

Mikrobiološka analiza vode s područja Varaždinske i Koprivničko-križevačke županije

Dreven, Rafaela

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University North / Sveučilište Sjever**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:405181>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

[University North Digital Repository](#)





**Sveučilište
Sjever**

Završni rad br. 2/PREH/2021

**Mikrobiološka analiza vode s područja Varaždinske i
Koprivničko-križevačke županije**

Rafaela Dreven, 3521/336

Koprivnica, lipanj 2022. godine



Sveučilište Sjever

Prehrambena tehnologija

Završni rad br. 2/PREH/2021

Mikrobiološka analiza vode s područja Varaždinske i Koprivničko-križevačke županije

Student

Rafaela Dreven, 3521/336

Mentor

izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj

Koprivnica, lipanj 2022. godine

Prijava završnog rada

Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL Odjel za prehrambenu tehnologiju

STUDIJ preddiplomski stručni studij Prehrambena tehnologija

PRISTUPNIK Rafaela Dreven

JMBAG 0336029875

DATUM 1.4.2021.

KOLEGIJ Prehrambena mikrobiologija

NASLOV RADA Mikrobiološka analiza vode s područja Varaždinske i Koprivničko-križevačke županije

NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU Microbiological analysis of water from Varaždin and Koprivničko-križevačka counties

MENTOR Bojan Šarkanj

ZVANJE izv. prof. dr. sc.

ČLANOVI POVJERENSTVA

1. doc. dr. sc. Dunja Šamec, predsjednica
2. izv. prof. dr. sc. Krunoslav Hajdek, član
3. izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj, mentor
4. doc. dr. sc. Natalija Uršulin-Trsterjak, zamjena člana
- 5.

Zadatak završnog rada

BROJ 2/PREH/2021

OPIS

Zadatak završnog rada je uzorkovati i analizirati uzorke vode s područja Varaždinske i Koprivničko-križevačke županije sukladno važećim zakonima i pravilnicima ovisno o namjeni vode. Ukupno se treba analizirati barem 10 uzoraka vode s minimalno 5 lokacija, a vrste analize koje se trebaju provesti propisane su odgovarajućim važećim zakonima i pravilnicima. Nakon provedene analize potrebno je dati mišljenje o mikrobiološkoj kvaliteti vode i smjernice za preradu takve vode u vodu pogodnu za ljudsku potrošnju.

ZADATAK URUČEN

10.6.2021.

POTPIS MENTORA

SVEUČILIŠTE
SJEVER



Zahvala

Prije svega zahvalila bi se svome mentoru izv. prof. dr. sc. Bojanu Šarkanj na svakoj vrsti pomoći koju mi je pružao tijekom pisanja ovog rada, ali i tijekom studiranja. Zahvaljujem se i mr. sc. Vesni Gaži-Tomić koja mi je omogućila da praktični dio završnog rada obavim u laboratoriju Zavoda za javno zdravstvo Koprivničko-križevačke Županije.

Hvala i mojoj kolegici Lei koja je sa mnom provodila dane učeći i koja je sa mnom dijelila sve dogodovštine za vrijeme studiranja. Također, hvala i mojim drugim prijateljima koji su mi bili podrška za vrijeme mog studiranja, ponajviše Sandri i Valentini koje su mi pružale podršku i bodrile me za vrijeme pisanja završnog rada i za vrijeme mog studentskog rada.

Posebnu zahvalu upućujem svojoj obitelji, posebno svojim roditeljima koji su mi omogućili da studiram, ali i svim ostalim velikim i malim članovima naše obitelji koji su mi na bilo koji način pružali podršku i vjerovali u mene tijekom studiranja.

Puno hvala i mom Mateju koju mi je uz moje roditelje bio najveća podrška kroz cijelo vrijeme mog studiranja.

Sažetak

Voda je tekućina koja se nalazi oko nas u bilo kojem trenu i u bilo kojem obliku. Osigurati zdravstveno ispravnu (fizikalno-kemijski i mikrobiološki) vodu svim ljudima na svijetu je danas teško, što zbog malih količina pitke vode, što zbog razvijenosti ili ne razvijenosti i zagađenja u određenim zemljama. Održavanje zdravstveno ispravne vode je danas najveći zadatak svih nas ljudi, kao i očuvanje naših voda čistima i nezagađenima.

U ovom radu analizirano je 10 uzoraka vode, od čega su 6 uzoraka vode za piće i 4 uzoraka površinskih voda. Provedena su mikrobiološka ispitivanja svih uzoraka u skladu s važećim zakonima i pravilnicima u Republici Hrvatskoj, a same analize provedene su u laboratoriju Zavoda za javno zdravstvo Koprivničko-križevačke županije. Od 6 uzoraka pitke vode, 50%, tj. 3 uzorka su odgovarala parametrima zadanim pravilnicima i zakonima, dok su preostala 3 imala povišene udjele određenih bakterija. Jedan uzorak sadržavao je prevelike količine koliformnih bakterija, odnosno, prema važećem zakonu u vodi se ne smije pojaviti niti jedna kolonija koliformnih bakterija. Drugi neodgovarajući uzorak sadržavao je povišene količine bakterijskih kolonija naraslih na 22°C što je vjerojatno rezultat ustajale vode i bakterija koje su se nakupile u cijevi, a ne onih koje se nalaze u vodi. Treći neodgovarajući uzorak sadržavao je povišene količine bakterijskih kolonija naraslih na 22°C i 36°C. Ostali uzorci pitkih voda bili su odgovarajući sa nekoliko naraslih bakterijskih kolonija na 22°C ili 36°C koje su još uvijek unutar granica. Kod uzoraka površinskih voda najgore mikrobiološke čistoće bila je rijeka Bednja dok su ostali uzroci površinskih voda uzeti na potoku Črncu i rijekama Dravi i Plitvici dali vrlo dobre i zadovoljavajuće rezultate, no svejedno je u njima prisutna u malim količinama *E. coli*.

Ključne riječi: voda, zdravstveno ispravna voda, mikrobiološka ispitivanja, površinske vode

Abstract

Water is liquid which can be found anywhere around us in any moment and any form. It is difficult to provide healthy (physical-chemical and microbiological) water for all people in the world, partly because of small amounts of healthy drinking water, partly because of the development or lack of development and pollution in certain countries. The biggest task today, for all of us, is maintaining healthy water, as well as keeping our waters clean and unpolluted.

In this paper, 10 water samples were analysed, of which 6 were drinking water samples and 4 were surface water samples. Microbiological tests of all samples were carried out in accordance with competent laws and regulations in the Republic of Croatia, and the analyses themselves were carried out in the laboratory of the Institute of Public Health of Koprivničko-križevačka County. Out of 6 samples of drinking water, 50% of samples corresponded to the parameters set by regulations and laws, while the remaining 3 had elevated proportions of certain bacteria. One sample contained excessive amount of coliform bacteria, which according to law, is defective sample, because, if even one colony of coliform bacteria appears, that water should not be used for drinking. Second defective sample contained elevated amounts of bacterial colonies grown at 22°C, which is likely the result of stagnant water and bacteria who settled in the pipe rather than those found in the water. Third defective sample contained elevated amounts of bacterial colonies grown at 22°C and 36°C. Other drinking water samples were adequate with few bacterial colonies growing at 22°C or 36°C still within limits. In surface water samples, one with worst microbiological purity was the river Bednja, while the other samples of surface water taken from the stream Črnc and rivers Drava and Plitvica gave very good and satisfactory results, but *E. coli* was still present in them in small amounts.

Key words: water, healthy drinking water, microbiological tests, surface waters

Popis korištenih kratica

WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (<i>eng. World Health Organization</i>)
MPN	Najvjerojatniji broj (<i>eng. Most Probable Number</i>)
MDK	Maksimalna dopuštena količina
ETEC	Enterotoksigena <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropatogena <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvazivna <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohemoragična <i>E. coli</i>
bik	Broj izraslih kolonija
CCA	<i>eng. Chromogenic Coliform agar</i> ; hranjiva podloga za dokazivanje <i>E.coli</i> i ukupnih koliforma
SBA	<i>eng. Slantex i Bartley</i> ; hranjiva podloga za uzgoj enterokoka
PSA	Hranjiva podloga za uzgoj bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
YEA	<i>eng. Yeast extract agar</i> ; hranjiva podloga za uzgoj mikroorganizama
ONPG	orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid
BEA	Žučni-eskulin-azid agar
ml	Mililitar

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Voda	2
2.1. Voda za ljudsku potrošnju	3
2.2. Vrste onečišćenja voda.....	5
3. Mikroorganizmi u vodi.....	6
3.1. <i>Escherichia coli</i>	8
3.2. Ukupni koliformi.....	10
3.3. Enterokoki	10
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
4. Materijali i metode.....	12
4.1. Sukladnosti s važećim pravilnicima i zakonima.....	12
4.2. Uzorkovanje.....	14
4.2.1. Postupak uzimanja uzoraka vode iz slavine	15
4.2.2. Postupak uzimanja uzoraka površinskih voda.....	16
4.3. Membranska filtracija	16
4.4. Određivanje broja bakterijskih kolonija na 22°C i 36°C.....	19
4.5. Colilert metoda dokazivanja koliformnih bakterija i <i>E. coli</i>	20
4.6. Mikrobiološke analize za površinske vode.....	24
5. Rezultati i diskusija.....	25
5.1. Analiza uzoraka vode iz izvora pitke vode	27
5.2. Analiza uzoraka vode iz kućnih slavina	28
5.3. Analiza uzoraka vode podzemnih voda.....	31
6. Zaključak.....	33
7. Literatura.....	34
8. Popis slika	36
9. Popis tablica.....	37

1. Uvod

Ljudski organizam duže može opstati bez hrane negoli vode. Voda je toliko jednostavna molekula, a opet neopisivo važna za svaki organizam na ovom svijetu. Ljudski organizam je i sam većim dijelom izgrađen od vode. Voda se iz našeg organizma svakodnevno izlučuje, kroz mokraću, izmet, kod disanja, znojenja i sl., u velikim količinama, pa ju je stoga i potrebno nadoknaditi. Jedan i najvažniji način nadoknađivanja vode je i pijenje zdravstveno ispravne vode. Ta voda mora biti čista i zdrava, te na ni koji način ne smije naštetiti ljudskom zdravlju [1]. Naselja su okružena raznim vrstama potoka i rijeka koje se nažalost svakodnevno onečišćuju od strane ljudi ili drugih životinja, pri čemu se ne razmišlja da će možda ta ista voda u jednom trenu završiti i kod nas u domu, preko javnog vodovoda. Voda koju mi puštamo kroz našu slavinu, prije pročišćavanja možda je tekla u nekoj okolnoj rijeci.

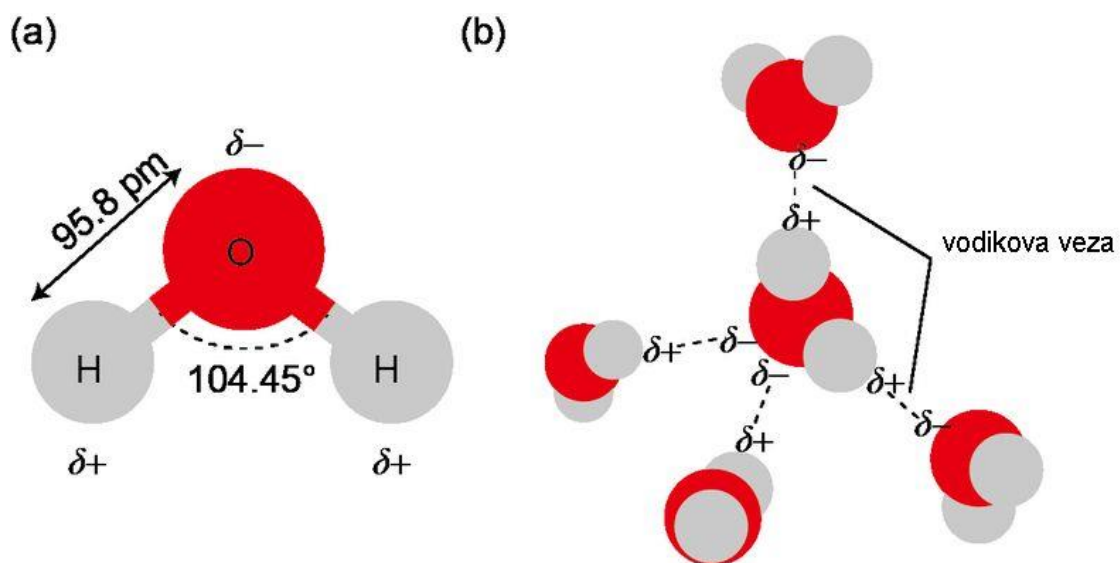
Svrha pročišćavanja voda je u prvom redu omogućiti ljudima zdravstveno ispravnu vodu za piće. Vode su često onečišćene fizikalnim, kemijskim i mikrobiološkim kontaminantima, od kojih su fekalni mikroorganizmi naročito nepoželjni u našoj vodi za piće. No, i nakon pročišćavanja vode, može se desiti da određene bakterije prežive ili da se voda naknadno zagadi križnom kontaminacijom.

