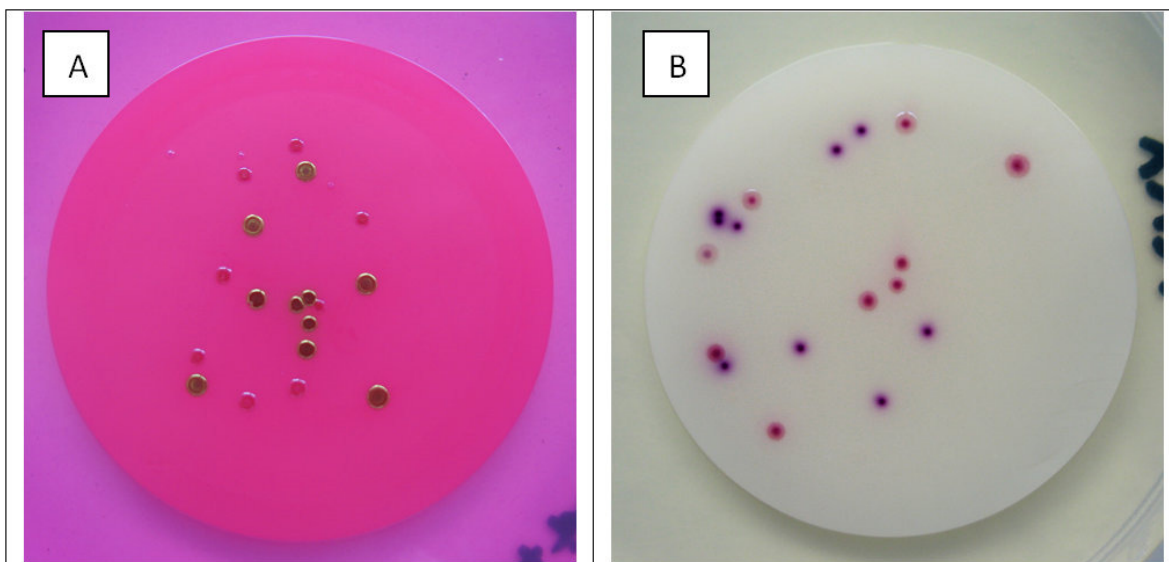
4 REZULTATI

4.1 PRIMERJAVA UPORABE CCA IN M-ENDO LES AGARJA

Med različnimi gojišči, ki so na voljo za dokazovanje koliformnih bakterij s pomočjo membranske filtracije smo se odločili, da preizkusimo kromogeni koliformni agar in mEndo LES agar.

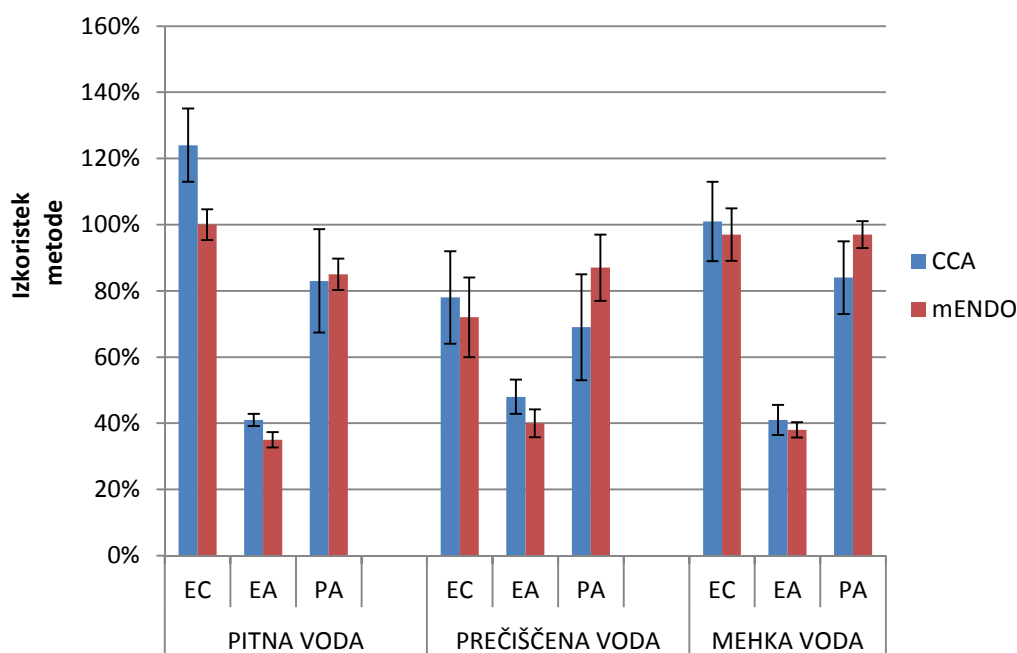
Morfologija kolonij:

Rast različnih mikroorganizmov na CCA in mEndo LES agarju je prikazana na sliki 5. Kolonije *E. coli* so v primeru uporabe mEndo LES agarja obarvane zeleno z zlatim sijem, na CCA pa so kolonije vijolično do modre barve. Kolonije *E. asburiae* so bile na mEndo agarju obarvane rdeče, na CCA pa temno roza barve z svetlejším robom. Kolonije *P. aeruginosa* pa so bile v obeh primerih obarvane belo. Razlikovanje med koliformnimi in nekoliformnimi bakterijami je bilo po 24-ih urah inkubacije možno na obeh gojiščih. V primeru naknadnega hranjenja plošč v hladilniku ali podaljšani inkubaciji, se kolonije *P. aeruginosa* na mEndo LES agarju obarvajo roza-vijolično, zato je razlikovanje med koliformnimi in nekoliformnimi kolonijami oteženo. Ker je občasno potrebno hraniti plošče do identifikacije v hladilniku je ustreznost rezultatov v primeru hranjenja v hladilniku pomembna, zato je uporaba CCA agarja primernejša.



Slika 5: Izgled kolonij na nitroceluloznem filtru (velikost por 45µm, velikost filtra 47mm) *E. coli*, *E. asburiae* in *P. aeruginosa* na gojišču mEndo LES (A) in CCA (B) po 24-ih urah inkubacije pri 35-37 °C.

Za obe gojišči smo določili izkoristek kolonij glede na teoretično vrednost kontaminacije za prečiščeno, pitno in mehko vodo. S tem smo želeli preveriti morebitne interference uporabljene metode s komponentami v vzorcu vode. Rezultati za izkoristek obeh metod pri različnih uporabljenih mikroorganizmih so prikazani na sliki 6.



Slika 6: Primerjava izkoristka metode ob uporabi membranske filtracije v kombinaciji s CCA in mENDO agarjem (EC = *E. coli*, EA = *E. asburiae*, PA = *P. aeruginosa*).

Izkoristek metode je za obe metodi primerljiv. Nižji izkoristek opazimo pri *E. coli* v prečiščeni vodi pri obeh metodah. Nizke vrednosti izkoristka pri *E. asburiae* so posledica visoke teoretične vrednosti za pričakovano število kolonij. Ker smo ugotovili, da se je dejanska vrednost števila bakterij v suspenziji razlikovala od teoretične vrednosti, smo v nadaljevanju ob vsakem testiranju s kontrolami preverili število bakterij v suspenziji in ga upoštevali pri preračunu izkoristka.

Zaradi boljšega razlikovanja med koliformnimi in nekoliformnimi bakterijami, zmožnosti podaljšanja inkubacije in hranjenja plošč v hladilniku, varnosti in enostavnosti metode smo se odločili za uporabo CCA agarja.

4.2 VALIDACIJSKI PARAMETRI

Vsako testiranje CCA metode je bilo izvedeno v treh neodvisnih ponovitvah s tremi paralelkami, razen v primeru določevanja natančnosti, kjer je bilo 10 vzporednih meritev. Rezultati so podani s standardno napako, kjer so podani drugače je to posebej navedeno.

4.2.1 Točnost

Točnost metode smo določili tako, da smo redčili suspenzije bakterij do 75, 50, 25 in 10 % začetne vrednosti. Pripravili smo suspenzije bakterij *E. coli*, *E. asburiae* in *C. gilleni*. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali izplen metode.

Preglednica 7: Izplen metode (%) glede na redčitev suspenzije za preverjanje točnosti.

Mikroorganizem	Redčitev vzorca (%)				
	100	75	50	25	10
<i>E. coli</i>	100	101 ± 9	102 ± 10	100 ± 10	112 ± 6
<i>E. asburiae</i>	100	109 ± 10	109 ± 10	97 ± 5	104 ± 6
<i>C. gilleni</i>	100	106 ± 13	116 ± 2	106 ± 9	86 ± 26

Izplen metode je v povprečju za vse redčitve in mikroorganizme ustrezen. Ugotovimo pa, da v primeru ene ponovitve pri *C. gilleni* (priloga A3) pridemo pod 70%. To je lahko posledica napake pri redčitvah, kot tudi večjega odklona od povprečne vrednosti pri manjšem številu kolonij na ploščah.

4.2.2 Natančnost

Natančnost metode smo preverili za vzorce, kjer smo dodali bakterije tako, da je bilo na filtru med 10-100 kolonij, nato pa smo meritve ponovili še za vzorce kontaminirane z 10-krat redčeno suspenzijo. Standardni odklon je bil največji v primeru določanja *E. coli*. Relativni standardni odklon je bil v razponu od 6 do 15 % (Preglednica 9). V primeru 10-krat redčene kulture se je standardni odklon zmanjšal, medtem ko se je relativni standardni odklon povečal in je znašal med 21 in 28 % (glej prilogo).

Preglednica 8: Parametri natančnosti za vzorce okužene z neredčeno suspenzijo bakterij (SD = standardni odklon, RSD = relativni standardni odklon).

Ponovitev	<i>E. coli</i> (CFU/ml)	<i>E. asburiae</i> (CFU/ml)	<i>C. gillenii</i> (CFU/ml)
1	50	58	75
2	43	60	70
3	47	62	72
4	55	70	68
5	51	65	65
6	69	74	73
7	58	75	75
8	50	62	80
9	62	64	66
10	44	68	72
Povprečje	52,9	65,8	71,6
SD	8,2	5,8	4,6
RSD(%)	15,50	8,80	6,36

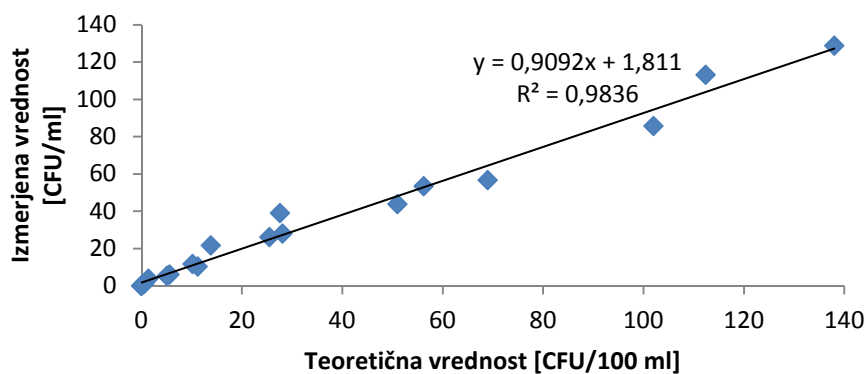
4.2.3 Linearnost

Za preverjanje linearnosti metode smo testirali različne koncentracije mikroorganizmov. Določili smo naslednje parametre linearnosti: koeficient korelacije (R^2), naklon regresijske krivulje (m) in odsek na y osi (b).

Preglednica 9: Parametri linearnosti za posamezen mikroorganizem.

Mikroorganizem	R^2	m	b
<i>E. coli</i>	0,9836	0,9092	1,811
<i>E. asburiae</i>	0,9935	0,9622	2,0869
<i>C. gillenii</i>	0,9332	0,7910	1,7554

Koeficient korelacije je bil v vseh primerih nad 0.93, kar kaže na linearnost znotraj opazovanega območja. Na sliki 7 je prikazana linearna regresijska krivulja za meritve *E. coli*.



Slika 7 Linearna regresijska krivulja za meritve *E.coli* s CCA metodo

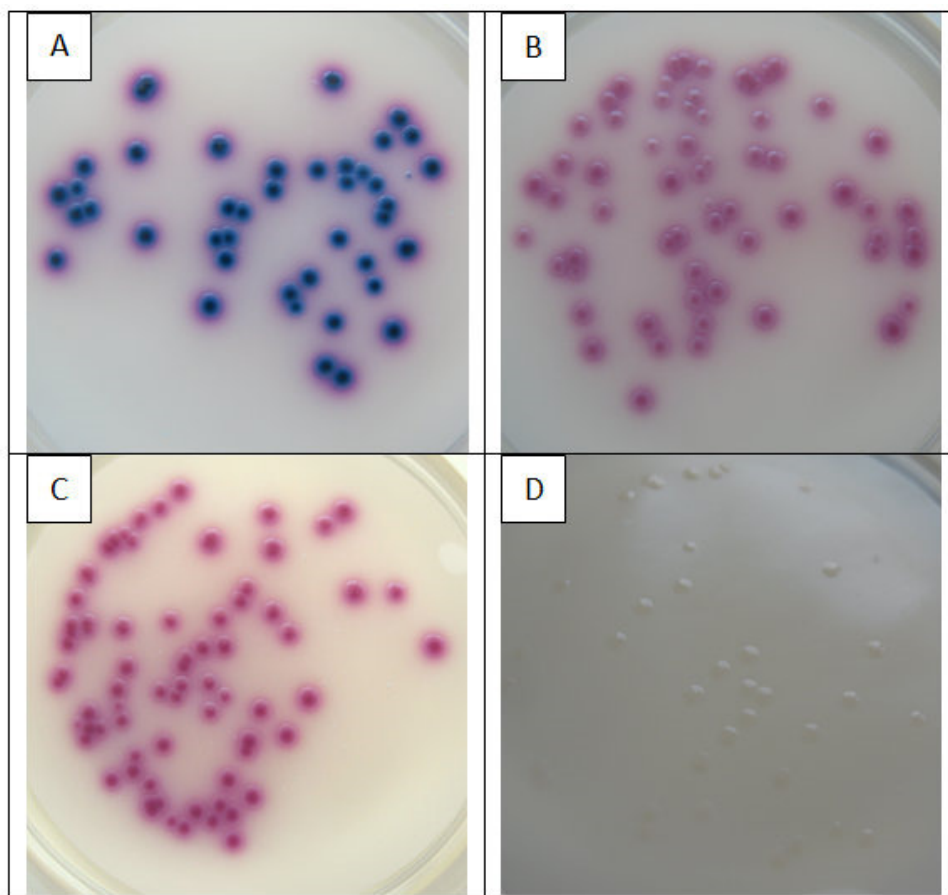
4.2.4 Meja detekcije in kvantifikacije

Meja detekcije za metodo membranske filtracije je 1 CFU/100 ml. Ugotovili smo, da pri najnižji teoretični kontaminaciji vzorca z 1 CFU/100 ml še dobimo rast na filtru. Ob testiranju natančnosti in točnosti smo ugotovili, da tudi pri vrednostih pod 10 CFU/100 ml še dobimo natančen rezultat.

