

UPOTREBA SREBRA ZA DEZINFEKCIJU VODE U CISTERNAMA

Vidaković, Nikola

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:058996>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Nikola Vidaković

**UPOTREBA SREBRA ZA DEZINFEKCIJU VODE
U CISTERNAMA**

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Nikola Vidaković

UPOTREBA SREBRA ZA DEZINFEKCIJU VODE U CISTERNAMA

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Kroz ovaj rad, zahvaljujem se...

... mentorici izv.prof.Dr.sc. Dariji Vukić – Lušić, dipl.sanit.ing. i komentoru Dr.sc. Marinu Gladu, dipl.sanit.ing. na svojoj stručnoj pomoći i strpljenju pri izradi i pisanju ovog diplomskog rada...

... osoblju Odsjeka za mikrobiološku analizu voda i osoblju Odsjeka za kontrolu otpada i otpadnih voda, pri Zdravstveno – ekološkom odjelu Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije, na pomoći prilikom analiziranja uzoraka, snalaženja u laboratoriju, te na ugodnoj i prijateljskoj atmosferi tijekom rada...

... prijateljima Denisu, Marinu i Karlu na moralnoj podršci, savjetima i dugogodišnjem bezuvjetnom prijateljstvu...

... cijeloj obitelji, a ponajviše bratu Petru, mami Vesni i tati Slobodanu na ukazanoj najvećoj podršci i razumijevanju, stalnom ohrabrivanju, te beskonačnom strpljenju i pruženoj ljubavi kroz cijeli život.

Nikola Vidaković

Mentor rada: Izv.prof.dr.sc. **Darija Vukić Lušić** dipl.sanit.ing.

Završni rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima _____ stranica, _____ slika, _____ tablica, _____ literaturnih navoda.

SAŽETAK:

U ovom radu ispitivano je dezinfekcijsko djelovanje srebra, nanesenog na nosač, na određene vrste bakterija indikatora fekalnog zagađenja (ukupne koliformne bakterije, *E. coli*, bakterija iz roda *Enterococcus*, *C. perfringens*, *P. aeruginosa*, te bakterije koje rastu pri temperaturama od 22 °C i 37°C). Ispitivanje se provodilo u laboratorijskim uvjetima i dvije cisterne na području Istre. Usporedbom rezultata željelo se utvrditi u kojem slučaju je dezinfekcijsko djelovanje srebra bolje, odnosno, kolika je učinkovitost dezinfekcijskog djelovanja srebra u realnim uvjetima, u odnosu na kontrolirane (laboratorijske) uvjete. U oba slučaja, dezinfekcijsko djelovanje srebra pokazalo se kao učinkovita metoda dezinfekcije vode na većinu ispitivanih mikroorganizama, ali u realnim uvjetima primjećene su smetnje koje su utjecale na konačan rezultat učinkovitosti dezinfekcijskog djelovanja srebra. Osim mikrobioloških parametara, mjerila se i koncentracija srebra u vodi nakon postavljanja nosača, a rezultati tog ispitivanja pokazali su kako je koncentracija srebra u vodi bila ispod maksimalno dopustive koncentracije propisane za vodu za piće, prema važećim zakonskim propisima.

Ključne riječi: dezinfekcijsko djelovanje, srebro, cisterna, indikatorske bakterije, fekalno zagađenje

ABSTRACT:

In this study the disinfection property of silver – coated vessel were tested on indicator bacteria of fecal pollution (total coliform bacteria, *E. coli*, bacteria from the genus *Enterococcus*, *C. perfringens*, *P. aeruginosa*, and total heterotrophic bacteria that are cultivated at temperatures of 22 °C and 37 °C). The study was conducted in laboratory conditions and two cisterns in Istria. Comparing the results the goal was to determine if the disinfection property of silver was more efficient in real conditions on two cisterns or in controlled (laboratory) conditions. In both cases, the disinfection property of silver has shown to be an effective method of disinfection of water on most tested bacteria, but the test conducted in real conditions showed interferences that affected the final results. Beside of microbiological tests, the concentration of silver in cistern water after installing the silver – coated vessel was also measured, and it showed that concentration of silver in that water was well below the maximum allowable concentrations of silver in drinking water, issued by current regulations.

Key words: disinfection property, silver, cistern, indicator bacteria, fecal pollution

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Srebro	2
1.1.1. Mehanizmi djelovanja srebra na bakterijsku stanicu	2
1.1.2. Utjecaj srebra na čovjekov organizam	3
1.1.3. Zakonska regulativa / granične vrijednosti srebra u vodi za piće.....	4
1.2. Indikatorske bakterije.....	5
1.2.1. Ukupni koliformi	6
1.2.2. <i>Enterococcus spp.</i>	7
1.2.3. <i>Pseudomonas spp.</i>	8
1.2.4. <i>Clostridium perfringens</i>	9
1.2.5. Ukupan broj bakterija pri 22 °C i 37 °C (UBB/22 i UBB/37)	9
1.3. Cilj istraživanja	11
2. MATERIJALI I METODE.....	12
2.1. Materijali	12
2.1.1. Nosač.....	12
2.1.2. Tollensov reagens	13
2.1.3. Presvlačenje nosača srebrom.....	13
2.2. Lokacije istraživanja	14
2.3. Uzorkovanje.....	18

2.4.	Metode.....	20
2.4.1.	Laboratorijski pokus – učinak srebra na fekalne bakterije.....	20
2.4.2.	Određivanje mikrobioloških pokazatelja u uzorcima vode.....	20
2.4.3.	Određivanje fizikalno – kemijskih i kemijskih pokazatelja u uzorcima vode	30
3.	REZULTATI.....	34
3.1.	Rezultati laboratorijskog pokusa	34
3.1.1.	Ukupni koliformi	34
3.1.2.	<i>E. coli</i>	36
3.1.3.	Enterokoki	37
3.1.4.	<i>Pseudomonas</i>	39
3.1.5.	<i>C. perfringens</i>	40
3.1.6.	UBB/22 i UBB/37.....	42
3.2.	Rezultati analiza mikrobioloških pokazatelja u uzorcima vode iz cisterni	45
3.2.1.	Ukupni koliformi (UK)	47
3.2.2.	<i>E. coli</i> (EC).....	50
3.2.3.	Enterokoki (ENT)	52
3.2.4.	<i>C. perfringens</i>	54
3.2.5.	Ukupan broj bakterija pri 22 °C i 37 °C (UBB/22 i UBB/37)	56
3.2.6.	Učinak dezinfekcijskog djelovanja srebra na vodu iz cisterni	60
4.	RASPRAVA	65

5. ZAKLJUČAK.....	72
6. LITERATURA.....	73

1. UVOD

Jedan od osnovnih preduvjeta za mogućnost čovjekovog trajnog nastanjivanja na određenom području jest dostupnost pitke vode. Od zahvaćanja vode direktno iz njenog izvora (rijeke, jezera), čovjek je postupno razvijao znanja koja su mu omogućila lakše zahvaćanje, ali i skladištenje određenih količina pitke vode. Kao primjer sustava namijenjenog skladištenju vode jest cisterna, vodoopskrbni objekt izgrađen od strane čovjeka za zahvaćanje i skladištenje kišnice [Ujević, 1942]. Izgradnjom cisterni postignuto je zadržavanje i akumuliranje vode na mjestima gdje nužno ne mora postojati izvor pitke vode, te je time omogućeno nastanjivanje nenaseljenih područja ili širenje već postojećih naselja, pridonoseći tako razvitku urbanizacije i definiranju jednog od osnovnih elemenata vodoopskrbnog sustava. Iz tog razloga nije iznenađujuće da se velik broj cisterni nalazi na području Hrvatskog primorja (Istra i Kvarner), Dalmacije te na hrvatskim otocima. Naime, zbog krškog terena koji karakterizira ta područja na pojedinim se mjestima javlja odsutnost ili nedovoljna količina pitke podzemne vode za opskrbu naselja, što je razlog za izgradnju cisterni kao glavnih vodoopskrbnih objekata tamošnjem stanovništvu.

U vodi koja je predviđena za ljudsku potrošnju, moguća je pojava određenih mikroorganizama koji za ljude mogu predstavljati uzrok pojedinih bolesti. Kako bi se pojavnost bolesti vezanih uz konzumaciju kontaminirane vode što više smanjila, ljudi su s vremenom počeli graditi sustave cisterni s prirodnim filterima (npr. pijesak) čija je svrha pročišćavanje vode prije nego li je se može zahvatiti radi konzumacije [Ujević, 1942]. Također, upotreba srebra u svrhu dezinfekcije vode poznata je već neko vrijeme u ljudskoj povijesti korištenjem posuda za čuvanje vode načinjenih od srebra [Joshi i Bhattacharyya, 2011], a stjecanjem znanja i razvojem tehnologija danas se uvelike razmatra mogućnost dezinfekcije vode putem otpuštanja nano – čestica srebra.

1.1. Srebro

Srebro je metal sjajne bijele boje, pogodan za kovanje zbog svoje male tvrdoće. Također, za srebro je karakteristično da ima manji električni otpor, ali i veću toplinsku vodljivost od svih ostalih metala. Srebro se u prirodi češće nalazi u olovnim i bakrenim rudama nego kao elementarna tvar, koje se u tom slučaju može pojavljivati kao čisti metal (Ag) ili kao *argentit* (Ag₂S) [Filipović i Lipanović, 1987]. Još jedna karakteristika srebra kao metala, jest *oligodinamički učinak*, odnosno sposobnost pojedinog metala da u malim koncentracijama izazove smrt bakterijske stanice [Shrestha et al., 2009].

1.1.1. Mehanizmi djelovanja srebra na bakterijsku stanicu

Način na koji srebro utječe na bakterijsku stanicu proizlazi iz njegovog prijanjanja na staničnu stijenkku bakterije zbog veće reaktivne površine nano – čestica srebra od drugih, većih molekula [M. Raffi et al., 2008], Također, srebro ima mogućnost ulaska unutar bakterijske stanice zbog promjene u permeabilnosti citoplazmatske membrane, oštećujući tako stijenkku i membranu i omogućavajući sadržaju stanice da „iscuri“ te dovodeći time do smrti bakterijske stanice [Sondi i Salopek – Sondi, 2004; Jung et al., 2008]. Kada se govori o utjecaju srebra na staničnu stijenkku, treba uzeti u obzir da nemaju sve bakterije istu strukturu stanične stijenkke. Prema strukturi stanične stijenkke, bakterije se dijele na gram – pozitivne i gram – negativne, s osnovnom razlikom u broju slojeva peptidoglikana koji sačinjavaju staničnu stijenkku [Kalenić, 2019]. S obzirom na to da gram – pozitivne bakterije imaju više slojeva peptidoglikana (čak i do 40 slojeva) u svojoj staničnoj stijenci, logično je da će biti manje podložne utjecaju srebra od gram – negativnih bakterija koje imaju jedan do dva sloja peptidoglikana [Kalenić, 2019; Kim et al., 2007; Jung et al., 2008]. Također, utjecaj srebra na bakterijsku stanicu očituje se u odvajanju citoplazmatske membrane

bakterijske stanice od svoje stijenke zbog utjecaja iona srebra (Ag^+) [Jung et al., 2008], nemogućnosti repliciranja DNK molekule jer je dovedena u kondenzirano („stisnuto“) stanje [Feng et al., 2000], ali i u stvaranju kompleksa s tiolnim skupinama proteina stanice, što dovodi do inaktivacije proteina, odnosno, dolazi do poremećaja u funkciji stanične membrane i/ili taloženja proteina te konačno, do smrti bakterijske stanice [Spadaro et al., 1974; Feng et al., 2000].

1.1.2. Utjecaj srebra na čovjekov organizam

Uporaba srebra u dezinfekciji hrane, vode, predmeta, pa čak i pri saniranju rana je već dobro dokumentirana [Shrestha et al., 2009; Karchmer et al., 2000; Joshi et al., 2011], te je s obzirom na tako široku potencijalnu primjenu srebra u svakodnevnom životu, potrebno posvetiti pažnju prekomjernom izlaganju i unosu srebra u čovjekov organizam.

1.1.2.1. Apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija (ADME)

Put ulaska srebra u ljudsko tijelo može biti inhalacijom srebrnih para ili aerosola koji sadrže čestice srebra, najčešće u djelatnostima gdje se obrađuje srebro, na primjer, prilikom izrade srebrnog nakita [Aktepe et al., 2015]. Nadalje, apsorpcija srebra moguća je i putem kože pri doticaju sa spojevima, najčešće tekućim, koji sadrže srebro. Primjer perkutanog unosa srebra u organizam je u medicini, pri korištenju preparata za sprječavanje infekcija otvorenih rana koje u sebi, između ostalog, sadrže spojeve srebra [Wright et al., 1999], te, danas puno rjeđe, u fotografskoj industriji, gdje se za razvijanje fotografija koriste spojevi sa srebrom. U kontekstu dezinfekcije vode pomoću srebra, najznačajniji put unosa u ljudski organizam je ingestijom vode koja je bila tretirana nano – česticama srebra [Eckhardt et al., 2013]. Nakon ulaska srebra u organizam, srebro ima sposobnost distribucije i akumulacije u pojedinim tkivima [van der Zande et al., 2012; Loeschner et al., 2011], što se u ljudi često manifestira kao *argirija*, ireverzibilna siva

ili plavkasto – siva pigmentacija kože, na dijelovima tijela koji su češće izloženi suncu [Chung et al., 2010; Brandt et al., 2005; Chang, Khosravi i Egbert., 2006]. Do reakcije, najvjerojatnije dolazi uslijed vezanja za proteine plazme [Wijnhoven et al., 2009], te potom redukcije u elementarno srebro nakon izlaganja sunčevoj svjetlosti [Shelley, Dorinda Shelley i Burmeister., 1987]. Uz argiriju, zabilježeno je i genotoksično djelovanje srebra na DNK mononuklearnih leukocita (agranulocita), uslijed povećanog oksidativnog stresa stanice, kod ljudi koji se profesionalno bave izradom nakita od srebra [Aktepe et al., 2015]. Iako je u spomenutom istraživanju dokazan štetan utjecaj srebra, treba uzeti u obzir da se radi o profesionalno izloženoj populaciji značajno većim koncentracijama nego što je to uobičajeno u općoj populaciji. Osim navedenog, ozbiljnije posljedice po zdravlje čovjeka nakon izlaganja srebru nisu zabilježene. Najvjerojatniji put ekskrecije srebra iz organizma jest putem urina, što pokazuje istraživanje provedeno na pacijentu koji je primljen u bolnicu s opeklinama, koje su tretirane posebnim oblozima koji u svom sastavu sadrže srebro [Trop et al., 2006]. Također, zabilježeno je da se srebro može izlučiti iz organizma putem fecesa [van der Zande et al., 2012], što je i najčešći put eliminacije srebra iz organizma kada je put ulaska u organizam ingestija.

1.1.3. Zakonska regulativa / granične vrijednosti srebra u vodi za piće

U državama članicama Europske Unije, na temu osiguravanja kvalitete vode za piće, na snazi je *Direktiva Vijeća 98/83/EZ*, te u njoj nisu sadržane granične vrijednosti za koncentraciju srebra u vodi za piće. U Republici Hrvatskoj, na snazi je *Zakon o vodi za ljudsku potrošnju (NN 56/13, 64/15, 104/17, 115/18, 16/20)*, koji se u svojoj velikoj većini nadovezuje na Direktivu Vijeća te prati smjernice dane u njoj. Uz navedeni zakon, donesen je i *Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringa i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te*

načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe (NN 125/17) u kojemu u svom Prilogu 1., Tablici 4. (indikatorski parametri) stoji kako MDK (maksimalno dozvoljena koncentracija) srebra u vodi za piće iznosi $10 \mu\text{g/L}$, ali uz napomene da ukoliko se srebro koristi kao dezinfekcijsko sredstvo, MDK iznosi $100 \mu\text{g/L}$, te da se koncentracija srebra ne određuje za vodu pakiranu u bocama i drugim vrstama ambalaže [NN 125/17]. Prema *Smjernicama za kvalitetu vode za piće* (eng. „*Guidelines for drinking water quality*“), izdanim od strane Svjetske zdravstvene organizacije iz 1993. godine, spomenuto je kako NOAEL (eng. „*No Observable Adverse Effect Level*“) za srebro iznosi 10 g srebra unešenih kroz cijeli život. U kontekstu vode za piće, stoji kako koncentracija srebra od 0.1 mg/L (ova koncentracija, kroz vremensko razdoblje od 70 godina, daje polovičnu vrijednost od definirane koncentracije pri kojoj nema primijećenog učinka – „NOAEL“) ne predstavlja opasnost po ljudsko zdravlje [WHO, 1993]. Treba napomenuti kako ove vrijednosti dane od strane Svjetske zdravstvene organizacije nisu smjernice koje su obvezujuće, već predstavljaju podlogu za definiranje legislative [WHO, 2018].

1.2. Indikatorske bakterije

Poznato je kako je voda osnova života, te je kao takva predstavlja pogodan medij za razvijanje velikog broja različitih mikroorganizama. Ukoliko čovjek konzumira vodu u kojoj se nalaze patogeni mikroorganizmi, može doći do pojave bolesti. Prilikom ocjene kakvoće i zdravstvene ispravnosti vode za piće, ispituje se prisutnost na određene „indikatorske“ bakterije. One su pogodni pokazatelj onečišćenja vode, obzirom da se u određenim okolišnim uvjetima ponašaju veoma slično kao i patogeni mikroorganizmi. Također, ukazuju na učinkovitost metoda pročišćavanja voda [Armon i Kott, 1996].

1.2.1. Ukupni koliformi

Pod pojmom „koliformne bakterije“ podrazumijevaju se mikroorganizmi iz porodice *Enterobacteriaceae*, koja uključuje rodove *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, te najznačajniji rod za određivanje fekalne kontaminacije vode, *Escherichia* [Kalenić, Bedenić i Bošnjak, 2019; Prescott, Harley i Klein, 2002a]. Navedene skupine bakterija čine oko 10% prirodne mikroflore crijeva čovjeka i ostalih toplokrvnih životinja [Prescott, Harley i Klein, 2002a; Patel et al., 2014], ali se u velikom broju mogu nalaziti i u okolišu [Carrero – Colón, Wickham i Turco, 2011; Edberg et al., 2000]. Koliformne bakterije su fakultativno anaerobni, gram – negativni, oksidaza – negativni, katalaza – pozitivni štapići, koji ne formiraju spore, te fermentiraju laktozu do stvaranja kiseline i plina unutar 48 h pri temperaturi inkubacije od 35 °C [Kalenić, Bedenić i Bošnjak, 2019; Prescott, Harley i Klein, 2002a; Caplenas i Kanarek, 1984; Brion i Mao, 2000]. Zbog navedenih karakteristika, koliformne bakterije služe kao indikator kontaminacije vode fekalnim materijalom, ali moguće i prirodnim materijalom iz okoliša (zemlja, lišće, trava, itd.).

1.2.1.1. *Escherichia coli*

Unutar skupine koliformnih bakterija može se izdvojiti skupina *termotolerantnih* ili *fekalnih koliformnih bakterija*, koje se razlikuju od ostalih koliforma po tome što fermentiraju laktozu do kiseline i plina na temperaturi inkubacije od 44,5 °C, unutar 48 h, te su dobar indikator fekalnog zagađenja vode [Ashbolt, 2004; Caplenas i Kanarek, 1984].

Glavni predstavnik termotolerantnih (fekalnih) koliforma je *Escherichia coli*. Ona se prirodno nalazi unutar crijeva čovjeka i toplokrvnih životinja [Kalenić, Bedenić i Bošnjak, 2019], a vrlo rijetko u prirodi kao organizam koji samostalno može opstati u okolišnim uvjetima [Matica

i Ramljak Šešo, 2003]. Njena prisutnost u vodi za piće je dobar indikator koji upućuje na kontaminaciju vode fekalnim putem [Rompré et al., 2002]. Prema važećim zakonskim propisima na području Europske Unije, uključujući i Republiku Hrvatsku, stoji kako se u 100 mL analizirane vode za ljudsku potrošnju ne smije nalaziti niti jedna kolonija *E. coli* [Direktiva Vijeća 98/83/EZ; NN 125/17]

1.2.2. *Enterococcus spp.*

Predstavnici roda *Enterococcus* karakterizirani su kao gram – pozitivni, katalaza – negativni koki ovalnog oblika, koji se mogu pojavljivati kao pojedinačna stanica, u parovima ili u manjim nakupinama, odnosno, kraćim lancima [Budimir, 2019; Carrol et al., 2015].

Također, za enterokoke je karakteristično, s obzirom na to da se nalaze u probavnom sustavu ljudi i životinja, da mogu rasti u prisustvu žuči (do 40% žučnih soli) [Fisher i Phillips, 2009] i natrijeva klorida, čak i do 6,5 % NaCl u mediju [Budimir, 2019; Domig et al., 2003; Edberg et al., 2000], na temperaturama od 5 do 50 °C (optimalno oko 37 °C), a preživljavaju i temperature od 60 °C unutar 30 min [Giraffa, 2014; Martins Teixeira et al., 2015]. Osim dobre otpornosti prema višim koncentracijama soli, pokazuju i rast pri pH vrijednosti od 9,6 [Prescott, Harley i Klein., 2002b; Giraffa, 2014]. Enterokoki su široko rasprostranjeni u okolišu, te čine oko 1% crijevne mikroflore čovjeka [Budimir, 2019; Tendolkar et al., 2003], ali i drugih vrsta životinja, na primjer, pasa i kokoši [Wheeler et al., 2002]. Zbog toga što nastanjuju crijevni trakt životinja i ljudi, te zbog otpornosti na povećanu koncentraciju soli i povišenu temperaturu, mikroorganizmi iz roda *Enterococcus* su dobar indikator fekalnog zagađenja voda [Carrero – Colón, Wickham i Turco, 2011].

Što se tiče zakonske regulative vezane uz prisutnost enterokoka u vodi za ljudsku potrošnju, vrijednosti su iste kao i za *E. coli*, da bi se voda za ljudsku potrošnju smatrala ispravnom, u 100 mL takve vode ne smiju biti prisutni enterokoki [Direktiva Vijeća 98/83/EZ; NN 125/17].

1.2.3. *Pseudomonas spp.*

Bakterije iz roda *Pseudomonas*, karakteristične su po tome što su aerobne, nesporulirajuće, gram – negativne bakterije koje se mogu pojavljivati pojedinačno, kao parovi ili u lancima. Žive u temperaturnom rasponu od 4 do 42 °C, ali za većinu je optimalna temperatura za rast i razvoj između 30 i 37 °C, dakle većina ih je mezofilnog karaktera [Drenjančević i Vraneš, 2019]. Pseudomonasi posjeduju jedan ili više flagela (bičeva) kojima se mogu kretati kroz medij u kojemu se nalaze [Høiby, Ciofu i Bjarnsholt, 2015], a također stvaraju i polisaharidnu kapsulu, odnosno, biofilm kojim se štite od potencijalno štetnih okolišnih čimbenika, a predstavlja relativno učestalu pojavu u modernim vodoopskrbnim distribucijskim sustavima [Drenjančević i Vraneš, 2019; Høiby, Ciofu i Bjarnsholt., 2015; de Victorica i Galván, 2001]. Glavni predstavnik ovoga roda jest *Pseudomonas aeruginosa*, bakterija koja je široko rasprostranjena u okolišu [Neves et al., 2014, Høiby, Ciofu i Bjarnsholt, 2015], a u kontekstu vode za ljudsku potrošnju, predstavlja oportunističkog patogena koji uzrokuje sekundarne crijevne infekcije, poglavito u imunokompromitiranih osoba [de Victorica i Galván, 2001; Drenjančević i Vraneš, 2019]. Prema zakonskoj regulativi, na *P. aeruginosa* predstavlja jedan od mikrobioloških parametara zdravstvene ispravnosti vode za piće na mjestu potrošnje u objektima od javnozdravstvenog interesa (npr. bolnice i druge zdravstvene ustanove, vrtići, starački domovi) i za potrebe tehničkih pregleda, te broj njenih kolonija u 250 mL analizirane vode mora iznositi 0 [NN 125/17].

1.2.4. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens je gram – pozitivni, aerotolerantni anaerobni štapić, koji za razliku od ostalih navedenih mikroorganizama ima mogućnost stvaranja spore, što mu omogućuje dugo preživljavanje u okolišu [Edberg et al., 2000; Kalenić i Budimir, 2019; Kiu i Hall, 2008]. *C. perfringens* dio je normalne mikroflore ljudskog probavnog sustava, što ga, uz mogućnost stvaranja spora i dugim preživljavanjem u okolišu, čini dobrim indikatorom fekalnog zagađenja [Edberg et al., 2000]. Od velikog zdravstvenog značenja je i činjenica da *C. perfringens* tijekom svog rasta i razmnožavanja izlučuje više vrsta toksina koji u ljudi mogu uzrokovati kratkotrajne, ali intenzivne grčeve i proljeve [Kalenić i Budimir, 2019], nekrotizirajući enterokolitis [Nillo, 1998] te klostridijsku mionekrozu ili plinsku gangrenu, koja predstavlja tip gangrene koja se najbrže razvija u čovjeka, u roku od nekoliko sati do dva dana, a može dovesti i do smrtnog ishoda oboljelog [Bryant et al. 2000; Kalenić i Budimir, 2019]. Također, *C. perfringens* predstavlja jedan od mikrobioloških parametara prilikom analiziranja vode za piće obuhvaćenog zakonskom regulativom na području Republike Hrvatske, gdje je definirano kako se 100 mL analizirane vode za ljudsku potrošnju ne smije nalaziti niti jedna kolonija ili spora *C. perfringens* [NN 125/17].