U ovom radu izneseni su rezultati analiza 6 uzoraka vode za piće sa različitih mjesta, te 4 uzoraka okolnih površinskih voda iz obližnjih potoka ili rijeka. Uzorci vode uzeti su na području Varaždinske i Koprivničko-križevačke županije. Uzorci su analizirani u skladu s važećim zakonima i pravilnicima.

2. Voda

Voda je tekućina koja nam je potrebna kroz cijeli život. Bez vode ne možemo živjeti i bez vode ne bi postojalo ništa na Zemlji. Voda je potrebna svakom organizmu na svijetu kako bi on mogao normalno funkcionirati, razvijati se i uopće opstati u svojem staništu. U njoj se odvijaju razne reakcije i otapaju sve tvari koje unosimo u organizam.

Voda se u prirodi pojavljuje u tri agregatna stanja koja najviše ovise o temperaturi okoline. Tri agregatna stanja u kojima pronalazimo vodu su kruto, tekuće i plinovito stanje. To je anorganska tekućina koja je u svojem prirodnom obliku bez boje, okusa i mirisa. Udio vode u ljudskom organizmu iznosi između 68-75% od ukupne težine ljudskog tijela [1] što nam i samo govori koliko je voda važna za nas i normalno odvijanje svih funkcija u našem organizmu. U vodi počinje život i pomoću vode se održava život. U bilo kojem vodenom okolišu najviše je molekula vode, no u njoj se nalaze u manjim udjelima i druge tvari i spojevi koji ovise o vrsti vode i kvaliteti vode, ali i o tome koju namjenu voda ima, tj. za što se koristi. [2]



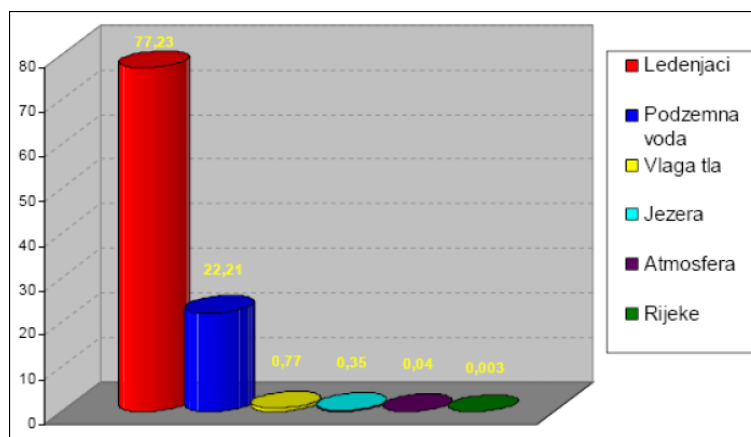
Slika 2.1. a) molekula vode s označenom duljinom veze i kutom između atoma u molekuli vode, b) prikaz vodikove veze

2.1. Voda za ljudsku potrošnju

Prema „Zakonu o vodi za ljudsku potrošnju“ (NN 16/20) [3]: „Voda namijenjena za ljudsku potrošnju je sva voda koja je u svojem izvornom stanju ili nakon obrade namijenjena za piće, kuhanje, pripremu hrane ili druge potrebe kućanstva, neovisno o njezinom porijeklu te neovisno o tome potječe li iz sustava javne vodoopskrbe, iz cisterni ili iz boca odnosno posuda za vodu“ [3], ali i prema istome „Zakonu o vodi za ljudsku potrošnju“ (NN 16/20) [3]: „voda za ljudsku potrošnju je sva voda koja se rabi u industrijama za proizvodnju hrane u svrhu proizvodnje, obrade, očuvanja ili stavljanja na tržište proizvoda ili tvari namijenjenih za ljudsku potrošnju, osim ako nadležno tijelo ne utvrdi da kakvoća vode ne može utjecati na zdravstvenu ispravnost hrane u njezinom konačnom obliku“ [3]. Voda koju mi pijemo ne smije biti zagađena raznim tvarima koje bi štetno utjecale na naše zdravlje, ne smije biti onečišćena i sadržavati mikroorganizme koji bi kod čovjeka mogli uzrokovati razna oboljenja ili tegobe. Voda koja se ispušta u vodotoke mora biti očišćena od fizičkih i bioloških onečišćenja i ne smije biti opasna za okoliš. Voda koju mi pijemo je slatkovodna voda i ona mora zadovoljavati uvjete donesene važećim „Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju“ (NN 16/20) [3] i „Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe“ (NN 125/2017) [14] kako bi ju mi mogli konzumirati. Također, voda koju mi pijemo je i voda koja se koristi u industrijama za proizvodnju različitih proizvoda, pri tome misleći na prehrambene industrije. Voda koja se koristi za proizvodnju prehrambenih proizvoda mora zadovoljavati iste uvjete kao i ona koju pijemo iz slavine kod kuće.

Količina nama dostupne pitke vode s vremenom se smanjuje jer je sve više ljudi na svijetu, a time su i sve veće potrebe za pitkom vodom. Slatkovodna voda se ne koristi samo izravno za piće, ona se koristi i u raznim industrijama, bilo prehrambenim ili ne prehrambenim, a nakon korištenja se vraća u prirodu ukoliko nije uklopljena u proizvod. Nakon što je korištena u bilo kakvoj industriji, voda više ne izlazi iste čistoće iz industrije s obzirom na to s kojom čistoćom je ušla u proizvodnju. Industrije moraju otpadne vode pročititi prije ispuštanja u prirodu, no često se puta dešava da se ona vraća u prirodu obogaćena teškim metalima, opasnim kemikalijama, ali i u prirodu dolazi otpadna kanalizacijska voda koja, naravno, ne može biti pitka ukoliko se na određene načine ne pročisti [4].

Zbog smanjenja količine pitke vode, moramo zaštititi vodu od onečišćenja. Ukoliko se voda ne bi pročišćavala i ukoliko se ne bi pazilo na onečišćenja, ubrzo bi nestalo pitke vode. Na svijetu je zapravo mnogo vode, no problem je da nije sva pitka ili nam je nedostupna. Procjenjuje se da na zemlji ima oko $1,4 \cdot 10^9 \text{ km}^3$ vode. Od toga, udio slane vode iznosi 97% dok je 2% vode „zarobljeno“ u ledenjacima na polovima [5]. Od ukupne količine slatke vode na zemlji (Slika 2.2.) može se koristiti samo 1% te vode jer je ona u ledenjacima nama nedostupna za korištenje [5].



Slika 2.2. Udio i raspored slatke vode na Zemlji [5]

„Zakonom o vodama“ propisano je da se vode moraju zaštititi od onečišćenja zbog (NN 153/2009): „očuvanja života i zdravlja ljudi, zaštite vodnih ekosustava i drugih o vodi ovisnih ekosustava, zaštite prirode, smanjenja onečišćenja i sprječavanja daljnjeg pogoršanja stanja voda, omogućavanja neškodljivog i nesmetanog korištenja voda za različite namijene“ [6]. Danas se tehnologija pročišćavanja voda sve više i više unaprjeđuje, ali i zahtjevi za kakvoću otpadnih voda postaju sve stroži i stroži. Količina dostupne pitke vode nama ljudima nije ista u svim zemljama svijeta. Na našem području količina pitke vode je velika, točnije za Hrvatsku iznosi otprilike 5300 m^3 po stanovniku, što je zapravo i više nego dovoljno za naše potrebe [5]. S obzirom na dostupnost pitke vode, Hrvatska se uvrštava u 30 zemalja bogatih pitkom vodom [7]. Obično se problem nedostatka pitke vode veže i s veličinom populacije u nekoj zemlji. Tako u zemljama koje imaju više stanovnika, imaju i manje dostupne pitke vode. Osim toga, nedostatak pitke vode povezan je i s onečišćenjima vode koja su s vremenom sve veća i veća. Postoji i mogućnost, ukoliko se onečišćenja voda ne smanje, da može doći do nestašice pitke vode i u više zemalja svijeta.

Vode koje teku našim vodovodima su vode zahvaćene iz podzemnih ili površinskih voda. Sva voda koja teče našim vodovodima mora biti zdravstveno ispravna i odgovarati navedenim granicama u pravilnicima i zakonima. Kemijska i mikrobiološka čistoća vode ispituje se redovito, a u Hrvatskoj ih provodi Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Ukoliko se desi da ispravnost vode nije sukladna zakonu i pravilnicima, o tome se obavještava stanovništvo sve do kad se opet ne uspostavi redovno stanje voda, unutar granica dozvoljenih parametara propisanih pravilnikom [7].

2.2. Vrste onečišćenja voda

U raznim industrijama voda se koristi za različite namijene. U prehrambenoj industriji voda se koristi kao procesna voda, voda za hlađenje i voda za kondenzatore [5]. Kao i u svakoj drugoj industriji i u prehrambenoj se koriste određene kemikalije, naravno, u dozvoljenim količinama i ne smiju zaostati u hrani. Te kemikalije mogu završiti u vodi koja se koristi u procesu proizvodnje, pri čemu se ta voda onečišćuje i takva ne smije dospjeti u prirodu, tj. nazad u vodotoke. U vodi koja se koristi u prehrambenoj industriji ne moraju se pojaviti samo otrovne kemikalije. U nekim prehrambenim industrijama, u vodi, mogu se pojaviti i amonijak, saharoza, masnoće kod prerade mesa ili drugih sirovina koje sadrže velike količine masnoće ili nekakva vapna koja se dodaju u vodu kod prerade sokova kako bi se smanjila tvrdoća vode i smanjio njezin alkalitet što nisu prirodni sastojci vode i u prirodi se smatraju zagađivačima [5].

Mikroorganizmi koji su prisutni u vodi, u određenim uvjetima mogu biti zagađivači. Oni su biološki zagađivači i u određenim uvjetima mogu uzrokovati različita oboljenja kod ljudi i životinja. Posebno su opasni fekalni mikroorganizmi koji uzrokuju razne crijevne tegobe ukoliko se konzumira voda u kojima su prisutni ti mikroorganizmi. Bilo koja tvar u prirodi može biti zagađivač, ukoliko se nalazi ili u prevelikim količinama ili u određenim uvjetima. Tako npr. imamo fosfor koji je u prirodi, ali i u vodi vrlo važan za rast organizama. Ukoliko se fosfor na određenom mjestu nalazi u prevelikim količinama, kod vodenih organizama može prouzročiti eutrofikaciju [8], tj. starenje vodenih ekosustava. Navedeni proces zapravo traje tisućama godina, no pod našim utjecajem može se skratiti i na nekoliko godina [9].

3. Mikroorganizmi u vodi

Ljudi su svakim danom konstantno izloženi raznim mikroorganizmima od kojih je mali broj njih sposoban za stvaranje nekakve interakcije koja bi rezultirala infekcijom ili bolesti. Mikroorganizmi koji uzrokuju bolesti nazivaju se patogenim mikroorganizmima, a infekcije su procesi u kojima se mikroorganizmi umnožavaju i rastu unutar nekog domaćina [10]. Mikroorganizme možemo pronaći i u pitkoj vodi. Pitka voda ne mora nužno biti sterilna voda. U pitkoj vodi moguće je pronaći neke vrste mikroorganizama koji u određenom broju ne moraju štetiti ljudima i njihovom zdravlju. Zato je pravilnicima i zakonom propisano koliko i kojih se mikroorganizama može nalaziti u pitkoj vodi koja je namijenjena za ljudsku konzumaciju. No, ukoliko mi konzumiramo vodu u kojoj se nalaze patogeni mikroorganizmi, da bi oni prouzročili bolest, mikroorganizmi prvo moraju narasti i razmnožiti se unutar domaćina. Vrijeme koje je potrebno da se pojave prvi znaci bolesti nakon infekcije naziva se vrijeme inkubacije. Vrijeme inkubacije je kada se mikroorganizmi prilagođavaju uvjetima u kojima su se nastanili te polako počinju rasti i razmnožavati se. Vrijeme inkubacije različito je za svaki mikroorganizam, te može biti od 6-12 sati, pa sve do 30-60 dana [10].