4.2.5 Specifičnost in selektivnost

Za določevanje selektivnosti metode smo testirali po tri predstavnike koliformnih bakterij (*E. coli*, *E. asburiae*, *C. gillanii*) in tri predstavnike nekoliformnih bakterij (*S. aureus*, *B. subtilis* in *P. aeruginosa*). Želeli smo preveriti ali se vse koliformne bakterije obarvajo roza do vijolično-modre barve in, ali pride do obarvanja in rasti nekoliformnih bakterij. V primeru *E. coli*, *E. asburiae* in *C. gillanii* je prišlo do tipične rasti bakterij na CCA (Slika 6). Kolonije so bile roza do temno vijolično obarvane. V primeru *S. aureus* in *B. subtilis* ni prišlo do rasti. Kolonije *P. aeruginosa* so bile obravane belo.

Testirali smo tudi mešanico zgoraj navedenih mikroorganizmov. Tako smo preverili ustreznost metode ob kontaminaciji z različnimi vrstami mikroorganizmov in ali lahko z metodo tudi v primeru mešanih kultur razlikujemo med koliformnimi in nekoliformnimi bakterijami. Vse roza do vijolično obarvane kolonije so bile identificirane kot koliformne. Vijolično do modre kolonije so bile identificirane kot *E. coli*. Bele kolonije so bile identificirane kot nekoliformne. Kolonije bakterij istega morfološkega tipa smo preverili s molekularno identifikacijo MicroSeqTM (Applied Biosystems).



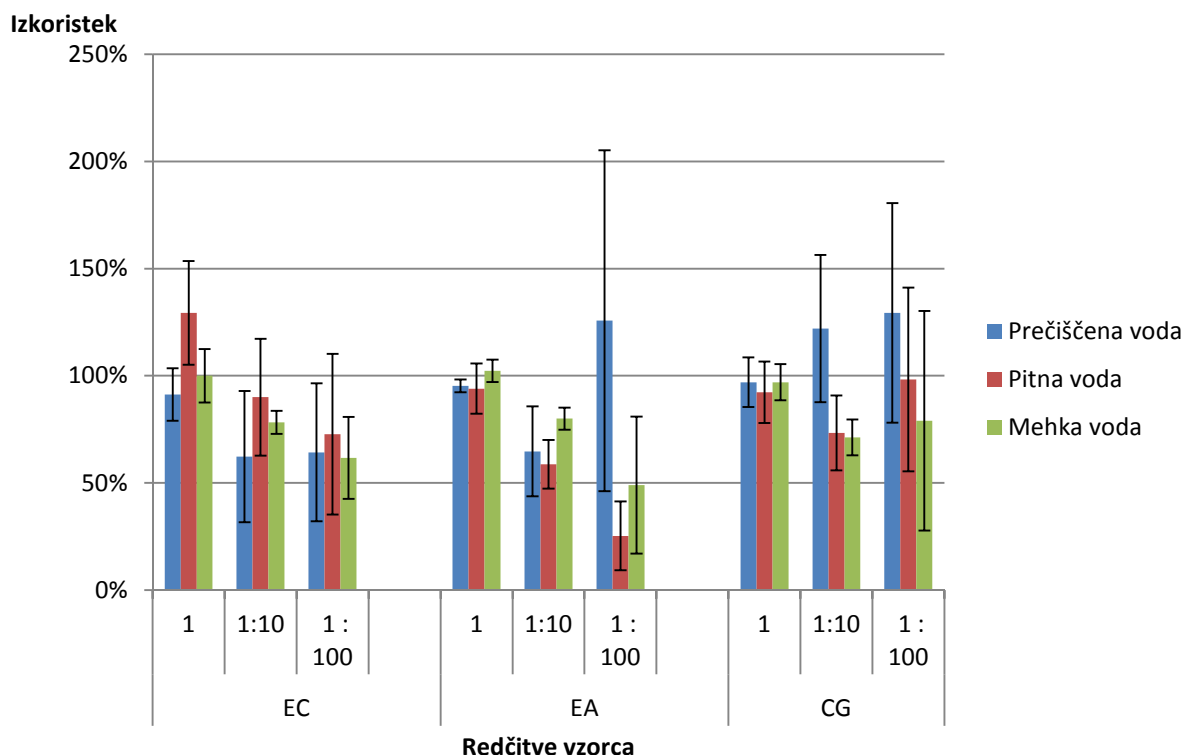
Slika 8: Izgled kolonij na filtru *E. coli* (A), *E. asburiae* (B), *C. gillenii* (C) in *P. aeruginosa* (D) na CCA agarju (Biolife, Italija) po 24-ih urah inkubacije pri 35-37 °C. Velikost filtra je 47 mm.

4.2.6 Analiza vzorcev v proizvodnem obratu

Analizirali smo 96 vzorcev vod različnih kakovosti, katere so imele zahtevo po odsotnosti koliformnih bakterij. Do rasti kolonij je prišlo na petih vzorcih. V 1 primeru je bila prisotna kolonija roza barve, v drugih pa kolonije bele ali bež barve. Kolonija roza barve je bila identificirana kot *Enterobacter sp.* (*Enterobacter cloacae*). Kolonije bež ali bele barve so bile identificirane kot *Herbaspirillum huttiense*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas sp.*

4.2.7 Vzoredno testiranje kontaminiranih vzorcev z MPN in membransko filtracijo z uporabo CCA

Izkoristek metode membranske filtracije z CCA ob preverjanju kontaminiranih vzorcev vod različnih kakovosti so predstavljeni na sliki 9.

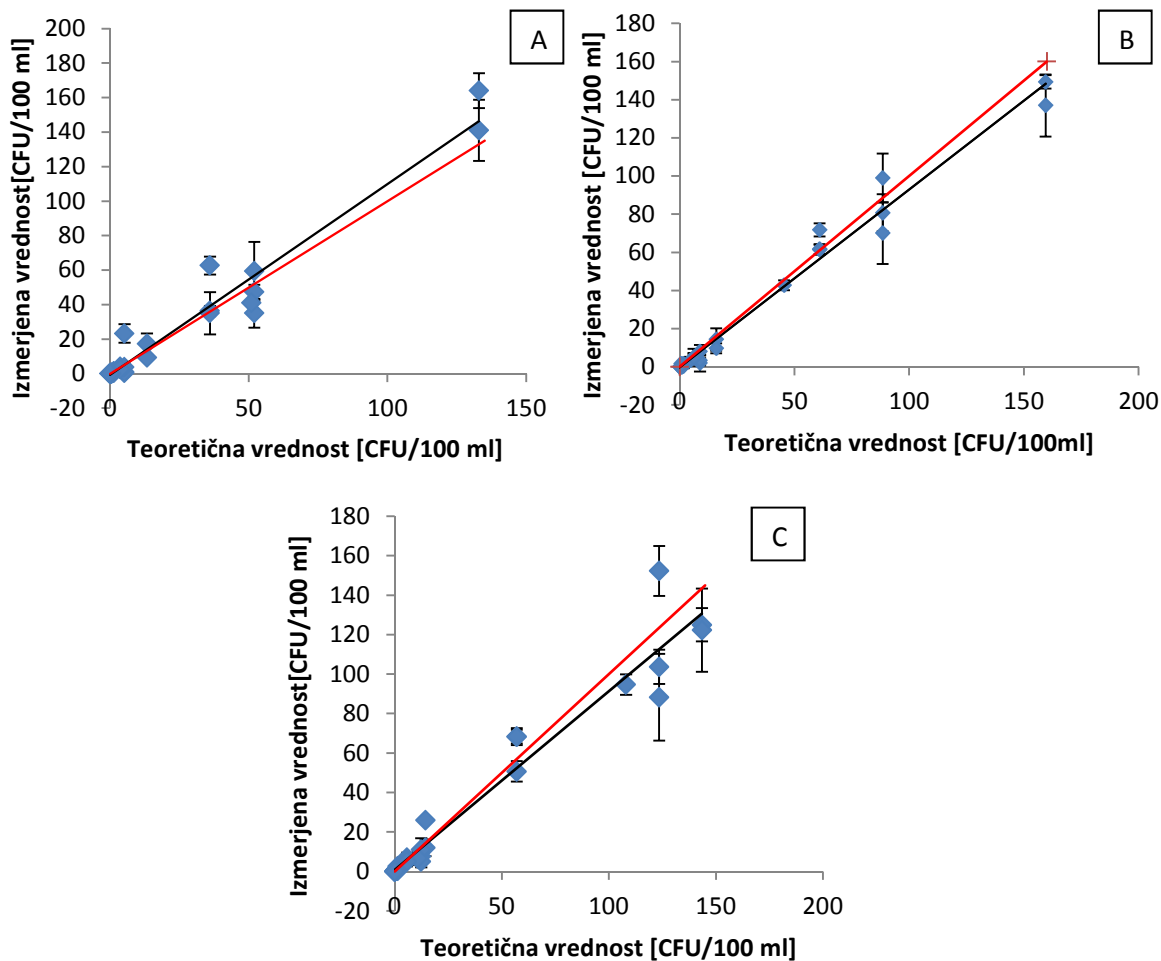


Slika 9: Izkoristek metode pri testiranju različnih kvalitete vod ob uporabi membranske filtracije s CCA metodo.

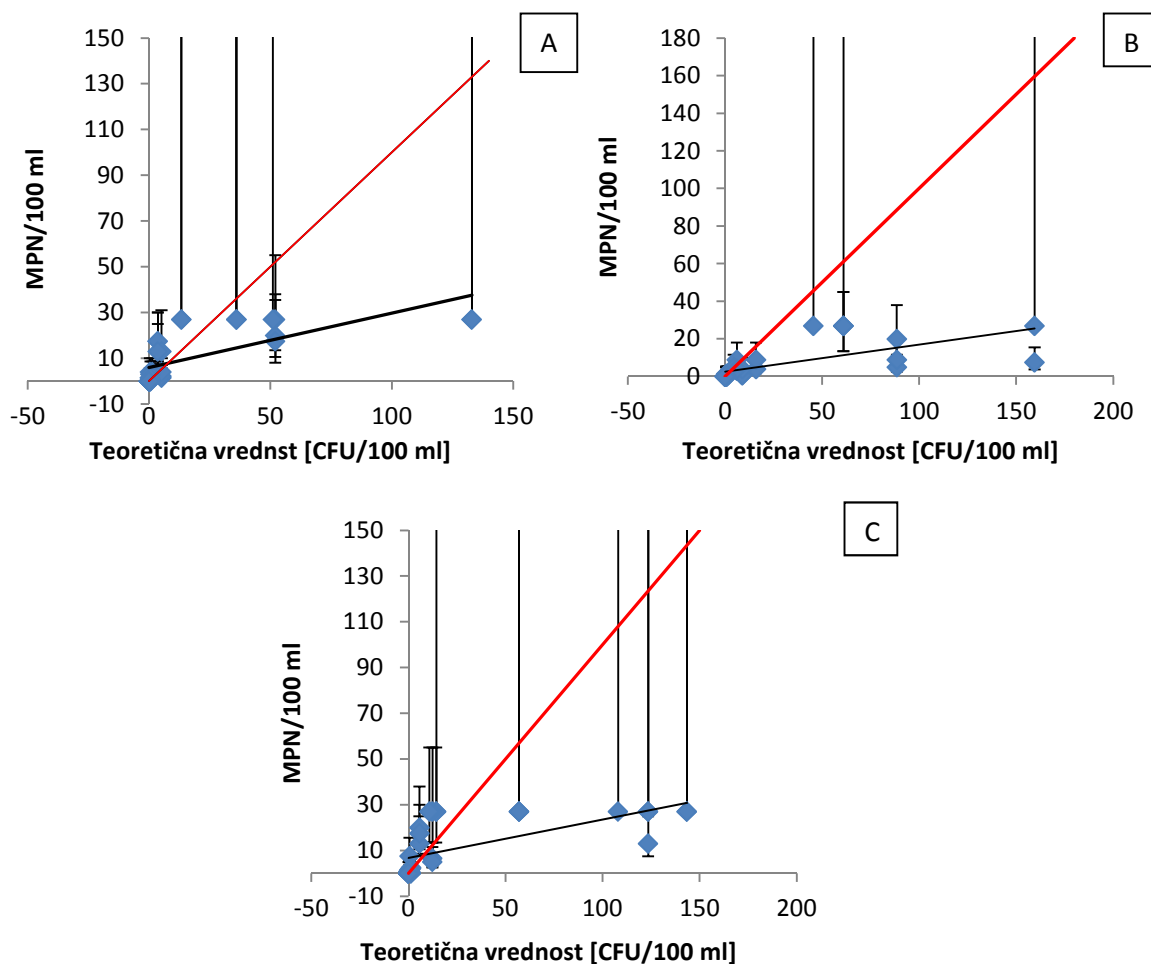
Izkoristek metode je za vse tri mikroorganizme in kvalitete vod v primeru neredčenih vzorcev znotraj 70-200 %. Pri redčenih vzorcih opazimo večjo napako meritev, ki se povečuje z vsakim redčenjem.