1.2.5. Ukupan broj bakterija pri 22 °C i 37 °C (UBB/22 i UBB/37)

Ukupan broj bakterija (UBB) je metoda procjene stupnja zagađenja, odnosno, sanitarne čistoće vode (sirove ili prerađene). U ovoj metodi se na neselektivnu hranjivu podlogu nasađuje uzorak vode. Broje se kolonije svih vrsta bakterija, prisutnih u uzorcima vode, koje su porastu na hranjivom agaru. Obično se radi o heterotrofnim bakterijama koje kao izvor energije koriste tvari s organskim ugljikom (eng. *Heterotrophic Plate Count, HPC*) [Bartram et al., 2003]. Kada se

ispitani uzorci vode nasade na hranjive podloge, Petrijeva ploča inkubira se na temperaturama od 22 °C i 37 °C, gdje temperatura od 22 °C predstavlja okolišnu temperaturu pri kojoj veći rast pokazuju mikroorganizmi koji se prirodno nalaze u okolišu (npr. *Pseudomonas aeruginosa*), dok temperatura od 37 °C predstavlja prosječnu temperaturu čovjekovog tijela, pri kojoj veći rast pokazuju bakterije koje mogu biti uzročnici bolesti u ljudi (npr. *E. coli*, enterokoki) [Gensberger et al., 2015].

Prema važećem Pravilniku, broj kolonija u analiziranoj vodi za ljudsku potrošnju na temperaturi od 22 °C iznosi 100 kolonija na 1 mL vode, a na temperaturi od 37 °C iznosi 20 kolonija na 1 mL vode [NN 125/17].

1.3. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je:

- ispitivanje dezinfekcijskog djelovanja srebra na vodu kontaminiranu fekalnim materijalom (fekalnom otpadnom vodom) u kontroliranim laboratorijskim uvjetima i na oborinsku vodu namijenjenoj ljudskoj potrošnji
- praćenje koncentracije srebra koja u vodu može dospjeti otpuštanjem s nosača,

Dodatno, potencijalni dugoročni cilj ovog istraživanja je pronalazak učinkovite metode dezinfekcije vode koja bi predstavljala alternativu današnjoj najraširenijoj metodi dezinfekcije vode, pomoću preparata koji sadrže klor.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Nosač

U ovom radu, kao nosač za srebro, korišteno je ukupno 2,5 kg kamenčića veličine 0,5 do 1 cm. Navedena frakcija dobivena je prosijavanjem kroz laboratorijska sita s veličinom oka od 0,5 i 1 cm, čime su se dobili kamenčići relativno ujednačene veličine. Nakon prosijavanja kroz sita, kamenčići (nosač) su prvotno isprani vodom iz slavine, a potom i destiliranom vodom, nakon čega su stavljeni na sušenje u aluminijskim posudama (Slika 1.) u sušionik na temperaturi od 105 °C u vremenskom razdoblju od 1 h. Poslije prvog ispiranja i sušenja u peći, uslijedilo je još jedno ispiranje sa 8 % octenom kiselinom (CH_3COOH) i destiliranom vodom, te konačno, sušenje 1 sat na 105 °C.



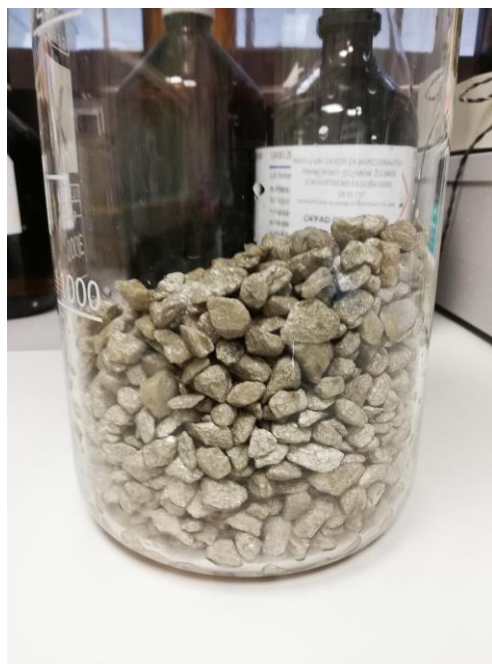
Slika 1. Kamenčići (nosač) nakon ispiranja (izvor: vlastita arhiva)

2.1.2. Tollensov reagens

Za potrebe ovog rada, Tollenosov reagens služi kao izvor elementarnog srebra koje je vezano na nosač. Pripremljen je na način da je u laboratorijskoj čaši od 1 L prvotno uliveno 500 mL, 0,1 M srebrovog nitrata (AgNO_3), u kojeg se postupno dodavao koncentrirani amonijak (NH_3) do stvaranja smeđeg obojenja, te nastavljajući s dodavanjem amonijaka do bistrenja otopine. Potom je u otopinu dodano 250 mL 0,8 M kalijevog hidroksida (KOH) pri čemu je otopina promijenila boju u tamno – smeđu do crnu, te je ponovno dodavan koncentrirani amonijak do bistrenja otopine. Navedeni postupak proveo se uz konstantno miješanje otopine na magnetskoj miješalici.

2.1.3. Presvlačenje nosača srebrom

U laboratorijsku čašu od 1 L stavljeno je 0,5 kg prethodno pripremljenih kamenčića (nosača) kojima je dodano 250 mL Tollensovog reagensa i 75 mL 0,5 M otopine glukoze. Smjesa nosača, Tollensovog reagensa i otopine glukoze grijana je na 60 °C u vremenskom razdoblju od 15 min, uz povremeno miješanje. Na početku procesa, otopina poprima žućkasto – smeđu boju nakon čega dolazi do zamućenja, otopina pocrni, te započinje izdvajanje srebra koje oblaže nosač. Nakon završenog postupka, nosač je izvađeni iz laboratorijske čaše te temeljito isprani destiliranom vodom. Tako pripremljen nosač spreman je za korištenje u pokusu (Slika 2.). Postupak je ponavljan do ukupne količine nosača od 2,5 kg. Pripremljeni nosač sa srebrom je upakiran u mrežaste vrećice, te je u tom obliku korišten u pokusu.



Slika 2. Nosač obložen srebrom (izvor: vlastita arhiva)

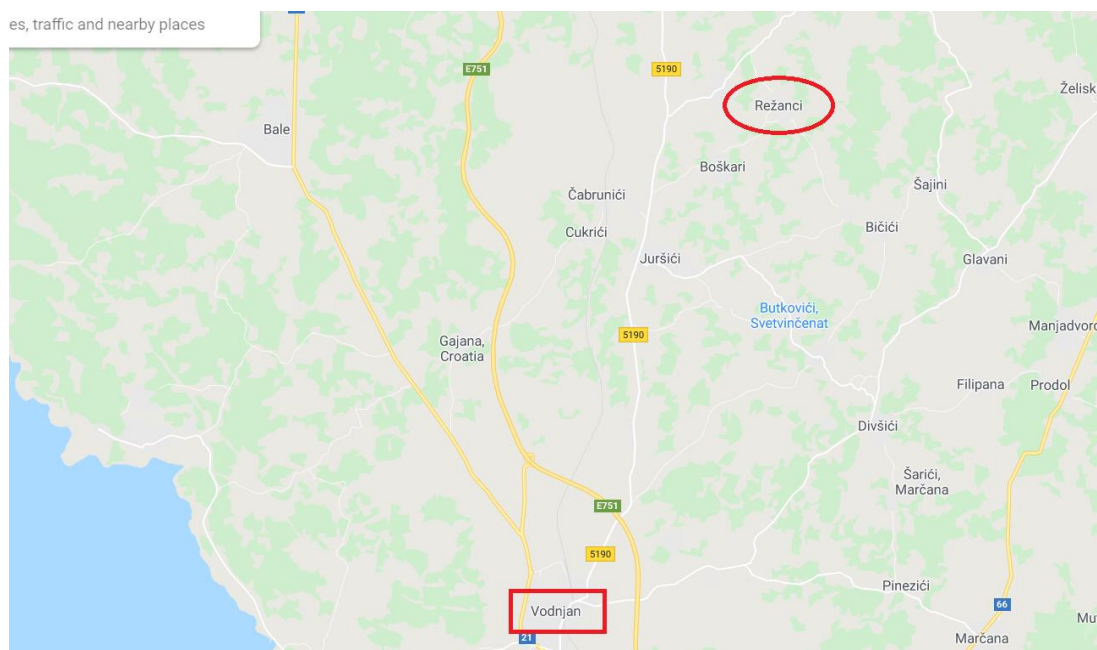
2.2. Lokacije istraživanja

Eksperimentalni dio ovog rada provodio se na dvije cisterne na području Istre. Prva cisterna (RE) na kojoj je proveden pokus nalazi se u južnom dijelu središnje Istre, u općini Svetvinčenat, u mjestu Režanci, udaljena od grada Vodnjana oko 11,7 km. (Slika 3., Slika 4.). Ova cisterna, građena 1980 – ih godina, manjeg je kapaciteta, oko 50 m³, nalazi se na privatnom posjedu, te je namijenjena za opskrbu vodom samo jedne kuće. Nakon priključivanja kućanstva na javni vodovod, cisterna se više nije intenzivno koristila niti redovito održavala, što je dovelo do pucanja spremnika i propuštanja vode, čime je kvaliteta vode opala, te ona više nije bila adekvatna za ljudsku potrošnju. Na svakom uzorku vode uzetom na ovoj lokaciji, uz mikrobiološko, provedeno je ispitivanje i fizikalno - kemijskih i kemijskih pokazatelja kvalitete vode, prije i nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu. Osnovni statistički podaci tih pokazatelja prikazani su tablično (Tablica 1.). Svi uzeti uzorci vode bili su bez mirisa i okusa, koji su određivani senzorski,

te zbog toga nisu uvršteni u tablicu s osnovnim statističkim podacima fizikalno – kemijskih i kemijskih pokazatelja kvalitete vode.



Slika 3. Cisterna u mjestu Režanci, u dvorištu privatne kuće (izvor: vlastita arhiva)



Slika 4. Lokacija mjesta Režanci (crveni oval) u odnosu na grad Vodnjan (crveni kvadrat) (izvor: Google karte)

Tablica 1. Osnovni statistički podaci o fizikalno – kemijskim i kemijskim karakteristikama vode uzetim na lokaciji RE (Režanci), prije i nakon dodavanja srebra

Lokacija RE	Vrijednosti prije dodavanja srebra			Vrijednosti nakon dodavanja srebra		
	Min.	Max.	Srednja vrijednost	Min.	Max.	Srednja vrijednost
T vode (°C)	10,0	11,0	10,1	10,0	16,0	12,6
Boja (°Pt/Co skala)	5,0	13,0	9,2	5,0	17,0	11,1
Mutnoća (NTU)	0,44	1,80	1,22	0,95	1,50	1,28
pH	6,9	7,8	7,2	6,9	7,3	7,1
El. vodljivost (μ S/cm)	70,0	95,0	83,3	56,0	108,0	81,4
KmnO₄ (mg/L kao O ₂)	0,57	1,20	0,76	0,80	1,20	0,95
Kloridi (mg/L)	2,5	4,3	3,3	2,5	5,3	4,4
Nitrati (mg/L kao NO ₃)	4,2	5,3	4,8	2,9	6,7	4,6
Amonijak (mg/L kao NH ₄)	0,006	0,014	0,010	0,006	0,212	0,077

Druga cisterna (ME) nalazi se u selu Mednjan, na jugozapadu Istre, u općini Vodnjan, približno 7 km od grada Vodnjana (Slika 5., Slika 6.). Građena je 1950-ih godina i zapremnine je oko 100 m³, a služila je kao izvor pitke vode za cijelo selo Mednjan. Zbog starosti, cisterna je počela propuštati, zbog čega voda u njoj više nije za piće, barem ne bez prethodnog iskuhavanja. Međusobna udaljenost dvaju cisterni zračnom linijom iznosi nešto manje od 10 km. Na ovoj lokaciji je također provedeno ispitivanje fizikalno - kemijskih i kemijskih pokazatelja kvalitete vode, kao i osnovna statistička obrada podataka o tim pokazateljima koji su prikazani tablično, uzimajući u obzir stanje vode prije i nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu (Tablica 2.).

Kao i na prvoj lokaciji istraživanja, uzeti uzorci vode bili su bez mirisa i okusa, što nije bilo potrebno prikazivati u tablici s ostalim fizikalno – kemijskim i kemijskim pokazateljima kvalitete vode.

Bitno je napomenuti kako na povišenje temperature u obje cisterne nakon postavljanja nosača sa srebrom nije utjecalo samo srebro, već je to posljedica prirodne promjene vremena koja se događala u razdoblju uzimanja uzoraka. Također, koncentracija srebra u vodi iz obje cisterne, ni prije, a niti poslije stavljanja nosača sa srebrom, nije prešla MDK vrijednost za srebro u vodi za ljudsku potrošnju od 10 $\mu\text{g/L}$ [NN125/17].



Slika 5. Cisterna u selu Mednjan (ME) (izvor: vlastita arhiva)



Slika 6. Lokacija mjesta Mednjan (crveni marker) u odnosu na grad Vodnjan (crveni oval) (izvor: Google karte)

Tablica 2. Osnovni statistički podaci o fizikalno – kemijskim i kemijskim pokazateljima vode uzetim na lokaciji ME (Mednjan), prije i nakon dodavanja srebra

Lokacija ME	Vrijednosti prije dodavanja srebra			Vrijednosti nakon dodavanja srebra		
	Min.	Max.	Srednja vrijednost	Min.	Max.	Srednja vrijednost
T vode (°C)	8,0	10,0	9,2	10,0	12,0	12,0
Boja (°Pt/Co skala)	5,0	9,0	6,7	5,0	13,0	7,3
Mutnoća (NTU)	0,4	1,1	0,6	0,4	1,3	0,9
pH	7,2	7,8	7,7	6,8	8,1	7,7
El. vodljivost (μ S/cm)	69,0	84,0	74,0	71,0	301,0	148,4
KmnO₄ (mg/L kao O ₂)	0,37	1,50	0,75	0,38	0,93	0,63
Kloridi (mg/L)	5,3	6,7	6,2	3,2	9,2	6,7
Nitrati (mg/L kao NO ₃)	1,84	2,22	1,97	2,15	5,11	3,40
Amonijak (mg/L kao NH ₄)	<0,004	<0,004	<0,004	0,005	0,053	0,294

2.3. Uzorkovanje

Uzorkovanje vode za potrebe ovog istraživanja provodilo se ukupno u više ponavljanja na svakoj cisterni. Iz cisterne RE prikupljeno je 7 uzoraka (RE 01 – 07) prije postavljanja nosača sa srebrom u cisternu, a drugih 7 (RE 07 – 14) nakon što je srebro postavljeno u cisternu; kod cisterne ME 11 uzoraka prije postavljanja srebra (ME 01 – 11) te 8 nakon postavljanja srebra (ME 12 – 19). Prvi uzorak je prikupljen 13. 1. 2020. godine, a posljednji 24. 8. 2020. godine. Svaki zasebni uzorak sastojao se od ukupno 1,5 L uzorka vode i to, 1 L uzorka u sterilnoj boci iz koje su se određivali mikrobiološki parametri, te u zasebnoj, nesterilnoj boci od 0,5 L s uzorkom iz koje su određivani kemijski pokazatelji. Tijekom uzimanja uzorka vode, na mjestu uzorkovanja izmjerena

je temperatura uzorka te je zabilježeno eventualno trenutno prisustvo padalina. Uzorci su do laboratorija transportirani na temperaturu od 4 °C. Podaci o pojedinim uzorcima prikazani su tablično (Tablica 3.)

Tablica 3. Uzorci vode sa datumima uzorkovanja, temperaturom pojedinih uzoraka, te podatkom o padalinama

	Redni broj uzorka	Datum	t/°C	Kiša
RE	1	13.1.2020	10	
	2	18.1.2020	10	Slaba kiša
	3	19.1.2020	10	
	4	25.1.2020	9	Slaba kiša
	5	26.1.2020	10	
	6	8.2.2020	10	
	7	9.2.2020	10	
	8	16.3.2020	11	
	9	17.3.2020	11	
	10	24.3.2020	10	
	11	11.5.2020	16	
	12	12.5.2020	16	
	13	18.5.2020	16	
	14	24.8.2020		
ME	1	18.1.2020	8	Slaba kiša
	2	19.1.2020	8	
	3	25.1.2020	9	Slaba kiša
	4	26.1.2020	9	
	5	1.2.2020	10	
	6	2.2.2020	10	
	7	8.2.2020	9	
	8	9.2.2020	10	
	9	15.2.2020	10	
	10	16.2.2020	10	
	11	7.3.2020	10	
	12	8.3.2020	10	
	13	16.3.2020	11	
	14	17.3.2020	11	
	15	23.3.2020	12	
16	24.3.2020	12		
17	11.5.2020	14		
18	18.5.2020	15		
19	19.5.2020	15		

2.4. Metode

2.4.1. Laboratorijski pokus – učinak srebra na fekalne bakterije

Prije ispitivanja dezinfekcijskog učinka srebra na vodi u cisternama, u laboratoriju je proveden pokus koji je služio kao simulacija teze ovog rada. Pokus se provodio na način da je u dva plastična spremnika stavljeno 100 L nekondicionirane izvorske vode uzete s izvora Mlaka, smještenog u Ulici Milutina Barača u Rijeci. Spremnici su zatvoreni i spremljeni u mračan i ohlađen prostor, na temperaturi do 15 °C, nakon čega je provedena mikrobiološka analiza vode iz oba spremnika. Nakon uzimanja uzorka nekondicionirane vode, u oba spremnika je dodano 200 mL fekalne otpadne vode koja je uzeta na ulazu Uređaja za pročišćavanje otpadnih voda Delta u Rijeci (Ulica Delta 3, Rijeka), nakon čega je ponovno provedena mikrobiološka analiza vode iz oba spremnika. U jedan od dva spremnika dodano je 100 g nosača sa srebrom koji je pripremljen na prethodno opisan način, nakon čega je ponovno uslijedila mikrobiološka analiza vode iz oba spremnika. Posljednja faza u pokusu je bila ponovno dodavanje 200 mL fekalne otpadne vode, ali ovaj put i sa dodatkom čiste kulture *E. coli*, peti dan pokusa, nakon čega se svakog dana provodila mikrobiološka analiza uzoraka vode iz oba spremnika.

Spremnik bez nosača sa srebrom služio je kao kontrola, a u spremniku sa nosačem se pratilo dezinfekcijsko djelovanje srebra na vodu kontaminiranu indikatorskim fekalnim bakterijama. Rezultati provedenog pokusa nalaze se u nadolazećem poglavlju (pogl. 3.1.).

2.4.2. Određivanje mikrobioloških pokazatelja u uzorcima vode

Od mikrobioloških pokazatelja u uzorcima ispitivao se broj aerobnih mezofilnih kolonija na temperaturi inkubacije 22°C i 37°C (UBB/22 i UBB/37). Od indikatora fekalnog onečišćenja u

razdoblju ispitivane su ukupne koliformne bakterije (UK), *Escherichia coli* (EC), crijevni enterokoki (ENT) i *Clostridium perfringens* te dodatni mikrobiološki pokazatelji *Pseudomonas aeruginosa* (PA) i *Staphylococcus aureus* (SA).

Ukupni broj kolonija (UBB) određivan je tehnikom ulijevanja (eng. „pour plate“), a UK, EC, ENT, PA i SA tehnikom membranske filtracije.

2.4.2.1. Tehnika ulijevanja („pour plate“)

Tehnika ulijevanja provodi se na način da se 1 ml uzorka (ili njegovog prikladnog razrjeđenja) prenese u Petrijevu zdjelicu, prelije s 15 – 20 mL otopljenog i na 45°C temperiranog kvašćevog agara, nakon čega se Petrijeva zdjelica pažljivo homogenizira kružnim pokretima. Podloga na koju je odložena Petrijeva zdjelica mora biti čvrsta i ravna. Vrijeme koje protekne između prijenosa uzorka u Petrijevu zdjelicu i ulijevanja kvašćevog agara ne bi smjelo biti dulje od 15 minuta. Nakon skrućivanja agara, Petrijeva zdjelica se preokrene i inkubira na dvije temperature: 22°C/72 sata i 37°C/48 sati.

2.4.2.2. Tehnika membranske filtracije

Tehnika membranske filtracije u mikrobiologiji voda koristi se zbog jednostavnosti izvođenja, praktičnosti te ekonomičnosti. Karakteristika ponovljivosti omogućava kvantitativnu detekciju mikroorganizama. Metoda se bazira na filtriranju uzorka vode preko membranskog filtera, pri čemu se mikroorganizmi iz uzorka koncentriraju na površini membranskog filtera. Bakterije se zadržavaju na površini filtera jer im je promjer stanice veći od promjera pora filtera. Nakon postupka filtracije slijedi naciepljivanje na hranjivu podlogu prenošenjem filtera s metalnog držača na krutu hranjivu podlogu. Nakon filtracije potrebnog volumena vode (za većinu parametara to je 100 mL ili potrebno razrjeđenje) slijedi inkubacija, na temperaturi propisanoj

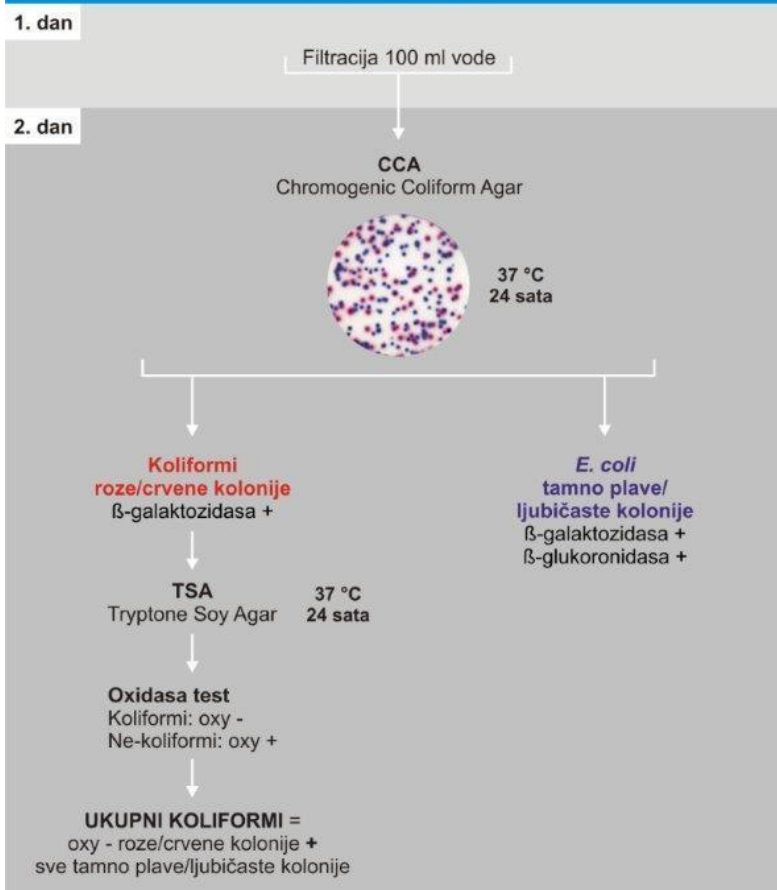
metodom. Kolonije porasle tijekom inkubacije se broje se i preračunavaju, obzirom na filtrirani volumen uzorka. Prednosti tehnike membranske filtracije je što se broj kolonija može direktno preračunati na volumen ispitanog uzorka te što se ispitivanje može ponoviti na velikom broju uzoraka.

2.4.2.3. Ukupni koliformi (UK) i *E. coli* (EC)

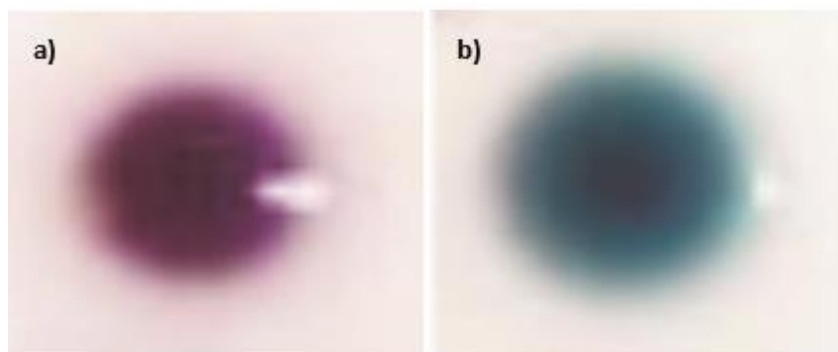
Za određivanje i brojenje koliformnih bakterija (UK) i *E. coli* (EC) primjenjuje se norma HRN EN ISO 9308-1:2014/A1:2017. Metoda se bazira na kultivaciji kromogene CCA (*Chromogenic Coliform Agar*) hranjive podloge. Filtrira se 100 mL uzorka ili drugi odgovarajući volumen. Nakon filtracije, membranski se filter sterilnom pincetom prenese na kromogenu CCA podlogu, koja se inkubira na 36 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$) kroz 21 h (± 3 h) (Slika 7.).