Prema „Zakonu o vodi za ljudsku potrošnju“ (NN 16/20) zdravstveno ispravnom vodom za piće smatramo vodu koja u sebi ne sadrži mikroorganizme iznad granica dozvoljenih pravilnikom i zakonom, ne sadrži nikakve parazite, fizička ni kemijska onečišćenja te ju ljudi mogu bez problema konzumirati, a da pritom ne dobe razna crijevna i druga oboljenja [3]. Bez obzira na redovita ispitivanja i načine pročišćavanja koji se provode, uvijek postoji mogućnost da se na nekom određenom mjestu voda kontaminira. Ta mjesta nazivaju se izvori onečišćenja, a oni mogu biti [11]:

- izvor pitke vode,
- neadekvatan tretman u postrojenju za pročišćavanje vode,
- sustav distribucije vode,
- razvoj biofilma koji može promijeniti kvalitetu vode.

Mikroorganizmi su u vodi, kao i u svim ostalim mjestima u prirodi, normalno prisutni. Na ponekim mjestima su prisutni u većim količinama, dok ih na drugim mjestima ima manje. Njihova pojava ovisi o uvjetima neke sredine. Nekim mikroorganizmima bolje odgovaraju toplije temperature, nekima hladnije, nekima bolje odgovara vlažno područje, dok drugi mikroorganizmi bolje rastu i razvijaju se na sušim mjestima. Rast mikroorganizama ovisi o raznim čimbenicima, te se neće nastaniti na mjestima koja nisu pogodna za njihov

metabolizam. Mikrobiološka ispravnost tekućih voda se u današnje vrijeme vrlo teško postiže jer ljudi u potoke i rijeke koji se nalaze oko sela, koja se još aktivno bave poljoprivredom i drugim sličnim djelatnostima, a nemaju sustav kanalizacije, ispuštaju otpadne vode iz septičkih jama ili nekih svojih domaćih komposta, pri čemu ta voda nije ni na koji način tretirana bilo kakvim sredstvom za pročišćavanje. Time se ta voda onečišćuje ponajprije fekalnim mikroorganizmima, a dalje se ta voda iz potoka ulijeva u druge potoke, rijeke ili jezera koji dolaze i do vodocrpilišta, a isto tako dolazi i do polja koja se nalaze oko tih potoka i rijeka, a na kojima se uzgajaju npr. žitarice koje će se kasnije koristiti za proizvodnju prehrambenih proizvoda.

Mikroorganizme ne možemo vidjeti golim okom pa su laboratorijske analize nužne za dokazivanje zdravstvene ispravnosti vode za piće i ocjene čistoće površinskih voda. Naizgled čista voda bez nekakvih stranih onečišćenja kao što su razne vrste otpadne plastike ili bilo kakvog smeća koje prouzroči čovjek, ne mora značiti da voda zapravo nije zagađena mikroorganizmima.

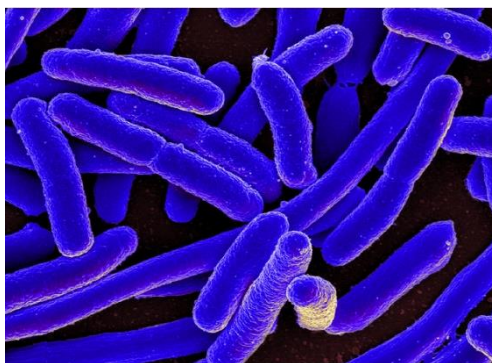
Dosta mikroorganizama, koji se nalaze u vodi, cijeli život uglavnom provedu u vodenom okruženju i samo slučajno naiđu na domaćina u ili na kojem se mogu nastaniti. Oni su se dobro prilagodili vodenom okolišu sa malim koncentracijama nutrijenata i slabim fizičkim, biološkim i kemijskim interakcijama [12]. Mikroorganizmi u vodi mogu izazvati razna oboljenja i bolesti što je prvi i glavni razlog mikrobioloških ispitivanja vode. Iako živimo u naprednim vremenima gdje se lako pronalaze rješenja za različite probleme, problem dostupnosti pitke vode svim ljudima na svijetu još je uvijek teško osigurati. Mikrobiološke analize i rutinske mikrobiološke provjere vode trebale bi biti svakodnevica na cijelom svijetu [13]. Mikrobiološka ispitivanja vode koja se uglavnom provode po akreditiranim laboratorijima, najvećim dijelom su fokusirana na fekalne bakterije i fekalno zagađenje. Nama najpoznatija bakterija fekalnog onečišćenja u vodama, a i drugim raznim medijima, je *Escherichia coli*. Prema „Pravilniku o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe“ (NN 125/2017) broj izraslih kolonija *E. coli* u uzorku od 250 ml vode mora biti jednak nuli. *E. coli* u pitkoj vodi ne smije biti prisutna [14]. Fekalne bakterije, unesene u organizam, mogu uzrokovati oboljenja, npr. dijarealne bolesti od kojih svake godine umire 1.5 miliona djece koja nemaju pristup pitkoj i čistoj vodi [13]. Osim toga, prema podacima WHO-a, svake godine 5 miliona ljudi umire od bolesti prenošenih vodom, odnosno infekcija nastalih zbog konzumacije ne pitke vode, od

čega je više od 50% slučajeva povezano sa mikrobnim kontaminacijama vode, od kojih je na prvom mjestu kolera [13].

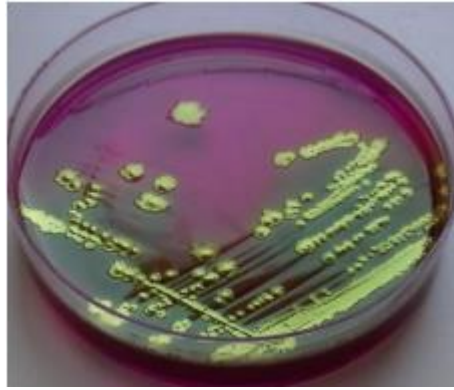
3.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli je bakterija koja se normalno nalazi u crijevima ljudi i u njima obavlja određenu funkciju kod probave hrane. Obično je pojava ove bakterije u nekom mediju znak da je u blizini fekalna kontaminacija. Ukoliko se radi o vodi kao mediju u kojem je pronađena *E. coli*, postoji velika mogućnost da se u blizini izliva kanalizacija ili otpadna voda iz septičkih jama. Zato se i *E. coli* također naziva i indikatorom fekalne kontaminacije. Osim *E. coli*, kao indikatori fekalne kontaminacije koriste se i ukupni koliformi, enterokoki i fekalni enterokoki.

E. coli je gram-negativna bakterija, štapićastog oblika i spada u skupinu *Enterobacteriaceae* [15]. Okružena je bičevima (flagelama) i većinom je pokretna bakterija. Najčešće se uzgaja na Endo agaru gdje uzrokuje kolonije metalnog sjaja (Slika 3.2.). Primarna funkcija *E. coli* u probavnom traktu ljudi je u održavanju normalnog funkcioniranja crijeva. *E. coli* je bakterija koja za preživljavanje zahtijeva jednostavne izvore ugljika i dušika uz fosfor, sumpor i ostale elemente u tragovima [15]. Također, ona može rasti i u aerobnim i anaerobnim uvjetima [15]. Optimalna temperatura za rast bakterije je 37°C, što znači da je ona mezofilna bakterija, no može rasti u rasponu temperatura od 7,5 do 49°C [15], no, ugiba na temperaturama od 60°C. *E. coli* se vrlo rijetko pojavljuje u vodovodnoj vodi, odnosno, u vodi koju pijemo kod kuće iz slavine. No, češće se javlja u rijekama ili potocima, ali i obično na mjestima koja ljudi koriste kao kupališta. *E. coli* u vodi obično ostaje između 4 i 12 tjedana [13].



Slika 3.1. *E. coli* pod elektronskim mikroskopom



Slika 3.2. Izrasle kolonije *E. coli* na Endo agaru

E. coli je u većini uvjeta bezopasna bakterija, kao što je to npr. u crijevima ljudi i toplokrvnih životinja gdje je ona normalni stanovnik. No, postoje i one vrste koje su patogene i koje mogu uzrokovati gastroenteritis. Neke od njih su enterotoksigena *E. coli* (ETEC), enteropatogena *E. coli* (EPEC), enteroinvazivna *E. coli* (EIEC) i enterohemoragična *E. coli* (EHEC) [10]. One su razvrstane po svojim sposobnostima preživljavanja i patogenosti, fenotipskim obilježjima, načinu reagiranja na različite antibiotike ili sposobnosti razgradnje ugljika [10, 13, 15]. Sve vrste *E. coli* prenose se fekalno-oralnim putem transmisije. Među ovim vrstama, neke od njih mogu se češće, a neke rjeđe pojavljivati u prirodi. Većina istraživanja dokazuje kako se EPEC vrsta *E. coli* najčešće pojavljuje u prirodi [15]. Razlog tomu je da EPEC vrste kao domaćina, većinom imaju ljude ili životinje koje tu bakteriju prenose.

Zaraza ETEC vrstom *E. coli* je česta pojava kod osoba koje putuju u nerazvijenije zemlje, te se dosta često javlja kod djece, u nerazvijenijim zemljama [10]. Također, ova vrsta uz dijareju može izazvati i gastroenteritis. Često se javlja u zemljama koje nemaju adekvatnu čistu pitku vodu sa čime se povezuje i loša higijena. Obično simptomi zaraze traju nekoliko dana i praćeni su uz grčeve u trbuhu, dijareju i povraćanje [13]. Zaraza ovom vrstom bakterije je česta kod male djece. Obično se prenosi preko kontaminirane hrane ili vode i uzrokuje dijareju što dovodi do dehidracije i pothranjenosti kod male djece [13].

EHEC vrsta *E. coli* se ne javlja toliko često kao problem konzumacije kontaminirane vode. Ova vrsta bakterije više se pojavljuje kod konzumacije sirove, nedovoljno obrađene hrane ili svježeg neobrađenog mlijeka [13]. Prijenos se često dešava sa osobe na osobu, ali postoje i slučajevi kada ljudi nisu imali nikakve simptome zaraze EHEC vrstom, ali su ju prenijeli na druge osobe. EHEC vrsta proizvodi dvije vrste toksina, verotoksin I i II [10]. Kao

i sve vrste, i ova vrsta uzrokuje određene probleme kod osobe koja je zaražena. Simptomi zaraze su grčevi i dijareja, no često dolazi do pojave krvi u stolici [10, 13].

EIEC vrsta *E. coli* javlja se kao zaraza kod konzumacije i kontaminirane vode, ali i kod konzumacije kontaminirane hrane [13]. Bolest obično traje otprilike osam dana i pojavljuje se uz abdominalne grčeve, vodenaste stolice i groznicu [10].

3.2. Ukupni koliformi

Koliformne bakterije su normalni stanovnici crijeva i probavnog sustava ljudi i toplokrvnih životinja. One su primarno nepatogene bakterije koje štite naša crijeva od infekcija te služe za normalan rad crijeva i normalnu probavu hrane. Ove bakterije ljudi izlučuju preko stolice, te kasnije preko otpadnih voda one dospijevaju u prirodu. Koliformne bakterije se kao indikatori fekalne kontaminacije uvode na prijelazu iz 19. na 20. stoljeće [13].

Ukupni koliformi su gram negativne štapićaste bakterije koje fermentiraju laktozu i stvaraju kiseline ili aldehide unutar 24 sata na temperaturama od 35-37°C [17, 19]. U koliformne bakterije ubrajamo *E. coli* koja čini ukupno 90% populacije fekalnih koliforma, *Citrobacter*, *Enterobacter* i *Klebsiella* [17, 18]. Ove četiri bakterije daju pozitivnu reakciju kod ispitivanja fekalnog zagađenja vode. One se nazivaju indikatori fekalne kontaminacije jer služe za dokazivanje fekalnog zagađenja vode. Ove bakterije, moguće je pronaći i u otpadnim i tzv. pročišćenim vodama i zato ukupni koliformi ne moraju uvijek značiti i fekalnu kontaminaciju. Koliformne bakterije dijele se u dvije skupine, ukupne i fekalne koliforme. Ove dvije skupine dijele se s obzirom na brzinu rasta pri različitoj temperaturi [17]. Fekalne koliformne bakterije toleriraju više temperature i uzgajaju se na 44,5°C, dok se ukupne koliformne bakterije uzgajaju pri 35°C [18]. Ukupni koliformi se uglavnom lako izoliraju i mogu identificirati zbog toga jer se kod fekalne kontaminacije vode, ili bilo kojeg drugog medija, nalaze u visokim koncentracijama. Ukoliko se koliformi pronađu u vodi one mogu također i ukazati na mogućnost stvaranja biofilma u sistemu distribucije vode.

