

Ispitivanje mikrobiološke ispravnosti različitih tipova voda na području Zadra

Perković, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:528358>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivona Perković

ISPITIVANJE MIKROBIOLOŠKE ISPRAVNOSTI RAZLIČITIH TIPOVA VODA NA
PODRUČJU ZADRA

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

Mentor rada: dr. sc. Mateja Ožanič , dipl. sanit. ing.

Završni rad obranjen je dana _____ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci,

pred povjerenstvom u sastavu:

1.

2.

3.

Rad ima 50 stranica, 24 slike, 3 tablice, 49 literaturnih navoda.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Mateji Ožanič, dipl. sanit. ing. na strpljenju, pomoći i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se svom osoblju Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci na susretljivosti i podršci.

Na kraju, velika zahvala mojoj obitelji na omogućavanju pohađanja sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci.

SAŽETAK

Voda je osnova života, a bakterijske infekcije koje se prenose vodom mogu predstavljati veliki javnozdravstveni problem. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mikrobiološku ispravnost različitih tipova voda na području Zadra. Za ovo istraživanje uzeta su 3 tipa voda, iz podzemnog izvora, površinskog izvora i sustava sakupljanja kišnice. Ispitivanje mikrobiološke ispravnosti se provelo indikatorima fekalne kontaminacije odnosno ukupnim koliformima, fekalnim koliformima, enterokokima, *E. coli* i *C. perfringens*-om. Dokazivanje i broj spomenutih bakterija je proveden metodom membranske filtracije. Broj aerobnih mezofilnih bakterija je određen naciepljivanjem na agare s kvašćevim ekstraktom. Rezultati su pokazali da su ukupni koliformi i enterokoki prisutni u sva 4 uzorka vode, dok je prisutnost *E. coli* dokazana u sustavu sakupljanja kišnice i podzemnoj vodi. Prisutnost *C. perfringens*-a je dokazana u podzemnoj vodi. Iz rezultata je uočeno da je najčešći izvor onečišćenja analiziranih voda fekalno onečišćenje. Aerobne mezofilne bakterije su u većem broju porasle na temperaturi od 22 °C u sva 4 uzorka vode zbog pogodnijih uvjeta. Prema Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju N.N. 125/17, sva 4 uzorka vode nisu prikladna za piće. Zdravstveno ispravna voda za piće je jedan od glavnih izazova 21. stoljeća. Financijske resurse treba posvetiti boljem razumijevanju ekologije i ponašanju ljudskih i životinjskih fekalnih bakterija u vodama okoliša.

Ključne riječi: *mikrobiološka ispravnost, zdravstveno ispravna voda, indikatori fekalne kontaminacije, aerobne mezofilne bakterije, membranska filtracija*

SUMMARY

Water is essential to life and water-borne bacterial infections can be a major public health problem. The aim of this research was determination of microbiological quality of different water types within the area of Zadar. Three types of water were used for this research water: an underground water, a surface water and a rainwater. Microbiological determination was performed with indicators of fecal contamination-total coliforms, fecal coliforms, enterococci, *E. coli* and *C. perfringens*. The detection and number of the mentioned bacteria was proven by the membrane filtration method. The number of aerobic mesophilic bacteria was determined by inoculation on yeast extract agar. The results showed that total coliforms and enterococci were present in all 4 water samples, while the presence of *E. coli* was demonstrated in the rainwater collection system and groundwater. The presence of *C. perfringens* has been demonstrated in groundwater. From the results it was noticed that the most common source of pollution of the analyzed waters is fecal pollution. Aerobic mesophilic bacteria increased in large numbers at a temperature of 22 ° C in all 4 water samples due to more favorable conditions. According to *Pravilnik o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju N.N. 125/17*, all 4 water samples are not suitable for drinking. Healthy drinking water is one of the major challenges of the 21st century. Financial resources should be devoted to a better understanding of the ecology and behavior of human and animal fecal bacteria in environmental waters.