Nakon inkubacije, broje se kolonije rozo – crvene boje, bez obzira na veličinu. Rozo – crvena boja kolonija ukazuje da enzim β -D-galaktozidaza (β -gal) reagira s prisutnim kromogenim supstratom, uz stvaranje ružičastog do crvenog precipitata. Opisane kolonije dodatno se potvrđuju testom produkcije oksidaze. Najmanje 10 kolonija prenosi se na TSA (*Triptic Soy agar*) hranjivu podlogu koja se inkubira na 36 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$) kroz 21 h (± 3 h), nakon čega se provodi oksidaza test. Nakon inkubacije, broje se kolonije sljedećih karakteristika, bez obzira na veličinu. Rozo – crvena boja kolonija ukazuje na β -D-galaktozidaza pozitivnu reakciju, pri čemu enzim reagira s prisutnim kromogenim supstratom uz stvaranje rozog do crvenog precipitata (Slika 8a). Kolonije tamno plav do ljubičaste boje ukazuju na aktivnost dva enzima, β -D- galaktozidaza (β -gal) i β -D-glukuronidaza (β -glu). Sve *E. coli* sadrže β -gal a njih 94 – 97 % je i β -glu pozitivno, što se očituje stvaranjem plave boje. Istovremena reakcija oba enzima daje kolonijama *E. coli* ljubičastu boju (Slika 8b). Rezultat se izražava kao cfu/100 mL.

Kvaliteta vode - Brojenje *Escherichia coli* i koliformnih bakterija - 1. dio:
Metoda membranske filtracije za vode s niskom pozadinom bakterijske flore
HRN EN ISO 9308-1:2014



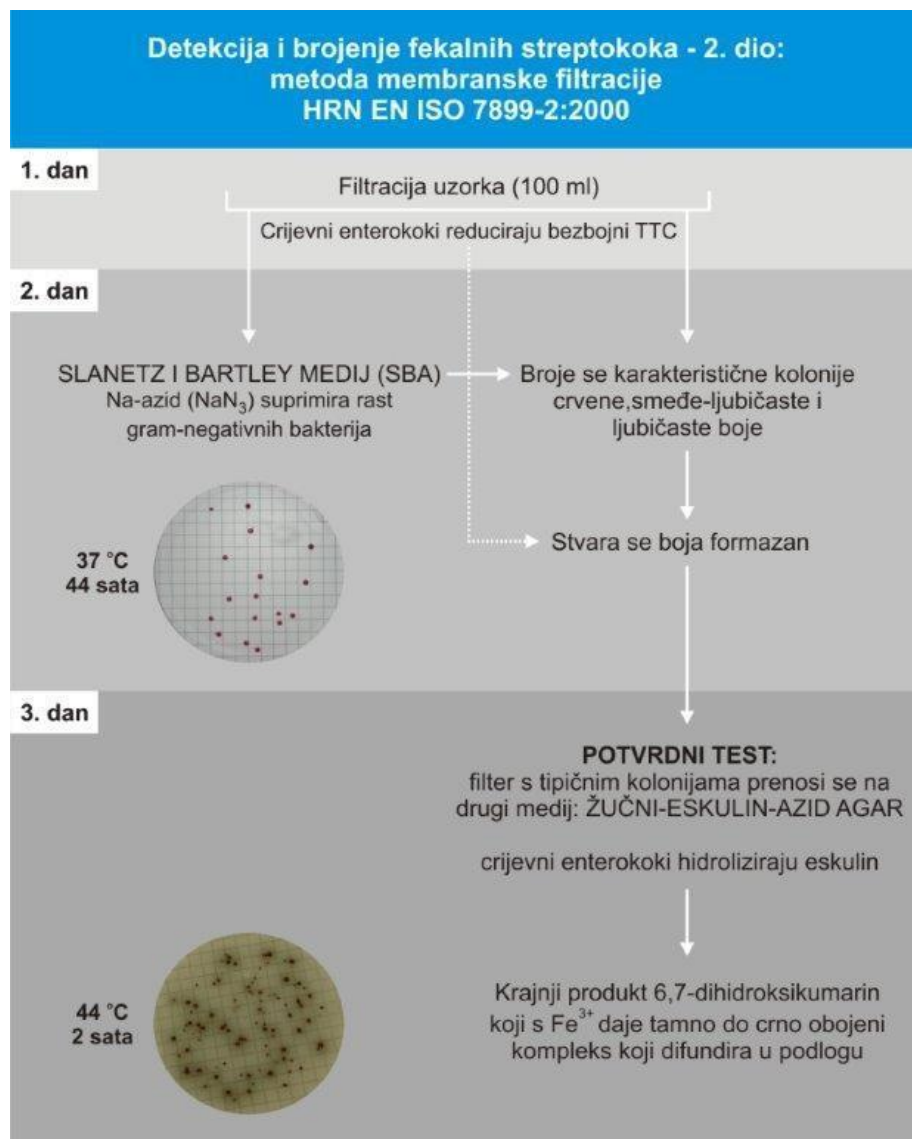
Slika 7. Shema metode brojenja koliformnih bakterija i *E. coli* membranskom filtracijom za vode s niskom pozadinom bakterijske flore (izvor: HRN EN ISO 9308-1:2014/A1:2017)



Slika 8. Boja poraslih kolonija na kromogenoj CCA podlozi a) β -gal pozitivna reakcija β -gal i b) β -glu pozitivna reakcija (izvor: HRN EN ISO 9308-1:2014/A1:2017)

2.4.2.4. Enterokoki (ENT)

Za dokazivanje i brojanje bakterija roda *Enterococcus* (ENT) korištena je metoda membranske filtracije prema normi HRN EN ISO 7899-2:2000. Ovom metodom detektiraju se i broje se bakterije roda *Enterococcus*: *E. faecalis*, *E. faecium* (ove dvije vrste enterokoka uzrokuju 95% infekcija kod čovjeka), *E. durans* i *E. hirae*. Ostale *Enterococcus* vrste, te neke vrste roda *Streptococcus* (*S. bovis* i *S. equinus*) također se ponekad mogu detektirati; međutim, ove vrste iz roda *Streptococcus* ne preživljavaju dugo u vodi te se vjerojatno ne mogu kvantitativno dokazati. Volumen od 100 mL vode profiltrira se preko membranskog filtera (veličine pora 0,45 µm). Nakon toga se vrši inkubacija na 36 °C (±2 °C) tijekom 44 h (±4 h). Tipične kolonije su uzdignute, crvene, kestenjaste ili ružičaste boje u centru kolonija ili oko njih. Dokazni test je neophodan ukoliko narastu tipične kolonije. Filter s kolonijama prenese se na žučni–eskulin-azid agar te se podloga inkubira 2 h na 44 °C. Pri pozitivnoj reakciji stvara se tamno do crno obojena tvar, koja difundira u medij („crni halo“) (Slika 9.).



Slika 9. Metoda membranske filtracije fekalnih streptokoka (izvor: HRN EN ISO 7899-2:2000)

2.4.2.5. *Pseudomonas aeruginosa* (PA)

Kroz pore sterilnog filtera veličine 0,45 μm profiltrira se 100 mL uzorka. Nakon toga slijedi kultivacija na CN – agaru te inkubacija na 36 °C (± 2 °C) kroz 44 h (± 4 h). Prvo očitavanje slijedi nakon 22 h (± 2 h) zbog mogućnosti prerasta. Kao dokaz *Pseudomonas aeruginosa* (PA) broje se one kolonije koje produciraju pocijanin. Kolonije su specifične plavo – zelene boje. Slijedi ispiranje membranskog filtra pod UV lampom. Treba izbjegavati dulje izlaganje kolonija UV

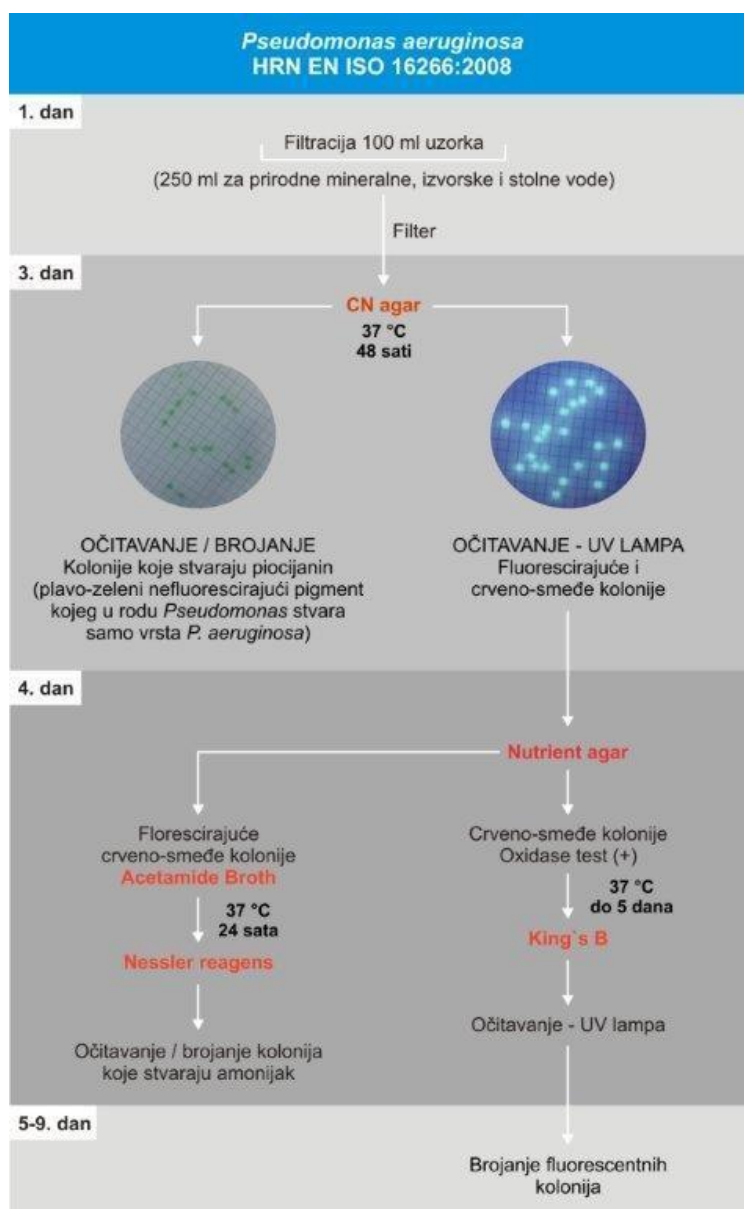
svijetlu jer može štetno djelovati na njih onemogućavajući porast na potvrdnim testovima. Kolonije koje ne produciraju piocijanin i crvenkasto-smeđe kolonije, a koje fluoresciraju podvrgavaju se potvrdnim testovima. Kolonije se presađuju na Nutrient agar te inkubiraju 22 h (± 2 h) na 36 °C (± 2 °C).

Kolonije koje fluoresciraju potvrđuju se testom produkcije amonijaka upotrebom acetamid bujona (eng. *acetamid broth*). Kolonije se presele u epruvete s acetamid bujonom te inkubiraju na 36 °C (± 2 °C) kroz 22 h (± 2 h) uz dodatak 1 – 2 kapi Nesslerovog reagensa. Stvaranjem žute do ciglasto – crvene boje potvrđuje se prisustvo *Pseudomonas aeruginosa*. Kod kolonija koje ne fluoresciraju a crvenkasto-smeđe su boje, postoji sumnja na *Pseudomonas aeruginosa*, što se provjerava dodatnim testovima. Kolonije crvenkasto-smeđe boje i koje su oksidaza – pozitivne presađuju se s Nutrijent agara na King'B medij. Slijedi inkubacija na 36 °C (± 2 °C). Prvi rezultati najčešće su vidljivi nakon 24 h ali inkubacija može trajati i do 5 dana. Promatra se porast pod UV svjetlom te se dnevno bilježi pojava fluorescencije. Ukoliko se nakon 5 dana ne pojavi fluorescencija nalaz se zaključuje kao negativan.

Produkcija amonijaka (acetamid bujon): porasle kolonije presađuju se s Nutrijent agara u epruvete s acetamid bujonom. Slijedi inkubacija na 36 °C (± 2 °C) kroz 22 (± 2 h) uz dodatak 1 – 2 kapi Nesslerovog reagensa. Promjena boje u epruvetama između žute do ciglasto-crvene dokazuje pozitivnu reakciju produkcije amonijaka.

Oksidaza test radi se pomoću filter papira na koji se kapne jedna kap reagensa za oksidazu, te se pomoću jednokratne eze na filter papir nanese uzorak. Ako filter papir promijeni boju u ljubičastu, rezultati su pozitivni, a ukoliko filter papir promijeni boju u žutu ili ne dođe do promjene boje, rezultati su tada negativni.

Kao potvrđene *Pseudomonas aeruginosa* računaju se sve kolonije koje produciraju piocijanin (plavo/zeleni pigment) ili koje su oksidaza – pozitivne, fluoresciraju pod UV svjetlom i koje stvaraju amonijak iz acetamida. Postupak dokazivanja i brojanja *P. aeruginosa* prikazan je shematski (slika 10.)

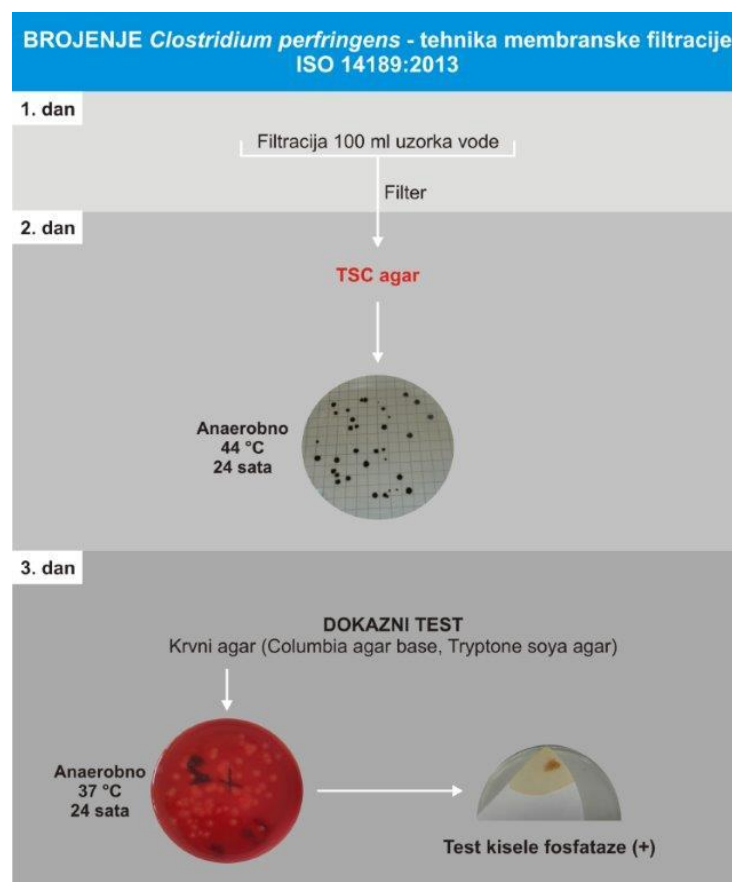


Slika 10. Shema metode za dokazivanje i brojenje *Pseudomonas aeruginosa* (izvor: HRN EN ISO 16266:2008)

2.4.2.6. *Clostridium perfringens* (CP)

Prisustvo i broj *C. perfringens* određivan je prema normi HRN EN ISO 14189:2016. *C. perfringens* obično stvaraju crne ili sive do žuto-smeđe kolonije, kao rezultat redukcije sulfita u sulfide, koji reagira sa željeznim solima sadržanim u hranjivom mediju (TSC agar – *Tryptose sulfite cycloserine agar*).

Potvrdni testovi provode se tako da se sumnjive kolonije razmažu po filter papiru, te se na njih nanese 2-3 kapi reagensa kisele fosfataze. Pojava ljubičaste boje u roku od 3 – 4 min smatra se pozitivnom reakcijom (Slika 11.). Rezultat se izražava kao cfu/100 mL.



Slika 11. Shema metode za dokazivanje i brojenje *Clostridium perfringens* (izvor: HRN EN ISO 14189:2016)

2.4.2.7. Ukupan broj bakterija (UBB)

Metoda se zasniva na detekciji i brojanju aerobnih heterotrofnih bakterija na temperaturi od 22°C i 37°C a provodi se prema normi HRN EN ISO 6222:2000.

Uzorak se homogenizira te se grlo boce spali. Nakon toga, odredi se razrjeđenje uzorka tako da se broj poraslih kolonija kreće između 30 i 300. Zatim se uzorak ili razrjeđenje nacijepi na medij. Vrijeme između dodavanja uzorka i otopljenog temperiranog agara ne smije biti duže od 15 min. Slijedi naciepljivanje na najmanje jednu ploču za inkubaciju pri svakoj od navedenih temperatura. Ploču je potrebno preokrenuti i inkubirati 22 °C kroz 68 h (± 4 h) odnosno na 37°C kroz 44 h (± 4 h). Nakon što se ploče izvade iz inkubatora, potrebno ih je što prije ispitati.

Nakon inkubacije, kolonije se broje te se procjenjuje BIK – „broj izraslih kolonija“ (eng. cfu – *colony forming unit*, u praksi izraz koji se češće koristi) po mililitru uzorka (cfu/mL uzorka), za svaku temperaturu inkubacije. Ako na ploči koja je naciepljena nerazrijeđenim uzorkom nema poraslih kolonija rezultat se izražava kao „nije detektirano u jednom mililitru“. Ako je broj kolonija u pločama inkubiranim s najvećim korištenim razrjeđenjem veći od 300, rezultat se izražava kao „> 300 cfu/mL uzorka“ ili samo kao približna vrijednost (Slika 12.).

duljini $\lambda = 456 \text{ nm}$, usporedbom sa standardnim otopinama platina-kobalta prema Beerovom zakonu. Ova metoda se primjenjuje za određivanje prave boje optički čistih uzoraka. Za potrebe ove metode korišten je spektrofotometar UV/VIS LAMBDA 25 (Perkin Elmer, SAD).

2.4.3.2. Mutnoća

Mutnoća vode određivana je prema međunarodnoj normi HRN EN ISO 7027-1:2016. Metoda se specificira kao kvantitativna uz korištenje optičkog instrumenta – turbidimetra (nefelometrijsko određivanje mutnoće). Mutnoća mjerena ovim postupkom primjenjiva je za vode niske mutnoće i izražava se kao *nephelometric turbidity units* (NTU). Metoda se bazira na komparaciji intenziteta svjetla raspršenog u uzorku pod definiranim uvjetima u odnosu na intenzitet raspršenog svjetla certificiranog standarda pod istim uvjetima rada. Dobivena vrijednost mutnoće očitava se direktno s instrumenta. Određivanje ovog parametra provedena je na turbidimetru HACH 2100NIS (Hach Company, SAD).

2.4.3.3. pH vrijednost

U uzorcima vode iz cisterne pH vrijednost određivana je prema međunarodnoj normi HRN EN ISO 10523:2012. Princip određivanja pH vrijednosti ove metode bazira se na mjerenju elektromotorne sile, odnosno mjerenju razlike potencijala (potenciometrijska metoda) koji nastaje na tankoj staklenoj membrani koja odjeljuje dvije otopine različitih koncentracija vodikovih iona. Upravo razlika potencijala služi kao analitički parametar kod potenciometrijskog određivanja pH vrijednosti. Određivanje pH vrijednosti provedeno je na instrumentu SevenExcellence (Mettler Toledo, Švicarska).

2.4.3.4. Električna vodljivost

Električna vodljivost vode određivana je primjenom međunarodne norme HRN EN 27888:2008. Električna vodljivost predstavlja brojčani izraz za svojstvo vodenih otopina da provode električnu struju. Ovo svojstvo ovisi o prisutnosti iona, njihovoj koncentraciji, mobilnosti, valenciji i temperaturi mjerenja. Određivanje električne vodljivosti provedeno je na instrumentu SevenExcellence (Mettler Toledo, Švicarska).

2.4.3.5. Permanganatni indeks (oksidativnost)

Određivanje permanganatnog indeksa u uzorcima vode iz cisterni proveden je sukladno međunarodnoj normi HRN EN ISO 8467:2001. Metoda se bazira na zagrijavanju uzorka na točki ključanja u vodenoj kupelji s poznatom količinom kalijevog permanganata (KmnO_4) i sumporne kiseline (H_2SO_4) kroz definirano vrijeme (10 min) te redukciji dijela permanganata oksidirajućim materijalom u uzorku i određivanje utrošenog permanganata dodatkom otopine oksalata ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$) u suvišku, nakon čega slijedi retitracija permanganatom.

2.4.3.6. Kloridi (Cl^-)

Koncentracija klorida (Cl^-) u vodi iz cisterne određivana je prema međunarodnoj normi HRN ISO 9297:1998. U reakciji klorida s dodanim srebrnim ionima stvara se netopljiva forma srebrnog klorida (AgCl) koji precipitira kvantitativno. Dodatkom male količine srebrnih iona (Ag^+) u suvišku dolazi do stvaranja crvenkasto-smeđeg obojenog srebrnog kromata (Ag_2CrO_4) koji nastaje u reakciji s kromatom (CrO_4^{2-}) koji se koristi kao indikator. Ova reakcija koristi se za dokazivanje završne točke titracije. pH se održava u području od 5,0 do 9,5 tijekom reakcije kako bi se omogućila precipitacija.

2.4.3.7. Nitrati (NO_3^-)

Određivanje koncentracije nitrata (NO_3^-) u uzorcima vode iz cisterne provedena je prema metodi iz priručnika za standardne metode analize vode [Braun – Howland i Hunt, 2017c]. Određivanje NO_3^- bazira se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja NO_3^- iona na valnoj duljini u UV području (220 nm) uz korekciju apsorpcije organske tvari na 275 nm. Zbog prirode ovih uzoraka, nije ih bilo potrebno posebno pripremiti za analizu. Za potrebe ove metode korišten je spektrofotometar UV/VIS LAMBDA 25 (Perkin Elmer, SAD).

2.4.3.8. Amonij ion (NH_4^+)

Postupak određivanja amonija (NH_4^+) u vodama iz cisterni proveden je prema međunarodnoj normi HRN ISO 7150-1. Metoda se temelji na spektrofotometrijskom određivanju, pri valnoj duljini od 655 nm, zelenog obojenog kompleksa koje se stvara pri reakciji amonija (NH_4^+) sa salicilatnim ($C_7H_5O_3^-$) i hipokloritnim ionima (ClO^-) u prisustvu natrijpentacijanoferata(III) (natrij-nitroprusida). Za potrebe ove metode korišten je spektrofotometar UV/VIS LAMBDA 25 (Perkin Elmer, SAD).

2.4.3.9. Srebro

Koncentracija srebra određivana je korištenjem atomskog apsorpcijskog spektrometra AAS800 (Perkin Elmer, SAD) bez prethodne pripreme izuzev zakiseljavanja uzorka s dušičnom kiselinom (HNO_3). Sve postavke aparata i metoda određivanja sukladna je uputama proizvođača atomskog apsorpcijskog spektrometra. Kvantifikacija je provedena metodom vanjskog standarda. Svaka kalibracijska krivulja dobivena je upotrebom najmanje pet kalibracijskih točaka izrađenih odgovarajućim razrjeđenjima standardne otopine. Za izračun koncentracije prihvaćene su kalibracijske krivulje s $R^2 \geq 0,999$.

3. REZULTATI

3.1. Rezultati laboratorijskog pokusa

Pokus proveden u laboratoriju na uzorcima nekondicionirane vode iz izvora Mlaka, sa dodatkom fekalne otpadne vode i kasnije čiste kulture *E. coli* služio je kao simulacija uvjeta kojima voda u cisterni može biti izložena, odnosno, u kontroliranim uvjetima ispitalo se dezinfekcijsko djelovanje srebra otpuštenog sa nosača. Količina prisutnih bakterija u ispitivanim uzorcima vode iskazana je kao *cfu* (eng. „*Colony Forming Unit*“), a izražena je pomoću logaritamske funkcije (\log_{10}). Konačna mjerna jedinica kojom se obilježila količina prisutnih mikroorganizama iskazana je kao *log cfu/100 mL* za uzorke vode na kojima se ispitivala prisutnost pojedinih vrsta bakterija, odnosno *log cfu/1 mL* za uzorke vode na kojima se ispitivao ukupan broj bakterija pri temperaturama od 22 i 37 °C (UBB/22, UBB/37). Grafički prikazi dobiveni su putem računalnog programa (MS Excell 2016). Pokus je ukupno trajao 13 dana, a dvostruki uzorci uzeti su prvi i peti dan pokusa, prije i nakon dodavanja fekalne otpadne vode u uzorke (prvi dan i peti dan), te čiste kulture *E. coli* (peti dan). To je rezultiralo sa ukupno 15 analiza kroz 13 dana pokusa, gdje analize pod brojevima 1 i 2 predstavljaju prvi dan pokusa, a analize pod brojevima 6 i 7 predstavljaju peti dan pokusa.