3.3. Enterokoki

Enterokoki su gram-pozitivne, okrugle malo jajolikog oblika, fakultativno anaerobne bakterije, iako više preferiraju anaerobne uvjete, ne tvore spore i obično se nalaze same, u

parovima ili kratkim lancima. Optimalna temperatura rasta ovih bakterija je od 35-37°C [13] što znači da su mezofili. Neki rastu i na višim temperaturama ili čak na nižim od otprilike 10°C [13]. Enterokoki se javljaju u različitim vrstama hrane, ali najviše u hrani životinjskog porijekla. Oni se ne smatraju uvijek kontaminantima jer u nekim vrstama hrane stvaraju posebnu aromu, npr. kod fermentiranih kobasica ili nekih vrsta sireva [13]. Enterokoki se još nazivaju i fekalnim streptokokima. Do 1984. godine, enterokoki su spadali u grupu streptokoka, no izdvojeni su kao zasebni zbog toga jer su otporniji na fizikalne i kemijske agense kojima su izloženi [20]. Ove bakterije zapravo čine grupu od ukupno 16 vrsta bakterija roda *Enterococcus* [4].

Optimalan pH za rast enterokoka iznosi 9,6 i mogu preživjeti na 60°C otprilike 30-ak minuta [20]. Enterokoki su bakterije koje se isto nalaze u probavnom sustavu ljudi i pomažu u probavi i drugim metaboličkim putevima u crijevima. Neke vrste se čak dodaju i u probiotike i služe za liječenje dijareje i pomažu u podizanju imuniteta [20]. Oni nisu normalni stanovnici u prirodi, tj. u okolišu, ali ukoliko su detektirani u okolišu, obično su rezultat fekalnog zagađenja [13]. Enterokoki se u velikom broju nalaze u vodama iz kanalizacije i otpadnim vodama koje su zagađene otpadom ljudi ili životinja [19].

2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je najvažniji oportunistički patogen u rodu *Pseudomonas*. On se smatra bolničkim patogenom jer je odgovoran za 9,9% bolničkih infekcija [10]. Istraživanja dokazuju kako se *P. aeruginosa* javlja u 2% slučajeva u flaširanoj vodi i 2-3% slučajeva u vodi iz slavine [10], no ove bakterije su zapravo normalni stanovnici voda [18], a uglavnom ukazuju na prisustvo stare vode.

P. aeruginosa je gram-negativna štapičasta bakterija. Obično izaziva pulmološke infekcije koje mogu biti i ozbiljnije za osobe slabijeg imuniteta. Ovu bakteriju se može pronaći u izmetu, tlu, vodi ili kanalizaciji, tj. otpadnim vodama. Može se nastaniti i rasprostranjivati u vodenom okolišu, ali i na tlu gdje ima dovoljne količine hranjivih tvari [19]. Zaraza ovom bakterijom češće će se javiti u bolnici nego preko pitke vode jer je jako osjetljiva na dezinfekciju vode.

4. Materijali i metode

Zdravstvena ispravnost vode za piće ispituje se prema analizama navedenim u pravilnicima i zakonima. Ukoliko nije u skladu s granicama navedenim u „Pravilniku o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe“, ne preporuča se konzumacija. Mikrobiološki pokazatelji zdravstvene ispravnosti vode, određeni „Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe“, su: *Escherichia coli*, enterokoki, broj kolonija na 22°C i 36°C, ukupni koliformi i *Pseudomonas aeruginosa*. Metode uzgoja i identifikacije mikroorganizama moraju se provesti u sterilnom prostoru bez mogućnosti naknadne kontaminacije uzoraka kako bi se dobili važeći rezultati. Osim analiza, također, i uzorkovanje se mora provoditi prema pravilima jer pogrešno uzorkovani uzorci ne daju ispravne rezultate. Metode kojima se određuju ukupni koliformi obično su test određivanja najvjerojatnijeg broja mikroorganizama korištenjem više epruveta, koja se koristi za jako zagađene vode, i metoda membranske filtracije koja se koristi za manja ili jako mala zagađenja vode [13]. Metoda membranske filtracije je vrlo osjetljiva metoda kojom se može detektirati i jedna jedina stanica u 500 ili 1000 ml uzorka vode [13]. Za obje metode je potrebno nekoliko dana provođenja da bi se dobili rezultati ispitivanja.

Analize vode za ljudsku potrošnju, kao i analize površinskih voda, provodi nadležni Zavod za javno zdravstvo. Analize vode provode se na uzorcima vode iz javne vodoopskrbe, ali i uzorcima vode iz individualne vodoopskrbe ukoliko netko koristi vodu iz bunara ili na neki drugi način dolazi do pitke vode. Ispitivanja zdravstvene ispravnosti vode provode se sukladno važećim zakonima i pravilnicima u kojima su jasno naznačeni parametri koje voda mora zadovoljavati. Također, učestalost uzimanja uzoraka i provođenja analiza utvrđena je istim zakonima i pravilnicima [21], no moguće su i češće analize koje svatko od korisnika može zatražiti u bilo koje vrijeme.

4.1. Sukladnosti s važećim pravilnicima i zakonima

Mikrobiološke analize provode se u skladu s važećim „Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju

te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe“ (NN 125/2017), „Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju“ (NN 16/20) i „Zakonom o vodama“ (NN 66/2019) te „Uredbom o standardu kakvoće vode“ (NN 96/2019). Nadležni dokumenti jasno određuju analize koje je potrebno provesti na dobivenim uzorcima, te koje su dopuštene granice mikroorganizama u ispitivanoj vodi. Također, određuju prisutnost kojih mikroorganizama je potrebno ispitati, ali i granice u kojima se oni mogu pojaviti. Nakon analize, rezultati se zapisuju na radni nalog te se donosi zaključak da li uzorak analizirane vode odgovara ili ne odgovara nadležnim dokumentima i zahtjevima iz istih. Prema NN 125/2017 i NN 16/20 zahtjevi za mikrobiološkom čistoćom su slijedeći (Tab. 1.):

Tablica 1. Maksimalne dopuštene količine mikroorganizama u uzorcima vode

Mikrobiološki pokazatelj	Jedinica mjere:	MDK:
<i>Escherichia coli</i>	broj/100 ml	0
Enterokoki	broj/100 ml	0
Broj kolonija na 22°C	broj/1 ml	100
Broj kolonija na 36°C	broj/1 ml	100
Ukupni koliformi	broj/100 ml	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	broj/100 ml	0

Ukoliko uzorak vode nakon analize pokaže vrijednosti maksimalne dopuštene količine mikroorganizama veće od navedenih u tablici 1., voda nije pogodna za piće i ne smije se kao takva konzumirati. Potrebno je pronaći izvor onečišćenja vode, te ga sanirati na odgovarajući način i vodu pročititi kako bi zadovoljavala kriterije određene pravilnicima i zakonima. Ukoliko je voda iz nekog izvor ili bunara, vodu je potrebno prestati konzumirati i koristiti u kućanstvu ili ju na odgovarajuće načine dezinficirati i pročititi kako bi bila pogodna za konzumaciju (npr. prokuhavanjem).

Analize površinskih voda provode se zbog ocjenjivanja njihove kvalitete. Parametri određivanja i ocjene kvalitete površinskih voda isti su kao i kod ocjenjivanja kvalitete voda za kupanje. Uglavnom su dva parametra koja se ispituju u pogledu mikrobiološke kakvoće vode, a to su prisutnost *E. coli* i prisutnost crijevnih enterokoka. U tablici 2. prikazani su zahtjevi za mikrobiološkom kakvoćom površinskih voda.

Tablica 2. Mikrobiološki pokazatelji ocjene kvalitete površinskih voda

Mikrobiološki pokazatelji:	Max. dopuštena vrijednost (bik/100)	
	Izvrсна	Dobra
<i>Escherichia coli</i>	≤500	≤1000
Crijevni enterokoki	≤200	≤400

4.2. Uzorkovanje

Samo uzorkovanje može uvelike utjecati na krajnje rezultate analiza, zbog čega postoje posebna pravila kako se uzorkovanje za mikrobiološku analizu treba provoditi. Uzorkovanje provode stručne osobe zadužene i za provođenje analiza uzoraka. Ukoliko nije moguće da uzorkovanje provodi stručna osoba, tada je važno da osoba koja uzima uzorak za analizu prati dobivene upute. Uzorkovanje vode za mikrobiološka ispitivanja je puno lakše nego što je to za ostale tvari. Ponajprije zbog toga jer je voda u većini slučajeva homogena, jednostavnije se uzima uzorak nego što je to kod npr. mesa ili neke konzervirane hrane, i sl., ali se i daljnje analize puno jednostavnije i lakše provode. Analize za otkrivanje bakterija u vodi se obično baziraju na membranskoj filtraciji i određivanju najvjerojatnijeg broja mikroorganizama (MPN) [22].

Prilikom uzorkovanja vode, potrebno je koristiti sterilne boce i uzeti dovoljnu količinu uzorka potrebnu za provođenje cijele analize. Za potrebe mikrobiološkog ispitivanja vode najčešće se koriste sterilne staklene boce od 500 ml (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Boce za uzorke vode za mikrobiološku analizu

Sa uzorkom vode, ali i bilo kakvim drugim uzorkom hrane ili pića koji se uzima za analizu, potrebno je biti pažljiv i koristiti zaštitnu opremu koja isto mora biti sterilna (tijekom uzorkovanja (rukavice, zaštitu za kosu, kuta, maska)), kako ne bi došlo do križne kontaminacije [23]. Uzeti uzorak mora biti reprezentativan i tijekom njegovog uzimanja, skladištenja i transporta, sastav se ne smije promijeniti. Tijekom uzorkovanja potrebno je paziti da se ne dotiče grlo boce ili unutrašnjost čepa boce kako ne bi došlo do kontaminacije sterilne boce za uzorkovanje vode. Kod uzimanja uzorka potrebno je napraviti i zapisnik o uzetom uzorku.

4.2.1. Postupak uzimanja uzoraka vode iz slavine

Kod uzimanja uzoraka vode iz kućne slavine, iz koje teče voda iz javne vodoopskrbe ili vode koje su klorirane, potrebno je koristiti boce koje u sebi imaju dodan natrijev tiosulfat. Natrijev tiosulfat dodaje se prije sterilizacije boca, a njegova svrha je da eliminira inaktivaciju bakterija klorom koje se nalaze u vodi, ako su prisutne u vodi [23]. Za vode iz slavine koje ne sadrže klor, nije potrebno korištenje boca sa natrijevim tiosulfatom.

Postupak uzorkovanja je slijedeći [24]:

1. prije uzorkovanja potrebno je sa slavine skinuti sve nastavke (mrežica i dr.),
2. pustiti da voda teče 2-3 minute prije uzimanja uzorka kako bi se isprali cjevovodi (zbog ustajale vode),
3. zatvoriti slavinu,
4. dezinficirati otvor slavine:
 - ukoliko je slavina metalna, dezinficira se plamenom (npr. upaljačem),
 - ukoliko je slavina plastična, za dezinfekciju se koristi 5-10%-tna otopina klora ili alkohola, te se njom ispere otvor slavine,
5. pustiti vodu na nekoliko sekundi kako bi se ponovno isprao otvor slavine,
6. napuniti bocu za uzorkovanje do pregiba na početku grla boce; boca se puni izravno ispod slavine.

Kada je uzorkovanje vode završeno, potrebno je bocu zatvoriti da joj se ne dira grlo ili unutrašnjost čepa. Uzorci se dostavljaju odmah nakon uzorkovanja. No, ukoliko nije moguće dostaviti uzorke odmah nakon uzorkovanja, potrebno ih je dostaviti unutar 24 sata, pri čemu je važno uzorke čuvati na hladnom mjestu, otprilike na 4°C.