V nadaljevanju smo nato preverjali novo metodo in MPN. Rezultati za posamezno kakovost vode in metodo pri različnih redčitvah in metodah so predstavljeni v prilogi C. Na sliki 10 in 11 so predstavljena odstopanja MPN in CCA metode od pričakovane vrednosti $x = y$, kjer bi dobili 100 % izkoristek metode. Primerjava rezultatov pokaže, da smo s CCA metodo dobili visoko korelacijo s teoretično vrednostjo $R^2 > 0,95$. Naklon regresijske krivulje se v merilnem območju od idealne vrednosti razlikuje za manj kot 15 %. V primeru MPN metode vidimo zelo slabo korelacijo s teoretično vrednostjo. Ob upoštevanju 95 % intervala zaupanja za izmerjene podatke so sicer izmerjene vrednosti znotraj teoretičnih vrednosti, a to je zato, ker je eksperimentalna napaka velika in so posledično intervali zaupanja pri MPN metodi zelo široki. To nakazuje, da je metoda slabo

kvantitativna. Ne moremo določiti prave vrednosti ampak samo nek približek, ki pa lahko od prave vrednosti močno odstopa.



Slika 10: Prikaz rezultatov dobljenih z metodo membranske filtracije z CCA (vse kakovosti vod) za bakterijo *E. coli* (A), *E. asburiae* (B) in *C. gillienii* (C) v primerjavi s teoretično vrednostjo. Rdeča trendna črta prikazuje idealno vrednost $y = x$.



Slika 11: Prikaz rezultatov dobljenih z MPN metodo (vse kvalitete vod) za bakterijo *E.coli* (A), *E.asburiae* (B) in *C.gillenii* (C) v primerjavi s teoretično vrednostjo. Rdeča trendna črta prikazuje idealno vrednost $y = x$.

4.2.8 Robustnost metode

4.2.8.1 Uporaba gojišč različnih proizvajalcev

Da bi preverili ustreznost gojišča smo testirali tri različne serije gojišča CCA (Biolife, Italija). Rezultati so predstavljeni v preglednici 10. Rezultati kažejo, da so izkoristki metode za različne serije gojišča znotraj dovoljenega območja 70-200 %.

Preglednica 10: Izkoristek (%) CCA metode za določevanje števila bakterij ob uporabi pripravljenega gojišča v petrijevih ploščah proizvajalca Biolife za posamezen mikroorganizem.

Ponovitev	<i>E.coli</i>	<i>E.asburiae</i>	<i>C.gillenii</i>
1	102	94	107
2	89	100	72
3	91	95	99
Povprečje	94 ± 6	96 ± 24	93 ± 12

Uporabili smo tudi gojišče Cromocult coliform agar (Merck, Nemčija). Gojišče je bilo pripravljeno po navodilih proizvajalca, za vsako testiranje posebej. Rezultati so prikazani v preglednici 11 in so znotraj dovoljenega intervala 70-200 %.

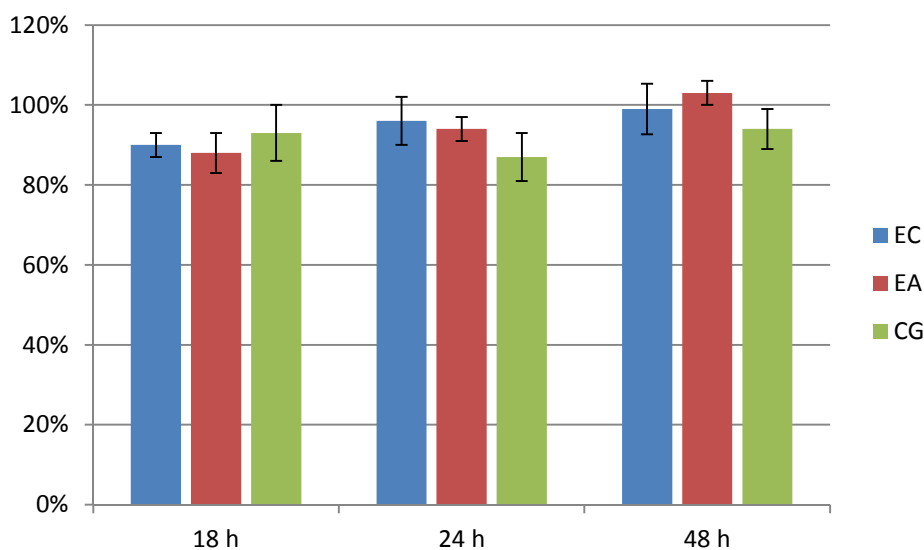
Preglednica 11: Izkoristek števila bakterij ob uporabi Cromocult coliform agarja proizvajalca Merck za posamezen mikroorganizem

Ponovitev	<i>E.coli</i>	<i>E.asburiae</i>	<i>C.gillenii</i>
1	117	141	111
2	87	91	107
3	96	97	103
Povprečje	100 ± 10	110 ± 24	111 ± 2

Obe gojišči izpolnjujeta kriterij za primernost uporabe v analizi.

4.2.8.2 Vpliv časa inkubacije na rezultate testa

Preverili smo ali je izkoristek metode ustrezen tudi če čas inkubacije skrajšamo (18 ur) ali podaljšamo (48 ur) glede na priporočen čas inkubacije (24 ur). Rezultati so prikazani na sliki 12.

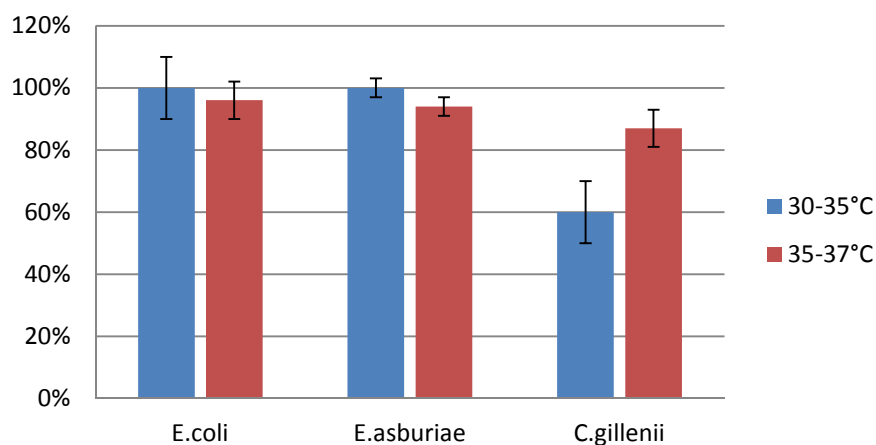


Slika 12: Izkoristek CCA metode ob različnih časih inkubacije (EC = *E. coli*, EA = *E. asburiae*, CG = *C. gillanii*), pri temperaturi inkubacije 30-35 °C.

Izkoristek metode je za vse tri čase inkubacije znotraj dovoljenega intervala 70-200 %. V našem primeru nismo opazili bistvenih razlik v izkoristku metode znotraj časovnega intervala inkubacije 18-48 ur. Ob podaljševanju inkubacije je bila intenzivnost barve in velikost kolonij večja.

4.2.8.3 Vpliv temperature inkubacije na rezultate testa

Rezultati so prikazani na sliki 13. Izkoristek metode za *E.coli* in *E.asburie* je znotraj dovoljenega intervala 70-200 %. Pri *E. coli* in *E. asburiae* ni značilnih razlik med višjo in nižjo temperaturo inkubacije. Izkoristek pri *C. gillanii* je nižji od ostalih bakterij, kjer pride tudi do značilnih razlik med nižjo in višjo temperaturo.



Slika 13 Vpliv temperature inkubacije na izkoristek CCA metode

4.3 VPLIV MATERIALOV NA ADHEZIJO BAKTERIJE *E.coli*

Na točnost določanja števila koliformov v vodnem sistemu vpliva tudi vezava bakterij na površine, ki so v stiku z vodo. Zaradi vezave se število bakterij v vodnem stolpcu zmanjša. Vezava bakterij na površino omogoča nastanek biofilma, ki lahko povzroča resne težave v proizvodnem obratu. Zaradi tega smo v nadaljevanju preverili, kako se *E. coli* veže na različne površine.

4.3.1 Delež pritrjenih bakterij

Delež pritrjenih bakterij smo izračunali po formuli (9). Uporabili smo različne materiale: hidrotermalno tretirane titanove diske (HT), titanove diske brez hidrotermalne obdelave (NT), titanove diske obdelane s kratkim programom plazme (PLK), titanove diske obdelane z dolгим programom plazme (PLD), jeklo (J), steklo (S), pleksi steklo (P). Vsak tip diska smo testirali vsaj v dveh neodvisnih ponovitvah z najmanj dvema paralelkama.

4.3.2 Vpliv obdelave diskov s plazmo na delež pritrjenih bakterij

Ker se površina materialov s časom zamaže smo površine titanovih diskov pred vezavo bakterij obdelali s plazmo. Na ta način smo želeli povečati ponovljivost rezultatov vezave bakterij na različne površine. Uporabili smo dva različna postopka obdelave s plazmo: krajši postopek (60 s, 75 Pa, 200 W, kisik) in daljši postopek (1 h, 75 Pa, 500 W, kisik). Rezultati XPS analize kemijske sestave površine po delovanju plazme so prikazani v preglednici 13. Iz rezultatov je razvidno, da se po delovanju plazme zmanjša delež ogljika, poveča pa se delež kisika. Ogljik je kontaminat, ki se veže na površino iz zraka. Delež titana se po delovanju krajše plazme poveča, po delovanju daljše plazme pa zmanjša in ga v primeru HT vzorca nismo zaznali v površinskem mikrosloju debelem 3-5 nm. Zaradi delovanja plazme je prišlo tudi do spremembe deleža nekaterih drugih elementov. Rezultati kemijske analize kažejo, da se je po delovanju plazme kemijska sestava vrhnjega sloja površine znatno spremenila.

Preglednica 12: Rezultati XPS analize.

Delež elementa (%)	ogljik	kisik	titan	fosfor	dušik	silicij	kalcij
NT	67.1	25.1	4.2	1.3	0.8	0.5	1
NT PLK	34.4	49.1	12.1	1.3	/	2.0	1.2
NT PLD	17.4	59.8	7.4	/	/	15.3	/
HT	47.5	41.2	10.1	/	/	/	1.1
HT PLK	26.6	52.8	19.1	/	/	/	1.5
HT PLD	24.8	52.7	0	/	/	22.3	0.3

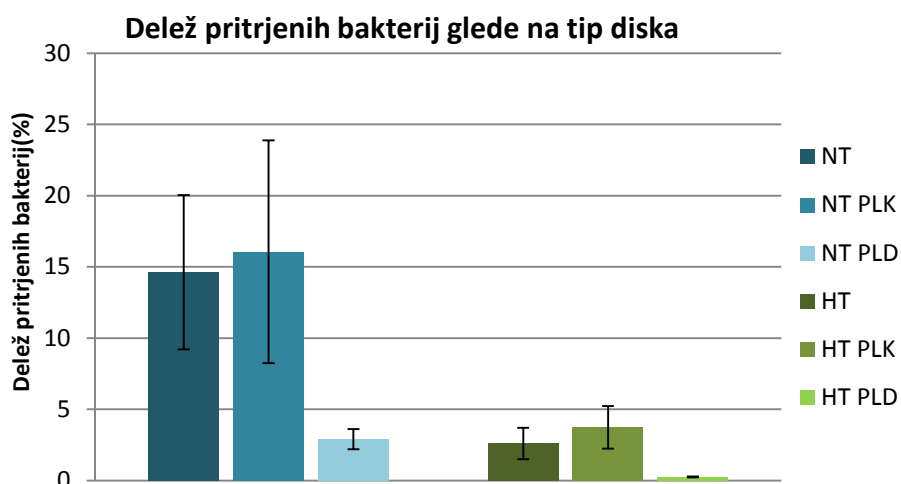
Preverili smo tudi kot omočitve pred in po delovanju plazme s krajšim postopkom. Rezultati so prikazani v preglednici 14. Neposredno po sintezi HT diskov je kot omočitve

$29 \pm 0,8^\circ$. Po obdelavi s plazmo je kot omočitve padel na 5° po enem dnevu je narasel na 48° in se je nato s časom staranja še nekoliko povečal. V primeru HT diskov, ki niso bili obdelani s plazmo se je pritrdilo $2,7 \pm 1 \%$ bakterij. Pri diskih obdelanih s plazmo je bil delež pritrjenih bakterij po preteklih štirih dneh od uporabe plazme $3,7 \pm 1 \%$. Dve uri po uporabi plazme, se je pritrdilo $2,3 \pm 1 \%$ vseh bakterij. Ker čas, ki je pretekel od obdelave s plazmo ni imel bistvenega vpliva na delež pritrjenih bakterij smo v naslednjih eksperimentih uporabili diske, ki so bili obdelani 1 dan pred testiranjem adhezije bakterij.