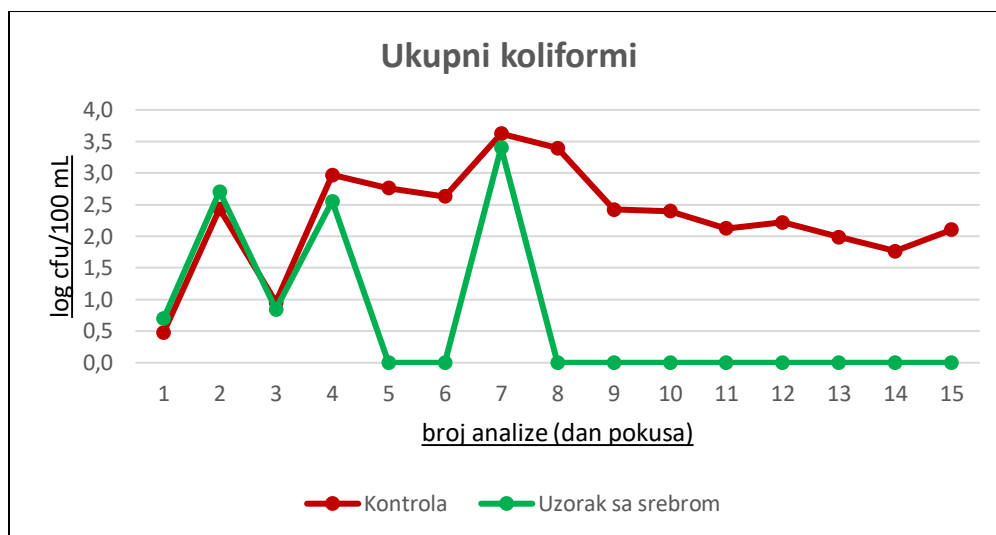
3.1.1. Ukupni koliformi

Uz pronađenu početnu brojnost koliformnih bakterija u uzorcima vode od 0,5 *log cfu/100 mL* za kontrolni, odnosno 0,7 *log cfu/100 mL* za uzorak vode sa srebrom, zabilježen je porast u njihovom broju nakon prvog dodavanja fekalne otpadne vode u uzorke, te su vrijednosti tada iznosile 2,4 *log cfu/100 mL* za kontrolni i 2,7 *log cfu/100 mL* za uzorak vode u kojoj se nalazio

nosač sa srebrom. Sljedećeg dana, u oba uzorka su navedene vrijednosti opale 1,0 log cfu/100 mL za kontrolni uzorak i 0,8 log cfu/100 mL za uzorak sa srebrom. Slijedi još jedan rast (3,0 log cfu/100 mL za kontrolu, 2,6 log cfu/100 mL za uzorak sa srebrom) nakon čega dolazi do razlike u brojnosti CFU ukupnih koliforma u uzorcima.

U kontrolnom uzorku prvo je zabilježen blagi pad do vrijednosti 2,6 log cfu/100 mL kroz 48 h, a nakon ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli* dostignut je vrhunac u brojnosti cfu ukupnih koliforma te je tada ta vrijednost iznosila 3,6 log cfu/100 mL. Nakon 24 h, zabilježen je blagi pad (3,4 log cfu/100 mL), a nakon 48 h taj je pad bio izraženiji (2,4 log cfu/100 mL). Prema kraju pokusa, ova vrijednost je postepeno padala do 1,8 log cfu/100 mL dvanaesti dan pokusa, a posljednjeg dana pokusa zabilježen je porast do 2,1 log cfu/100 mL.

U uzorku vode sa srebrom, nakon prvog pada i rasta broja cfu koliformnih bakterija nakon dodavanja fekalne otpadne vode, uslijedio je pad broja cfu ukupnih koliforma na 0,0 log cfu/100 mL. Veliki rast je u broju koliformnih bakterija zabilježen je nakon ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli.*, peti dan pokusa, kada je vrijednost iznosila 3,4 log cfu/100 mL. Međutim, već u sljedećoj analizi uzorka vode sa srebrom vidljivo je da je dezinfekcijsko djelovanje srebra na broj cfu ukupnih koliforma veoma izraženo, kada je broj cfu koliformnih bakterija samo jedan dan (24 h) nakon ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli* opao na 0,0 log cfu/100 mL i uspjelo zadržati tu vrijednost do kraja pokusa (Slika 7.).



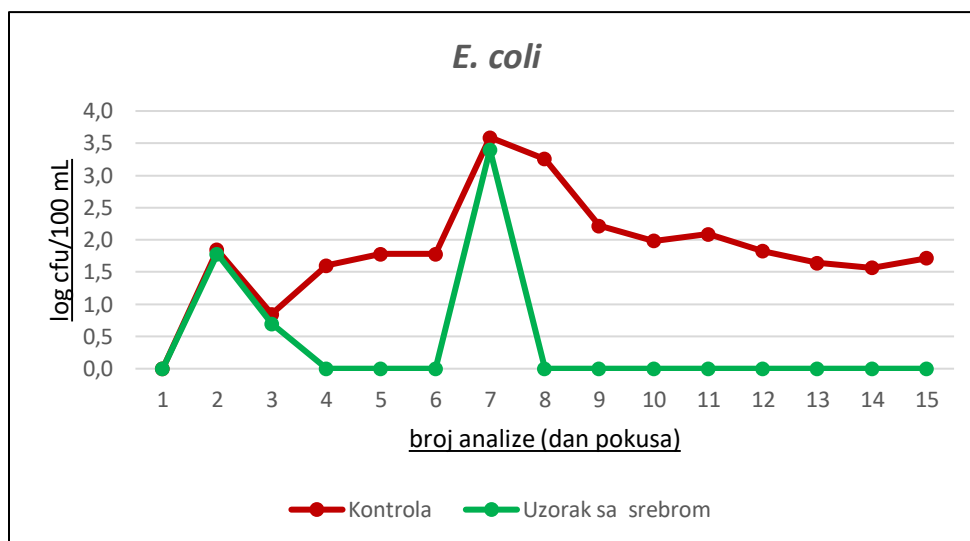
Slika 13. Grafički prikaz broja cfu ukupnih koliformnih bakterija u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza

3.1.2. *E. coli*

U uzorcima nekondicionirane vode, početne vrijednosti broja *E. coli* iznosio je 0,0 log cfu/100 mL, a dodavanjem fekalne otpadne vode u uzorke uzrokovalo je rast u njihovom broju na 1,8 log cfu / 100 mL. U kontrolnom uzorku broj cfu *E. coli* postepeno raste te dostiže vrhunac peti dan pokusa, kada je ponovno dodana fekalna otpadna voda i čista kultura *E. coli*, sa vrijednošću od 3,6 log cfu/100 mL. Nakon toga, vrijednosti broja cfu *E. coli* postepeno padaju, kada su se vrijednosti kretale oko 2,0 cfu / 100 mL, od sedmog dana pokusa pa do njegova kraja (1,6 – 2 log cfu/100 mL).

S druge strane, u uzorku vode u kojem se nalazio nosač sa srebrom, prisutnost *E. coli* zabilježena je neposredno nakon dodavanja fekalne otpadne vode, prvi dan pokusa, kada je vrijednost broja cfu *E. coli* iznosila 1,8 log cfu/100 mL. Ta vrijednost već sljedećeg dana opada na 0,7 log cfu/100 mL, a nakon 48 h pada na 0,0 log cfu/100 mL. Također, zabilježen je velik rast u brojnosti *E. coli* nakon ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli* u uzorak, peti dan pokusa,

kada je vrijednost iznosila 3,4 log cfu/100 mL. Već sljedećeg sljedećeg dana, ta vrijednost je pala na 0,0 log cfu/100 mL. Time je u pokusu dokazano dezinfekcijsko djelovanje srebra na *E. coli*. Dinamika djelovanja srebra na *E. coli* prikazana je grafički (Slika 14.).



Slika 14. Grafički prikaz broja cfu *E. coli* u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza

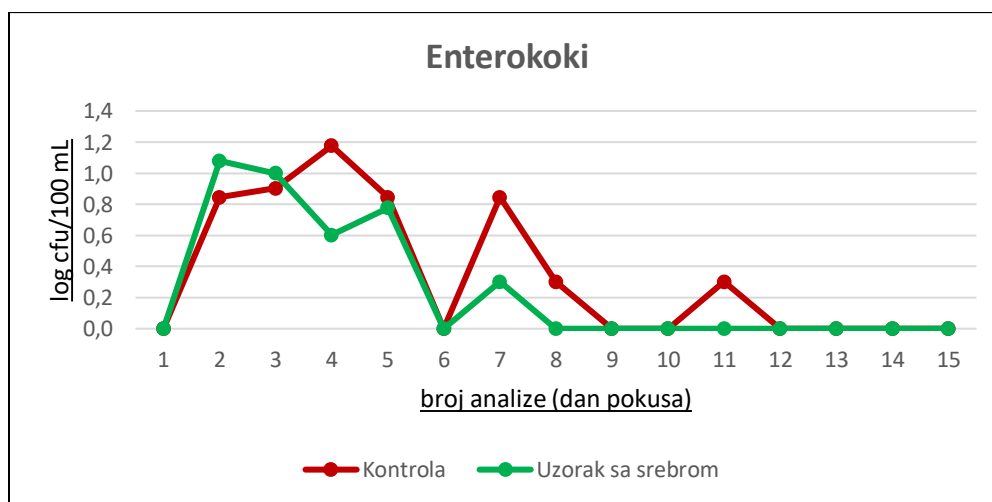
3.1.3. Enterokoki

Nakon dodavanja fekalne otpadne vode u uzorke vode, zabilježen je relativno velik porast u brojnosti bakterija iz roda *Enterococcus*. U kontrolnom uzorku vrijednost cfu enterokoka iznosio je 0,8 log cfu/100 mL, a uzorku vode sa srebrom 1,1 log cfu/100 mL. U prva tri dana pokusa, u kontrolnom uzorku broj enterokoka rastao je do dostizanja vrhunca brojnosti kada je vrijednost cfu enterokoka iznosila 1,2 log cfu/100 mL. Nakon navedene maksimalne vrijednosti cfu enterokoka, uslijedio je pad nakon 24h (0,8 log cfu/100 mL), a nakon 48 h vrijednost je pala na 0,0 log cfu/100 mL. Peti dan pokusa brojnost enterokoka je opet porasla na vrijednost 0,8 log cfu/100 mL, uslijed ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode u uzorke. Već 24 h nakon, vrijednost se više od dvostruko smanjila (0,3 log cfu/100 mL), a 48 h nakon ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli* vrijednost cfu enterokoka pala je na 0,0 log cfu/100

mL. Deveti dan pokusa zabilježen je mali porast u broju enterokoka (0,3 log cfu/100 mL), ali je već sljedećeg dana ta vrijednost pala na 0,0 log cfu/100 mL gdje se i zadržala do kraja pokusa.

Suprotno kontrolnom uzorku, u uzorku vode sa srebrom zabilježen je pad u broju cfu enterokoka, kroz prva tri dana pokusa, od 1,1 log cfu/100 mL do 0,6 log cfu/100 mL. Idućeg dana primijećen je manji rast (0,8 log cfu/100 mL), a 24 h nakon njega pad vrijednosti cfu enterokoka na 0,0 log cfu/100 mL, usporedno sa kontrolnim uzorkom. Ponovno dodavanje fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli* u uzorak vode sa srebrom rezultiralo je malim porastom, te je vrijednost cfu enterokoka peti dan pokusa iznosila 0,3 log cfu/100 mL. Međutim, u iduća 24 h vrijednost cfu enterokoka pala je na 0,0 log cfu/100 mL, te je ostala konstantna do kraja pokusa (Slika 15.).

Na temelju dinamike djelovanja srebra na rast i razvoj kolonija enterokoka u vodi, vidljivo je kako, u odnosu na *E. coli*, srebro ima manje izraženo dezinfekcijsko djelovanje, ali i dalje se može smatrati učinkovitim dezinficijensom protiv bakterija iz roda *Enterococcus*.



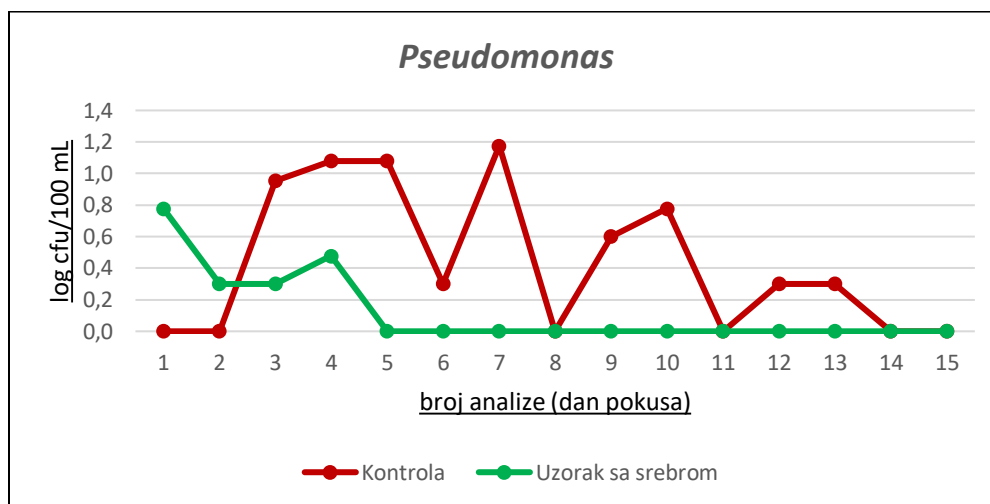
Slika 15. Grafički prikaz broja cfu enterokoka u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza

3.1.4. *Pseudomonas*

Od svih indikatorskih mikroorganizama, najizraženije djelovanje srebra zabilježeno je na bakterijama iz roda *Pseudomonas*. Treba napomenuti kako početna koncentracija *Pseudomonasa* nije bila ista u oba uzorka, te je u kontrolnom uzorku iznosila 0,0 log cfu/100 mL, a u uzorku vode sa srebrom 0,8 log cfu/100 mL. U kontrolnom uzorku vode, broj cfu *Pseudomonasa* počeo je naglo rasti 24 h nakon dodavanja fekalne otpadne vode u uzorak te je ta vrijednost iznosila 1,0 log cfu/100 mL, a 48 h nakon dodavanja fekalne otpadne vode (treći dan pokusa) vrijednost cfu *Pseudomonasa* iznosila je 1,1 log cfu/100 mL, gdje se zadržala i četvrti dan pokusa. Sljedećeg dana ta vrijednost pala je na 0,0 log cfu/100 mL, a nakon ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli* zabilježen je vrhunac u broju *Pseudomonasa* u vrijednosti od 1,2 log cfu/100 mL. 24 h nakon, vrijednost cfu *Pseudomonasa* iznosila je 0,0 log cfu/100 mL, a sljedeća dva dana (šesti i sedmi dan pokusa), vrijednosti su rasle, prvo na 0,6 log cfu/100 mL, a potom na 0,8 log cfu/100 mL, nakon čega je ponovno uslijedio pad na 0,0 log cfu/100 mL u devetom danu pokusa. Posljednji porast u vrijednosti broja cfu *Pseudomonasa* zabilježen je u naredna dva dana kada je ta vrijednost iznosila 0,3 log cfu/100 mL, a posljednji dan pokusa se vrijednost ponovno vratila na 0,0 log cfu/100 mL.

U uzorku vode koji je sadržavao nosač sa srebrom, od početnog zabilježenog broja cfu *Pseudomonasa* od 0,8 log cfu/100 mL, vidljivo je smanjenje njihove brojnosti nakon prvog dodavanja fekalne otpadne vode (0,3 log cfu/100 mL), te zadržavanje iste vrijednosti idućih 24 h. Trećeg dana pokusa, zabilježen je blagi porast u broju cfu *Pseudomonasa*, sa vrijednošću od 0,5 log cfu/100 mL. Od četvrtog dana pokusa, pa sve do njegovog kraja, vrijednost broja cfu *Pseudomonasa* iznosila je 0,0 log cfu/100 mL, unatoč ponovnom dodavanju fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli*.

Temeljem navedenog, vidljivo je kako srebro ima izuzetno dobro dezinfekcijsko djelovanje na bakterije iz roda *Pseudomonas* (Slika 16.).



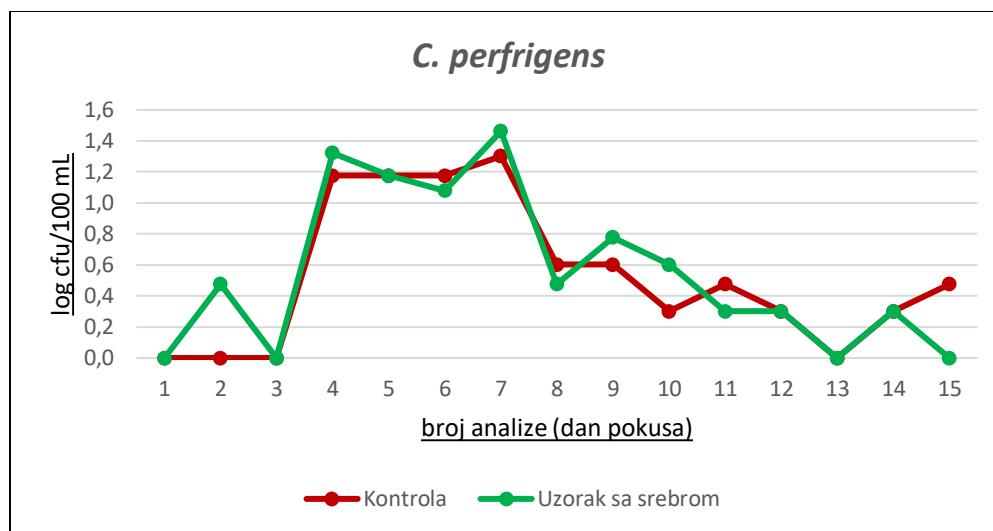
Slika 16. Grafički prikaz broja cfu *Pseudomonasa* u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza

3.1.5. *C. perfringens*

U oba uzorka vode, dinamika brojnosti cfu *C. perfringens* bila je približno usporedna tijekom cijelog pokusa. U kontrolnom uzorku, brojnost se s 0,0 log cfu/100 mL povećala na vrijednost od 1,2 log cfu/100 mL tek treći dan pokusa, zadržala je svoju vrijednost iduća dva dana, a vrhunac je dostignut peti dan pokusa, nakon ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli*, kada je brojnost iznosila 1,3 log cfu/100 mL. 24 h nakon dostizanja maksimalne vrijednosti, brojnost cfu *C. perfringens* pada na 0,6 log cfu/100 mL, gdje se zadržava još 24 h. Osmi dan pokusa, zabilježen je daljnji pad (0,3 log cfu/100 mL), a idućeg dana je vrijednost porasla na 0,5 log cfu/100 mL. U sljedeća dva dana pokusa zabilježen je pad, prvo na 0,3 log cfu/100 mL, a potom na 0,0 log cfu/100 mL, nakon čega je uslijedio „zrcalni“ rast u posljednja dva dana pokusa, prvo na 0,3 log cfu/100 mL, te konačno na 0,5 log cfu/100 mL u posljednjem danu pokusa.

Uzorak vode sa srebrom, nakon dodavanja fekalne otpadne vode, dao je vrijednost broja cfu *C. perfringens* od 0,5 log cfu/100 mL, nakon čega se ona vratila na 0,0 log cfu/100 mL sljedećeg dana. Kao i kod kontrolnog uzorka, trećeg dana pokusa zabilježen je nagli porast broja cfu *C. perfringens* i iznosio je čak i više nego kod kontrolnog uzorka (1,3 log cfu/100 mL). Kroz iduća dva dana pokusa, vrijednost se smanjila prvo na 1,2 log cfu/100 mL, a potom na 1,1 log cfu/100 mL. Vrhunac je dostignut kao i kod kontrolnog uzorka, nakon ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli*, te je on iznosio 1,5 log cfu/100 mL. 24 h nakon, zabilježeno je smanjenje vrijednosti na 0,5 log cfu/100 mL. Sedmi dan pokusa, vrijednost je ponovno narasla (0,8 log cfu/100 mL), te nastavila opadati kroz sljedeća dva dana, prvo na 0,6 log cfu/100 mL, a potom na 0,3 log cfu/100 mL, gdje se zadržala i deseti dan pokusa. Vrijednost broja cfu *C. perfringens*, u posljednja tri dana pokusa, pada na 0,0 log cfu/100 mL, raste na vrijednost od 0,3 log cfu/100 mL, te konačno ponovno pada na 0,0 log cfu/100 mL (Slika 17.).

Prema rezultatima pokusa, dezinfekcijsko djelovanje srebra na *C. perfringens* nije posebno izraženo kao kod drugih indikatorskih mikroorganizama, te bi se trebale razmotriti druge metode dezinfekcije vode protiv *C. perfringens*.



Slika 17. Grafički prikaz broja cfu *C. perfringens* u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza

3.1.6. UBB/22 i UBB/37

Kod ukupnog broja bakterija koje rastu pri temperaturama od 22 °C (UBB/22) i 37 °C (UBB/37), u oba uzorka vode, zabilježena je slična dinamika porasta njihovog broja. Nagli rast u ukupnom broju bakterija pri 22 °C dogodio se četvrti dan pokusa (analiza 4), kada je vrijednost s 0,0 log cfu/1 mL porasla na 4,3 log cfu/1 mL u kontrolnom uzorku, odnosno 3,6 log cfu/1 mL u uzorku vode sa srebrom. U kontrolnom uzorku, navedena vrijednost je ostala ista kroz sljedećih 24 h, čak i nakon ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli*. U idućih pet dana pokusa, vrijednost broja cfu UBB/22 varirala je na dnevnoj razini sa vrijednostima, redom, 4,0 log cfu/1 mL , 4,5 log cfu/1 mL , 4,0, log cfu/1 mL 4,4 log cfu/1 mL , te 4,3 log cfu/1 mL . Jedanaesti dan pokusa zabilježen je vrhunac u broju cfu UBB/22 u kontrolnom uzorku, te je u tom trenutku vrijednost broja cfu UBB/22 iznosila 5,2 log cfu/1 mL , a kroz posljednja dva dana pokusa se zadržala na vrijednosti od 4,9 log cfu/1 mL (Slika 18.).

U uzorku vode sa srebrom, nakon navedenog velikog porasta u broju ukupnog broja bakterija pri 22 °C četvrti dan pokusa (3,6 log cfu/1 mL), ta vrijednost je kroz idućih 24 h ostala otprilike jednaka, te je iznosila 3,6 log cfu/1 mL , odnosno, 3,7 log cfu/1 mL , nakon ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli*. Uslijedio je pad vrijednosti broja cfu UBB/22 šesti i sedmi dan (2,8 log cfu/1 mL), nakon čega je ta vrijednost postepeno rasla do završetka pokusa, dajući redom vrijednosti: 2,9 log cfu/1 mL (osmi dan pokusa), 3,4 log cfu/1 mL (deveti dan pokusa), 4,0 log cfu/1 mL (deseti dan pokusa), 4,1 log cfu/1 mL (jedanaesti dan pokusa), 4,2 log cfu/1 mL (dvanaesti dan pokusa), te konačno 4,3 log cfu/1 mL (trinaesti dan pokusa), kada je dostignut vrhunac u broju cfu UBB/22 u uzorku vode sa srebrom (Slika 18.)