4.2.2. Postupak uzimanja uzoraka površinskih voda

Postupak uzimanja uzoraka vode za analizu površinskih voda je malo drugačiji nego što je to kod uzimanja uzoraka iz slavine. Uvjeti za dostavu i čuvanje uzoraka prije analize su jednaki kao i za uzorkovanje iz slavine.

Postupak uzorkovanja je slijedeći [24]:

- prilikom uzorkovanja potrebno je obratiti pozornost da se ne dira unutrašnjost čepa boce i da se ne dodiruje grlo boce kako ne bi došlo do kontaminacije sterilnog pribora. Boca se uranja na dubinu od otprilike 20-30 cm ispod površine i ukosi se na način da voda može ulaziti u bocu a da pritom ta voda koja ulazi u bocu ne dodiruje ruku. Boca se također puni do pregiba na početku boce. Razlog uranjanja boce dublje u vodu je taj da se ne zahvati voda sa površine i nečistoće koje se nalaze na površini vode.

Boce s uzorcima dostavljaju se isti dan ili unutar 24 sata od uzimanja uzorka, pri čemu se mora paziti na uvjete u kojima se uzorak čuva do dostave u laboratorij.

4.3. Membranska filtracija

Nakon dopreme uzoraka u laboratorij, potrebno je što je prije moguće započeti analizu uzoraka. Mikrobiološka analiza pitke vode za većinu ispitivanja započinje membranskom filtracijom. Bočice s uzorcima vode je prije analize potrebno dobro promućkati radi homogenizacije.



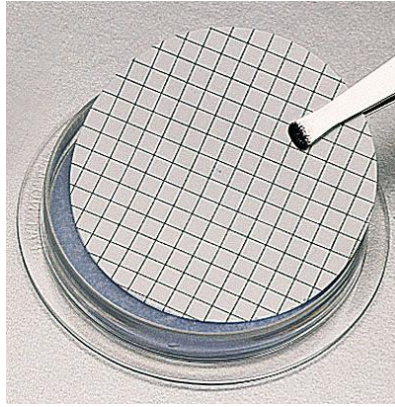
Slika 4.2. Priprema uzoraka vode za mikrobiološku analizu sukladno „Pravilniku o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodopskrbe“

Membranska filtracija se koristi za uzorke koji sadrže male količine suspendirane tvari, kao što je to slučaj sa vodom za ljudsku potrošnju, tj. pitku vodu [25]. Ova metoda zasniva se na tome da se sve prisutne bakterije, iz uzorka vode, skupe na membranski filter. Membranski filter je tanka membrana bez vlakana, veličine pora veće od $0,1 \mu\text{m}$, a na čiju se površinu primjenom vakuuma ili pritiska zadržavaju sve čestice i mikroorganizmi veći od promjera pora membranskog filtera [25]. Sva oprema koja se koristi kod provođenja membranske filtracije mora biti čista i sterilna. Sama aparatura sastoji se od uređaja za filtriranje koji se sastoji od boce za prihvatanje tekućine i vakuumpumpe, zatim membranskog filtera, metalnih lijevaka, pipete, sterilne pincete i Petrijeve zdjelice, koje također moraju biti sterilne i odgovarajuće veličine [25].



Slika 4.3. Uređaj za membransku filtraciju

U lijevke za membransku filtraciju stavi se membranski filter pomoću sterilne pincete na koji se tijekom procesa membranske filtracije ulove sve bakterije veće od promjera membranskog filtera. Membranski filter koji se koristi za ispitivanje vode za ljudsku potrošnju ima promjer pora od $0,45 \mu\text{m}$, a kroz takav filter se može profiltrirati i do nekoliko litara vode. Takav membranski filter koristi se za ispitivanja s visokim stupnjem osjetljivosti [25].



Slika 4.4. Izgled membranskog filtra

Boca za prihvatanje tekućine mora biti priključena na vakuum. Prije pokretanja vakuuma, u lijevke se ulije 20 ml sterilne vode koja služi za ispiranje lijevaka. Nakon toga se uključi vakuum te se kroz lijevke profiltrira 100 ml, prethodno promućkanog, uzorka vode, te se lijevci poklope odgovarajućim poklopcima. Nakon što se uzorak vode profiltrira, dva puta se kroz lijevke propusti po 20 ml sterilne vode. Nakon provedenog postupka isključi se vakuum, te se pomoću sterilne pincete zahvati membranski filter, a zatim se membranski filter položi na hranjivu podlogu, što ovisi o vrsti ispitivanja. Prilikom postavljanja membranskog filtra na hranjivu podlogu, potrebno je paziti da između hranjive podloge i membranskog filtra nema mjehurića zraka. Ukoliko ima mjehurića zraka, membranski filter se pažljivo podigne i vrati na hranjivu podlogu kako bi se maknuli mjehurići zraka. Kod postavljanja membranskog filtra na hranjivu podlogu, važno je da je mrežica, ucrtana na filter, s gornje strane. Ukoliko se lijevak dalje koristi za iste uzorke vode nije ga potrebno dezinficirati, no ukoliko se više ne koriste isti uzorci vode, tada se lijevak dezinficira na plamenu kružnim pokretima kao i prije početka same membranske filtracije.

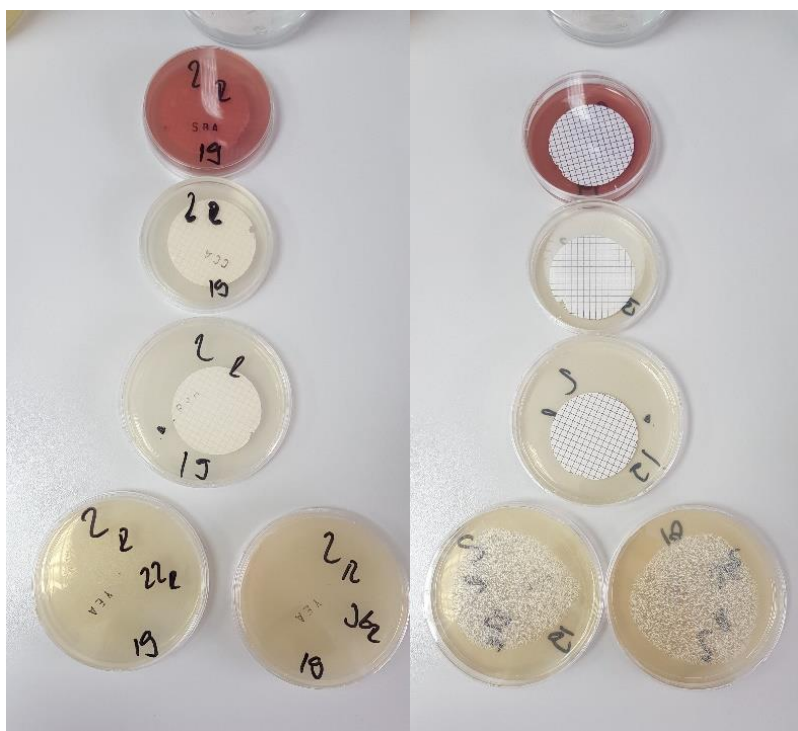
Uspješnost ove metode ovisi o korištenju ispravne hranjive podloge za rast mikroorganizama kako bi se na najlakši način omogućila identifikacija bakterijskih kolonija koje rastu na površini membranskog filtra [26]. Radi dokazivanja *E. coli* i ukupnih koliforma, membranski filter postavlja se na CCA (Chromogenic Coliform agar) hranjivu podlogu, te se inkubacija vrši na 37°C kroz 24 sata. Ukoliko su prisutne bilo koje koliformne bakterije, one izrastu kao crveno-ljubičaste kolonije, ali ponekad se mogu javiti i kao blago roze kolonije [27]. Za određivanje i uzgoj enterokoka koristi se SBA (Slanetz i Bartley medij) hranjiva podloga, te se inkubacija vrši na 37°C kroz 48 sati. Za detekciju i uzgoj bakterije *P. aeruginosa* koristi se PSA hranjiva podloga koja se, nakon naciepljivanja, inkubira na 37°C

kroz 48 sati. Sve nasađene Petrijeve zdjelice inkubiraju se okrenute na poklopac kako kondenzirana tekućina na poklopcu ne bi kapala po hranjivoj podlozi.

4.4. Određivanje broja bakterijskih kolonija na 22°C i 36°C

Za određivanje broja izraslih bakterijskih kolonija na 22°C i 36°C nije potrebno provoditi membransku filtraciju uzorka. Ova metoda koristi se za dokazivanje bakterija u vodama (pitkoj vodi, stolnoj, prirodnoj izvorskoj, prirodnoj mineralnoj, podzemnim vodama, površinskim vodama,...) [28].

Odpipetira se 0,33 ml uzorka ili odgovarajućeg razrjeđenja uzorka na hranjivu podlogu s ekstraktom kvasca, tj. YEA (Yeast Extract Agar) podlogu, u Petrijevoj zdjelici, te se uzorak pažljivo razmaže sterilnim štapićem. Ukoliko se pravi razrjeđenje uzorka, ono se pravi na način da se pomiješa 50 ml sterilne vode i 50 ml uzorka u sterilnu bocu, te se nacijepi na YEA hranjivu podlogu i razmaže sterilnim štapićem. Nanosi se ista količina za svaku Petrijevu zdjelicu. Nasađene hranjive podloge stavljaju se na inkubaciju, okrenute zbog sprječavanja kapanja kondenzirane tekućine na poklopcu Petrijeve zdjelice, na 22°C kroz 72 sata i 36°C kroz 48 sati. Nakon inkubacije broje se sve izrasle kolonije na hranjivoj podlozi. Izbrojeni broj izraslih kolonija pomnoži se s 3 jer se nanosi volumen uzorka 0,33 ml na hranjivu podlogu.

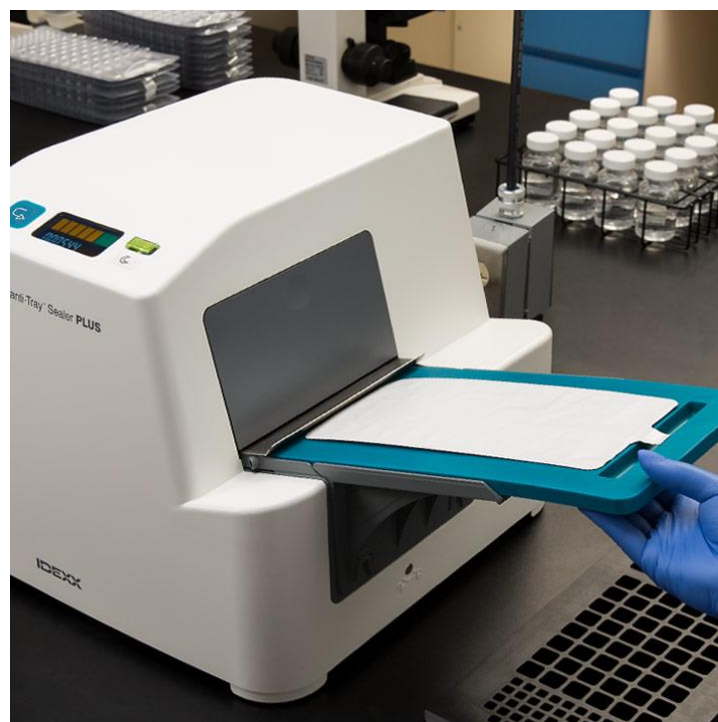


Slika 4.5. Izgled hranjivih podloga (SBA, CCA, PSA, YEA) naci jepljenih sa 0,45 μm filterima koji su se koristili za filtriranje uzoraka vode.

4.5. Colilert metoda dokazivanja koliformnih bakterija i *E. coli*

Colilert metoda služi kao metoda određivanja *E. coli* i koliformnih bakterija u vodi. To je metoda određivanja najvjerojatnijeg broja (MPN) bakterija u vodi pomoću Colilert reagensa [29]. Uz Colilert metodu nije potrebno koristiti druge testove identifikacije kako bi se dokazala prisutnost *E. coli* u uzorcima vode. Također, ova metoda omogućuje brojenje koliformnih bakterija, odnosno, određivanje najvjerojatnijeg broja koliformnih bakterija u uzroku vode. Testovi koji su, do prije pojave Colilert testa, služili za dokazivanje koliformnih bakterija uglavnom su se zasnivali na fermentaciji laktoze i stvaranje kiseline i plina. Colilert test za dokazivanje koliformnih bakterija zasniva se na metaboliziranju orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG) [30]. Ovaj spoj imitira molekulu laktoze, a bakterijska stanica ga cijepa na orto-nitrofenil- β -D-piranozid i on u jažicama Qunati-Tray-a stvara žućkastu boju [30] koja na kraju znači pozitivnu reakciju i prisutnost koliformnih bakterija. Ovim testom moguće je brojati i koliformne bakterija, ali i bakteriju *E. coli*.