Preglednica 13: Koti omočitve za hidrotermalno odelane diske (HT diski) v odvisnosti od časa po obdelavi s plazmo.

Pretečen čas od plazme	Kot omočitve
Vzorec brez plazme	$67 \pm 2^\circ$
2 h	5°
1 dan	$48^\circ \pm 1^\circ$
3 dni	$60^\circ \pm 2^\circ$
5 dni	$56^\circ \pm 3^\circ$
7 dni	$60^\circ \pm 2^\circ$

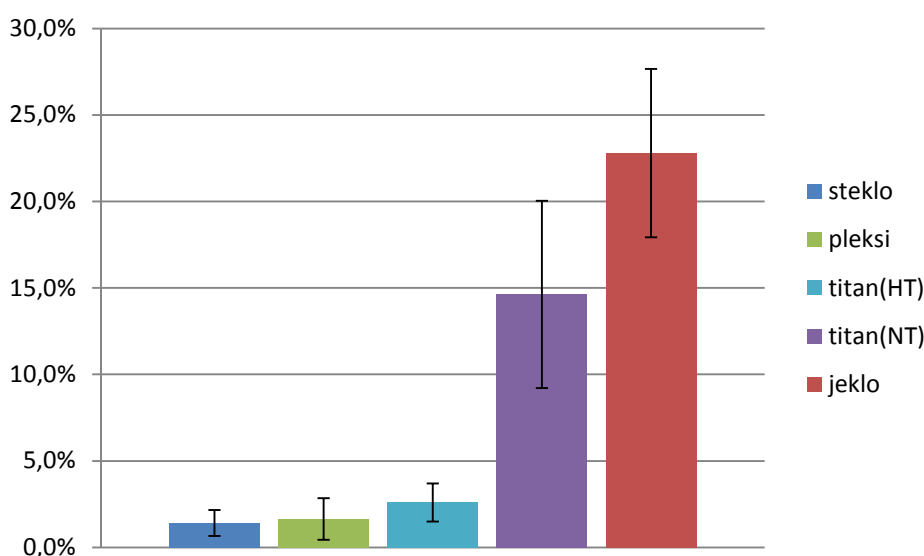
Vpliv dveh programov plazme na adhezijo smo preverili za hidrotermalno tretirane in netretirane diske (slika 14). Rezultati kažejo, da se delež pritrjenih bakterij na hidrotermalno neobdelane površine po obdelavi s kratkim programom plazme ni spremenil. Ob uporabi daljšega programa plazme se je delež pritrjenih bakterij zmanjšal. Hidrotermalna obdelava titanovih površin je zmanjšala število pritrjenih bakterij za ~ 5 x. Po dodatni obdelavi z dolgo plazmo pa se je število pritrjenih bakterij zmanjšalo še ~ 50 x (priloga F).



Slika 14 Delež pritrjenih bakterij glede na tip diska.

4.3.3 Adhezija bakterij na netitanove površine

Adhezijo bakterij smo preverili tudi na steklu, pleksi steklu in jeklu. Za veljavnost testa adhezije bakterij na površino smo uporabili pozitivne in negativne kontrole. Negativno kontrolo so predstavljali diski brez bakterij. Negativna kontrola je bila ustrezna, če na diskih kjer predhodno nismo zaznali oblik, katere bi lahko kasneje zamenjali za bakterije. Pred testiranjem jekla smo opazili nečistoče na površini diskov, ki so fluorescirale v rdečem spektru. Po čiščenju z etanolom in vodo te nečistoče niso več motile analize. Da bi preverili, koliko bakterij lahko zaznamo na disku, če diskov po inkubaciji bakterij ne spiramo smo analizirali slike diskov, ki jih predhodno nismo sprali. Delež zaznanih bakterij je znašal 94 ± 5 %. Deleži bakterij, ki so se pritrdili na različne površine so predstavljeni na sliki 15.

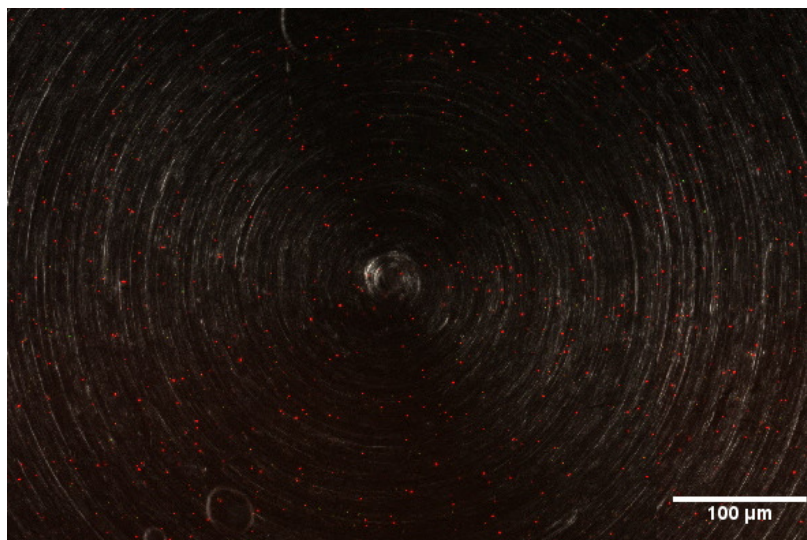


Slika 15: Delež pritrjenih bakterij glede na material.

Najmanj bakterij se je pritrdilo na steklo, pleksi steklo in hidrotermalno obdelane titanove površine. Kljub temu, da so si ti materiali po kemijskih karakteristikah različni je delež pritrjenih bakterij primerljiv in se znatno razlikuje od netretiranega titana in jekla.

4.3.4 Površina diskov

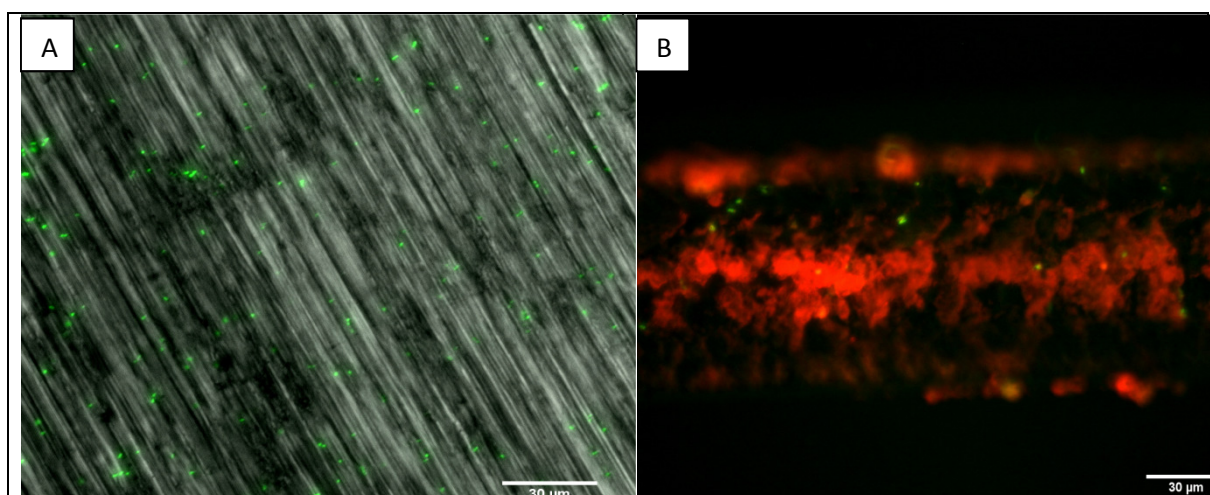
Ker na adhezijo bakterij vpliva hrapavost površine smo v nadaljevanju preverili vpliv hrapavosti na pritrjevanje. Hrapavost površin je bila različna. Steklo in pleksi steklo sta imela gladki površini, pri jeklu pa smo pri mikroskopiranju opazili nepravilnosti na površini. Kot je prikazano na sliki 16 so bili pri titanovih diskih opazni koncentrični krogi, ki so posledica mehanske obdelave površine titanovih diskov.



Slika 16 Površina titanovega diska z bakterijami

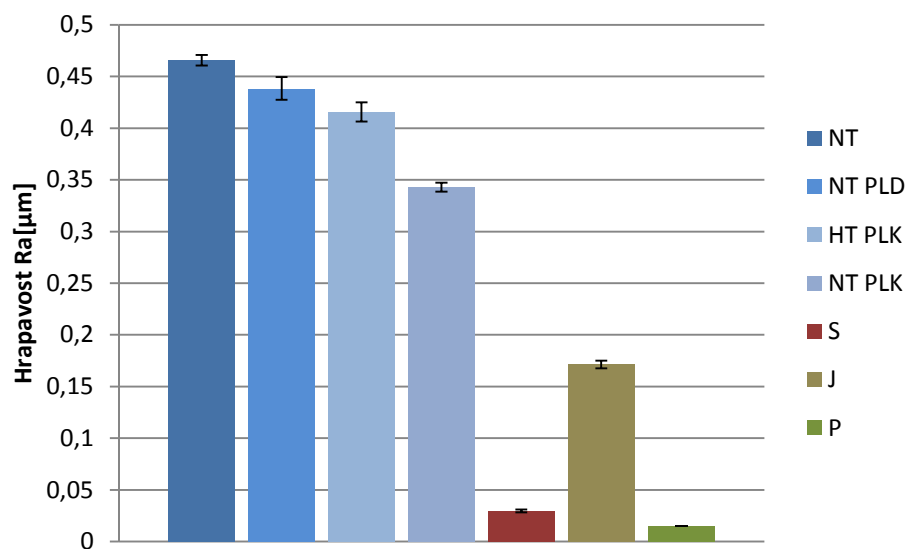
S pomočjo svetlobne mikroskopije smo lahko določili makrostrukturo teh kanalov. S fluorescenco pa smo določevali lego pritrjenih bakterij. Na sliki so z rdečo prikazane mrtve bakterije (propidijev jodid), zeleno so obravane žive bakterije (Gfp). Razmerje med živimi in mrtvimi bakterijami se je od testa do testa razlikovalo. Pritrjene bakterije so sledile površinskim nepravilnostim (slika 17). Večina bakterij je bila vezanih v mikrokanalih na površini. Ugotovili smo, da je delež pritrjenih bakterij na materialih, ki imajo nepravilnosti na površini (titan, jeklo) višji v primerjavi z glatkimi materiali (steklo).

Pri testiranju površin moramo biti pozorni, da le te ne spremenimo, saj lahko z nanosom kakršnih koli umazanij ali poškodbo površine spremenimo njihovo lastnost do te mere, da je adhezija bakterij različna od prvotne površine. Slika 17 prikazuje površino pleksi stekla, kjer smo umetno vrezali kanale na površino. Večina bakterij se je ujela v novo nastali prostor. Bakterije v umetno narejenem kanalu nismo uspeli odstraniti tudi če smo disk dodatno spirali pod ostrejšimi pogoji spiranja.



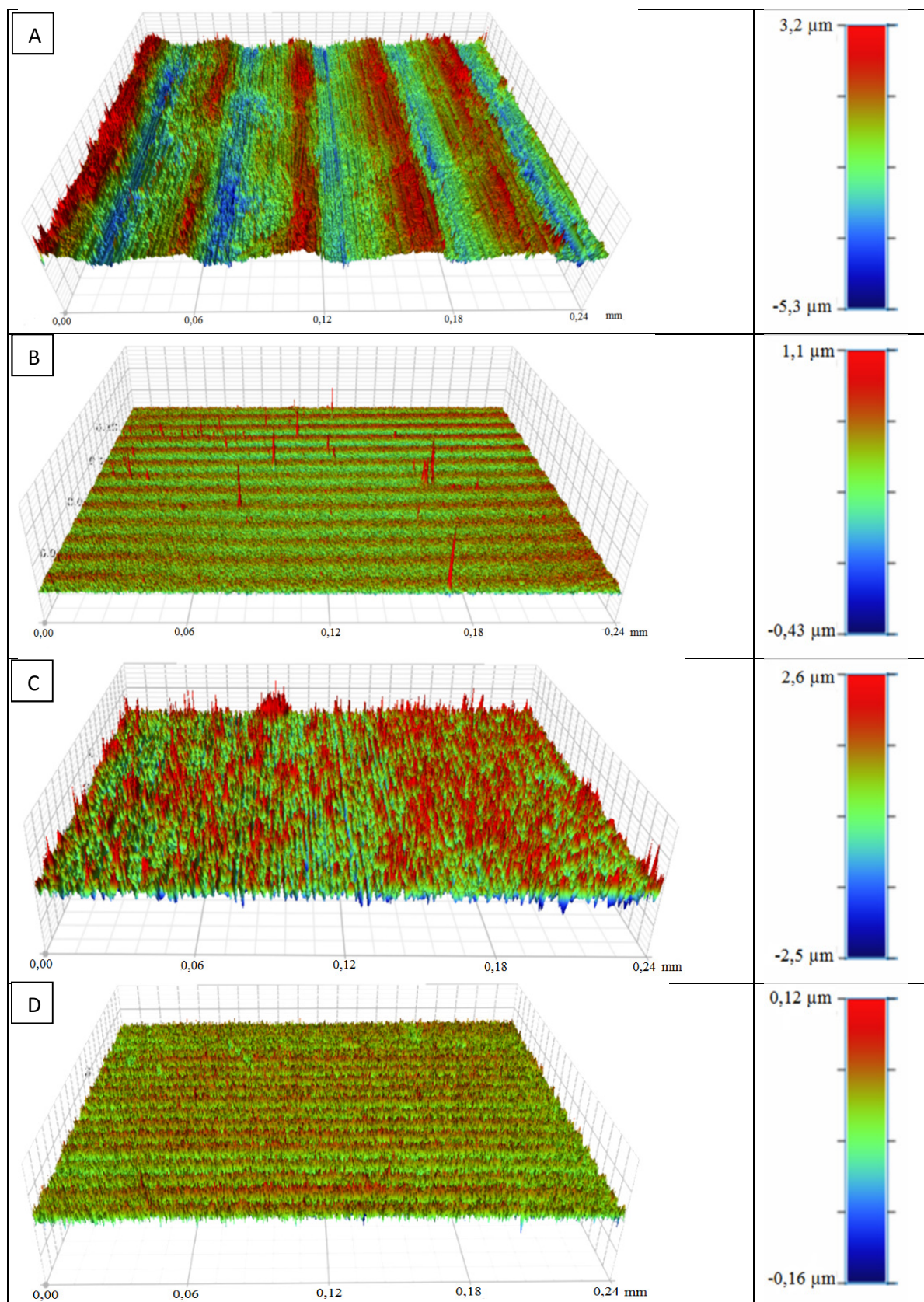
Slika 17: Bakterije na površini diskov: A- bakterije (zeleno) pritrjene na disk iz titana, B-bakterije(zeleno) v umetno narejenih zarezah na pleksi steklu.