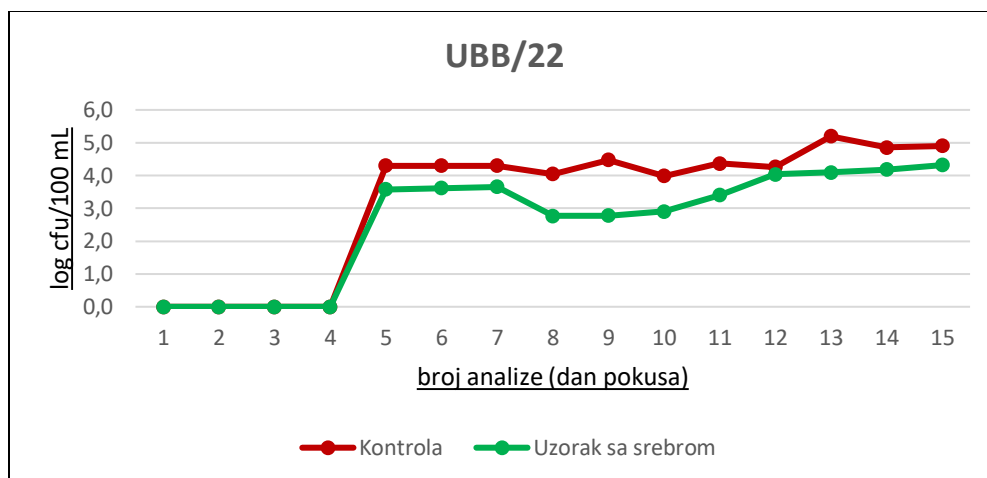
Kod ukupnog broja bakterija koje su izrasle pri temperaturi od 37 °C (UBB/37), također je zabilježen nagli rast četvrti dan pokusa, u oba uzorka vode. Kod kontrolnog uzorka su vrijednosti broja cfu UBB/37 bile više u odnosu na uzorak vode sa srebrom cijelo vrijeme trajanja pokusa. Prva zabilježena vrijednost broja cfu UBB/37 bila je 4,1 log cfu/1 mL , kroz četvrti i peti dan pokusa prije ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli*, a nakon dodavanja vrijednost je bila 4,3 log cfu/1 mL . Šesti dan pokusa zabilježen je pad vrijednosti (4,0 log cfu/1 mL), sedmi dan porast (4,5 log cfu/1 mL), te osmi dan ponovno pad vrijednosti cfu UBB/37 na 3,8 log cfu/1 mL . Nakon toga, uslijedio je postepeni rast do završetka pokusa, dajući vrijednosti: 4,2 log cfu/1 mL (deveti dan pokusa), 4,4 log cfu/1 mL (deseti dan pokusa), 4,9 log cfu/1 mL (jedanaesti dan pokusa), 5,1 log cfu/1 mL (dvanaesti dan pokusa), te konačno 5,0 log cfu/1 mL (trinaesti dan pokusa) (Slika 19.).

U uzorku vode sa srebrom, nakon naglog porasta u broju cfu UBB/37 na vrijednost od 3,6 log cfu/1 mL , uslijedio je blagi pad prije (3,3 log cfu/1 mL), ali i poslije (3,2 log cfu/1 mL) ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli*. U iduća 24 h, zabilježena je najniža

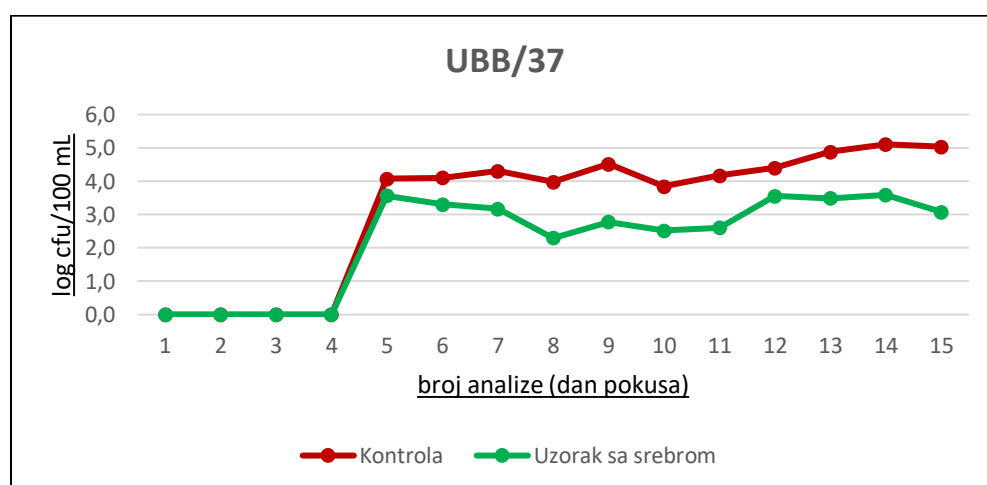
vrijednost broja cfu UBB/37 kada je iznosila 2,3 log cfu/1 mL , nakon čega je vrijednost rasla (2,8 log cfu/1 mL), te ponovno pala na 2,5 log cfu/1 mL osmi, odnosno 2,6 log cfu/1 mL deveti dan pokusa. Od desetog dana pokusa, vrijednosti cfu UBB/37 su se povećale u odnosu na prethodni dan, te su redom iznosile: 3,6 log cfu/1 mL (deseti dan pokusa), 3,5 log cfu/1 mL (jedanaesti dan pokusa), 3,6 log cfu/1 mL (dvanaesti dan pokusa), te konačno 3,1 log cfu/1 mL (trinaesti dan pokusa) (Slika 19.)

Razlog za nagli rast ukupnog broja bakterija koji se dogodio četvrti dan pokusa, kao i blagi porast te vrijednosti prema kraju pokusa, vjerojatno je taj što srebro nema jednak učinak na sve vrste mikroorganizama koje spadaju u ovaj indikatorski parametar, što znači da smanjenje broja jedne vrste mikroorganizama stvara pogodnije uvjete za razvoj druge, najčešće u dostupnosti organske tvari kojom se ti mikroorganizmi hrane.

Treba ipak napomenuti kako je u uzorku vode koja je sadržavala srebro zabilježen manji broj mikroorganizama nego u kontrolnom uzorku, što dovodi do zaključka kako srebro ipak posjeduje dezinfekcijski učinak u vodi u odnosu na vodu koja ni na koji način nije kondicionirana ili tretirana, kada se gleda ukupni broj mikroorganizama koji se potencijalno mogu nalaziti u vodi (Slika 18., Slika 19.).



Slika 18. Grafički prikaz broja cfu ukupnog broja bakterija koje rastu pri temperaturi od 22°C u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza



Slika 19. Grafički prikaz broja cfu ukupnog broja bakterija koje rastu pri temperaturi od 37 °C u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza

3.2. Rezultati analiza mikrobioloških pokazatelja u uzorcima vode iz cisterni

Analiza mikrobioloških pokazatelja kvalitete vode provedena je na uzorcima uzetim iz dvaju cisterni na području Istre. Na prvoj cisterni (RE), analizirano je njih 14, od kojih je prvih 7 predstavljalo uzorak vode prije, a drugih 7 nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu. Na

drugoj lokaciji (ME) analizirano je 19 uzoraka, prvih 10 uzoraka prije postavljanja nosača sa srebrom u cisternu, a ostalih 9 nakon. Rezultati analiza prikazani su tablično u Tablici 4. i Tablici 5., gdje isprekidana linija predstavlja granicu između uzoraka uzetih prije i nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu. Grafički prikazi dobiveni su pomoću računalnog programa (MS Excell 2016). Crvena linija na grafovima predstavlja uzorke analizirane prije postavljanja nosača sa srebrom u cisternu, a zelena nakon. Kao i kod laboratorijskog pokusa, brojnost prisutnih mikroorganizama iskazana je kao *log cfu/100 mL* za uzorke vode na kojima se ispitala prisutnost pojedinih vrsta bakterija, odnosno *log cfu/1 mL* za uzorke vode na kojima se ispitivao ukupan broj bakterija koje su porasle pri temperaturama od 22 i 37 °C (UBB/22, UBB/37).

Mikrobiološka analiza pokazala je kako u niti jednom uzorku na prvoj cisterni (RE), a u samo dva od 19 uzorka na drugoj cisterni (ME) pronađene su vrlo male koncentracije bakterije *P. aeruginosa* (0,301 log cfu/100 mL). Zbog navedenog, rezultati analiza na taj parametar su u nadolazećim potpoglavljima izostavljeni.

Tablica 4. Vrijednosti pojedinih analiziranih parametara na prvoj lokaciji istraživanja (RE), izraženih kao log cfu/100 mL ili log cfu/1 mL

Datum analize uzorka	UK (log cfu/100 mL)	EC (log cfu/100 mL)	ENT (log cfu/100 mL)	CP (log cfu/100 mL)	UBB/22 (log cfu/1 mL)	UBB/37 (log cfu/1 mL)
13.1.2020	2,703	2,004	2,364	1,908	2,876	2,479
18.1.2020	2,592	1,519	2,212	1,799	3,204	3,292
19.1.2020	2,479	0,845	2,179	1,863	2,904	2,870
25.1.2020	2,004	0,778	1,826	1,851	3,236	2,820
26.1.2020	2,004	0,954	1,708	1,447	3,087	2,004
8.2.2020	2,749	2,164	0,602	0,0	3,017	2,904
9.2.2020	3,114	2,417	0,477	0,0	3,114	2,955
16.3.2020	1,959	1,756	0,0	0,778	2,258	1,732
17.3.2020	2,004	1,591	0,954	0,778	2,207	1,322
24.3.2020	1,908	1,146	0,699	0,778	2,281	1,613
11.5.2020	1,785	1,041	1,041	0,778	2,303	2,004
12.5.2020	2,207	1,041	0,301	0,778	2,303	1,987
18.5.2020	1,839	1,568	1,643	0,954	1,959	1,643
24.8.2020	1,857	0,845	1,613	1,079	2,479	2,243

Tablica 5. Vrijednosti pojedinih analiziranih parametara na drugoj lokaciji istraživanja (ME), izraženih kao log cfu/100 mL ili log cfu/1 mL

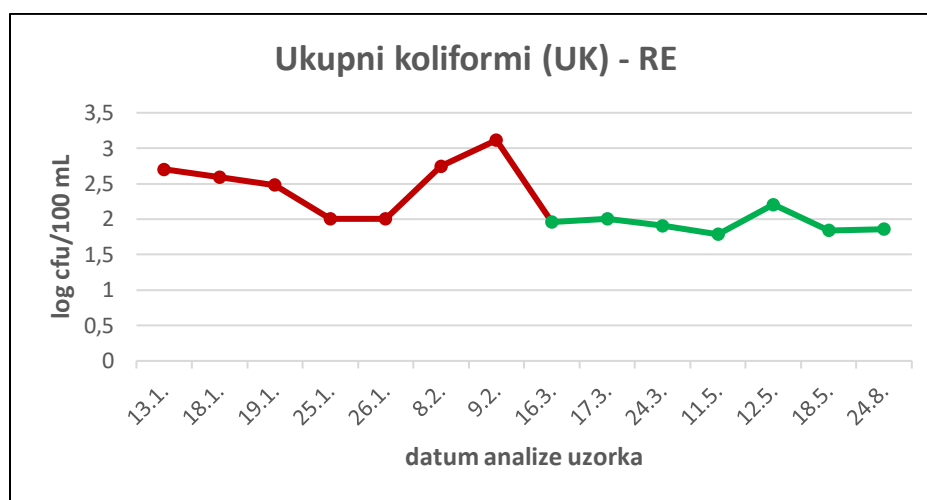
Datum analize uzorka	UK (log cfu/100 mL)	EC (log cfu/100 mL)	ENT (log cfu/100 mL)	CP (log cfu/100 mL)	UBB/22 (log cfu/1 mL)	UBB/37 (log cfu/1 mL)
18.1.2020	2,303	0,699	0,477	1,176	3,080	2,533
19.1.2020	2,256	0,477	0,477	0,903	2,603	1,756
25.1.2020	1,204	0,0	0,954	1,447	2,876	2,955
26.1.2020	1,415	0,0	0,845	1,531	2,964	2,004
1.2.2020	1,505	0,301	1,041	0,0	2,955	2,117
2.2.2020	2,814	0,845	0,845	0,0	2,303	1,708
8.2.2020	2,133	1,431	0,602	0,0	2,507	2,433
9.2.2020	2,417	0,602	0,602	0,0	2,045	1,908
15.2.2020	2,479	0,477	1,255	1,322	3,681	2,846
16.2.2020	2,117	1,041	1,531	1,322	3,000	2,7
7.3.2020	1,491	0,778	1,792	0,699	3,204	2,558
8.3.2020	1,041	0,699	1	1,041	2,207	2,149
16.3.2020	1,708	0,301	0,845	0,778	2,004	1,851
17.3.2020	1,322	0,0	1,000	0,602	2,004	1,908
23.3.2020	0,0	0,0	0,477	0,954	2,083	2,207
24.3.2020	1,556	0,0	0,0	0,778	2,045	1,322
11.5.2020	0,301	0,0	1,041	0,954	2,303	2,117
18.5.2020	1,079	0,954	0,778	0,602	2,507	2,507
19.5.2020	0,903	0,778	1,041	0,602	2,479	2,233

3.2.1. Ukupni koliformi (UK)

Na prvoj lokaciji istraživanja (RE), brojnost cfu ukupnih koliforma prvog ispitanog uzorka (13.1) iznosio je 2,703 log cfu/100mL. Sljedeća četiri uzorka pokazivali su manje vrijednosti, redom: 2,592 log cfu/100 mL (18.1.), 2,478 log cfu/100 mL (19.1), 2,004 log cfu/100 mL (25.1. i 26.1.). Nakon toga, uslijedio je rast u brojnosti ukupnih koliformnih bakterija u sljedeća dva uzorka u vrijednostima od 2,749 log cfu/100 mL (8.2.), te 3,114 log cfu/100 mL (9.2.), čime su prikazane vrijednosti broja ukupnih koliformnih bakterija u svim uzetim uzorcima prije postavljanja nosača sa srebrom u cisternu.

Sljedeći uzorak (16.3.), daje nižu vrijednost od najniže vrijednosti uzoraka prije postavljanja srebra u cisternu, te ona iznosi 1,959 log cfu/100 mL. Idući uzorak (17.3.), daje nešto višu vrijednost

(2,004 log cfu/100 mL), a brojnost ukupnih koliforma u sljedeća dva uzorka pada na vrijednosti 1,908 log cfu/100 mL (24.3.) i 1,785 (11.5.). Najveći porast u broju ukupnih koliforma zabilježen je na uzorku analiziranom 12.5. u vrijednosti od 2,206 log cfu/100 mL, nakon čega je uslijedio pad vrijednost na 1,839 log cfu/100 mL (18.5.), te konačno blagi rast u brojnosti ukupnih koliformnih bakterija na posljednjem analiziranom uzorku (24.8.) u vrijednosti od 1,857 log cfu/100 mL (Slika 20.).

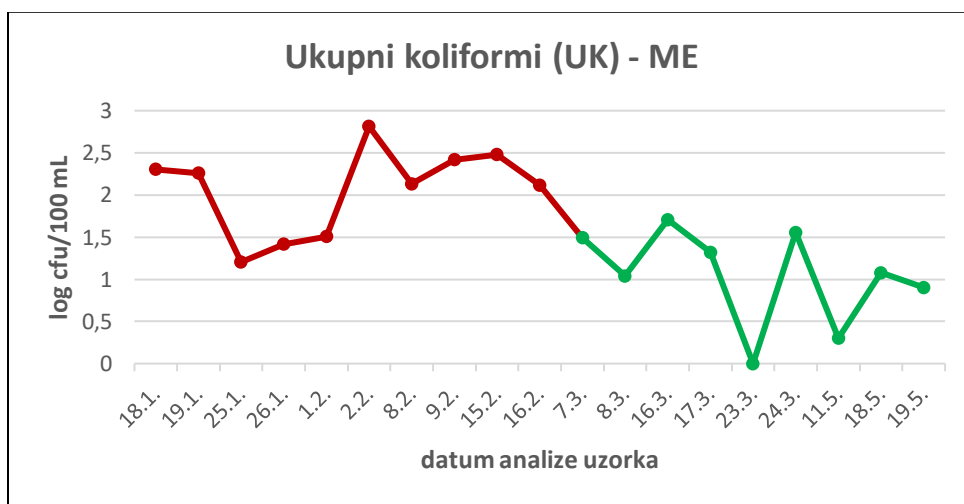


Slika 20. Grafički prikaz broja cfu ukupnih koliformnih bakterija (UK) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zeleno linija) dodavanja srebra, uzetim na prvoj cisterni (RE), po datumima analize pojedinih uzoraka

Uzorci vode u drugoj cisterni (ME) pokazivali su intenzivnije promjene u brojnosti ukupnih koliformnih bakterija. Vrijednost broja ukupnih koliforma na prvom analiziranom uzorku (18.1.) iznosila je 2,303 log cfu/100 mL, a drugi analizirani uzorak (19.1.) pokazivao je nešto nižu vrijednost od 2,257 log cfu/100 mL. Uzorak analiziran 25.1. pokazuje puno nižu vrijednost od prethodnih (1,204 log cfu/100 mL), a potom se bilježi rast u sljedeća dva uzorka u vrijednostima od 1,415 log cfu/100 mL (26.1.), te 1,505 log cfu/100 mL (1.2.). Nagli rast u broju ukupnih koliforma primijećen je u uzorku analiziranom 2.2. u vrijednosti od 2,814 log cfu/100 mL. Idući uzorak (8.2.) daje nižu vrijednost (2,134 log cfu/100 mL) od prethodnog, a u sljedeća dva uzorka

zabilježen je rast u broju ukupnih koliforma u vrijednostima od 2,417 log cfu/100 mL (9.2.) i 2,479 log cfu/100 mL (15.2.). Posljednji analizirani uzorak vode na brojnost ukupnih koliforma prije postavljanja nosača sa srebrom (16.2.) iznosio je 2,117 log cfu/100 mL.

Prvi uzorak nakon postavljanja nosača sa srebrom (7.3.) daje vrijednost broja ukupnih koliformnih bakterija od 1,491 log cfu/100 mL, nakon čega slijedi pad te vrijednosti na 1,041 log cfu/100 mL (8.3.). U uzorku analiziranom 16.3. primijećen je rast ukupnih koliforma na 1,708 log cfu/100 mL. U sljedeća tri uzorka bilježi se prvo blagi pad, vrijednosti od 1,322 log cfu/100 mL (17.3.), a potom potpuni pad te vrijednosti na 0,0 log cfu/100 mL (23.3.), te ponovni rast te vrijednosti na 1,556 log cfu/100 mL (24.3.). U odnosu na prethodni analizirani uzorak, vrijednost broja ukupnih koliforma naglo pada na vrijednost od 0,301 log cfu/100 mL (11.5.), raste na 1,709 log cfu/100 mL (18.5.), a konačna vrijednost broja ukupnih koliformnih bakterija iznosila je 0,903 log cfu/100 mL u posljednjem analiziranom uzorku (19.5.) (Slika 21.).

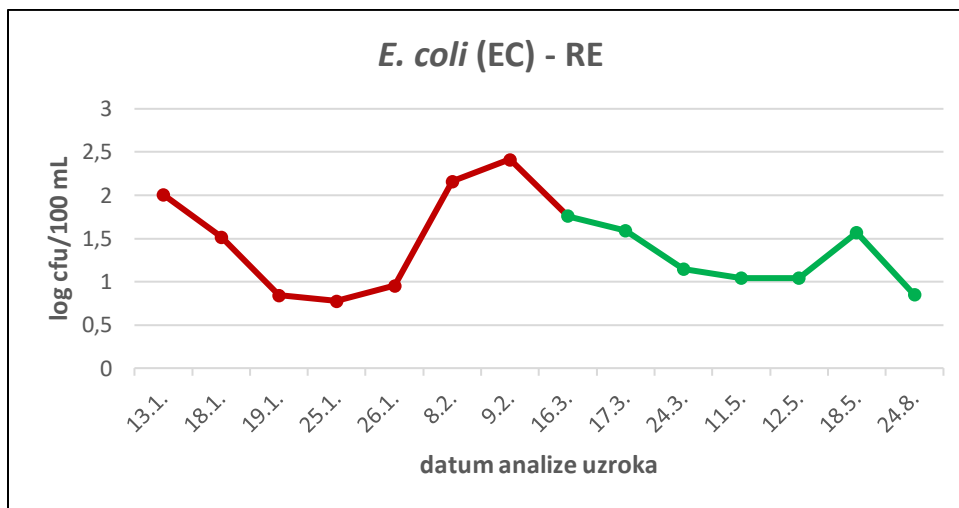


Slika 21. Grafički prikaz broja cfu ukupnih koliformnih bakterija (UK) u 100 , prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzoraka vode uzetim na drugoj cisterni (ME), po datumima analize pojedinih uzoraka

3.2.2. *E. coli* (EC)

Početna vrijednost broja cfu *E. coli* u prvom ispitanom uzorku (13.1.) na prvoj cisterni (RE) iznosila je 2,004 log cfu/100 mL. U sljedeća tri uzorka ta vrijednost pada, redom: 1,519 log cfu/100 mL (18.1.), 0,845 log cfu/100 mL (19.1.), te 0,778 log cfu/100 mL (25.1.). U iduća tri analizirana uzorka vrijednost broja cfu *E. coli* raste, prvo blago, na 0,954 log cfu/100 mL (26.1.), a potom izraženije, na 2,164 log cfu/100 mL (8.2.), te 2,417 log cfu/100 mL (9.2), čime je dosegnut vrhunac u brojnosti cfu *E. coli* među svim analiziranim uzorcima.

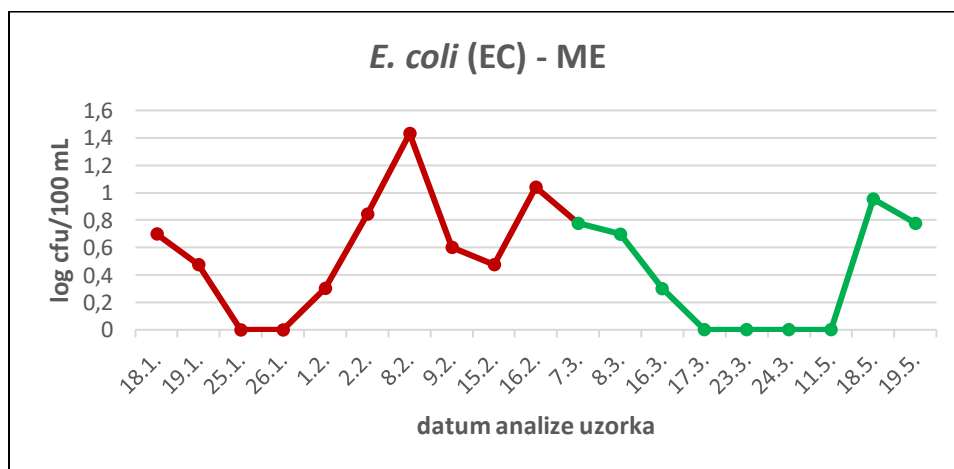
Nakon navedenog vrhunca, uslijedio je pad u broju cfu *E. coli*, na vrijednost od 1,756 log cfu/100 mL, u prvom analiziranom uzorku nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu (16.3.). U sljedeća četiri uzorka zabilježen je pad vrijednosti broja cfu *E. coli*, redom: 1,591 log cfu/100 mL (17.3.), 1,146 log cfu/100 mL (24.3.), 1,041 log cfu/100 mL (24.3. i 12.5.). Nakon navedenog, uslijedio je rast vrijednosti na 1,568 log cfu/100 mL (18.5.), a u posljednjem analiziranom uzorku (24.8.), broj cfu *E. coli* iznosio je 0,845 log cfu/100 mL (Slika 22.).



Slika 22. Grafički prikaz broja cfu *E. coli* (EC) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na prvoj cisterni (RE), po datumima analize pojedinih uzoraka

Prva zabilježena vrijednost broja cfu *E. coli* u prvom uzorku vode (18.1.) uzetom iz druge cisterne (ME), iznosila je 0,699 log cfu/100 mL. U sljedeća tri uzorka ta vrijednost je padala, prvo 0,477 log cfu/100 mL (19.1.), a potom na 0,0 log cfu/100 mL (25.1. i 26.1.). Iduća tri uzorka bilježe ponovni rast broja cfu *E. coli*, prvo na 0,301 log cfu/100 mL (1.2.), zatim na 0,845 log cfu/100 mL (2.2.), a vrhunac je dostignut 8.2. kada je vrijednost broja cfu *E. coli* iznosio 1,431 log cfu/100 mL. Slijedi pad te vrijednosti na 0,602 log cfu/100 mL (9.2.), potom na 0,477 log cfu/100 mL (15.2.), a u posljednjem uzorku prije postavljanja nosača sa srebrom u cisternu (16.2.), vrijednost broja cfu *E. coli* iznosio je 1,041 log cfu/100 mL.

Prvi analizirani uzorak nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu (7.3.) daje vrijednost broja cfu *E. coli* od 0,778 log cfu/100 mL. U sljedeća dva analizirana uzorka, zabilježene su vrijednosti od 0,699 log cfu/100 mL (8.3.) i 0,301 log cfu/100 mL, a u idućih četiri uzorka (17.3., 23.3., 24.3. i 11.5.) vrijednost broja cfu *E. coli* iznosila je 0,0 log cfu/100 mL. U uzorku analiziranom 18.5. bilježi se nagli rast broja cfu *E. coli*, u odnosu na prethodne, u vrijednosti od 0,954 log cfu/100 mL, a u posljednjem analiziranom uzorku (19.5.), ta vrijednost je iznosila 0,778 log cfu/100 mL (Slika 23.).