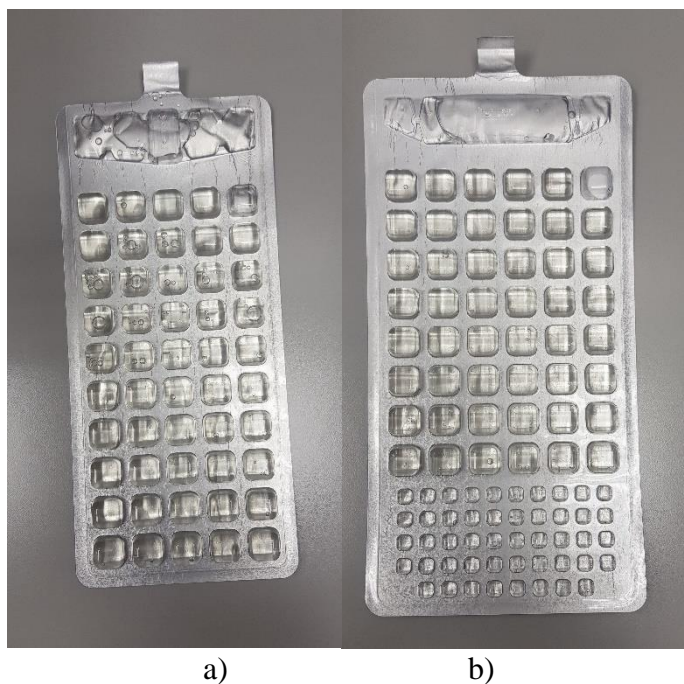
10-15 minuta prije početka rada, potrebno je uključiti Quanti-Tray zavarivač (Slika 4.6.), te se počinje sa radom kada je zavarivač spreman za korištenje. Za analizu je potrebno pripremiti otopinu 100 ml uzorka vode i 100 ml sterilne vode i u nastalu otopinu doda se aseptički dehidriran Colilert reagens (2,6 g) (Slika 4.7.). Otopina se lagano promućka kako bi se Colilert reagens otopio i kako bi nastala homogena smjesa. Kada je uzorak homogeniziran, ulije se u Quanti-Tray ili Quanti-Tray/2000 i lagano se potapša kako bi se uklonili mjehurići zraka koji su zalutali u male jažice. Uzorak je potrebno zavariti, odnosno zalijepiti tzv. vrećicu na način da se stavi na gumeni nastavak na način da su jažice okrenute prema dolje, odnosno, da su naslonjene u predviđene rupice. Kada se Quanti-Tray vrećica dobro smjestila u gumeni nastavak, sve se zajedno postavi na nosač na otvoru uređaja da bi motor uređaja mogao povući vrećicu i provesti kroz uređaj za zavarivanje. Kada Quanti-Tray vrećica izađe zavarena na zadnji dio uređaja, potrebno ju je izvaditi iz gumenog nastavka i stavlja se na inkubaciju kroz 24 sata na 36°C.



Slika 4.6. Quanti-Tray zavarivač



Slika 4.7. Colilert reagens



Slika 4.8. a) Qunati-Tray; b) Quanti-Tray/2000

Nakon inkubacije, ploče se vade iz inkubatora i broje se pozitivne jažice. Pozitivna jažica je ona u kojoj se pojavila žućkasta boja, te se boja uspoređuje sa Colilert komparatorom (Slika 4.9.). Colilert komparator služi kako bi znali odrediti je li neka jažica pozitivna ili ne. Nakon što se izbroje pozitivne jažice, točan broj koliformnih bakterija provjeri se u tablicama (Slika 4.10.), a broj *E. coli* provjerava se pod UV lampom jer jažice u kojima se nalazi *E. coli* pod UV lampom fluoresciraju. Prvo se očitava broj pozitivnih jažica, a zatim broj jažica koje fluoresciraju. Za ovu metodu nije potreban identifikacijski test.



Slika 4.9. Colilert komparator

51-Well Quanti-Tray MPN Table

No. of wells giving positive reaction per 100 ml sample	Most Probable Number	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
0	<1	0.0	3.7
1	1.0	0.3	5.6
2	2.0	0.6	7.3
3	3.1	1.1	9.0
4	4.2	1.7	10.7
5	5.3	2.3	12.3
6	6.4	3.0	13.9
7	7.5	3.7	15.5
8	8.7	4.5	17.1
9	9.9	5.3	18.8
10	11.1	6.1	20.5
11	12.4	7.0	22.1
12	13.7	7.9	23.9
13	15.0	8.8	25.7
14	16.4	9.8	27.5
15	17.8	10.8	29.4
16	19.2	11.9	31.3
17	20.7	13.0	33.3
18	22.2	14.1	35.2
19	23.8	15.3	37.3
20	25.4	16.5	39.4
21	27.1	17.7	41.6
22	28.8	19.0	43.9
23	30.6	20.4	46.3
24	32.4	21.8	48.7
25	34.4	23.3	51.2
26	36.4	24.7	53.9
27	38.4	26.4	56.6
28	40.6	28.0	59.5
29	42.9	29.7	62.5
30	45.3	31.5	65.6
31	47.8	33.4	69.0
32	50.4	35.4	72.5
33	53.1	37.5	76.2
34	56.0	39.7	80.1
35	59.1	42.0	84.4
36	62.4	44.6	88.8
37	65.9	47.2	93.7
38	69.7	50.0	99.0
39	73.8	53.1	104.8
40	78.2	56.4	111.2
41	83.1	59.9	118.3
42	88.5	63.9	126.2
43	94.5	68.2	135.4
44	101.3	73.1	146.0
45	109.1	78.6	158.7
46	118.4	85.0	174.5
47	129.8	92.7	193.0
48	144.5	102.3	224.1
49	165.2	115.2	272.2
50	200.5	139.8	397.5
51	> 200.5	146.1	infinite

06-03202-03
1175

Slika 4.10. Primjer MPN tablice za očitavanje rezultata Colilert testa

4.6. Mikrobiološke analize za površinske vode

Kod površinskih voda provodi se ispitivanje na prisutnost *E. coli* i crijevnih enterokoka. Metoda za određivanje *E. coli* jednaka je kao i kod određivanja *E. coli* u vodi za ljudsku potrošnju. Prvo se provodi membranska filtracija, a zatim, ukoliko se nakon inkubacije na CCA hranjivoj podlozi pojave crvenkasto ružičaste kolonije, provodi se Colilert test kako bi se potvrdila prisutnost *E. coli* u uzorcima vode.

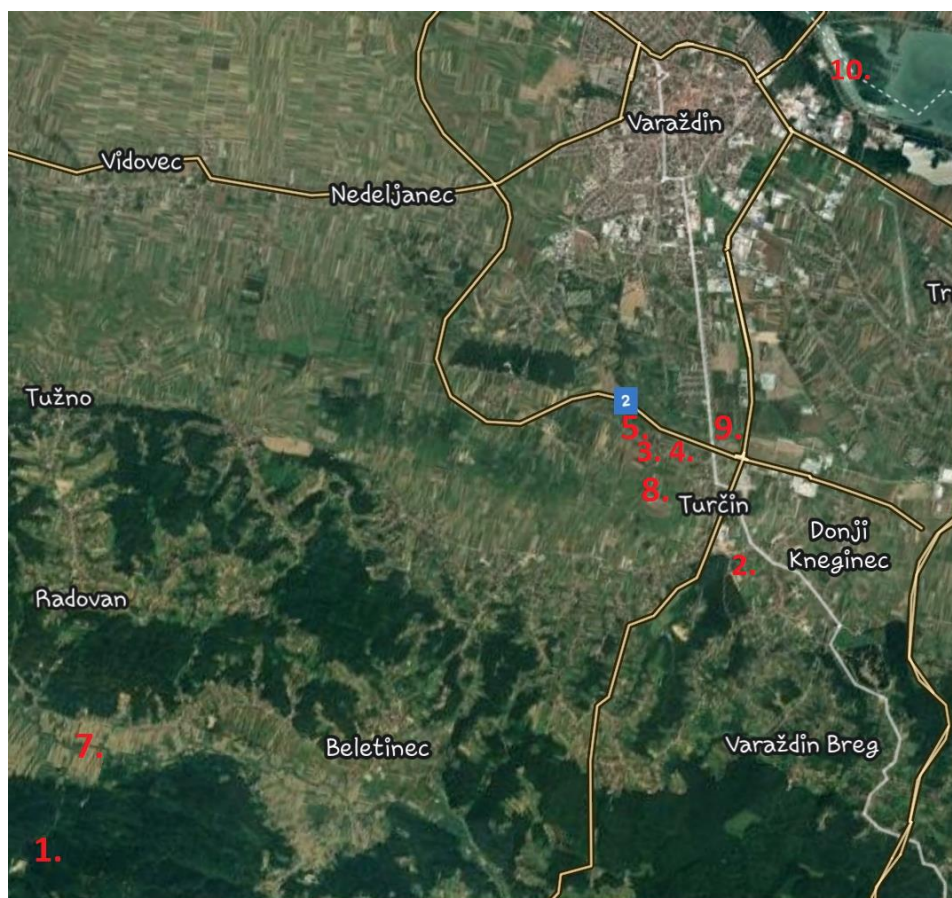
Određivanje crijevnih enterokoka u uzorcima vode provodi se na način da se napravi razrjeđenje od 50 ml sterilne vode i 50 ml uzorka vode, te se dobiveni uzorak vode također profiltrira membranskom filtracijom, a zatim se membranski filter pažljivo prenese na SBA agar, te se nasađena hranjiva podloga inkubira na 37°C kroz 48 sati. Ukoliko se na hranjivoj podlozi pojave ljubičaste kolonije, provodi se potvrdni test za crijevne enterokoke. Potvrdni test provodi se na način da se pomoću sterilne pincete membranski filter prenese na drugu hranjivu podlogu, žučni-eskulin-azid agar (BEA agar), te se hranjiva podloga inkubira na 44°C kroz 2 sata. Ukoliko se nakon dva sata pojave crne kolonije to je znak da su u uzorku vode bili prisutni crijevni enterokoki.

5. Rezultati i diskusija

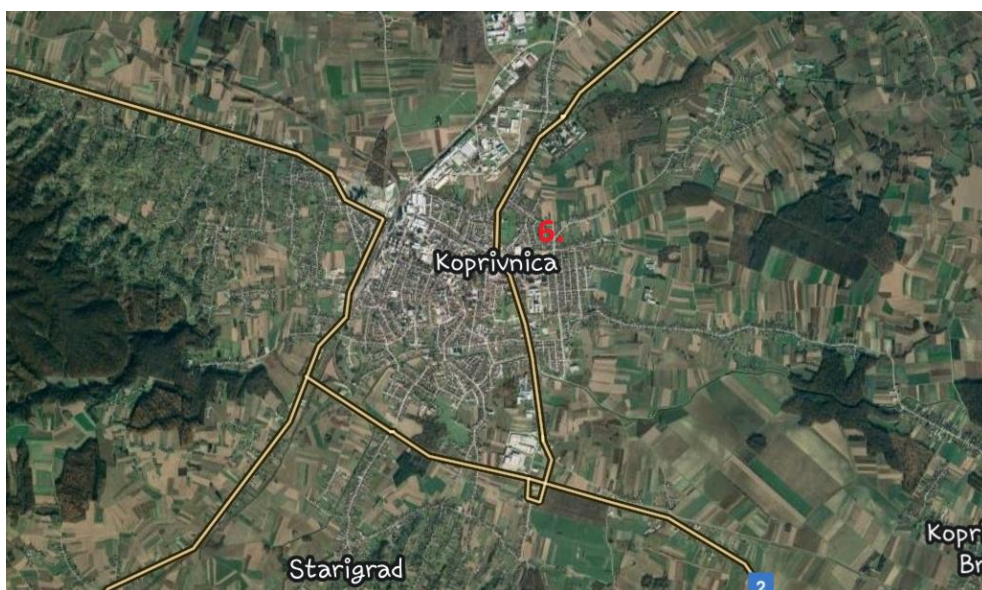
Cilj ovog rada bio je provesti mikrobiološke analize uzoraka pitke vode i površinskih voda. Propisanim metodama mikrobiološke analize vode za piće i površinskih voda, provedena je analiza ukupno 6 uzoraka vode za ljudsku potrošnju uzorkovanih iz izvora vode, kućnih slavina i vanjske slavine korištene za vodu za piće, te 4 uzoraka površinskih voda uzorkovanih oko grada Varaždina i Koprivnice (Tab. 3). Svi uzorci uzorkovani su na propisani način i prema uputama dobivenim u Zavodu za javno zdravstvo Koprivničko-križevačke Županije, te su i sami analizirani u laboratoriju za Zavoda za javno zdravstvo Koprivničko-križevačke županije. Mikrobiološke analize provedene su u mikrobiološkom laboratoriju Zavoda za javno zdravstvo na odjelu službe za zdravstvenu ekologiju. Određenim mikrobiološkim metodama dokazana je kvaliteta ispitanih uzoraka vode, te je li voda prihvatljiva za uporabu u kućanstvu, odnosno, je li površinska voda izvrsne ili dobre kakvoće. Površinske vode uzorkovane su za vrijeme kišnog razdoblja zbog čega je moguće da dobiveni rezultati i ne daju 100%-tnu točnu mikrobiološku sliku analiziranih površinskih voda.