Da bi bolj natančno določili hrapavost površine smo določili različne parametre hrapavosti izbranih površin. Hrapavost v vzdolžnih vdolbinah titanovih diskov je bila v povprečju enaka in je znašala $0,099 \pm 0,0032 \mu\text{m}$. Razlike v hrapavosti med različnimi materiali v prečni smeri je prikazana na sliki 18. Razlike v hrapavost med različnimi materiali so bile velike. Najmanj hrapave površine so bile na steklu in pleksi steklu. Topografija različnih površin je prikazana na sliki 19.



Slika 18 Hrapavost površine različnih materialov

Hrapavost netretiranih titanovih površin je bila največja in je korelirala z deležem vezanih bakterij. Vendar pa v primeru titanovih diskov ne moremo trditi, da zgolj hrapavost in topografija površine vpliva na različne deleže pritrjenih bakterij, saj so se pri hidrotermalnem tretiranju diskov in obdelavi s plazmo spremenile tudi kemijske značilnosti površine. Temu pritruje tudi vezava bakterij, ki je bila največja na jeklu, kljub temu, da površina ni bila najbolj hrapava.



Slika 19: Topografija površin: A-titanovi diski (NT), B-steklo, C-jeklo, D-pleksi steklo

5 DISKUSIJA

5.1 PREIZKUŠANJE IN VALIDACIJA METODE ZA DOKAZOVANJE KOLIFORMNIH BAKTERIJ

Za dokazovanje koliformnih bakterij v vzorcih vode imamo na razpolago veliko metod. V okviru magistrskega dela smo želeli izbrati in validirati metodo, s katero bi nadomestili trenutno uveljavljeno MPN metodo v kombinaciji z DEV laktonskim peptonskim bujonom z indikatorjem bromkrezol vijolično. Med različnimi metodami, ki so na voljo za dokazovanje koliformnih bakterij smo se odločili za metodo membranske filtracije. Pribor potreben za izvedbo analize je v laboratoriju že prisoten (filtracijske enote, filtri itd.), večina izvajalcev analiz je seznanjena z metodo membranske filtracije in jo lahko zato po potrebi izvaja več tehnikov. Za molekularne metode se nismo odločili zaradi potrebe po dražji opremi in bolj izobraženemu izvajalcu analiz, poleg tega molekularne metode za dokazovanje koliformnih bakterij še niso široko preizkušene. V Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano smo si ogledali tudi metodo Colilert 18, ki je različica MPN metode. Za izvedbo metode je potreben dodaten material in aparature, ki jih sedaj v laboratoriju ni, kar bi pomenilo dodaten strošek. Ker se analize izvajajo v komorah z laminarnim tokom je metoda nepraktična, saj bi material za nekaj vzorcev zavzel veliko prostora v komori. Tudi sama izvedba testa je zamudnejša od membranske filtracije. V primeru pojava rasti koliformov je tudi težje odvzeti mikroorganizem za nadaljno identifikacijo, ker je gojišče v plastičnih vrečkah in je potreben odvzem okuženega gojišča s sterilno iglo, pri čemer obstaja nevarnost kontaminacije vzorca.

Med gojišči, ki se uporabljajo v kombinaciji z membransko filtracijo smo se odločili, da preizkusimo kromogeni koliformni agar (CCA) in mEndo agar gojišče, pri katerem je potrebna vmesna inkubacija na LSB gojišču. Uporaba CCA ob membranski filtraciji je standardizirana po ISO 9308-1 (2014). mEndo agar pa je naveden pod standardnimi metodami za testiranje vod (Clesceri in sod., 1998). Rezultati so pokazali, da je ob uporabi CCA metode razlikovanje med koliformnimi in nekoliformnimi bakterijami ob različnih pogojih inkubacije boljše, priprava gojišča je varnejša in ni vmesnih obogatitvenim korakov. Iz teh razlogov smo se odločili za uporabo CCA metode.

Pri validaciji smo preverili točnost, natančnost, linearnost, mejo detekcije in selektivnost CCA metode. Rezultati kažejo, da je metoda v povprečju točna za testirane koncentracije vzorca. V enem primeru testiranja najnižje koncentracije *C. gilleni* smo dobili rezultat nižji od 70 %. V primeru manjšega števila kolonij se napaka zaradi teže posamezne kolonije in napake pri redčitvi poveča. Ker v praksi redčenje vzorca ne bo potrebno, sklepamo da metoda še vedno ustreza kriteriju. Rezultati natančnosti kažejo, da je relativna standardna napaka metode pod 30 %, kar je sprejemljiva vrednost za mikrobiološke metode. Opazili smo, da je bila standardna napaka pri vzorcih z nižjim številom kolonij višja. Ker je vrednost CFU porazdeljena po principu Poissonove porazdelitve je ocena napake enaka

kvadratnemu korenu povprečja. Zato se napaka ob padcu števila CFU pod mejo števnosti močno poveča (Sutton, 2011). V razponu med 0 in 180 CFU/100 ml se je metoda izkazala kot linearna z vrenostjo R^2 nad 0,90. Meja detekcije za membransko filtracijo je 1 CFU/100 ml, pri 5,5 CFU/100 ml smo dobili rezultat, ki še ustreza pogojem natančnosti. Določevanje meje kvantifikacije je tudi odvisno od načina določevanja in izračuna le-te, zato je lahko meja ob različnih pristopih različna. Z metodo CCA lahko razlikujemo med kolonijami koliformnih bakterij in kolonijami nekoliformnih bakterij. Metoda se je pokazala kot selektivna. V našem primeru ni prišlo do rasti nekoliformnih bakterij *S. aureus* in *B. subtilis*. Specifičnost metode smo preverili tudi na rednih vzorcih tehnološke vode. Tudi v tem primeru ni prišlo do pojava lažnih rezultatov. Pri preizkusu metode na naravno kontaminiranih vzorcih so drugi laboratoriji dokazali dobro občutljivost (94 % in 91 %) in specifičnost (97 % in 94 %) CCA metode. Delež lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov je bil nizek. Izkoristek metode je bil v vseh primerih višji od 70 %. Metoda je bila močno selektivna (Lange in sod., 2013). Metoda je dala primerljive rezultate v dveh gojiščih različnih proizvajalcev. Predpisano temperaturno območje metode je med 35-37 °C. V primeru inkubacije na 30-35 °C dobimo ustrezen izplen kolonij pri *E. coli* in *E. asburiae*. V *C. gillenii* pa je bil izkoristek pod 70 %, zato uporaba temperature nižje od predpisane ni priporočljiva.

Ob primerjavi rezultatov pridobljenih z metodama CCA in MPN, smo ugotovili, da se z metodo s CCA bolje približamo pravi vrednosti rezultata. Večjih interferenc ob uporabi različnih kvalitiet vod nismo dokazali za nobeno od metod. Izkoristek metode z uporabo CCA je bil pri neredčenih vzorcih nad 70 % in s tem v skladu z našim kriterijem. Ker v praksi redčenje vzorca ne bo potrebno, bo napaka metode veliko manjša. V primerjavi z obstoječo metodo je metoda membranske filtracije s CCA hitrejša saj omogoča odčitavanje rezultatov po 24-urah, dokazali smo, da je tudi po 18-ih urah izplen metode ustrezen. Po končani inkubaciji grejo roza do vijolično, modro obarvane kolonije v identifikacijo in je s tem analiza končana. Pri MPN metodi pa je potrebno iz sumljivih epruvet precepiti kulturo na MacConkey agar s čimer se analiza podaljša za dodaten dan. Ker je manj korakov to pomeni tudi manj dela za tehnika. Potrebno je tudi manj steklovine in manj dela s pripravo epruvet s cevkami. V primeru potrebe po daljši inkubaciji je izplen metode ustrezen tudi, če čas inkubacije podaljšamo na 48 ur. V našem primeru ni prišlo do bistvenih razlik med različnimi časi inkubacije. Iz dobljenih rezultatov izhaja, da je metoda ustrezna za dokazovanje koliformnih bakterij, je bolj točna od obstoječe metode, ustreza postavljenim kriterijem ter je časovno bolj ugodna.

4.3 VPLIV POVRŠINE NA ADHEZIJO BAKTERIJ

Potrebno se je zavedati, da z obstoječimi metodami za dokazovanje vsebnosti mikroorganizmov v vodah dokazujemo mikroorganizme, ki so v vodi prosto prisotni. Del bakterij se lahko pritrdi tudi na površino cevi ali aparatov, kjer lahko ob primernih pogojih

tvorijo biofilm. Adhezija bakterij na površino je odvisna od materiala s katerim pridejo v stik.

Adhezijo bakterij smo proučevali na različne površine kot so titan, jeklo, steklo in pleksi steklo. Titan in titanove zlitine se uporabljajo za ortopedske implantate (Geetha in sod. 2009). TiO_2 bi lahko uporabili tudi kot primarni dezinfekcijski sistem za vodo. Z uporabo fotokatalize lahko povzročimo smrt ali poškodbe bakterij. Ugotovili so, da lahko po 60 minutni radiaciji pride do inaktivacije več kot 90 % koliformnih bakterij (Rizzo, 2009). Iz predhodnih rezultatov je izhajalo, da prihaja pri eksperimentiranju do velikih napak. Da bi povečali ponovljivost smo površine diskov predhodno očistili z obdelavo s plazmo. Poznano je, da lahko s plazmo očistimo različen medicinski pribor (Whittaker in sod., 2004). Učinek plazme na adhezijo bakterij smo preverili na titanovih diskih. Učinek je bil odvisen od intenzitete delovanja plazme. Medtem, ko pri manj intenzivni obdelavi površine s plazmo nismo zaznali vpliva na adhezijo, je bil vpliv daljše plazme relativno velik, saj se je delež pritrjenih bakterij znižal za 50-krat. XPS analiza je pokazala, da se je delež kisika na površini diska po obdelavi s plazmo povečal, kar je bilo pričakovano. Zlasti pri daljšem programu plazme pa smo opazili močno spremenjeno kemijsko sestavo površine. Predvsem visok delež silicija, kateri je lahko posledica kontaminacije, ter odsotnost titana pri hidrotermalno tretiranih diskih nam nakazuje, da je na površini nastal oksidacijski sloj, ki znatno spremeni adhezijo bakterij. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi v primeru hidrotermalne obdelave titanovih površin, kjer nastane spremenjen površinski sloj. Na hidrotermalno netretiranih diskih je bil delež pritrjenih bakterij v povprečju 15 %, pri hidrotermalnih diskih pa se je zmanjšal na 2,6 %.

Pri testiranju različnih materialov smo ugotovili, da se je najmanj bakterij pritrdilo na steklo, pleksi steklo in hidrotermalno obdelane titanove diske. Materiali so si po kemijskih karakteristikah različni. Poleg tega se razlikujejo tudi po hrapavosti. Steklu in pleksi stekluje skupno, da sta obe površini razmeroma gladki, medtem ko sta titanova in jeklena površina precej bolj hrapavi. Pri preprečevanju adhezije je pomembno, da je material odporen na zunanje mehanske vplive. Pleksi steklo je v osnovi gladko, vendar smo lahko z lahkoto zarezali vdolbine na površino, kamor so se kasneje ujele bakterije, ki tudi po močnejšem izpiranju niso zapustile svoje niše. Tako jeklo kot titanovi diski so imeli na površini nepravilnosti, ki so prispevale k večjemu deležu pritrjenih bakterij. Bolj kot je material hrapav večja je tudi verjetnost, da so v vdolbinah nečistoče na katere se vežejo bakterije. V primerjavi s predhodnimi testi adhezije na titanovih diskih (Lorenzetti in sod., 2015), smo zaznali nižji delež pritrjenih bakterij. To bi lahko bila posledica staranja materiala. V skladu s pričakovanji pa je bil delež bakterij na hidrotermalno tretiranih diskih nižji kot pri hidrotermalno netretiranih diskih.