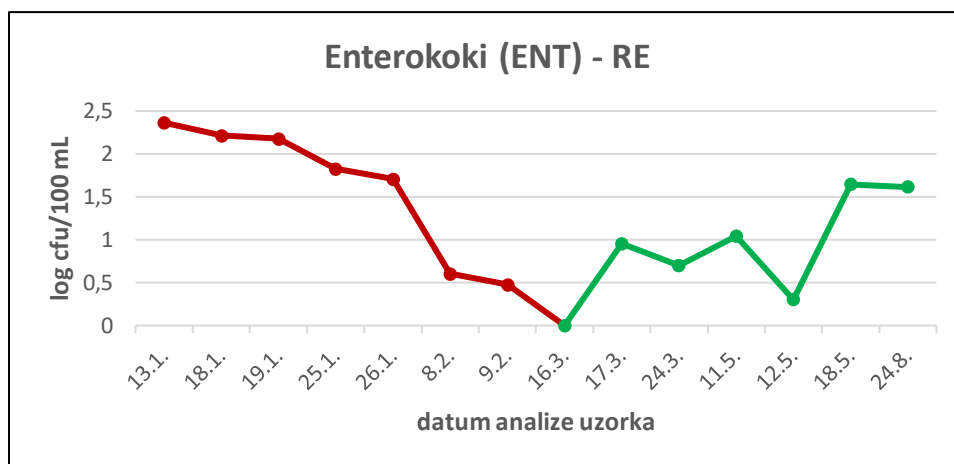


Slika 23. Grafički prikaz broja cfu *E. coli* (EC) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na drugoj cisterni (ME), po datumima analize pojedinih uzoraka

3.2.3. Enterokoki (ENT)

Početna vrijednost broja cfu enterokoka u uzorcima vode prikupljenim na prvoj cisterni (RE), bila je relativno visoka, 2,363 log cfu/100 mL (13.1.). U sljedeća četiri uzorka, ta vrijednost je postupno padala, prvo na 2,212 log cfu/100 mL (18.1.), zatim na 2,179 log cfu/100 mL (19.1.), 1,826 log cfu/100 mL (25.1.), te na 1,707 log cfu/100 mL (26.1.). Nakon navedenog pada, uslijedio je intenzivniji pad broja cfu enterokoka na vrijednost 0,602 log cfu/100 mL (8.2.), te ponovno blagi pad na vrijednost od 0,477 log cfu/100 mL (9.2.).

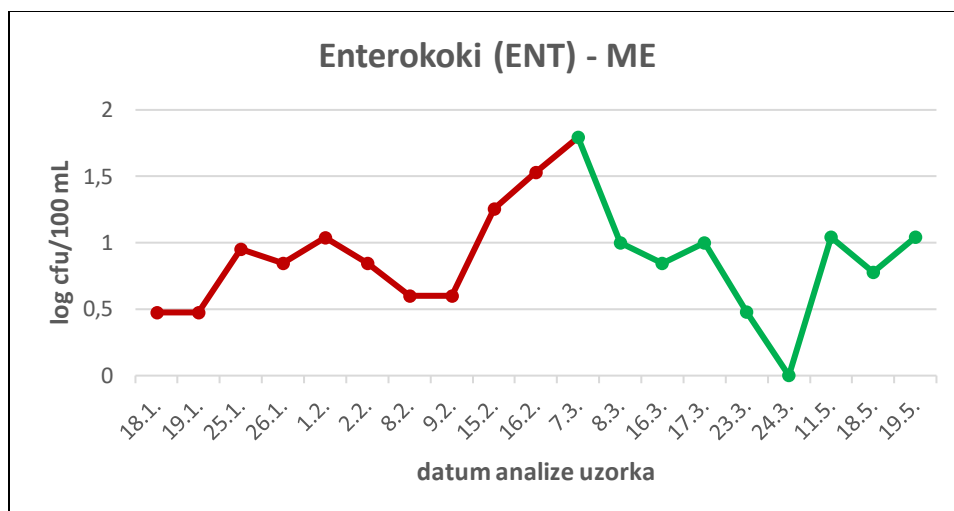
U prvom ispitanom uzorku vode nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu (16.3.), nije zabilježeno prisustvo enterokoka (0,0 log cfu/100 mL). U sljedećem uzorku (17.3.), zabilježen je rast broja cfu enterokoka u vrijednosti od 0,954 log cfu/100 mL, nakon čega je uslijedio blagi pad na 0,699 log cfu/100 mL (24.3.), te ponovni rast na vrijednosti od 1,041 log cfu/100 mL (11.5.). U uzorku analiziranom 12.5., zabilježena je manja vrijednost broja cfu enterokoka, u odnosu na prethodni uzorak, od 0,301 log cfu/100 mL. U posljednja dva uzorka, vrijednost broja cfu enterokoka bila je slična, prvo je iznosila 1,643 log cfu/100 mL (18.5.), a potom 1,612 log cfu/100 mL (24.8.) (Slika 24.).



Slika 24. Grafički prikaz broja cfu enterokoka (ENT) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na prvoj cisterni (RE), po datumima analize pojedinih uzoraka

U drugoj cisterni (ME), početna vrijednost broja cfu enterokoka u uzorcima vode bila je niža u odnosu na prvu cisternu, te je iznosila 0,477 log cfu/100 mL (18.1). Ista vrijednost dobivena je i na drugom analiziranom uzorku (19.1). Nakon toga, uslijedio je rast vrijednosti broja cfu enterokoka na 0,954 log cfu/100 mL (25.1.), blagi pad na 0,845 log cfu/100 mL (26.1.), te ponovni rast te vrijednosti na 1,041 log cfu/100 mL (1.2.). U iduća tri uzorka, vrijednost broja cfu enterokoka je prvo pala ponovno na 0,845 log cfu/100 mL (2.2.), a potom na 0,602 log cfu/100 mL (8.2. i 9.2.). Slijedi rast u vrijednosti broja cfu enterokoka na 1,225 log cfu/100 mL (15.2.) i konačno 1,531 log cfu/100 mL (16.2.), prije postavljanja nosača sa srebrom u cisternu.

Maksimalna vrijednosti broja cfu enterokoka zabilježena je u prvom analiziranom uzorku vode nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu (7.3.), kada je ona iznosila 1,792 log cfu/100 mL, nakon čega je uslijedio pad vrijednosti, prvo na 1,000 log cfu/100 mL (8.3.), a zatim na 0,845 log cfu/100 mL (8.3.). U sljedeća tri uzorka prvo je zabilježen rast vrijednosti broja cfu enterokoka ponovno na 1,000 log cfu/100 mL (17.3.), a nakon njega pad na 0,477 log cfu/100 mL (23.3.), te 0,0 log cfu/100 mL (24.3.). Idući analizirani uzorak (11.5.), bilježi vrijednost broja cfu enterokoka od 1,041 log cfu/100 mL. U posljednja dva analizirana uzorka zabilježene su vrijednosti broja cfu enterokoka od 0,778 log cfu/100 mL (18.5.), te konačno 1,041 log cfu/100 mL (19.5) (Slika 25.).

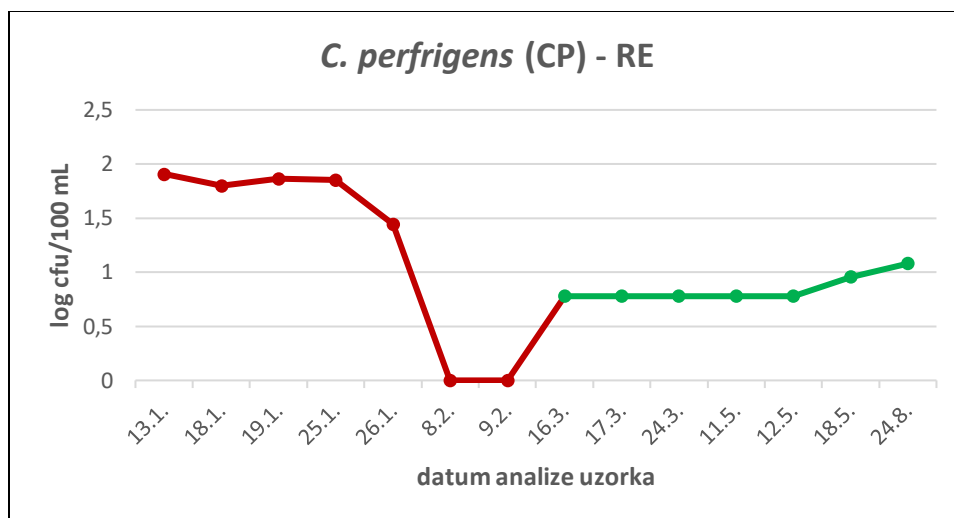


Slika 25. Grafički prikaz broja cfu enterokoka (ENT) u 100 mL uzorka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na drugoj cisterni (ME), po datumima analize pojedinih uzorka

3.2.4. *C. perfringens*

Na prvoj cisterni (RE), broj cfu *C. perfringens* u prvom ispitanom uzorku (13.1.) iznosio je 1,908 log cfu/100 mL. U iduća tri uzorka, vrijednosti se nisu puno mijenjale, a iznosile su, redom: 1,799 log cfu/100 mL (18.1.), 1,863 log cfu/100 mL (19.1.), te 1,851 log cfu/100 mL (25.1.). Uzorak analiziran 26.1. pokazivao je nešto nižu vrijednost broja cfu *C. perfringens* od 1,447 log cfu/100 mL, a iduća dva uzorka (8.2. i 9.2.) nisu pokazivala znakove prisutnosti *C. perfringens* u analiziranoj vodi (0,0 log cfu/100 mL).

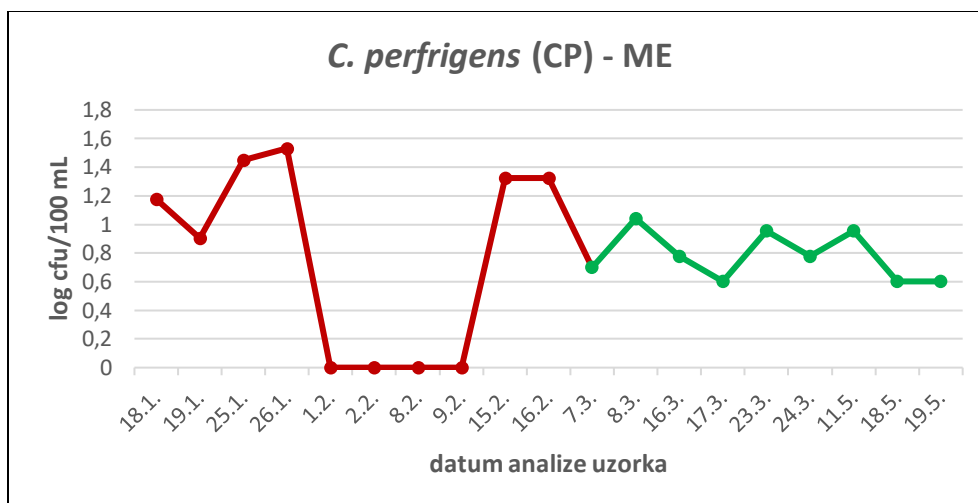
Nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu, u prvih pet uzorka (16.3., 17.3., 24.3., 11.5., te 12.5.) izmjerene su vrijednosti broja cfu *C. perfringens* od 0,778 log cfu/100 mL. U posljednja dva uzorka ta vrijednost se nešto povećala u odnosu na prethodne, te je iznosila 0,954 log cfu/100 mL (18.5.), odnosno 1,079 log cfu/100 mL (24.8.) (Slika 26.).



Slika 26. Grafički prikaz broja cfu *C. perfringens* (CP) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelenja linija) dodavanja srebra, uzetim na prvoj cisterni (RE), po datumima analize pojedinih uzoraka

Na drugoj lokaciji istraživanja (ME), vrijednost broja cfu *C. perfringens* u prvom analiziranom uzorku (18.1.) iznosila je 1,176 log cfu/100 mL, a u sljedećem (19.1.) 0,903 log cfu/100 mL. Nakon toga, vrijednost broja cfu *C. perfringens* raste na 1,447 log cfu/100 mL (25.1.), a potom i na 1,531 log cfu/100 mL (26.1.). U idućih četiri uzorka (1.2., 2.2., 8.2., te 9.2.), vrijednost broja cfu *C. perfringens* iznosila je 0,0 log cfu/100 mL, nakon čega raste na 1,322 log cfu/100 mL (15.2. i 16.2.).

Nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu, broj cfu *C. perfringens* pada na 0,699 log cfu/100 mL u prvom analiziranom uzorku (7.3.), dok je u drugom (8.3.) zabilježen blagi porast na vrijednost od 1,041 log cfu/100 mL. Nakon toga, uslijedio je pad te vrijednosti, prvo na 0,778 log cfu/100 mL (16.3.), a potom i na 0,602 log cfu/100 mL (17.3.). U sljedeća tri uzorka, zabilježen je rast broja cfu *C. perfringens* na 0,954 log cfu/100 mL (23.3.), zatim pad na 0,778 log cfu/100 mL (24.3.), te ponovni rast na 0,954 log cfu/100 mL (11.5.). Posljednja dva uzorka (18.5. i 19.5.) bilježe isti broj cfu *C. perfringens* u vrijednosti od 0,602 log cfu/100 mL. (Slika 27.).



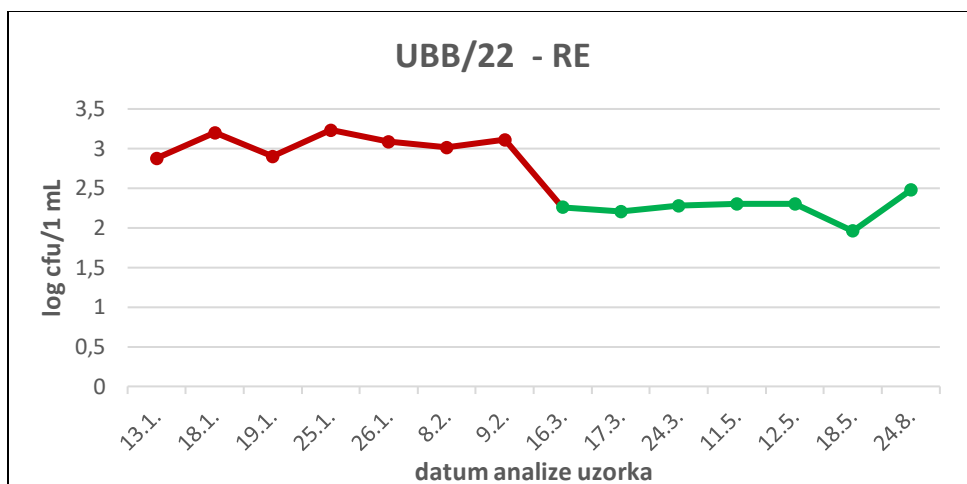
Slika 27. Grafički prikaz broja cfu *C. perfringens* (CP) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zeleno linija) dodavanja srebra, uzetim na drugoj cisterni (ME), po datumima analize pojedinih uzoraka

3.2.5. Ukupan broj bakterija pri 22 °C i 37 °C (UBB/22 i UBB/37)

3.2.5.1. UBB/22

Broj cfu UBB/22 u prvom analiziranom uzorku (13.1.), na prvoj cisterni (RE), iznosio je 2,876 log cfu/1 mL. U drugom uzorku (18.1.), ta vrijednost je porasla na 3,204 log cfu/1 mL, a u trećem (19.1.) je pala na 2,903 log cfu/1 mL. U četvrtom uzorku (25.1.) zabilježen je rast broja cfu UBB/22 na 3,235 log cfu/1 mL. U sljedećih tri uzorka, vrijednost broja cfu UBB/22 bio je otprilike podjednak, sa vrijednostima: 3,086 log cfu/1 mL (26.1.), 3,017 log cfu/1 mL (8.2.), te 3,114 log cfu/1 mL (9.2.).

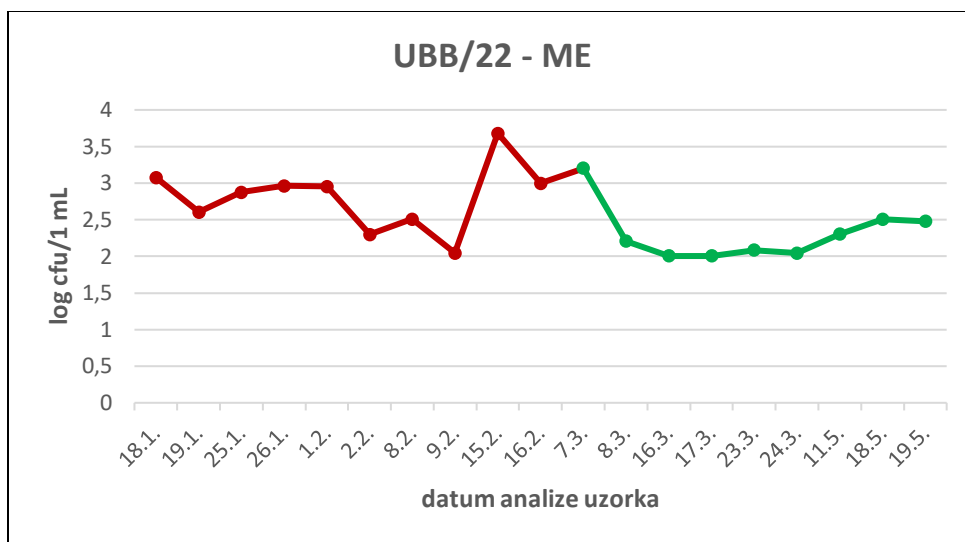
Prvi analizirani uzorak nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu (16.3.), dao je vrijednost broja cfu UBB/22 od 2,258 log cfu/1 mL, nakon čega je ta vrijednost pala na 2,207 log cfu/1 mL (17.3.). Kroz iduća tri uzorka vrijednost je blago porasla na 2,281 log cfu/1 mL (24.3.), a zatim na 2,303 log cfu/1 mL (11.5. i 12.5.). U posljednja dva uzorka prvo je primijećen pad vrijednosti broja cfu UBB/22 na 1,959 log cfu/1 mL (18.5.) i konačno na 2,476 log cfu/1 mL (19.5.) (Slika 28.).



Slika 28. Grafički prikaz broja cfu ukupnog broja bakterija koje su porasle pri 22 °C (UBB/22) u 1 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zeleno linija) dodavanja srebra, uzetim na prvoj cisterni (RE), po datumima analize pojedinih uzoraka

Na drugoj cisterni (ME), prvi analizirani uzorak davao je vrijednost broja cfu UBB/22 od 3,080 log cfu/1 mL (18.1.), nakon čega je uslijedio pad vrijednosti na 2,603 log cfu/1 mL (19.1.). U sljedeća tri uzorka vrijednost je nešto porasla te je iznosila, redom: 2,876 log cfu/1 mL (25.1.), 2,964 log cfu/1 mL (26.1.), te 2,954 log cfu/1 mL (1.2.). Vrijednost broja cfu UBB/22 u uzorku analiziranom 2.2. iznosila je 2,303 log cfu/1 mL, nakon čega je ta vrijednost rasla na 2,506 log cfu/1 mL (8.2.), te na 2,045 log cfu/1 mL (9.2.). Maksimalna vrijednost broja cfu UBB/22 iznosila je 3,681 log cfu/1 mL (15.2.), a nakon toga je ta vrijednost pala na 3,000 log cfu/1 mL (16.2.).

Nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu, prvi analizirani uzorak (7.3.) dao je vrijednost broja cfu UBB/22 od 3,204 log cfu/1 mL. Ta vrijednost je slična u sljedećih pet uzorka, te je iznosila, redom: 2,206 log cfu/1 mL (8.3.), 2,004 log cfu/1 mL (16.3. i 17.3.), 2,083 log cfu/1 mL (23.3.), te 2,045 log cfu/1 mL (24.3.). U iduća dva uzorka, vrijednost broja cfu UBB/22 je rasla, te je iznosila 2,303 log cfu/1 mL (11.5.) i 2,506 log cfu/1 mL (18.5.), a u posljednjem uzorku je zabilježen blagi pad te vrijednosti od 2,479 log cfu/1 mL (19.5.) (Slika 29.).

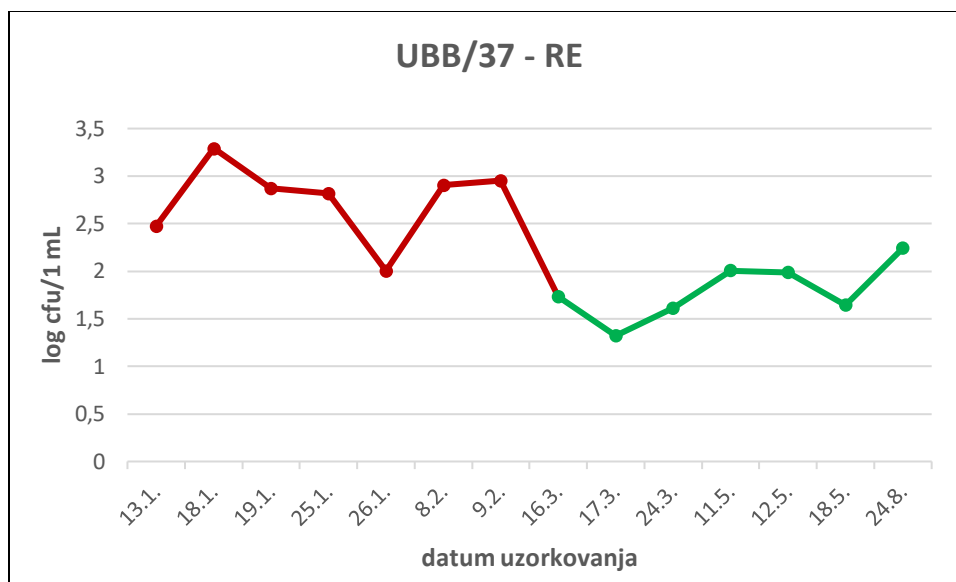


Slika 29. Grafički prikaz broja cfu ukupnog broja bakterija koje su porasle pri 22 °C (UBB/22) u 1 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zeleno linija) dodavanja srebra, uzetim na drugoj cisterni (ME), po datumima analize pojedinih uzoraka

3.2.5.2. UBB/37

Početna vrijednost broja cfu UBB/37 na prvoj cisterni (RE) iznosila je 2,479 log cfu/1 mL (13.1.), od koje je dalje porasla na 3,292 log cfu/1 mL (18.1.). U sljedeća tri uzorka, vrijednosti broja cfu UBB/37 je opadala, redom: 2,870 log cfu/1 mL (19.1.), 2,820 log cfu/1 mL (25.1.), te 2,004 log cfu/1 mL (26.1.). U posljednja dva uzorka prije postavljanja nosača sa srebrom u cisternu, zabilježen je porast broja cfu UBB/37 na vrijednosti, prvo od 2,903 log cfu/1 mL (8.2.), a potom na 2,954 log cfu/1 mL (9.2.).

Nakon dodavanja nosača sa srebrom cisternu, prvi uzorak (16.3.) pokazuje vrijednost broja cfu UBB/37 od 1,732 log cfu/1 mL, nakon čega se ta vrijednost spušta na 1,322 log cfu/1 mL (17.3.). U sljedeća tri uzorka vrijednost broja cfu UBB/37 raste prvo na 1,613 log cfu/1 mL (24.3.), 2,004 (11.5.), te 1,987 log cfu/1 mL (12.5.). Nakon navedenog rasta, zabilježen je te vrijednosti na 1,643 log cfu/1 mL (18.5.), a posljednji uzorak je dao vrijednost broja cfu UBB/37 od 2,243 log cfu/1 mL (24.8.) (Slika 30.).

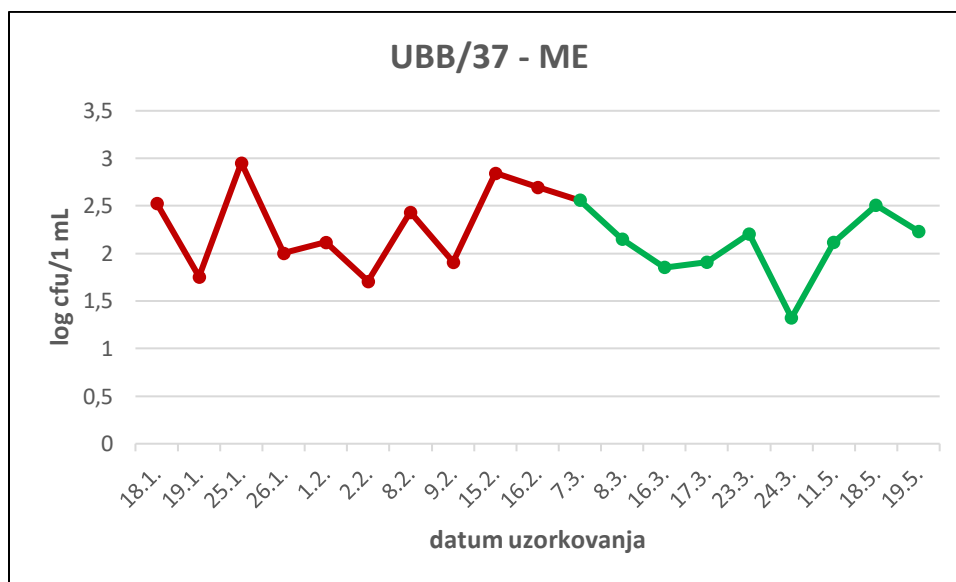


Slika 30. Grafički prikaz broja cfu ukupnog broja bakterija koje su porasle pri 37 °C (UBB/37) u 1 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zeleno linija) dodavanja srebra, uzetim na prvoj cisterni (RE), po datumima analize pojedinih uzoraka

Prvi analizirani uzorak na drugoj cisterni (ME), dao je vrijednost broja cfu UBB/37 od 2,533 log cfu/1 mL (18.1.). Sljedeći uzorak pokazao ne nešto nižu vrijednost, 1,756 log cfu/1 mL (19.1.). Rast vrijednosti cfu UBB/37 zabilježen je na idućem uzorku (25.1.), te je ona iznosila 2,955 log cfu/1 mL, što je ujedno i bila maksimalna vrijednost broja cfu UBB/37. Sljedeći uzorak (26.1.) pokazivao je pad te vrijednosti na 2,004 log cfu/1 mL. U idućih pet uzoraka, na grafu se pojavljuje „cik – cak“ uzorak, odnosno vrijednosti između svakog uzorka rastu i padaju. Prvo je zabilježen blagi rast, u odnosu na prethodni uzorak, od 2,117 log cfu/1 mL (1.2.), nakon čega slijedi pad vrijednosti cfu UBB/37 na 1,708 log cfu/1 mL (2.2.), ponovno rast na 2,433 log cfu/1 mL (8.2.), pad na 1,908 log cfu/1 mL (9.2.), rast 2,846 log cfu/1 mL (15.2.), te pad na 2,700 log cfu/1 mL (16.2.).

Nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu, prvi uzorak (7.3.) daje nižu vrijednost od posljednjeg uzorka uzetog prije postavljanja srebra, te je ona iznosila 2,558 log cfu/1 mL. Sljedeća

dva uzorka pokazuju pad vrijednosti cfu UBB/37, prvo na 2,149 log cfu/1 mL (8.3.), a potom i na 1,851 log cfu/1 mL (16.3.), nakon čega je uslijedio rast na 1,908 log cfu/1 mL (17.3.), pa na 2,207 log cfu/1 mL (23.3.). Najniža vrijednost broja cfu UBB/37 zabilježena je na uzorku analiziranom 24.3. kada je ona iznosila 1,322 log cfu/1 mL. Nakon toga, uslijedio je rast te vrijednosti, prvo na 2,117 log cfu/1 mL (11.5.), a zatim i na 2,507 log cfu/1 mL (18.5.). Posljednji uzorak, analiziran 19.5., dao je vrijednost broja cfu UBB/37 od 2,233 log cfu/1 mL (Slika 31.).



Slika 31. Grafički prikaz broja cfu ukupnog broja bakterija koje su porasle pri 37 °C (UBB/37) u 1 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zeleno linija) dodavanja srebra, uzetim na drugoj cisterni (ME), po datumima analize pojedinih uzoraka

3.2.6. Učinak dezinfekcijskog djelovanja srebra na vodu iz cisterni

Kako bi se dobila vrijednost učinka dezinfekcijskog djelovanja srebra na vodu iz obje cisterne, izražen u postotku, korištene su vrijednosti broja cfu pojedinih parametara izražene kao cfu/100 mL, odnosno cfu/1 mL. Navedene vrijednosti prikazane su u Tablici 6. i Tablici 7., gdje

isprekidana linija predstavlja granicu između uzoraka uzetih prije i nakon postavljanja nosača sa srebrom u cisternu.

Tablica 6. Vrijednosti pojedinih ispitivanih parametara, uzetih na prvoj lokaciji istraživanja (RE), izraženih kao cfu/100 mL ili cfu/1 mL

Datum analize uzorka	UK (cfu/100 mL)	EC (cfu/100 mL)	ENT (cfu/100 mL)	CP (cfu/100 mL)	UBB/22 (cfu/1 mL)	UBB/37 (cfu/1 mL)
13.1.2020	504	100	230	80	750	300
18.1.2020	390	32	162	62	1600	1960
19.1.2020	300	6	150	72	800	740
25.1.2020	100	5	66	70	1720	660
26.1.2020	100	8	50	27	1220	100
8.2.2020	560	145	3	0	1040	800
9.2.2020	1300	260	2	0	1300	900
16.3.2020	90	56	0	5	180	53
17.3.2020	100	38	8	5	160	20
24.3.2020	80	13	4	5	190	40
11.5.2020	60	10	10	5	200	100
12.5.2020	160	10	1	5	200	96
18.5.2020	68	36	43	8	90	43
24.8.2020	71	6	40	11	300	174

Tablica 7. Vrijednosti pojedinih ispitivanih parametara, uzetih na drugoj lokaciji istraživanja (ME), izraženih kao cfu/100 mL ili cfu/1 mL

Datum analize uzorka	UK (cfu/100 mL)	EC (cfu/100 mL)	ENT (cfu/100 mL)	CP (cfu/100 mL)	UBB/22 (cfu/1 mL)	UBB/37 (cfu/1 mL)
18.1.2020	200	4	2	14	340	1200
19.1.2020	180	2	2	7	56	400
25.1.2020	15	0	8	27	900	750
26.1.2020	25	0	6	33	100	920
1.2.2020	31	1	10	0	130	900
2.2.2020	650	6	6	0	50	200
8.2.2020	135	26	3	0	270	320
9.2.2020	260	3	3	0	80	110
15.2.2020	300	2	17	20	700	4800
16.2.2020	130	10	33	20	500	1000
7.3.2020	30	5	61	4	360	1600
8.3.2020	10	4	9	10	140	160
16.3.2020	50	1	6	5	70	100
17.3.2020	20	0	9	3	80	100
23.3.2020	0	0	2	8	160	120
24.3.2020	35	0	0	5	20	110
11.5.2020	1	0	10	8	130	200
18.5.2020	11	8	5	3	320	320
19.5.2020	7	5	10	3	300	170

Učinak dezinfekcijskog djelovanja je izračunat na način da srednja vrijednost broja kolonija nakon djelovanja srebra podijeljena sa srednjom vrijednosti broja kolonija nakon djelovanja srebra, dobivena vrijednost pomnožena je sa 100, te je ta dobivena vrijednost oduzeta od 100, prema izrazu:

$$\frac{(sr. \text{ vr nakon Ag} \cdot 100)}{sr. \text{ vr. prije Ag}} - 100 = \text{dezinfekcijsko djelovanje Ag [\%]}$$

Tablica 8. Srednje vrijednosti pojedinih parametara prije uvrštavnaja u logaritamsku funkciju

Lokacija RE	UK	EC	ENT	CP	UBB/22	UBB/37
Prije dodavanja Ag (sr.vr.)	464,9	79,4	94,7	44,4	780,0	1204,3
Nakon dodavanja Ag (sr.vr.)	89,9	24,1	15,1	6,3	75,1	188,6
Lokacija ME	UK	EC	ENT	CP	UBB/22	UBB/37
Prije dodavanja Ag (sr.vr.)	177,8	5,4	13,7	11,4	1109,1	316,9
Nakon dodavanja Ag (sr.vr.)	16,8	2,3	6,4	5,6	176,3	136,3

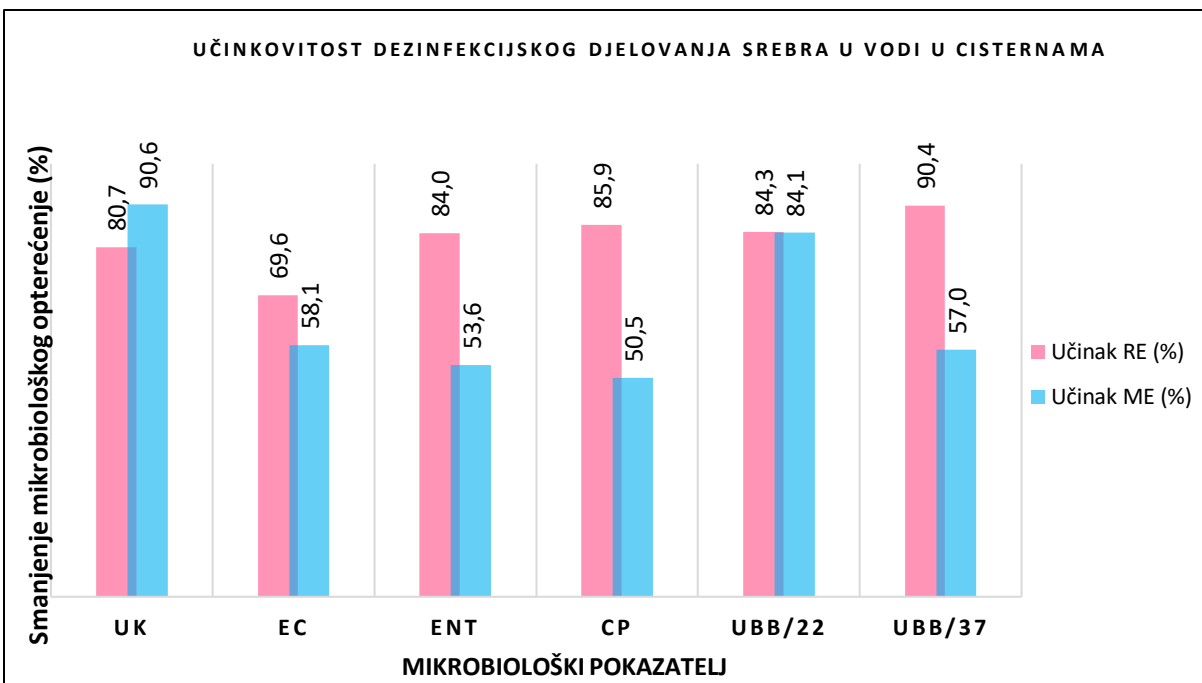
Učinkovitost dezinfekcijskog djelovanja nosača sa srebrom, na pojedine parametre vode iz cisterni koji su se pratili u ovom istraživanju, prikazani su u Tablici 9., te grafički (Slika 33.). Sve vrijednosti učinkovitosti dezinfekcijskog djelovanja srebra iskazane su u postotku, u odnosu na početnu vrijednost mikrobiološkog opterećenja vode od 100%.

Na prvoj cisterni (RE), vrijednost broja ukupnih koliformnih bakterija (UK) pala je za 80,7 %. Brojnost *E. coli* (EC), nakon dodavanja nosača sa srebrom u vodu, pala je za 69,6 %. Broj enterokoka (ENT) pao je za 84,0 %, a *C. perfringens* (CP) bilježila je pad od 85,9 %, u odnosu na početnu vrijednost. Brojnost bakterija koje su porasle na temperaturi od 22 °C (UBB/22) smanjila se za 84,3 % a bakterija koje su porasle na temperaturi od 37 °C (UBB/37) za 90,4 %.

Vrijednost broja UK, na drugoj cisterni (ME), smanjila se za 90,6 %, u odnosu na početnu vrijednost. Brojnost EC bilježila je pad vrijednosti od 58,1 %, ENT za 53,6 %, a brojnost CP smanjila se za 50,5 %. Vrijednost broja UBB/22, nakon dodavanja nosača sa srebrom u vodu, smanjena je za 84,3 %, a brojnost UBB/37 za 57,0% od početne vrijednosti.

Tablica 9. Smanjenje vrijednosti mikrobiološkog opterećenja vode iz obje cisterne nakon dodavanja nosača sa srebrom

Lokacija	UK	EC	ENT	CP	UBB/22	UBB/37
RE	80,7 %	69,6 %	84,0 %	85,9 %	84,3 %	90,4 %
ME	90,6 %	58,1 %	53,6 %	50,5 %	84,1 %	57,0 %



Slika 33. Grafički prikaz učinkovitosti dezinfekcijskog djelovanja vode iz obje cisterne (%), u odnosu na početno stanje od 100%

3.2.6.1. Koncentracija srebra u vodi nakon postavljanja nosača

U niti jednom od svih ispitanih uzoraka vode, izmjerena koncentracija srebra nije prelazila vrijednost od 1 µg/L, što je u skladu sa trenutnom zakonskom regulativnom (NN 125/17) koja propisuje MDK srebra u vodi za piće od 10 µg/L.

4. RASPRAVA

Cisterna, kao vodoopskrbni objekt za zahvaćanje i skladištenje kišnice, bez adekvatnog načina pročišćavanja vode potencijalno može biti izvor bakterija koje mogu uzrokovati bolesti u ljudi koji tu vodu konzumiraju. Danas najčešći način kondicioniranja, odnosno dezinfekcije vode za ljudsku potrošnju je uporaba preparata na bazi klora [Bowden et al., 2006.]. Kao alternativa korištenju klora za dezinfekciju vode, jedna od mogućih opcija jest korištenje srebra kao glavno dezinfekcijsko sredstvo, a u kontekstu ovog rada, srebro koje je navučeno na nosač, te se u tom obliku postavi u samu cisternu.

Uzimajući u obzir da je cisterna tip vodoopskrbnog objekta koji je nerijetko otvorenog tipa i u kojemu nema potpune kontrole vode koja u taj sustav dolazi, onečišćenje fekalnim materijalom predstavlja realnu opasnost. Sukladno tome, za ispitivanje kvalitete zdravstvene ispravnosti analizirane vode iz cisterni, služe indikatorske bakterije fekalnog zagađenja. U najvećoj mjeri, pokazatelji fekalnog onečišćenja voda jesu ukupne koliformne bakterije, s glavnim predstavnikom skupine *E. coli*, te crijevni enterokoki [Anderson, Whitlock i Harwood, 2005; Wheeler Alm, Burke i Spain, 2003], Uz navedene, dobri pokazatelji fekalnog onečišćenja jesu bakterije *C. perfringens* i *P. Aeruginosa* [Edberg et al., 2000; Bisson i Cabelli, 1980; Kalenić i Budimir, 2019; de Victorica i Galván, 2001]. U svrhu praćenja učinkovitosti dezinfekcijskog djelovanja srebra, provedena su ispitivanja uzoraka vode na sve navedene indikatorske bakterije.

U laboratorijskom pokusu simulirani su uvjeti cisterne koja sadrži vodu onečišćenu fekalnim materijalom, na način da se u dva spremnika, zapremnine 100 L, dodavala fekalna otpadna voda. Rezultati su pokazali kako je u kontrolnom uzorku vode, bez dodavanja nosača sa srebrom, broj ukupnih koliformnih bakterija rastao, najviše nakon dodavanja fekalne otpadne vode prvi i peti dan pokusa. U uzorku vode u kojemu se nalazio nosač sa srebrom, zabilježeno je učinkovito

dezinfekcijsko djelovanje srebra na ukupne koliformne bakterije, te se time može smatrati da je srebro učinkovito dezinfekcijsko sredstvo protiv ukupnih koliformnih bakterija. *E. coli*, kao glavni predstavnik skupine koliformnih bakterija, u kontekstu fekalnog onečišćenja vode, bilježio je slične vrijednosti kao i kod ukupnih koliforma, s najvećim vrijednostima prvi i peti dan pokusa (nakon dodavanja fekalne otpadne vode i čiste kulture *E. coli* u uzorak), te vrlo dobro dezinfekcijsko djelovanje srebra protiv *E. coli*, što je pokazano i u drugim istraživanjima [Raffi et al., 2008; Sondi i Salopek – Sondi, 2004].

Na bakterije iz roda *Enterococcus*, srebro također pokazuje dobar dezinfekcijski učinak, ali je potrebno više vremena, u odnosu na koliformne bakterije, da se on postigne. Kada srebro počne djelovati, ima vrlo jako dezinfekcijsko djelovanje. To je vidljivo po tome što čak i nakon ponovnog dodavanja fekalne otpadne vode u uzorak vode u kojemu se nalazio nosač sa srebrom, broj cfu enterokoka bio je više nego dvostruko manji nego u kontrolnom uzorku. Produljeno vrijeme izlaganja bakterija iz roda *Enterococcus* srebru, da se postigne dezinfekcijski učinak, povezano je s njihovom sposobnošću da stvaraju biofilm, u kojem obliku su te bakterije otpornije na vanjske uvjete od samih kolonija [Wu et al., 2014; Halkai et al., 2018].

P. aeruginosa oportunistički je patogen sa sposobnošću stvaranja biofilma, ali unatoč tome, dezinfekcijsko djelovanje srebra na *P. aeruginosa* je najizraženije među svim ispitivanim parametrima. Dokazano je kako je srebro dobro dezinfekcijsko sredstvo protiv *P. aeruginosa* [Salomoni et al., 2017] a ono se povećava sa produljenjem vremena izlaganja (kontaktnim vremenom), kao i povišenjem koncentracije srebra [Liao et al., 2019].

Rezultati laboratorijskog pokusa u kontrolnom uzorku i uzorku vode koji je sadržavao srebro pokazivali su sličnu dinamiku u brojnosti *C. perfringens*, kroz cijelo trajanje pokusa. Navedeni rezultati upućuju na to kako srebro otpušteno s nosača u vodu nije pokazalo posebno dobro

dezinfekcijsko djelovanje protiv *C. perfringens*, vrlo vjerojatno zbog sposobnosti te bakterije da stvara spore, čime se štiti od vanjskih uvjeta okoliša. Međutim, u kombinaciji sa drugim tvarima, srebro pokazuje dobro dezinfekcijsko djelovanje protiv *C. perfringens* [Gnosh et al., 2013].

Gledano kroz cijelo razdoblje trajanja pokusa, broj bakterija koje su izrasle na temperaturama od 22 °C i 37 °C (UBB/22 i UBB/37) je rastao. Razlog tomu je vjerojatno što srebro nema jednak učinak na sve vrste mikroorganizama koje spadaju u ovaj indikatorski parametar, što znači da smanjenje broja jedne vrste mikroorganizama stvara pogodnije uvjete za razvoj druge, najčešće u dostupnosti organske tvari kojom se ti mikroorganizmi hrane. Treba ipak napomenuti kako je u uzorku vode koja je sadržavala srebro zabilježen manji broj mikroorganizama nego u kontrolnom uzorku, što dovodi do zaključka kako srebro ipak posjeduje dezinfekcijski učinak u vodi u odnosu na vodu koja nije ni na koji način kondicionirana ili tretirana, kada se gleda ukupni broj mikroorganizama koji se potencijalno mogu nalaziti u vodi.

U realnim uvjetima, broj ukupnih koliforma na prvoj lokaciji istraživanja (RE), bio je manji nakon postavljanja nosača sa srebrom u odnosu na razdoblje prije postavljanja nosača, što upućuje na to da je srebro posjeduje dezinfekcijsko djelovanje na ukupan broj koliformnih bakterija. Na drugoj lokaciji (ME), to je djelovanje bilo više izraženo, a mogući razlog tome je u prosjeku veća oksidativnost vode na drugoj lokaciji istraživanja u odnosu na prvu, kao i veća koncentracija izmjerenih klorida u toj vodi. Veća koncentracija kisika u vodi direktno je povezana sa povećanim dezinfekcijskim djelovanjem srebra u vodi [Park et al., 2009]. Unatoč manje izraženom dezinfekcijskom djelovanju srebra na prvoj cisterni (RE) (- 80,7 % mikrobiološkog opterećenja) u odnosu na drugu (ME) (- 90,6 % mikrobio. opt.), u obje cisterne srebro se pokazalo kao dobro dezinfekcijsko sredstvo protiv koliformnih bakterija.

U odnosu na pokus proveden u laboratoriju, dezinfekcijsko djelovanje srebra na *E. coli* je smanjeno, u obje cisterne. Razlog tome je vjerojatno resuspenzija taloga koja se dogodila pomicanjem vrećice u kojoj se nalazio nosač sa srebrom prilikom uzorkovanja, s obzirom da se u talogu nalaze veće koncentracije bakterija nego u vodi [Stephenson i Rychert, 1982; An, Kampbell i Breidenbach, 2002; LaLiberte i Grimes, 1982]. Uspoređujući koncentraciju *E. coli* na pojedinim lokacijama, prva lokacija (RE) bilježi veću brojnost bakterija od druge (ME), najvjerojatnije zbog povećane koncentracije nitrata (NO_3^-), koja u metabolizmu *E. coli* može služiti u procesu respiracije ili samog rasta bakterija [Moreno – Vivian et al., 1999]. Unatoč većoj brojnosti bakterija u prvoj cisterni (RE), učinkovitost dezinfekcijskog djelovanja srebra je izraženije (- 69,6 % mikrobio. opt.), u odnosu na drugu (- 58,1 % mikrobio. opt.) Treba također napomenuti kako je brojnost *E. coli* smanjena u razdoblju od 19. 1. 2020. do 26. 1. 2020., a moguć razlog tome su niže vanjske temperature, koje mogu utjecati na dostupnost, odnosno usporavanje procesa pretvorbe nitrata u nitrite (denitrifikacije) [Zheng, Cardenas i Wang, 2016], bez obzira na njihovu ukupnu koncentraciju.

Na prvoj lokaciji istraživanja (RE), zabilježen je pad u ukupnom broju bakterija iz roda *Enterococcus* prije postavljanja nosača sa srebrom u cisternu. Kao i kod *E. coli*, razlog za to je vjerojatno snižavanje vanjske temperature, čime se proces denitrifikacije usporava, a posljedično tome i rast enterokoka. U kontekstu indirektnog utjecaja temperature na rast enterokoka, u razdoblju od 16. 3. 2020. nadalje, zabilježen je porast njihove brojnosti. Ta vrijednost nije premašila početnu brojnost enterokoka jer je u navedenom razdoblju postavljen nosač sa srebrom u cisternu, čime se utjecalo na smanjenje ukupnog broja bakterija iz roda *Enterococcus*. U drugoj cisterni (ME), razlika između početne i konačne vrijednosti ukupnog broja enterokoka ne ukazuje na posebno izraženo dezinfekcijsko djelovanje srebra, s obzirom da je brojnost enterokoka u

posljednjem prikupljenom uzorku bila veća nego u prvom. Međutim, u razdoblju od 15. 2. 2020. do 7.3. 2020. zabilježen je porast njihove brojnosti, vjerojatno uslijed povećanja vanjske temperature. Od 7.3. 2020. (prvi prikupljeni uzorak nakon dodavanja srebra u vodu) do 24. 3. 2020. zabilježeno je snižavanje te vrijednosti, ali kroz posljednja tri uzorka te vrijednosti su ponovno rasle. U usporedbi obje cisterne, dezinfekcijski učinak srebra je više izražen na prvoj cisterni (RE) (- 84,0 % mikrobio. opt.) nego na drugoj cisterni (ME) (- 53,6 % mikrobio. opt.).

U slučaju *C. perfringens*, u laboratorijskom pokusu srebro se nije pokazalo kao učinkovito sredstvo protiv navedene bakterije, najvjerojatnije zbog njenih karakteristika, odnosno sposobnosti da stvara spore, čime se štiti od vanjskih uvjeta. Unatoč tome, na prvoj cisterni (RE) zabilježeno je vrlo dobro dezinfekcijsko djelovanje (- 85,9 % mikrobio. opt.) protiv *C. perfringens* zbog povećane koncentracije otopljenog kisika u vodi u odnosu na drugu cisternu (ME) (- 50,5 % mikrobio. opt.), što je direktno povezano sa pojačanim dezinfekcijskim djelovanjem srebra [Inoue et al., 2002]. Također, u obje cisterne, u razdoblju od 1. 2. 2020. do 9. 2. 2020., nije zabilježeno prisustvo *C. perfringens* u uzorcima vode. Mogući razlog tome je što je pri nižim temperaturama, rast *C. perfringens* inhibiran [Beerens, Sugama, i Tahon-Castel, 1965; De Jong, Rombouts i Beumer, 2004], a sadržaj niže temperature od one u cisterni, lako je mogao ući u cisterne zbog njihovih trenutnih stanja i tako utjecati na brojnost *C. perfringens*.

Dezinfekcijsko djelovanje srebra na ukupan broj bakterija koje rastu pri temperaturi od 22 °C vrlo je izraženo u obje cisterne, gotovo isto (- 84,3 % mikrobio. opt. – RE / - 84,1% mikrobio. opt. – ME). Osim samog srebra koje ima dezinfekcijski učinak, na ovako veliko smanjenje ukupnog mikrobiološkog opterećenja vode utječu i fizikalno – kemijske i kemijske karakteristike vode, od kojih je oksidativnost vode najistaknutija. Količina otopljenog kisika direktno utječe na pojačano dezinfekcijsko djelovanje srebra tako što sudjeluje u katalitičkoj reakciji sa srebrom u kojoj nastaju

slobodni kisikovi radikali (ROS – eng. „*Reactive Oxygen Species*“) za koje je poznato da imaju jako oksidacijsko, a zbog toga i baktericidno djelovanje [Le Pape et al., 2002; Inoue et al., 2002; Le Pape et al., 2004; Park et al., 2009]. Ukupne bakterije koje su izrasle pri 37 °C (UBB/37) pokazuju kako je dezinfekcijsko djelovanje srebra bilo puno jače izraženo na prvoj lokaciji istraživanja (RE) (- 90,4 % mikrobio. opt.), nego na drugoj (ME) (- 57,0 % mikrobio. opt.), što je, kao i kod UBB/22, vrlo vjerojatno povezano sa razlikom u koncentraciji otopljenog kisika između obje cisterne.

Obzirom na rezultate mikrobioloških ispitivanja uzoraka vode prikupljene iz dvaju cisterni (RE i ME), u ovom radu prikazano je dezinfekcijsko djelovanje srebra . Međutim, treba imati na umu da samo srebro nije dovoljno kako bi se postigao navedeni učinak. Važne su karakteristike samih mikroorganizama na koje se srebro primjenjuje, kao što je broj slojeva peptidoglikana u staničnoj stijenci, mogućnost stvaranja spora ili formiranje biofilma. Osim navedenog, bitnu ulogu u učinkovitosti srebra kao dezinfekcijskog sredstva igraju i fizikalno – kemijske i kemijske karakteristike vode, uključujući temperaturu i koncentraciju otopljenog kisika, ali i koncentraciju dostupne organske tvari koja je potrebna za rast i razvoj mikroorganizama za koje se pretpostavlja da će se najvjerojatnije nalaziti u sustavu cisterne.