Tablica 3. Broj uzorka i mjesto uzorkovanja

Broj uzorka	Lokacija uzorkovanja	Vrsta vode
1.	Belski dol	Izvor
2.	Izvor Kneginec	Izvor
3.	Kućna slavina u staroj kući koja nije korištena dugo godina (uzorkovanje vode nakon stajanja vode duže vrijeme u cijevima)	Vodovod Varaždin
4.	Kućna slavina u staroj kući koja nije korištena dugo godina (uzorkovanje vode nakon 15 minuta protoka vode kroz cijevi)	Vodovod Varaždin
5.	Vrtna pumpa	Podzemna voda
6.	Kućna slavina	Vodovod Koprivnica
7.	Rijeka Bednja	Rijeka
8.	Potok Črnc	Potok
9.	Rijeka Plitvica	Rijeka
10.	Rijeka Drava	Rijeka



a)



b)

Slika 5.1. Prikaz mjesta uzorkovanja u a) Varaždinskoj županiji i B) Koprivničko-križevačkoj županiji

5.1. Analiza uzoraka vode iz izvora pitke vode

Uzorci vode uzorkovani iz izvora na dva različita i poprilično udaljena mjesta, daju i dva različita rezultata. Izvor Belski dol (Tab. 4) nalazi se nasred šume, udaljeni od naseljenih područja što je vjerojatno i razlog zašto je voda poprilično čista, a nije tretirana nikakvim sredstvima za pročišćavanje. U uzorku ove vode pronađeni je vrlo malen i zanemarujući broj bakterija, a također, moguće je da su bakterije došle u vodu i sa cijevi koja je postavljena da se kroz nju lakše ulovi voda.

Tablica 4. Rezultati analize vode, izvor – Belski dol

Mikrobiološki pokazatelj	Jedinica mjere:	MDK:	Vrijednost:
<i>Escherichia coli</i>	broj/100 ml	0	0
Enterokoki	broj/100 ml	0	0
Broj kolonija na 22°C	broj/1 ml	100	3
Broj kolonija na 36°C	broj/1 ml	100	3
Ukupni koliformi	broj/100 ml	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	broj/100 ml	0	0

Kod uzorka vode uzete na izvoru u Knegincu (Tab. 5.) dobiveno je da su u vodi prisutni koliformi u malo povišenim koncentracijama. Taj izvor nalazi se u naseljenom području u Gornjem Knegincu pa postoji mogućnost da je voda zagađena koliformima zbog okolnih polja koja su vrlo vjerojatno gnojena stajskim ili sličnim gnojivom koje se za vrijeme padanja kiše ispire u dublje tlo i na taj način dolazi do izvora vode. Dobiveni rezultati ukazuju na fekalnu kontaminaciju vode i vodu je potrebno prestati konzumirati ili staviti odgovarajući filter na cijev za vodu koja je nadograđena radi lakšeg prikupljanja vode. Parametri nisu u skladu sa „Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju“ (NN 16/20). Zakon nalaže da sva vodocrpilišta moraju biti zaštićena od onečišćenja i drugih utjecaja koja utječu na ispravnost pitke vode [3].

Tablica 5. Rezultati analize vode, izvor - Knežinec

Mikrobiološki pokazatelj	Jedinica mjere:	MDK:	Vrijednost:
<i>Escherichia coli</i>	broj/100 ml	0	0
Enterokoki	broj/100 ml	0	0
Broj kolonija na 22°C	broj/1 ml	100	0
Broj kolonija na 36°C	broj/1 ml	100	3
Ukupni koliformi	broj/100 ml	0	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	broj/100 ml	0	0

5.2. Analiza uzoraka vode iz kućnih slavina

Vodovodna voda treba biti zdravstveno ispravna i sukladna svim parametrima „Zakona o vodi za ljudsku potrošnju“ (NN 16/20). Od analiziranih uzoraka vode za piće iz slavine, od ukupno četiri njih, tri su bili uzorci vode iz javne vodoopskrbe, dok je jedan uzorak bio podzemnih voda. Prvi uzorak vode bio je uzorak vode iz slavine koja se dugo vremena nije koristila, te je cilj ovog ispitivanja bio utvrditi koliko se bakterija može skupiti i koje su to bakterije unutar cijevi slavine ukoliko se voda dugo vremena ne pušta (Tab 6.) i hoće li to imati utjecaja ako ne isperemo slavinu mlazom vode, te usporediti sa normalnim uzorkovanjem vode nakon 15 minuta protoka vode kroz slavinu (Tab 7.). Dobiveni rezultati pokazuju da su u prvom uzorku otkrivene bakterije uzgojene na 22°C iznad granica dopuštenih Zakonom, što znači da ta voda ne bi bila zdravstveno ispravna i prikladna za konzumaciju.

Tablica 6. Rezultati analize vode, kućna slavina u staroj kući koja nije korištena dugo godina (odmah)

Mikrobiološki pokazatelj	Jedinica mjere:	MDK:	Vrijednost:
<i>Escherichia coli</i>	broj/100 ml	0	0
Enterokoki	broj/100 ml	0	0
Broj kolonija na 22°C	broj/1 ml	100	108
Broj kolonija na 36°C	broj/1 ml	100	3
Ukupni koliformi	broj/100 ml	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	broj/100 ml	0	0

Nakon ispiranja cijevi slavine vodom (normalnim protokom vode), te naknadnog uzorkovanja, dobiveni su rezultati koji prikazuju zdravstveno ispravnu vodu za piće. Voda nije bila kontaminirana nekim opasnijim bakterijama i sukladna je svim parametrima „Zakona o vodi za ljudsku potrošnju“ (NN 16/20). Ukoliko se u vodi iz javne vodoopskrbe pojave bakterije iznad dopuštenih granica potrebno je zaustaviti isporuku vode u kućanstva zbog mogućnosti pojave određenih oboljenja uzrokovanih infekcijom bakterijama iz vode, te provesti hitne mjere pročišćavanja vode na potrebnu čistoću [3].

Tablica 7. Rezultati analize vode, kućna slavina u staroj kući koja nije korištena dugo godina (nakon 15 minuta protoka vode)

Mikrobiološki pokazatelj	Jedinica mjere:	MDK:	Vrijednost:
<i>Escherichia coli</i>	broj/100 ml	0	0
Enterokoki	broj/100 ml	0	0
Broj kolonija na 22°C	broj/1 ml	100	0
Broj kolonija na 36°C	broj/1 ml	100	3
Ukupni koliformi	broj/100 ml	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	broj/100 ml	0	0

Uzorak vode uzet iz slavine priključene na vrtanu pumpu pokazao je velike količine bakterijskih kolonija izraslih na 22°C i 36°C. Dopuštena granica za oba dvije vrste bakterija je 100 kolonija na 1 ml uzorka vode. U analiziranoj vodi, kod oba parametra, vidljiva su velika odstupanja od granice. Ta voda je zdravstveno neispravna i nije pogodna za piće i upotrebu u kućanstvu. Ukoliko se namjerava koristiti kao voda za piće, potrebno je poduzeti mjere dezinfekcije vode sukladno „Zakonu o vodi za ljudsku potrošnju“ (NN 16/20).

Tablica 8. Rezultati analize vode, vanjska slavina spojena na vrtanu pumpu

Mikrobiološki pokazatelj	Jedinica mjere:	MDK:	Vrijednost:
<i>Escherichia coli</i>	broj/100 ml	0	0
Enterokoki	broj/100 ml	0	0
Broj kolonija na 22°C	broj/1 ml	100	645
Broj kolonija na 36°C	broj/1 ml	100	357
Ukupni koliformi	broj/100 ml	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	broj/100 ml	0	0

U uzorku vode iz javne vodoopskrbe grada Koprivnice, dobiveni su rezultati da je voda zdravstveno ispravna i pogodna za konzumaciju i upotrebu u kućanstvu. Svi parametri u

skladu su sa „Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju“ (NN 16/20) te nije potrebno poduzimati nikakve mjere dezinfekcije i pročišćavanja vode.

Tablica 9. Rezultati analize vode, kućna slavina

Mikrobiološki pokazatelj	Jedinica mjere:	MDK:	Vrijednost:
<i>Escherichia coli</i>	broj/100 ml	0	0
Enterokoki	broj/100 ml	0	0
Broj kolonija na 22°C	broj/1 ml	100	6
Broj kolonija na 36°C	broj/1 ml	100	0
Ukupni koliformi	broj/100 ml	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	broj/100 ml	0	0

5.3. Analiza uzoraka vode podzemnih voda

Uzorci analiziranih voda prikazali su različite podatke. Uzorci su uzeti tijekom kišnog razdoblja što daje mogućnost da ne predstavljaju u potpunosti pravu sliku pravog stanja tih voda. Najlošiju mikrobiološku sliku imao je uzorak vode iz rijeke Bednje. U rijeci Bednji pronađeni je ogroman broj *E. coli* što ukazuje na veliko onečišćenje fekalnim mikroorganizmima. Voda iz rijeke Bednje ukazuje na dobru mikrobiološku čistoću površinske vode.

Tablica 10. Rezultati analize vode, rijeka Bednja

Mikrobiološki pokazatelji:	Max. dopuštena vrijednost (bik/100)		Vrijednost:
	Izvrсна	Dobra	
<i>Escherichia coli</i>	≤500	≤1000	4830
Crijevni enterokoki	≤200	≤400	>400

Voda iz potoka Črnca pokazala je vrlo dobre rezultate za potok u koji se svakodnevno ulijeva otpadna voda iz septičkih jama. Udio *E. coli* u ovoj vodi malo je izraženiji nego što je to slučaj s crijevnim enterokokima, no bez obzira na to voda je izvrsne mikrobiološke čistoće.

Tablica 11. Rezultati analize vode, potok Črnec

Mikrobiološki pokazatelji:	Max. dopuštena vrijednost (bik/100)		Vrijednost:
	Izvrсна	Dobra	
<i>Escherichia coli</i>	≤500	≤1000	394
Crijevni enterokoki	≤200	≤400	126

Uzorak vode iz rijeke Plitvice, također je ukazao izvrsnu mikrobiološku čistoću. Također je udio *E. coli* nešto veći od udjela crijevnih enterokoka što je još uvijek mali broj za rijeku koja se nalazi oko obrađivanih i gnojnih polja.

Tablica 12. Rezultati analize vode, rijeka Plitvica

Mikrobiološki pokazatelji:	Max. dopuštena vrijednost (bik/100)		Vrijednost:
	Izvrсна	Dobra	
<i>Escherichia coli</i>	≤500	≤1000	34
Crijevni enterokoki	≤200	≤400	12

Uzorak vode iz rijeke Drave ukazuje na izvrsnu mikrobiološku čistoću. Voda nije previše zagađena fekalnim mikroorganizmima, no oni su i dalje prisutni u malom broju u vodi.