Pri preučevanju adhezije je zelo pomembno izbrati primerno metodo za analizo. V našem primeru smo opazovali bakterije s pomočjo fluorescence, saj lahko tako opazujemo tudi bakterije na materialu, ki ni prosojen. Ker se nekatera fluorescentna barvila vežejo na opazovane materiale, smo uporabili sev *E. coli* z Gfp proteinom. Problem uporabe

fluorescence je avtofluorescenca nekaterih materialov, zato je potrebno v primeru uporabe fluorescence preveriti avtofluorescenca materiala pod opazovanimi filtri. Ob pripravi testne površine moramo zagotoviti čim bolj enake vzorce. Kadar nimamo homogene površine je zagotavljanje enakih testnih površin težavno. Rezultati adhezije se lahko glede na uporabljen protokol testiranja močno razlikujejo, zato se je potrebno zavedati, da dobljeni rezultati veljajo samo za rezultate pridobljene z našim protokolom, vrsto bakterije in za naše gojitvene pogoje.

Adhezija je prvi korak pri nastanku biofilma. Nastanek biofilma tako v napeljavah vodovodnega sistema, kot tudi v zdravstvu povzroča velike nevšečnosti in ogroža zdravje ljudi. Zato so raziskave na področju nastanka biofilma in razvoj materialov, ki lahko potencialno zmanjšajo možnost nastanka biofilma zelo pomembne, saj lahko na ta način pridemo do preventivnih rešitev problemov, ki jih povzročajo biofilmi. Rezultati te naloge kažejo, da se z obdelavo površine materialov lahko adhezija bakterij znatno zniža.

6 SKLEPI

- Metoda membranske filtracije v kombinaciji s kromogenim koliformnim agarjem je ustrezna metoda za dokazovanje koliformnih bakterij v vzorcih tehnološke vode v farmacevtski industriji.
- Hidrotermalna obdelava titanovih površin in obdelava s plazmo znižata delež adsorbiranih površin za dva velikostna reda.
- Adezija bakterij je odvisna od vrste materiala, ki ga testiramo in njegovih kemijskih in fizikalnih lastnosti, adhezija je bila največja na nerjaveče jeklu, manjša na titanovih površinah in najmanjša na steklu in pleksi steklu.

7 POVZETEK

Da zagotovimo ustrezno mikrobiološko kakovost vode, je potrebna odsotnost patogenih bakterij. Med drugimi je potrebno zagotoviti odsotnost koliformnih bakterij. Koliformne bakterije so skupina enterobakterij, katerih glavna metabolna značilnost je predvsem fermentacija laktoze in β -galaktozidazna aktivnost. Tipičen predstavnik koliformnih bakterij je *Escherichia coli*, ki nakazuje fekalno kontaminacijo. V magistrskem delu smo testirali in validirali metodo membranske filtracije v kombinaciji s kromogenim koliformnim agarjem. Preverili smo točnost, natančnost, linearnost, mejo detekcije in selektivnost izbrane metode. Glede na dobljene rezultate lahko trdimo, da je metoda v povprečju točna. V primeru manjšega števila kolonij se napaka zaradi teže posamezne kolonije in napake pri redčitvi poveča. Relativna standardna napaka metode je pod 30 %. V razponu med 0 in 180 CFU/100 ml se je metoda izkazala kot linearna z vrednostjo R^2 nad 0,90. Meja detekcije za membransko filtracijo je 1 CFU/100 ml. Z metodo CCA lahko razlikujemo med kolonijami koliformnih bakterij in kolonijami nekoliformnih bakterij. Metoda se je pokazala kot selektivna. Metoda je dala primerljive rezultate v dveh gojiščih različnih proizvajalcev, ki omogočata rast koliformnih bakterij. Predpisano temperaturno območje metode je med 35-37 °C. V primeru inkubacije na 30-35 °C dobimo ustrezen izplen kolonij pri *E. coli* in *E. asburiae*. V *C. gillenii* pa je bil izkoristek pod 70 %, kar je pod mejo ustreznosti. Izkoristek metode je ustrezen tudi, če čas inkubacije skrajšamo na 18 ur ali podaljšamo do 48 ur. Validacijski parametri so ustrezali zahtevam in tudi primerjava z obstoječo MPN metodo je pokazala boljše rezultate. Sklepamo, da je metoda ustrezna za dokazovanje koliformnih bakterij v vzorcih tehnološke vode v farmacevtski industriji.

Ker se lahko bakterije pritrdijo na različne površine in tvorijo biofilm smo preverili vpliv površine na adhezijo bakterij. Testirali smo titanove diske brez in z hidrotermalno obdelavo, ki je privedla do TiO_2 anataznih slojev na površini. Ugotovili smo, da je delež pritrjenih bakterij na hidrotermalno tretiranih diskih (2,6 %) nižji od diskov brez obdelave (15 %). Pri dovolj dolgi obdelavi diskov s plazmo smo opazili znižanje deleža pritrjenih bakterij na obeh tipih diskov. Pri diskih brez hidrotermalne obdelave se je delež iz 15 % znižal na okoli 3 %, pri hidrotermalno obdelanih pa iz 2,6 % na okoli 0,3 %. S primerno obdelavo materiala lahko povzročimo do 50-kratno znižanje števila pritrjenih bakterij. Pri primerjavi še treh materialov smo ugotovili, da je bil delež pritrjenih bakterij najvišji pri jeklu 23 %. Pri steklu in pleksiju je bil delež pritrjenih bakterij nizek (1,6 % oziroma 1,4 %). V primeru stekla in pleksija smo opazili korelacijo z nizko hrapavostjo površine in nižjim deležem pritrjenih bakterij.

8 VIRI

- Analytical procedures and methods validation for Drugs and Biologics. 2015. New Hampshire, Food and drug administration: 15 str.
- Blodgett R. 2010. BAM Appendix 2: Most probable number from serial dilutions. New Hampshire, Food and drug administration.
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.html> (2.11.2015)
- Brunelle J. P. 1978. Preparation of catalysts by metallic complex adsorption on mineral oxides. *Pure and Applied Chemistry*, 50: 1211–1229
- Camesano T. A., Liu Y., Datta M. 2007. Measuring bacterial adhesion at environmental interfaces with single-cell and single-molecule techniques. *Advances in Water Resources*, 30: 1470-1491
- Castonguay M.H., Van der Schaaf S., Koester W., Krooneman J., Van der Meer W., Harmsen H., Landini P. 2006. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. *Research in Microbiology*, 157, 5: 471-478
- Chao W. L. 2006. Evaluation of Colilert-18 for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in tropical fresh water. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 2: 115-120
- Chromogenic coliform agar ISO formulation. 2014. Technical sheet. Milano, Biolife Italiana.
<http://www.biolifeitaliana.it/public/cartellina-allegati-schede-certificazioni/schede-tecniche-inglese/TS-4012972.pdf> (8.12.2015)
- Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ED. Washington, APHA American Public Health Association: 1220 str.
- De la Fuente-Núñez C., Reffuveille F., Fernández L., Hancock R. E. W. 2013. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 5: 580-589
- Di Bonaventura G., Piccolomini R., Paludi D., D'Orio V., Vergara A., Conter M., Ianieri A. 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 6: 1552-1561

- Fatemeh D., Reza Z. M., Mohammad A., Salomeh K., Reza A. G., Hossein S., Maryam S., Azam A., Mana S., Negin N., Reza K. A., Saeed F. 2014. Rapid detection of coliforms in drinking water of Arak city using multiplex PCR method in comparison with the standard method of culture (Most Probably Number). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, 5: 404-409
- Fink R., Oder M., Torkar K. 2009. Mikrobiološka kakovost vode iz individualnih zajetij in vodnjakov V: Raziskovalni dan Zdravstvene fakultete. Rugelj D. in Sevšek F. (ur.). Ljubljana, Zdravstvena fakulteta: 135-144
- Finney M., Smullen J., Foster H. A., Brokx S., Storey D. 2003. Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* from faecal samples from healthy subjects. *Journal of Microbiological Methods*, 54, 3: 353-358
- Garrett T. R., Bhakoo M., Zhang Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18, 9: 1049-1056
- Geetha M., Singh A. K., Asokamani R., Gogia A. K. 2009. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Progress in Materials Science*, 54, 3: 397-425
- González R. D., Tamagnini L. M., Olmos P. D., de Sousa G. B. 2003. Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. *Food Microbiology*, 20, 5: 601-604
- Guidelines for drinking water quality. 1997. Geneva, World health organization: 238 str. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwqvol32ed.pdf (30. 12. 2015)
- Guidelines for drinking water quality. 2011. Geneva, World health organization: 541 str. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf (30.12.2015)
- Hermansson M. 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14, 1–4: 105-119
- Hočevár M., Godec M., Jenko M., Drobne D., Gunde Cimerman N., Novak S. 2013. The adhesion of bacteria on austenitic stainless steel with different surface roughness. V: Proceedings Of the MC 2013: Microscopy conference, Regensburg, 25.-30. avgust 2013. University of Regensburg: 35-37
- Hörman A., Hänninen M.L. 2006. Evaluation of the lactose Tergitol-7, m-Endo LES, Colilert 18, ReadyCult Coliforms 100, Water-Check-100, 3M Petrifilm EC and DryCult Coliform test methods for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water samples. *Water Research*, 40,17: 3249-3256

- ISO 9308. Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method. 2000: 10 str.
- ISO 9308. Water quality - Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria -- Part 2: Most probable number method. 2012: 45 str.
- ISO 9308. Water quality - Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. 2014: 10 str.
- Jastrzębska A. M., Karwowska E., Olszyna A. R., Kunicki A. 2015. Influence of bacteria adsorption on zeta potential of Al₂O₃ and Al₂O₃/Ag nanoparticles in electrolyte and drinking water environment studied by means of zeta potential. *Surface and Coatings Technology*, 271: 225-233
- Karcher. S. J. 2002. Blue plants. Transgenic plants with the GUS reporter gene. V: Tested Studies for laboratory teaching. O'Donnell M. A. (ur.). Chicago, University of Chicago: 29-42
- Kastelec D., Košmelj K. 2010. Osnove statistike z Excelom 2007. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 251 str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2763/OSE_2007/Osnove_statistike_z_Excelom.pdf (30. 12. 2015)
- Katsikogianni M. G., Y.F. 2010. Interactions of bacteria with specific biomaterial surface chemistries under flow conditions. *Acta Biomaterialia*, 6, 3: 1107-1118
- Kämpfer P., Nienhüser A., Packroff G., Wernicke F., Mehling A., Nixdorf K., Fiedler S., Kolauch C., Esser M. 2008. Molecular identification of coliform bacteria isolated from drinking water reservoirs with traditional methods and the Colilert-18 system. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211, 3–4: 374-384
- Kilb B., Lange B., Schaule G., Flemming H., Wingender J. 2003. Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206, 6: 563-573
- Kramer M. 2006. Uporaba ATP bioluminescence za presejalno testiranje učinkovitosti konzervansov v zgodnji fazi razvoja izdelkov. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 142 str.
- Lange B., M. Strathmann, Oßmer R. 2013. Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 57, 6: 547-553
- Li B., Logan B.E. 2004. Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 36, 2: 81-90

- Lichter J. A., Van Vliet K. J., Rubner M. F. 2009. Design of Antibacterial Surfaces and Interfaces: Polyelectrolyte Multilayers as a Multifunctional Platform. *Macromolecules*, 42, 22: 8573-8586
- Lorenzetti M., Dogša I., Stošicki T., Stopar D., Kalin M., Kobe S., Novak S. 2015. The Influence of Surface Modification on Bacterial Adhesion to Titanium-Based Substrates. *ACS Applied materials & Interfaces*, 7, 3: 1644-1651
- Maheux A. F., Dion-Dupont V., Bisson M., Bouchard S., Rodriguez M. 2014. Detection of *Escherichia coli* colonies on confluent plates of chromogenic media used in membrane filtration. *Journal of Microbiological Methods*, 97: 51-55
- Maheux A. F., Huppé V., Boissinot M., Picard F. J., Bissonnette L., Bernier J. L., Bergeron M. 2008. Analytical limits of four β -glucuronidase and β -galactosidase-based commercial culture methods used to detect *Escherichia coli* and total coliforms. *Journal of Microbiological Methods*, 75, 3: 506-514
- McDougald D., Rice S., Weichert D., Kjelleberg S. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation. *FEMS Microbiology Ecology*, 25, 1: 1-9
- MEndo agar LES. 2009. Difco & BBL manual. New Jersey, Becton Dickinson. https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/273620.pdf (8.12.2015)
- Niquette P., Servais P., Savoir R. 2000. Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. *Water Research*, 34, 6: 1952-1956
- Ortega M. P., Hagiwara T., Watanabe H., Sakiyama T. 2010. Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. *Food Control*, 21,4: 573-578
- O'Toole G., Kaplan H. B. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 1: 49
- PDA Technical Report No. 33.- Evaluation, validation and implementation of new microbiological testing methods. 2000. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 54: 1-39
- Pratt L.A., Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30: 285-293
- Pitkänen T., Paakkari P., Miettinen I., Heinonen-Tanski H., Paulin L., Hänninen M. 2007. Comparison of media for enumeration of coliform bacteria and *Escherichia coli* in non-disinfected water. *Journal of Microbiological Methods* 68, 3: 522-529