Laboratorijskim pokusom stvoreni su uvjeti koji se lako mogu kontrolirati i tako pratiti promjene u pojedinim parametrima. Nasuprot tome, obje cisterne iz kojih su prikupljeni uzorci predstavljaju sustav u kojemu je teško pratiti ulaz i izlaz tvari. Prvenstveno zbog starosti samih cisterni i pojave pukotina u njihovim stijenkama, te zbog ne održavanja čistoće cisterni, uslijed prestanka njihovog redovnog korištenja u vodoopskrbne svrhe. Ne redovitim održavanjem čistoće cisterni dolazi do akumulacije taloga na njeno dno, čijim se resuspendiranjem prilikom pomicanja nosača povećava

koncentracija bakterija u vodi, uzimajući u obzir da se veće koncentracije tih bakterija nalaze u talogu u odnosu na vodu, što može davati krive rezultate analiza na pojedine parametre.

Mjerenjem koncentracija srebra u uzorcima vode nakon postavljanja nosača sa srebrom pokazano je kako je ona više nego deseterostruko manja od koncentracije srebra u vodi od maksimalne dopustive koncentracije, propisane trenutnom zakonskom regulativnom, što upućuje na to kako srebro posjeduje učinkovito dezinfekcijsko djelovanje pri niskim koncentracijama [Shrestha et al., 1970; Chambers, Proctor i Kabler, 1962, Wijnhoven et al., 2009].

5. ZAKLJUČAK

U ovome radu određivalo se dezinfekcijsko djelovanje srebra u kontroliranim, laboratorijskim uvjetima, te u realnim uvjetima na dvije cisterne u Istri. Ispitivanje vode se provodilo na mikrobiološke indikatore fekalnog zagađenja, redom: ukupne koliformne bakterije, *E. coli*, bakterija iz roda *Enterococcus*, *C. perfringens*, *P. aeruginosa*, te bakterije koje rastu pri temperaturama od 22 °C i 37°C, s obzirom da one predstavljaju realno potencijalno prisutne bakterije u vodi u cisternama. Temeljem dobivenih rezultata, može se zaključiti sljedeće:

- Srebro pokazuje dobar dezinfekcijski učinak u kontroliranim, laboratorijskim uvjetima, ali i u realnim uvjetima na dvije ispitivane cisterne.
- Morfologija samih mikroorganizama, kao i njihovi mehanizmi otpornosti prema okolišnim čimbenicima igraju ulogu na učinkovitost dezinfekcijskog djelovanja srebra u vodi.
- U realnim uvjetima, stanje same cisterne u koju se postavlja srebro, ali i redovno čišćenje i održavanje, igraju ulogu u učinkovitosti dezinfekcijskog djelovanja srebra zbog veće kontrole ulaza i/ili akumulacije tvari i mikroorganizama u toj cisterni.
- Niske koncentracije srebra pokazuju dobro dezinfekcijsko djelovanje u vodi, i to u koncentracijama više puta nižim od propisane maksimalno dopustive koncentracije srebra u vodi za piće prema aktualnim važećim zakonskim propisima.

6. LITERATURA

1. Aktepe et al. (2015) Increased DNA Damage and Oxidative Stress Among Silver Jewelry Workers. *Biological Trace Element Research*, 164 (2), str. 185–191.
2. An, Y., Kampbell, D. H. i Breidenbach, G. P. (2002). *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas. *Environmental Pollution*, 120, str. 771 – 778.
3. Armon, R. i Kott, Y. (1996) Bacteriophages as Indicators of Pollution. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 26 (4), str. 299–335.
4. Ashbolt, N. J. (2004) Microbial Contamination of Drinking Water and Disease Outcomes in Developing Regions. *Toxicology*, 198, str. 229–238.
5. Bartram et al. (2003) Expert consensus. U: Bartram et al. (ur.), *Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health*. London: IWA Publishing, str. 1 – 12.
6. Beerens, H., Sugama, S. i Tahon-Castel, M. (1965). Psychrotrophic Clostridia. *Journal of Applied Bacteriology*, 28 (1), str. 36 – 48.
7. Bisson, J. W. i Cabelli V. J. (1980) *Clostridium perfringens* as a Water Pollution Indicator. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 52 (2), str. 241 – 248.
8. Bowden et al. (2006) Forecasting chlorine residuals in a water distribution system using a general regression neural network. *Mathematical and Computer Modeling*, 44, str. 469 – 484.
9. Brandt, D. et al. (2005) Argyria Secondary to Ingestion of Homemade Silver Solution. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53 (2), str. S105–S107.

10. Braun – Howland, E. B. i Hunt, M. E. (2017a) Microbiological examination: 9213 Recreational Waters. U: Baird, Eaton i Rice (ur.), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23. izd. Washington, DC: American Public Health Association, str. 9-45–9-51.
11. Braun – Howland, E. B. i Hunt, M. E. (2017b) Inorganic Nonmetallic Constituents: 4500-NO₃⁻: Nitrogen (Nitrate). U: Baird, Eaton i Rice (ur.), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23. izd. Washington, DC: American Public Health Association, str. 4-126–4-136.
12. Braun – Howland, E. B. i Hunt, M. E. (2017c) Physical and Aggregate Properties: 2120 Color. U: Baird, Eaton i Rice (ur.), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23. izd. Washington, DC: American Public Health Association, str. 2-5–2-11.
13. Brion, G. M. i Mao, H. H. (2000) Use of Total Coliform Test for Watershed Monitoring with Respect to Atypicals. *Journal of Environmental Engineering*, 126 (2), str. 175–181.
14. Bryant et al. (2000) Clostridial Gas Gangrene. II. Phospholipase C–Induced Activation of Platelet gpIIbIIIa Mediates Vascular Occlusion and Myonecrosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 182 (3), str. 808–815.
15. Budimir, A. (2019) Enterokoki i ostali gram – pozitivni koki: Uvod. U: Kalenić et al. (ur.), *Medicinska mikrobiologija*. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada, str. 161–164.
16. Caplenas, N. R. i Kanarek M. S. (1984) Thermotolerant Non-Fecal Source *Klebsiella pneumoniae*: Validity of the Fecal Coliform Test in Recreational Waters. *American Journal of Public Health*, 74 (11), str. 1273–1275.

17. Carrero – Colón, M., Wickham G. S. i Turco R. F. (2011) Taxonomy, Phylogeny and Physiology of Fecal Indicator Bacteria. U_;: Sadowsky, M. J. i Whitman, R. L. (ur.), *The Fecal Bacteria*. Washington, DC: ASM Press, str. 23 – 38.
18. Chambers, C. W., Proctor, C. M., i Kabler, P. W. (1962) Bactericidal Effect of Low Concentrations of Silver. *Journal - American Water Works Association*, 54 (2), str. 208 – 216.
19. Chang, A. L. S., Khosravi V. i Egbert B. (2006) A Case of Argyria after Colloidal Silver Ingestion.” *Journal of Cutaneous Pathology*, vol. 33 (12), 2006, pp. 809–811.
20. Chung et al.(2010) Three Systemic Argyria Cases after Ingestion of Colloidal Silver Solution. *International Journal of Dermatology*, 49 (10), str. 1175–1177.
21. de Jong, A. E. I., Rombouts, F. M. i Beumer, R. R. (2004). Behavior of *Clostridium perfringens* at low temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 97 (1), str. 71 – 80.
22. de Victorica, J. i Galván, M. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* as an indicator of health risk in water for human consumption. *Water Science and Technology*, 43 (12), str. 49–52.
23. Domig, K. J., Mayer, H. K., Kneifel, W. (2003) Methods Used for the Isolation, Enumeration, Characterisation and Identification of *Enterococcus spp.* *International Journal of Food Microbiology*, 88, str. 165–188.
24. Drenjančević, D. i Vraneš, J. (2019) *Pseudomonas, acinetobacter* i srodne bakterije: *Pseudomonas*. U: Kalenić et al. (ur.), *Medicinska mikrobiologija*. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada, str. 242–247.
25. Eckhardt et al. (2013) Nanobio Silver: Its Interactions with Peptides and Bacteria, and Its Uses in Medicine. *Chemical Reviews*, 113 (7), str. 4708–4754.

26. Edberg et al. (2000) *Escherichia coli*: The Best Biological Drinking Water Indicator for Public Health Protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88, str. 106S-116S.
27. Feng et al. (2000) A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52 (4), str. 662–668.
28. Filipović, I. i Lipanović, S. (1987) Elementi I B skupine: Srebro. U: Filipović, I. i Lipanović, S. *Opća i anorganska kemija II dio: kemijski elementi i njihovi spojevi*. 6. izd. Zagreb: Školska knjiga, str. 1079–1085.
29. Fisher, K., i C. Phillips. (2009) The Ecology, Epidemiology and Virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155 (6), str. 1749–1757.
30. Gensberger et al. (2015) *Effect of Different Heterotrophic Plate Count Methods on the Estimation of the Composition of the Culturable Microbial Community*. Tulin: Austrian Institute of Technology. URL: <https://peerj.com/articles/862/> [prstup: 15. 7. 2020.]
31. Giraffa, G. (2014) *Enterococcus*. U: Batt, C. A. (ur.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Cambridge, Massachusetts: Elsevier/Academic Press str. 674.
32. Gnosh et al. (2013) Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: a case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. *International Journal of Nanomedicine*, 8, str. 4721 – 4731.
33. Halkai et al. (2018) Antibacterial Efficacy of Biosynthesized Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm: An *in vitro* Study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 9 (2), str. 237 – 241.
34. Høiby N., Ciofu O., Bjarnsholt T. (2015) *Pseudomonas*. U: Carroll, K. C. et al. (ur.), *Manual of Clinical Microbiology*. 11. izd. Washington, DC: ASM Press, str. 773.

35. Inoue et al. (2002) Bactericidal activity of Ag – zeolite mediated by reactive oxygen species under aerated conditions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92, str. 37 – 42.
36. Joshi, M., and A. Bhattacharyya. (2011) Nanotechnology – a New Route to High-Performance Functional Textiles. *Textile Progress*, 43 (3), str. 155–233.
37. Jung et al. (2008) Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (7), str. 2171–2178.
38. Kalenić, S. (2019) Uvod u bakteriologiju. Struktura i fiziologija bakterija. Razmnožavanje i genetika bakterija: Građa bakterijske stanice. U: Kalenić et al. (ur.), *Medicinska mikrobiologija*. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada, str. 61–67.
39. Kalenić, S. i Budimir, A. (2019.) Anaerobne bakterije. Uvod. Anaerobni gram – pozitivni sporogeni štapići (klostridiji): Klostridiji – anaerobni gram – pozitivni sporogeni štapići. U: Kalenić et al. (ur.), *Medicinska mikrobiologija*. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada, str. 283–291.
40. Kalenić, S., Bedenić, B. i Bošnjak, Z. (2019) Enterobakterije: *Enterobacteriaceae*. U: Kalenić et al. (ur.), *Medicinska mikrobiologija*. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada, str. 207–220.
41. Karchmer et al. (2000) A Randomized Crossover Study of Silver-Coated Urinary Catheters in Hospitalized Patients. *Archives of Internal Medicine*, 160 (21), str. 3294.
42. Kim et al (2007) Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3 (1), str. 95–101.
43. Kiu, R., and Hall. L. J. (2018) An Update on the Human and Animal Enteric Pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging Microbes i Infections*, 7 (1), str. 1–15.

44. Laliberte, P. i Grimes, J. D. (1982) Survival of *Escherichia coli* in Lake Bottom Sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, str. 623 – 628.
45. Le Pape, H., Solano-Serena, F., Contini, P., Devillers, C., Maftah, A. i Leprat, P. (2002) Evaluation of the anti-microbial properties of an activated carbon fibre supporting silver using a dynamic method. *Carbon*, 40 (15), str. 2947 – 2954.
46. Le Pape, H., Solano-Serena, F., Contini, P., Devillers, C., Maftah, A. i Leprat, P. (2004) Involvement of reactive oxygen species in the bactericidal activity of activated carbon fibre supporting silver. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98 (6), str. 1054 – 1060.
47. Liao et al. (2019) Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug – resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine*, 14, str. 1469 – 1487.
48. Loeschner et al. (2011) Distribution of Silver in Rats Following 28 Days of Repeated Oral Exposure to Silver Nanoparticles or Silver Acetate. *Particle and Fibre Toxicology*, 8 (1), str. 18.
49. Martins Teixeira et al. (2015) *Enterococcus*. U: Carroll, K. C. et al. (ur.), *Manual of Clinical Microbiology*. 11. izd. Washington, DC: ASM Press, str. 403.
50. Matica, B. i Ramljak Šešo M. (2003) *Enterobacteriaceae I*. U: Mlinarić Galinović G. i Ramljak Šešo M. (ur.), *Specijalna medicinska mikrobiologija i parazitologija*. Zagreb: Merkur A. B. D., str. 39 – 43.
51. Moreno – Vivian et al. (1999) Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. *Journal of Bacteriology*, 181 (21), str. 6573 – 6584.

52. Neves, et al. (2014) *Pseudomonas aeruginosa*. U: Batt, C. A. (ur.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Cambridge, Massachusetts: Elsevier/Academic Press str. 253.
53. Niilo L. (1988) *Clostridium perfringens* Type C Enterotoxemia. *Canadian Veterinary Journal*, 29 (8) str. 658-664.
54. Park et al. (2009) Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water research*, 43, str. 1027 – 1032.
55. Park et al. (2009) Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Research*, 43 (4), 1027 – 1032.
56. Patel et al. (2014) *Enterobacteriaceae*, coliforms and *E. coli*. U: Batt, C. A. (ur.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Cambridge, Massachusetts: Elsevier/Academic Press str. 662.
57. Pravilnik 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 125/17)
58. Prescott, L. M, Harley J. i Klein D. A. (2002a) *Microorganisms in Aquatic Environments*. U: Prescott, L. M, Harley J. i Klein D. A. (ur.), *Microbiology*. 5. izd. New York: The McGraw – Hill Companies, str. 634 – 667.
59. Prescott, L. M, Harley J. i Klein D. A. (2002b) *Bacteria: The Low G + C Gram Positives*. U: Prescott, L. M, Harley J. i Klein D. A. (ur.), *Microbiology*. 5. izd. New York: The McGraw – Hill Companies, str. 518 – 535.
60. Raffi et al. (2008) Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224. *Journal of Materials Science & Technology*, 24, str. 192–196.

61. Rompré et al. (2002) Detection and Enumeration of Coliforms in Drinking Water: Current Methods and Emerging Approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49 (1), str. 31–54.
62. Salomoni et al. (2017) Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotechnology, Science and Applications*, 10, str. 115 – 121.1
63. Shelley, W. B., Dorinda Shelley E. i Burmeister V. (1987) Argyria: The Intra-dermal ‘Photograph,’ a Manifestation of Passive Photosensitivity. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 16 (1), str. 211–217.
64. Shrestha et al. (1970) Oligodynamic Action of Silver, Copper and Brass on Enteric Bacteria Isolated from Water of Kathmandu Valley. *Nepal Journal of Science and Technology*, 1, str. 189–193.
65. Sondi, I. i Salopek-Sondi, B. (2004) Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agent: A Case Study on *E. coli* as a Model for Gram-Negative Bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275 (1), str. 177–182.
66. Spadaro et al. (1974) Antibacterial Effects of Silver Electrodes with Weak Direct Current. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6 (5), str. 637–642.
67. Stephenson G. R. i Ryhcert R. C. (1982) Bottom Sediment: a Reservoir of *Escherichia coli* in Rangeland Streams. *Journal of Range Management*, 35 (1), str. 119 – 123.
68. Tendolkar, P. M., Baghdayan, A. S., Shankar, N. (2003) Pathogenic *Enterococci*: New Developments in the 21st Century. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60 (12), str. 2622–2636.

69. Trop et al. (2006) Silver-Coated Dressing Acticoat Caused Raised Liver Enzymes and Argyria-like Symptoms in Burn Patient. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 60 (3), str. 648–652.
70. Ujević M. (1942.) *Hrvatska enciklopedija, svezak 3*. Zagreb: Hrvatski izdavački bibliografski zavod, str. 784–787.
71. van der Zande et al. (2012) Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure. *ACS Nano*, 6 (8), str. 7427–7442.
72. Wheeler et al. (2002) Potential of *Enterococcus faecalis* as a Human Fecal Indicator for Microbial Source Tracking. *Journal of Environmental Quality*, 31 (4), str. 1286–1293.
73. Wijnhoven et al. (2009) Nano-Silver – a Review of Available Data and Knowledge Gaps in Human and Environmental Risk Assessment. *Nanotoxicology*, 3 (2), str. 109–138.
74. World Health Organisation (1993) *Guidelines for Drinking-Water Quality*, 2. izd. Ženeva: World Health Organisation (WHO).
75. World Health Organisation (2018) *Silver as a drinking water disinfectant*. Ženeva: World Health Organisation (WHO).
76. Wu et al. (2014) Evaluation of Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Journal of Endodontics*, 40 (2), str. 285 – 290.
77. Zheng, L., Cardenas, M. B. i Wang, L.(2016), Temperature effects on nitrogen cycling and nitrate removal – production efficiency in bed form – induced hyporheic zones. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 121, str. 1086 – 1103.

ŽIVOTOPIS

Nikola Vidaković rođen je 2. lipnja 1994. godine u Zagrebu. Osnovnu školu pohađao je u Puli nakon koje upisuje i završava Opću Gimnaziju u Puli. 2014. godine upisuje preddiplomski stručni studij Sanitarnog inženjerstva pri Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu kojeg završava u veljači 2018. godine. Nakon nekoliko mjeseci rada u DDD sektoru, akademske godine 2018./2019. upisuje diplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, te izrađuje diplomski rad pod naslovom „Upotreba srebra za dezinfekciju vode u cisternama“, pod voditeljstvom mentorice izv.prof.dr.sc. Darije Vukić – Lušić, dipl.sanit.ing i komentora dr.sc. Marina Glada, dipl.sanit.ing. na Nastavnom Zavodu za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije (NZZJZPGŽ).

POPIS TABLICA

Tablica 1. Osnovni statistički podaci o fizikalno – kemijskim i kemijskim karakteristikama vode uzetim na lokaciji RE (Režanci), prije i nakon dodavanja srebra.	16
Tablica 2. Osnovni statistički podaci o fizikalno – kemijskim i kemijskim pokazateljima vode uzetim na lokaciji ME (Mednjan), prije i nakon dodavanja srebra.	18
Tablica 3. Uzorci vode sa datrumima uzorkovanja, temperaturom pojedinih uzoraka, te podatkom o padalinama.	19
Tablica 4. Vrijednosti pojedinih analiziranih parametara na prvoj lokaciji istraživanja (RE), izraženih kao log cfu/100 mL ili log cfu/1 mL.	46
Tablica 5. Vrijednosti pojedinih analiziranih parametara na drugoj lokaciji istraživanja (ME), izraženih kao log cfu/100 mL ili log cfu/1 mL.	47
Tablica 6. Vrijednosti pojedinih ispitivanih parametara, uzetih na prvoj lokaciji istraživanja (RE), izraženih kao cfu/100 mL ili cfu/1 mL.	61
Tablica 7. Vrijednosti pojedinih ispitivanih parametara, uzetih na drugoj lokaciji istraživanja (ME), izraženih kao cfu/100 mL ili cfu/1 mL.	62
Tablica 8. Srednje vrijednosti pojedinih parametara prije uvrštavnaja u logaritamsku funkciju.	63
Tablica 9. Smanjenje vrijednosti mikrobiološkog opterećenja vode iz obje cisterne nakon dodavanja nosača sa srebrom.	64

POPIS SLIKA

Slika 1. Kamenčići (nosač) nakon ispiranja (izvor: vlastita arhiva).	12
Slika 2. Nosač obložen srebrom (izvor: vlastita arhiva).	14
Slika 3. Cisterna u mjestu Režanci, u dvorištu privatne kuće (izvor: vlastita arhiva).	14
Slika 4. Lokacija mjesta Režanci (crveni oval) u odnosu na grad Vodnjan (crveni kvadrat) (izvor: Google karte).	15
Slika 5. Cisterna u selu Mednjan (ME) (izvor: vlastita arhiva).	17
Slika 6. Lokacija mjesta Mednjan (crveni marker) u odnosu na grad Vodnjan (crveni oval) (izvor: Google karte).	17
Slika 7. Shema metode brojenja koliformnih bakterija i <i>E. coli</i> membranskom filtracijom za vode s niskom pozadinom bakterijske flore (izvor: HRN EN ISO 9308-1:2014/A1:2017).	23
Slika 8. Boja poraslih kolonija na kromogenoj CCA podlozi a) β -gal pozitivna reakcija β -gal i b) β -glu pozitivna reakcija (izvor: HRN EN ISO 9308-1:2014/A1:2017).	23
Slika 9. Metoda membranske filtracije fekalnih streptokoka (izvor: HRN EN ISO 7899-2:2000).	25
Slika 10. Shema metode za dokazivanje i brojenje <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (izvor: HRN EN ISO 16266:2008).	27
Slika 11. Shema metode za dokazivanje i brojenje <i>Clostridium perfringens</i> (izvor: HRN EN ISO 14189:2016).	28
Slika 12. Shema brojenja uzgojenih mikroorganizama tehnikom naciepljivanja na hranjivi agar (izvor: HRN EN ISO 6222:2000).	30
Slika 13. Grafički prikaz broja cfu ukupnih koliformnih bakterija u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza.	36
Slika 14. Grafički prikaz broja cfu <i>E. coli</i> u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza.	37
Slika 15. Grafički prikaz broja cfu enterokoka u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza.	38
Slika 16. Grafički prikaz broja cfu <i>Pseudomonasa</i> u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza.	40
Slika 17. Grafički prikaz broja cfu <i>C. perfringens</i> u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza.	42

Slika 18. Grafički prikaz broja cfu ukupnog broja bakterija koje rastu pri temperaturi od 22°C u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza.	45
Slika 19. Grafički prikaz broja cfu ukupnog broja bakterija koje rastu pri temperaturi od 37 °C u 100 mL kontrolnog uzorka i uzorka vode sa srebrom kroz 15 analiza.	45
Slika 20. Grafički prikaz broja cfu ukupnih koliformnih bakterija (UK) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na prvoj cisterni (RE), po datumima analize pojedinih uzoraka.	48
Slika 21. Grafički prikaz broja cfu ukupnih koliformnih bakterija (UK) u 100 , prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzoraka vode uzetim na drugoj cisterni (ME), po datumima analize pojedinih uzoraka.	49
Slika 22. Grafički prikaz broja cfu <i>E. coli</i> (EC) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na prvoj cisterni (RE), po datumima analize pojedinih uzoraka.	50
Slika 23. Grafički prikaz broja cfu <i>E. coli</i> (EC) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na drugoj cisterni (ME), po datumima analize pojedinih uzoraka.	51
Slika 24. Grafički prikaz broja cfu enterokoka (ENT) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na prvoj cisterni (RE), po datumima analize pojedinih uzoraka.	52
Slika 25. Grafički prikaz broja cfu enterokoka (ENT) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na drugoj cisterni (ME), po datumima analize pojedinih uzoraka.	54
Slika 26. Grafički prikaz broja cfu <i>C. perfringens</i> (CP) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na prvoj cisterni (RE), po datumima analize pojedinih uzoraka.	55
Slika 27. Grafički prikaz broja cfu <i>C. perfringens</i> (CP) u 100 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na drugoj cisterni (ME), po datumima analize pojedinih uzoraka.	56
Slika 28. Grafički prikaz broja cfu ukupnog broja bakterija koje su porasle pri 22 °C (UBB/22) u 1 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na prvoj cisterni (RE), po datumima analize pojedinih uzoraka.	57
Slika 29. Grafički prikaz broja cfu ukupnog broja bakterija koje su porasle pri 22 °C (UBB/22) u 1 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na drugoj cisterni (ME), po datumima analize pojedinih uzoraka.	58

Slika 30. Grafički prikaz broja cfu ukupnog broja bakterija koje su porasle pri 37 °C (UBB/37) u 1 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na prvoj cisterni (RE), po datumima analize pojedinih uzoraka. 59

Slika 31. Grafički prikaz broja cfu ukupnog broja bakterija koje su porasle pri 37 °C (UBB/37) u 1 mL uzoraka vode, prije (crvena linija) i poslije (zelena linija) dodavanja srebra, uzetim na drugoj cisterni (ME), po datumima analize pojedinih uzoraka. 60

Slika 32. Matematička jednadžba pomoću koje je dobivena vrijednost učinka dezinfekcijskog djelovanja srebra na pojedine parametre (%). 63

Slika 33. Grafički prikaz učinkovitosti dezinfekcijskog djelovanja vode iz obje cisterne (%), u odnosu na početno stanje od 100%. 64