Tablica 13. Rezultati analize vode, rijeka Drava

Mikrobiološki pokazatelji:	Max. dopuštena vrijednost (bik/100)		Vrijednost:
	Izvrсна	Dobra	
<i>Escherichia coli</i>	≤500	≤1000	56
Crijevni enterokoki	≤200	≤400	24

6. Zaključak

Na temelju provedenih mikrobioloških analiza pitkih i površinskih voda možemo zaključiti da je 50% ispitanih voda za piće bilo mikrobiološki ispravno te nisu pronađeni fekalni mikroorganizmi niti bakterijske kolonije iznad granica dopuštenih „Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju“ (NN 16/20). Uzorci pitkih voda koji nisu udovoljavali važećem Zakonu su bili uzorci vode od izvora iz Gornjeg Kneginca, uzorak vode iz stare kuće prije ispiranja cijevi slavine i uzorak vode iz slavine spojene na vrtnu pumpu. Ostali su uzorci pitke vode odgovarali parametrima mikrobiološke čistoće pitkih voda i samim time oni su zdravstveno ispravi za piće i upotrebu u kućanstvu. Vodu iz izvora u Gornjem Knegincu ne bi trebalo konzumirati zbog povećane koncentracije koliformnih bakterija u vodi, jer konzumacijom te vode mogu nastati razna crijevna oboljenja, pa čak i neki ozbiljniji simptomi koji mogu uzrokovati teške tegobe kod osoba koje tu vodu konzumiraju. Vodu iz slavine spojene na vrtnu pumpu je potrebno dezinficirati i pročistiti na odgovarajući način ukoliko se ona koristi za piće. Do uspostavljanja određene mikrobiološke čistoće ne bi je se trebalo konzumirati u kućanstvu i kao vodu za piće.

Od površinskih voda najlošije rezultate dala je voda uzorkovana u rijeci Bednji. Pomoću Colilert metode dobivena je vrijednost od 4830 bakterija *E. coli* u uzorku razrjeđenja 50 ml uzorkovane vode i 50 ml sterilne vode. To je vrlo visok udio *E. coli* u vodi, te je ta voda lošije mikrobiološke čistoće od ostalih triju uzoraka površinskih voda. Svi uzorci površinskih voda pokazuju izvrsnu mikrobiološku čistoću površinskih voda, jedino uzorak rijeke Bednje ukazuje na dobru mikrobiološku čistoću vode.

Pitke vode koje imaju bakterije iznad granica dopuštenih važećim „Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju“ (NN 16/20), potrebno je pročistiti kako bi bile zdravstveno ispravne. Sve do kada se ne uspostavi odgovarajuća mikrobiološka čistoća vode te vode ne bi trebalo konzumirati niti koristiti u kućanstvu. Nakon provođenja potrebnih mjera za pročišćavanje vode potrebno je ponovno provesti određene analize voda kako bi se dokazala potrebna mikrobiološka čistoća i zdravstvena ispravnost voda za piće. Površinske vode trebalo bi manje zagađivati otpadnim i kanalizacijskim vodama, kako one ne bi bile zagađene raznim mikroorganizmima koji bi mogli preko tih voda završiti u javnoj vodoopskrbi.

7. Literatura

- [1] Š. Ivoš: O vodi i njenome značenju za život, zdravlje i produkciju, Mljekarstvo 3, br. 11, 1953, str. 261-263
- [2] M. M. Benjamin: Water Chemistry: Second Edition, Waveland Press, 2014.
- [3] Narodne Novine: Zakon o vodi za ljudsku potrošnju, Zagreb, 2020.
- [4] M. Bermanec: Mikrobiološko onečišćenje pitke vode Bjelovarsko-bilogorske županije u razdoblju od 2011. do 2013. godine, Završni specijalistički diplomski stručni rad, Visoko gospodarsko učilište, Križevci, 2015.
- [5] A. Štrkalj: Onečišćenje i zaštita voda, Metalurški fakultet, Sisak, 2014.
- [6] Narodne Novine: Zakon o vodi, Zagreb, 2009.
- [7] <https://www.voda.hr/>, pristupljeno: 12.7.2021.
- [8] P. K. Goel: Water Pollution: Causes, Effects and control, New Age International, 2006.
- [9] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=18675>, pristupljeno: 12.7.2021.
- [10] C. P. Gerba: Environmental Microbiology (Second Edition): Environmentally Transmitted Pathogens, Chapter 22, 2009, str. 445-484
- [11] G. Bitton: Microbiology of Drinking Water, Production and Distribution, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2014.
- [12] S. L. Percival, M. V. Yates, D. W. Williams, R. M. Chalmers, N. F. Gray: Microbiology of Waterborne Diseases, Elsevier, Great Britain, 2014.
- [13] J. P. S. Cabral: Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2010., str. 3657-3703
- [14] Narodne Novine: Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnosti javne vodoopskrbe, Zagreb, 2017.
- [15] S. Ishii, M. J. Sadowsky: Escherichia coli in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health, Vol. 23, No 2., 2008, str. 101-108
- [16] S. C. Edberg, E. W. Rice, R. J. Karlin, M. J. Allen: *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection, Vol. 88, 2000, str. 106-116
- [17] J. Hrenović, S. Šimunović: Pogodnost komercijalnih krutih hranjivih podloga za kultivaciju ukupnih koliformnih bakterija iz površinskih voda, Hrvatske vode: časopis za vodno gospodarstvo, 2010, str. 35-40

- [18] S. Dekić, J. Hrenović: Bakteriološka analiza izvorske vode uz najpoznatija izletišta Parka prirode Medvednica, Hrvatske vode, br. 99, 2017, str. 13-16
- [19] WHO, Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth edition, 2017
- [20] M. N. Byappanahalli, M. B. Nevers, A. Korajkic, Z. R. Staley, V. J. Harwood: Enterococci in the Environment, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2012, str. 685-706
- [21] <http://www.zzjz-kkz.hr/defaultcont.asp?id=23&n=3>, pristupljeno: 08.10.2021
- [22] I. L. Pepper, C. P. Gerba, R. M. Maier, Environmental Microbiology (Second Edition): Environmental Sample Collection and Processing, Chapter 8, 2009, str. 137-155
- [23] S. Furmeg, J. Sokolović, M. Bukvić, K. Sokolić, P. Mustapić, M. Benić, Ž. Cvetnić, V. Jaki Tkalec: Uzorkovanje hrane, vode za ljudsku potrošnju te obrisaka površina na mikrobiološku ispravnost, Veterinarska stanica, br. 1, 2021, str. 105-112
- [24] Upute za uzimanje uzoraka vode iz slavine, Upute za uzimanje uzoraka površinskih voda, Zavod za javno zdravstvo Koprivničko-križevačke županije, Služba za zdravstvenu ekologiju
- [25] HRN EN ISO 6222
- [26] C. P. Gerba, Environmental Microbiology (Second Edition): Indicator Microorganisms, Chapter 23, 2009, str. 485-499
- [27] D. Wang, W. Fiessel, Evaluation of medira for simultaneous enumeration of total coliform and *Escherichia coli* in drinking water supplies by membrane filtration techniques, Journal of Environmental Sciences, br. 20, 2008, str. 273-277
- [28] HRN EN ISO 6222:2000
- [29] HRN EN ISO 9308-2:2014
- [30] J. Frece, K. Markov, Uvod u mikrobiologiju i fizikalno-kemijsku analizu voda, Inštitut za sanitarno inženjstvo, Ljubljana, 2015

8. Popis slika

Slika 2.1. a) molekula vode s označenom duljinom veze i kutom između atoma u molekuli vode, b) prikaz vodikove veze, izvor: Mentor	2
Slika 2.2. Udio i raspored slatke vode na Zemlji, izvor: A. Štrkalj: Onečišćenje i zaštita voda, Metalurški fakultet, Sisak, 2014.	4
Slika 3.1. <i>E. coli</i> pod elektronskim mikroskopom, izvor: https://www.microscopemaster.com/e-coli-under-microscope.html#gallery[pagegallery]0/ , pristupljeno: 27.04.2022.	8
Slika 3.2. izrasle kolonije <i>E. coli</i> na Endo agaru, izvor: http://www.dr-moeller-und-schmelz.de/agar-e/Endo-Agar.pdf , pristupljeno: 27.04.2022.	9
Slika 4.1. Boce za uzorke vode za mikrobiološku analizu, izvor: https://www.zzjz-zz.hr/usluge/ispitivanje-voda/ , pristupljeno: 8.10.2021.	14
Slika 4.2. Priprema uzoraka vode za mikrobiološku analizu sukladno „Pravilniku o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodopskrbe“, izvor: Autor	16
Slika 4.3. Uređaj za membransku filtraciju, izvor: Autor	17
Slika 4.4. Izgled membranskog filtra, izvor: http://www.dem.hr/laboratorijski_potrosni_materijal_filter_papir.html , pristupljeno: 9.10.2021.....	18
Slika 4.5. Izgled nasadenih hranjivih podloga, izvor: Autor	20
Slika 4.6. Quanti-Tray zavarivač, izvor: https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/quant-tray-system/ , pristupljeno: 9.10.2021.	21
Slika 4.7. Colilert reagens, izvor: https://www.weberscientific.com/colilert-and-colisure-idexx , 9.10.2021.....	22
Slika 4.8 a) Quanti-Tray; b) Quanti-Tray/2000, izvor: Autor.	22
Slika 4.9 Colilert komparator, izvor: Autor	23
Slika 4.10. Primjer MPN tablice za očitavanje rezultata Colilert testa, izvor: Autor	23
Slika 5.1. Prikaz mjesta uzorkovanja u a) Varaždinskoj županiji i B) Koprivničko-križevačkoj županiji, izvor: Autor	26

9. Popis tablica

Tablica 1. Maksimalne dopuštene količine mikroorganizama u uzorcima vode, izvor: Autor	13
Tablica 2. . Mikrobiološki pokazatelji ocjene kvalitete površinskih voda, izvor: Autor	14
Tablica 3. Broj uzorka i mjesto uzorkovanja, izvor: Autor	25
Tablica 4. Rezultati analize vode, izvor – Belski dol, izvor: Autor	27
Tablica 5. Rezultati analize vode, izvor – Kneginec, izvor: Autor	28
Tablica 6. Rezultati analize vode, kućna slavina u staroj kući koja nije korištena dugo godina (odmah), izvor: Autor	29
Tablica 7. Rezultati analize vode, kućna slavina u staroj kući koja nije korištena dugo godina (nakon 15 minuta protoka vode), izvor: Autor	30
Tablica 8. Rezultati analize vode, vanjska slavina spojena na vrtnu pumpu, izvor: Autor	30
Tablica 9. Rezultati analize vode, kućna slavina, izvor: Autor	31
Tablica 10. Rezultati analize vode, rijeka Bednja, izvor: Autor	31
Tablica 11. Rezultati analize vode, potok Črnec, izvor: Autor	32
Tablica 12. Rezultati analize vode, rijeka Plitvica, izvor: Autor	32
Tablica 13. Rezultati analize vode, rijeka Drava, izvor: Autor	32



IZJAVA O AUTORSTVU
I
SUGLASNOST ZA JAVNU OBJAVU

Završni/diplomski rad isključivo je autorsko djelo studenta koji je isti izradio te student odgovara za istinitost, izvornost i ispravnost teksta rada. U radu se ne smiju koristiti dijelovi tuđih radova (knjiga, članaka, doktorskih disertacija, magistarskih radova, izvora s interneta, i drugih izvora) bez navođenja izvora i autora navedenih radova. Svi dijelovi tuđih radova moraju biti pravilno navedeni i citirani. Dijelovi tuđih radova koji nisu pravilno citirani, smatraju se plagijatom, odnosno nezakonitim prisvajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, RAFAELA DREVEN (ime i prezime) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom MIKROBIOLOŠKA ANALIZA VODE U PORUČJA (upisati naslov) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:

(upisati ime i prezime)

RAFAELA DREVEN
Rafaela Dreven

(vlastoručni potpis)

Sukladno Zakonu o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju završne/diplomske radove sveučilišta su dužna trajno objaviti na javnoj internetskoj bazi sveučilišne knjižnice u sastavu sveučilišta te kopirati u javnu internetsku bazu završnih/diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice. Završni radovi istovrsnih umjetničkih studija koji se realiziraju kroz umjetnička ostvarenja objavljuju se na odgovarajući način.

Ja, RAFAELA DREVEN (ime i prezime) neopozivo izjavljujem da sam suglasan/na s javnom objavom završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom MIKROBIOLOŠKA ANALIZA VODE U PORUČJA (upisati naslov) čiji sam autor/ica.

Student/ica:

(upisati ime i prezime)

RAFAELA DREVEN
Rafaela Dreven

(vlastoručni potpis)