- Rizzo L. 2009. Inactivation and injury of total coliform bacteria after primary disinfection of drinking water by TiO₂ photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 1–3: 48-51
- Rompré A., Servais P., Baudart J., de-Roubin MR., Laurent P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49, 1: 31-54
- Schwartz T., Hoffmann S., Obst U. 1998. Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Water Research* 32, 9: 2787-2797
- Shanks O. C., Sivaganesan M., Peed L., Kelty C. A., Blackwood A. D., Greene M. R., Noble R. T., Bushon R. N., Stelzer E. A., Kinzelman, J., Anan'eva T., Sinigalliano C., Wanless D., Griffith J., Cao Y., Weisberg S., Harwood V. J., Staley C., Oshima, K. H., Varma M., Haugland, R. 2012. Interlaboratory Comparison of Real-Time PCR Protocols for Quantification of General Fecal Indicator Bacteria. *Environmental Science & Technology*, 46, 2: 945-953
- Soni K. A., Balasubramanian A. K., Beskok A., Pillai S. D. 2008. Zeta potential of selected bacteria in drinking water when dead, starved, or exposed to minimal and rich culture media. *Current Microbiology*, 56, 1: 93-97
- The Microbiology of Drinking Water - Part 1 - Water Quality and Public Health. 2002. Bristol, Environment Agency: 47 str.
https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/316838/mdwpart1.pdf (30.12.2015)
- Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A. 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology letters*, 223, 2: 287-292
- United States Pharmacopeia 36 - National Formulary 31. 2013. Baltimore, United book press: 2281 str.
- Van Houdt R., Michiels C. W. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156, 5–6: 626-633
- Vesterlund S., Paltta J., Karp M., Ouwehand A. 2005. Measurement of bacterial adhesion- in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 2: 225-233
- Wang H., Sodagari M., Chen Y., He X., Newby B. Z., Ju L. K. 2011. Initial bacterial attachment in slow flowing systems: Effects of cell and substrate surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87, 2: 415-422

- Whitman R. L., Ge Z., Nevers M., Boehm A. B., Chern E. C., Haugland R. A., Lukasik A. M., Molina M., Przybyla-Kelly K., Shively D. A., White E. M., Zepp R. G., Byappanahalli M. N. 2010. Relationship and Variation of qPCR and Culturable *Enterococci* Estimates in Ambient Surface Waters Are Predictable. *Environmental Science & Technology*, 44, 13: 5049-5054
- Whittaker A. G., Graham E. M., Baxter R. L., Jones A. C., Richardson P. R., Meek G., Campbell G. A., Aitken A., Baxter H. C. 2004. Plasma cleaning of dental instruments. *Journal of Hospital Infection*, 56,1: 37-41
- Zhang X., Wang L., Levanen E. 2013. Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion. *RSC Advances*, 3, 30: 12003-12020

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. Davidu Stoparju za pomoč in strokovne nasvete pri nastajanju magistrskega dela ter za strokoven pregled magistrske naloge.

Somentorici dr. Mateji Kramer se zahvaljujem za usmeritev pri delu magistrske naloge in pregled magistrskega dela.

Zahvalila bi se tudi dr. Iztoku Dogši za pomoč pri izvajanju eksperimentov in za nasvete pri praktičnem delu naloge.

Recenzentu prof. dr. Alešu Podgorniku se zahvaljujem za pregled magistrskega dela.

Zahvaljujem se Iti Junkar in Martini Lorencetti za sodelovanje pri testiranju vpliva plazme na adhezijo diskov. Zahvala tudi drugim delavcem Inštituta Jožef Štefan, ki so sodelovali pri obdelavi in karakterizaciji površin. Hvala tudi prof dr. Mitjanu Kalinu in njegovim sodelavcem iz Fakultete za strojništvo, ki so izmerili hrapavost in topografijo analiziranih diskov.

Hvala tudi vsem delavcem in študentom iz katedre za mikrobiologijo na Biotehniški fakulteti za skupno preživeti čas in sodelovanje.

Zahvaljujem se tudi sodelavcem iz Lek d.d. za pomoč, nasvete in sodelovanje.

Hvala tudi mojim prijateljem in družini, ki so me podpirali v času študija. Hvala tudi vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali, katere pa tukaj mogoče nisem omenila.

Priloga A

Rezultati testiranja točnosti metode

Preglednica A1: Rezultati testiranja točnosti metode za bakterijo *E. coli*. Posamezen odsek v grafu označuje eno ponovitev.

Vzorec in redčitev vzorca	Paralelka 1 (CFU/100ml)	Paralelka 2 (CFU/100ml)	Paralelka 3 (CFU/100ml)	Povprečje (CFU/100ml)	Izplen metode (%)
EC1 100 %	30	28	31	29,7	100 %
EC1 75 %	23	25	29	25,7	115 %
EC1 50 %	14	13	10	12,3	83 %
EC1 25 %	5	5	8	6,00	81 %
EC1 10 %	4	2	3	3,00	101 %
EC2 100 %	54	52	54	53,3	100 %
EC2 75 %	46	36	41	41,0	103 %
EC2 50 %	31	27	26	28,0	105 %
EC2 25 %	14	16	14	14,7	110 %
EC2 10 %	7	7	4	6,00	113 %
EC3 100 %	42	45	44	43,7	100 %
EC3 75 %	32	24	28	28,0	85 %
EC3 50 %	28	22	28	26,0	119 %
EC3 25 %	14	14	8	12,0	110 %
EC3 10 %	7	5	4	5,33	122 %

Preglednica A2: Rezultati testiranja točnosti metode za bakterijo *E. asburiae*. Posamezen odsek v grafu označuje eno ponovitev.

Vzorec in redčitev vzorca	Paralelka 1 (CFU/100ml)	Paralelka 2 (CFU/100ml)	Paralelka 3 (CFU/100ml)	Povprečje (CFU/100ml)	Izplen metode (%)
EA1 100 %	65	60	58	61,00	100 %
EA1 75 %	56	53	63	57,33	125 %
EA1 50 %	36	38	42	38,7	127 %
EA1 25 %	16	17	14	15,67	103 %
EA1 10 %	5	7	9	7,00	115 %
EA2 100 %	56	53	55	54,67	100 %
EA2 75 %	39	37	37	37,67	92 %
EA2 50 %	28	29	29	28,67	105 %
EA2 25 %	12	15	14	13,67	100 %
EA2 10 %	8	3	5	5,33	98 %
EA3 100 %	54	47	50	50,33	100 %
EA3 75 %	40	42	42	41,33	109 %
EA3 50 %	21	27	24	24,00	95 %
EA3 25 %	14	9	10	11,00	87 %
EA3 10 %	3	7	5	5,0	99 %

Preglednica A3: Rezultati testiranja točnosti metode za bakterijo *C. Gillenii*. Posamezen odsek v grafu označuje eno ponovitev.

Vzorec in redčitev vzorca	Paralelka 1 (CFU/100ml)	Paralelka 2 (CFU/100ml)	Paralelka 3 (CFU/100ml)	Povprečje (CFU/100ml)	Izplen metode (%)
CG 100%	23	32	29	28,00	100 %
CG 75%	13	22	18	17,67	84 %
CG 50%	10	19	18	15,7	112 %
CG 25%	7	3	9	6,33	90 %
CG 10%	2	2	0	1,33	48 %
CG 100%	36	32	35	34,33	100 %
CG 75%	26	38	35	33,00	128 %
CG 50%	18	20	21	19,67	115 %
CG 25%	8	10	12	10,00	117 %
CG 10%	6	3	4	4,33	126 %
CG 100%	104	110	108	107,33	100 %
CG 75%	82	90	83	85,00	106 %
CG 50%	72	58	63	64,33	120 %
CG 25%	26	34	29	29,67	111 %
CG 10%	10	8	9	9,0	84 %

Priloga B

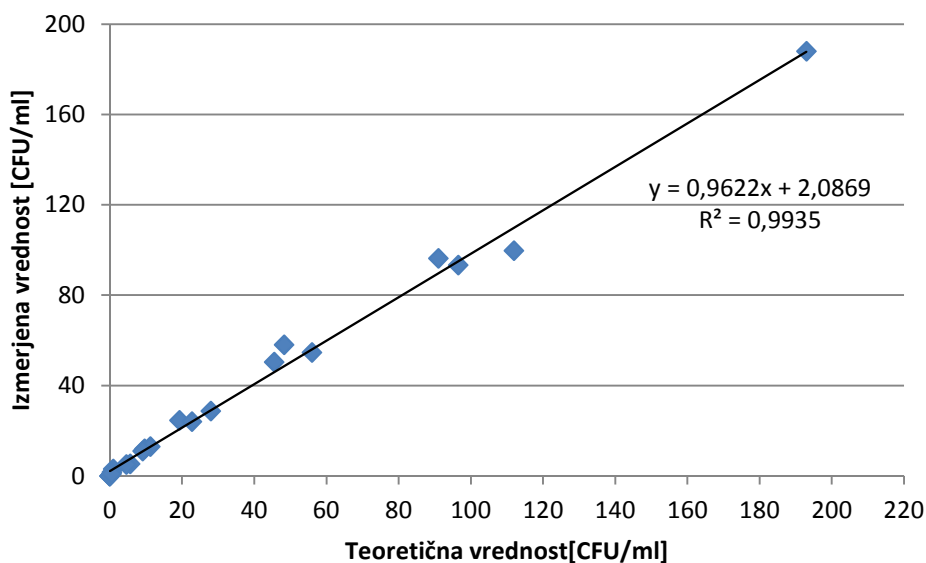
Parametri natančnosti za vzorce okužene z redčeno (10 %) suspenzijo bakterij

Priloga B: Parametri natančnosti za vzorce okužene z redčeno (10 %) suspenzijo bakterij (SD = standardni odklon, RSD = relativni standardni odklon).

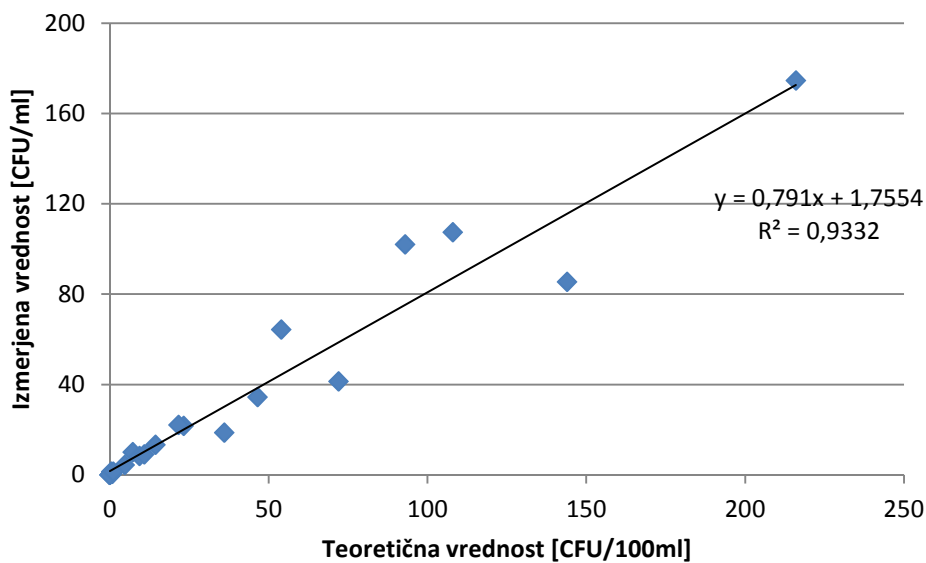
Ponovitev	<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	<i>E. asburiae</i> (CFU/100ml)	<i>C. gillenii</i> (CFU/100ml)
1	6	6	8
2	6	8	10
3	3	7	9
4	7	8	10
5	4	4	11
6	8	6	7
7	6	7	8
8	6	5	7
9	4	3	13
10	5	8	12
Povprečje	5,5	6,2	9,5
SD	1,5	1,8	2,1
RSD (%)	27,44	28,25	21,77

Priloga C

Linearne regresijske krivulje



Slika C1: Linearna regresijska krivulja za meritve *E. asburiae*



Slika C2: Linearna regresijska krivulja za meritve *C. gillenii*

Priloga D

Vzporedno testiranje z MPN in membransko filtracijo z uporabo CCA

Testiranje smo izvedli na treh kvalitetah vode: prečiščeni, mehki in pitni vodi.

Prečiščena voda

Preglednica D1: Število CFU/100ml ali MPN/100ml glede na metodo ob različnih redčitvah in neodvisnih ponovitvah testa. Koncentracija suspenzije s katero smo kontaminirali vzorce je bila med posameznimi ponovitvami nekoliko različna. Rezultat pri MPN je podan kot interval, srednja vrednost predstavlja MPN vrednost.

Bakt.	Redčitev	1 (CCA)	1 (MPN)	2 (CCA)	2 (MPN)	3 (CCA)	3 (MPN)
<i>E.coli</i>	1	141 ± 6,01	>27	35,0 ± 2,9	(10,5-20-38)	36,3 ± 1,7	>27
	1:10	9,3 ± 0,3	>27	0,3 ± 0,3	(0,36-1,5-5,5)	4,0 ± 0,5	(8,5-17,5-30)
	1 : 100	1,3 ± 0,9	(1,7- 4,1-10)	0,0 ± 0,0	0,0	0,3 ± 0,3	(0,36-1,5-5,5)
	1 :1000	0,0 ± 0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0
<i>E.asburiae</i>	1	149±1,2	(3,7-7,5-15,5)	80,7 ± 3,3	(2,5-5-11,5)	61,3 ± 0,9	(13,5-27-55)
	1:10	14,3±2,0	(1,7-4,1-10)	2,0 ± 1,5	(0,1-0,7-4,9)	5,0 ± 1,5	(1,2-3,1-8,5)
	1 : 100	1,7±0,9	(0,1-0,7-4,9)	0,0 ± 0,0	0,0	1,7 ± 0,9	(0,1-0,7-4,9)
	1 :1000	0,0±0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0
<i>C.gillenii</i>	1	125 ± 2,9	>27	104 ± 3,0	(7,5-13-25)	68,3 ± 1,2	>27
	1:10	26,0 ± 0,5	(13,5-27-55)	7,7 ± 1,2	(2,95-6,5-14)	7,0 ± 0,6	(13,5-27-55)
	1 : 100	2,7 ± 0,3	(0,7-2,3-7)	0,3 ± 0,3	0,0	1,0 ± 0,6	(3,8-7,5-15,5)
	1 :1000	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	(0,1-0,7-4,9)

Pri redčitvi 1:1000 ni prišlo do rasti kolonij, kar je posledica močno redčenega vzorca in pridemo pod limitno detekcije.

Preglednica D2: Izkoristek metode (%) za metodo membranske filtracije v kombinaciji z CCA agarjem za prečiščeno vodo.

Redčitev	<i>E. coli</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>C. gillenii</i>
1	91 ± 12	95 ± 3,0	97 ± 12
1:10	62 ± 31	65 ± 21	122 ± 34
1:100	64 ± 32	126 ± 80	129 ± 51

Izkoristek metode je za neredčene vzorcev znotraj meje 70-200 % pri vseh mikroorganizmih. Izkoristek pri redčitvi 1:1000 je povsod 0 %, kar je v skladu s pričakovanji, saj pridemo pod mejo detekcije. Pod 70 % pridemo pri redčitvah *E. coli* 1:10 in 1:100, ter pri *E. asburiae* pri redčitvi 1:10. Pri posameznih ponovitvah je lahko prišlo do odstopa od ustrezne vrednosti zaradi napake pri redčenju. Vidimo, da je napaka z vsako redčitvijo višja. Z vsakim prenosom vode smo naredili napako in je zato napaka vsakič večja. Ker je z vsako redčitvijo tudi manjše število bakterij v vzorcu, pri redčenju težje zajamemo prisotne bakterije.

Pitna voda

Preglednica D3: Število CFU/100ml ali MPN/100ml glede na metodo ob različnih redčitvah in neodvisnih ponovitvah testa. Koncentracija suspenzije s katero smo kontaminirali vzorce je bila med posameznimi ponovitvami nekoliko različna. Rezultat pri MPN je podan kot interval, srednja vrednost predstavlja MPN vrednost.

Bakt.	redčitev	1 (CCA)	1 (MPN)	2 (CCA)	2 (MPN)	3 (CCA)	3 (MPN)
<i>E. coli</i>	1	164 ± 3,5	>27	47,3 ± 1,5	(8,5-17,5-30)	62,7 ± 1,8	>27
	1:10	17,3 ± 2,0	>27	1,0 ± 0,6	(0,7-2,3-7)	3,7 ± 0,9	(8,5-17,5-30)
	1:100	1,7 ± 0,3	(1,2-3,1-8,5)	0,0 ± 0,0	0,0	0,3 ± 0,3	(1,7-4,1-10)
	1:1000	0,3 ± 0,3	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0
<i>E. asburiae</i>	1	137 ± 5,6	>27	70,0 ± 5,5	(4,5-8-18)	71,7 ± 1,2	(13,5-27-55)
	1:10	9,7 ± 0,9	(4,5-9-18)	3,3 ± 0,9	(0,1-0,7-4,9)	4,7 ± 0,7	(4,7-9-18)
	1 : 100	0,3 ± 0,3	(0,35-1,5-5,5)	0,0 ± 0,0	0,0	0,3 ± 0,3	(0,36-1,5-5,5)
	1 :1000	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0
<i>C. gilleni</i>	1	122 ± 7,2	>27	88,3 ± 7,5	>27	68,3 ± 1,5	>27
	1:10	12,0 ± 1,5	>27	5,0 ± 0,6	(13,5-27-55)	6,0 ± 1,2	(7,5-13-25)
	1 : 100	1,3 ± 0,3	(0,36-1,5-5,5)	0,3 ± 0,3	(0,7-2,3-7)	1,0 ± 0,6	(0,36-1,5-5,5)
	1 :1000	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0

Pri redčitvi 1:1000 ni prišlo do rasti kolonij, kar je posledica močno redčenega vzorca in pridemo pod limito detekcije.

Preglednica D4: Izkoristek metode (%) za metodo membranske filtracije v kombinaciji z CCA agarjem za pitno vodo.

Redčitev	<i>E. coli</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>C. gilleni</i>
1	130 ± 24	94 ± 12	92 ± 14
1:10	90 ± 27	59 ± 11	73 ± 18
1:100	73 ± 38	25 ± 16	98 ± 43

Izkoristek metode je pri pitni vodi ustrezen pri vseh neredčenih vzorcih. Pod 70 % pridemo pri redčitvah *E. asburiae*. Pri posameznih ponovitvah pridemo pod 70 % predvsem pri redčenih vzorcih. Izkoristek pri 1:1000 je v vseh primerih 0 %. Napaka metode je tudi v tem primeru večja pri redčenih vzorcih.

Mehka voda

Preglednica D5: Število CFU/100ml ali MPN/100ml glede na metodo ob različnih redčitvah in neodvisnih ponovitvah testa. Koncentracija suspenzije s katero smo kontaminirali vzorce je bila med posameznimi ponovitvami nekoliko različna. Rezultat pri MPN je podan kot interval, srednja vrednost predstavlja MPN vrednost.

Bakt.	redčitev	1(CCA)	1(MPN)	2(CCA)	2(MPN)	3(CCA)	3(MPN)
<i>E. coli</i>	1	152 ± 4,3	(13,5-27-55)	41,0 ± 0,6	>27	35,0 ± 4,2	>27
	1:10	11,0 ± 2,0	(1,7-4,1-10)	3,7 ± 0,9	(7,5-13-25)	2,7 ± 0,7	(7,5-13-25)
	1 : 100	0,3 ± 0,3	0,0	0,3 ± 0,3	(1,1-3,1-8,5)	0,3 ± 0,3	(0,36-1,5-5,5)
	1 :1000	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,3	0,0
<i>E. asburiae</i>	1	99,0 ± 4,4	23,7	42,7 ± 0,9	>27	61,7 ± 0,9	>27
	1:10	8,0 ± 1,1	(1,7-4,1-10)	3,3 ± 0,7	(2,5-5-11,5)	4,7 ± 0,9	(1,7-4,1-10)
	1 : 100	0,3 ± 0,3	0,0	0,0 ± 0,0	(0,1-0,7-4,9)	0,7 ± 0,3	(0,1-0,7-4,9)
	1 :1000	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0
<i>C. gillenii</i>	1	59,3 ± 5,8	>27	94,7 ± 1,8	>27	50,7 ± 1,8	>27
	1:10	3,3 ± 1,9	(2,5-5-11,5)	6,7 ± 1,2	(13,5-27-55)	5,0 ± 0,6	(8,5-17,5-30)
	1 : 100	0,0 ± 0,0	0,0	0,7 ± 0,3	(0,1-0,7-4,9)	1,0 ± 0,5	(0,36-1,5-5,5)
	1 :1000	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0

Preglednica D6: Izkoristek metode(%) za metodo membranske filtracije v kombinaciji z CCA agarjem za mehko vodo.

Redčitev	<i>E. coli</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>C. gillenii</i>
1	100 ± 13	102 ± 5,2	97 ± 8,5
1:10	78 ± 5,4	80 ± 5,1	71 ± 8,4
1:100	62 ± 19	49 ± 32	79 ± 51

Izkoristek metode je za mehko vodo ustrezen pri vseh neredčenih vzorcih. Izkoristek pri redčitvi 1:1000 je v vseh primerih 0%. Pri posameznih ponovitvah testa je bil izkoristek za posamezne redčitve pod 70%. Pri redčitvi 1:100 je bila napaka največja. Največja odstopanja so predvsem pri vzorcih kjer ni prišlo do rasti.

Priloga E

Robustnost metode

Preglednica E1: Izkoristek števila bakterij (%) po 18-urni inkubaciji pri 35-37 °C.

Ponovitev	<i>E.coli</i>	<i>E.asburiae</i>	<i>C.gillenii</i>
1	95	78	100
2	85	93	78
3	93	93	100
Povprečje	91±3	88±5	93±7

Preglednica E2: Izkoristek števila bakterij (%) po 24-urni inkubaciji pri 35-37 °C.

Ponovitev	<i>E.coli</i>	<i>E.asburiae</i>	<i>C.gillenii</i>
1	109	88	84
2	89	100	78
3	91	95	99
Povprečje	96±6	94±3	87±6

Preglednica E3: Izkoristek števila bakterij po 48-urni inkubaciji pri 35-37 °C.

Ponovitev	<i>E.coli</i>	<i>E.asburiae</i>	<i>C.gillenii</i>
1	112	99	95
2	93	109	85
3	93	101	101
Povprečje	99±6	103±3	94±5

Rezultati testa za temperaturno območje 35-37 °C so enaki rezultatom za časovni termin 24-ur (Preglednica 22).

Preglednica E4: Izkoristek števila bakterij po inkubaciji na temperaturi 30-35 °C.

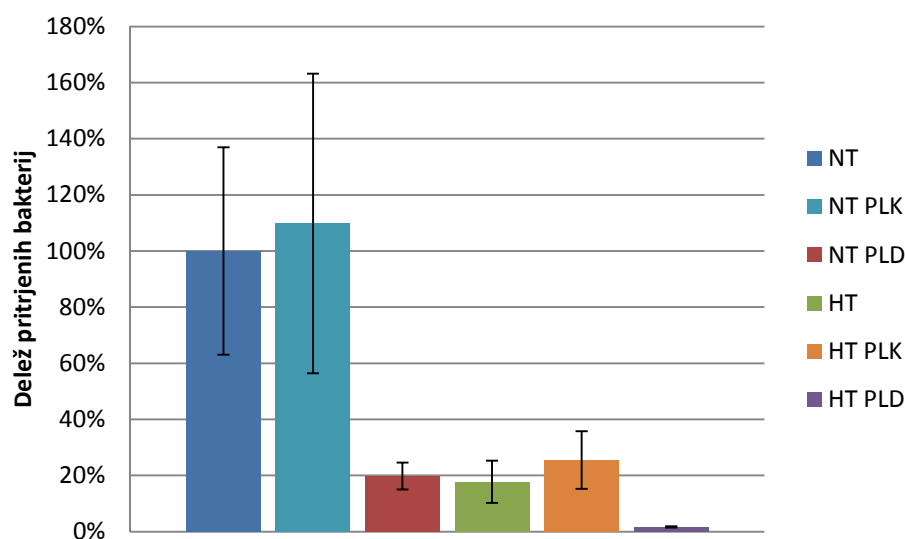
Ponovitev	<i>E.coli</i>	<i>E.asburiae</i>	<i>C.gillenii</i>
1	119	93	48
2	70	106	91
3	95	102	67
4	96	102	49
Povprečje	95±10	101±3	64±10

Priloga F

Delež pritrjenih bakterij

Preglednica F1: Delež pritrjenih bakterij za posamezen tip diska.

Tip diska	Delež pritrjenih bakterij (%)
HT	$2,6 \pm 1,1$
HT PLK	$3,7 \pm 1,5$
HT PLD	$0,25 \pm 0,03$
NT	$15 \pm 5,4$
NT PLK	$16 \pm 7,8$
NT PLD	$2,9 \pm 0,7$

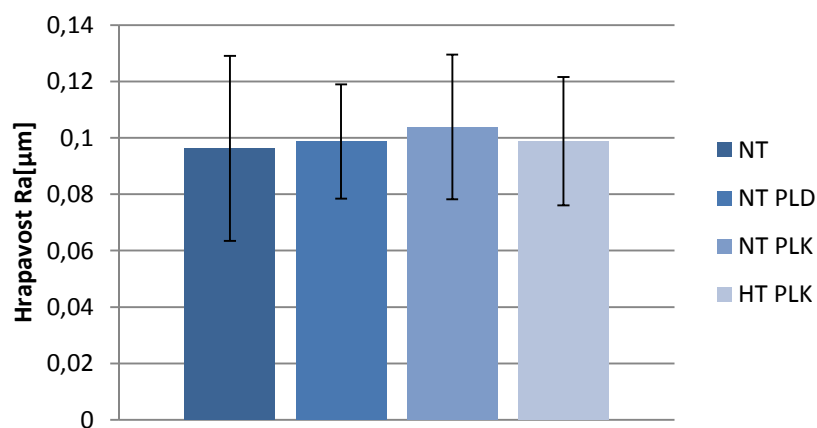


Slika F1: Relativni delež pritrjenih bakterij glede na NT diske

V enem testiranju pa smo preverili tudi vpliv brušenja površine na adhezijo bakterij. Netretirane titanove diske smo zbrusili. Delež pritrjenih bakterij na brušenih diskih je bil $10 \pm 1\%$, pri brušenih diskih obdelanih s krajšim programom plazme pa $7 \pm 1\%$. Iz tega je razvidno, da se na bolj gladke površine pritrdi manj bakterij. Vendar bi za potrditev te domneve potrebovali še dodatne ponovitve testa.

Preglednica F2: Delež pritrjenih bakterij za različen material

Material	Delež pritrjenih bakterij (%)
steklo	$1,4 \pm 0,75$
PMMA	$1,6 \pm 1,2$
titan (HT)	$2,6 \pm 1,1$
titan (NT)	$15 \pm 5,4$
jeklo	$23 \pm 4,9$



Slika F2: Hrapavost titanovih diskov ob vzdolžnem merjenju znotraj kanalov.

Preglednica F3 Hrapavost površine za različne materiale

Tip diska	Hrapavost-Ra (μm)
NT	0,46 ± 0,0051
NT PLK	0,34 ± 0,0044
NT PLD	0,44 ± 0,011
HT PLK	0,42 ± 0,0093
J	0,17 ± 0,0038
S	0,03 ± 0,0014
P	0,015 ± 0,00004