Keywords: *microbiological determination, drinking water, indicators of fecal contamination, aerobic mesophilic bacteria, membrane filtration*

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. ZAHTJEVI KVALITETE VODE	2
1.2. SASTAV Ljudskog izmeta.....	3
1.3. MIKROBIOLOŠKI POKAZATELJI U VODI.....	4
1.3.1. Koliformne bakterije (koliformi).....	4
1.3.2. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	6
1.3.3. Rod <i>Clostridium</i>	10
1.3.4. Rod <i>Enterococcus</i>	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. UZORCI VODE	18
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE.....	20
3.2. METODE	24
3.2.1. UZORKOVANJE VODE.....	24
3.2.3. MEMBRANSKA FILTRACIJA	25
3.2.4. DOKAZIVANJE I ODREĐIVANJE BROJA UKUPNIH KOLIFORMA METODOM MEMBRANSKE FILTRACIJE.....	26
3.2.5. DOKAZIVANJE I ODREĐIVANJE BROJA FEKALNIH KOLIFORMA METODOM MEMBRANSKE FILTRACIJE.....	27
3.2.6. DOKAZIVANJE I ODREĐIVANJE BROJA ENTEROKOKA METODOM MEMBRANSKE FILTRACIJE.....	28
3.2.7. DOKAZIVANJE I ODREĐIVANJE BROJA <i>E. coli</i> METODOM MEMBRANSKE FILTRACIJE.....	29
3.2.8. DOKAZIVANJE I ODREĐIVANJE BROJA <i>C. perfringens</i> -a METODOM MEMBRANSKE FILTRACIJE.....	30
3.2.9. ODREĐIVANJE UKUPNOG BROJA BAKTERIJA	30
4. REZULTATI.....	32
4.1. Prisutnost i broj bakterija u uzorku 1 (bunar tzv. „Bunarić“).....	32
4.2. Prisutnost i broj bakterija u uzorku 2 (kućni zdenac).....	34
4.3. Prisutnost i broj bakterija u uzorku 3 (poljski bunar).....	35
4.4. Prisutnost i broj bakterija u uzorku 4 (rijeka Miljašić Jaruga)	37
5. RASPRAVA.....	41
6. ZAKLJUČAK	44
7. LITERATURA.....	45

8. ŽIVOTOPIS	50
--------------------	----

1. UVOD

Voda je osnova života, ali mnogi ljudi nemaju pristup čistoj i zdravstveno ispravnoj vodi za piće, a mnogi umiru od bakterijskih infekcija koje se prenose vodom. Svima mora biti dostupna opskrba sigurnom i pitkom vodom. Poboljšanje pristupa zdravstveno ispravnoj vodi za piće može rezultirati značajnim koristima za zdravlje populacije, stoga treba uložiti sve napore kako bi se postigla potrebna kvaliteta pitke vode (1).

U Europi i Sjevernoj Americi se opskrba zdravstveno ispravnom vodom smatra normom, ali u zemljama u razvoju pristup čistoj vodi i sanitarijama nije svima dostupan, što dovodi do čestih hidričnih infekcija. Dvije i pol milijarde ljudi nema pristup adekvatnim sanitarnim uvjetima, a više od 1,5 milijuna djece svake godine umire od dijareje (2). Prema WHO-u, smrtnost od bolesti povezanih s vodom prelazi 5 milijuna ljudi godišnje. Od toga je više od 50% mikrobnih crijevnih infekcija, a na prvom mjestu je kolera.

Nadalje, najveći mikrobni rizici povezani su s konzumacijom vode koja je zagađena ljudskim ili životinjskim izmetom. Glavni izvor fekalnih mikroorganizama, uključujući i patogene, je ispuštanje otpadnih voda u slatke vode i obalne morske vode (1–4).

Akutne mikrobne bolesti s dijarejom su glavni javnozdravstveni problem u zemljama u razvoju. Skupine pogođene navedenim infekcijama su ljudi s nedovoljnim financijskim sredstvima i neadekvatnim higijenskim objektima. Najviše su pogođena djeca mlađa od pet godina, prvenstveno u azijskim i afričkim zemljama (5).

No, mikrobiološke bolesti koje se prenose vodom, također pogađaju i razvijene zemlje. Prema procjenama, u SAD-u svake godine 560 000 ljudi oboli od teških bolesti koje se prenose vodom, a 7,1 milijuna pati od blage do umjerene infekcije, što rezultira s 12 000 smrtnih slučajeva godišnje (6). Najvažnije bakterijske bolesti koje se prenose vodom navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Glavne bakterijske bolesti koje se prenose vodom za piće (7).

Bolest	Uzročnik
Kolera	<i>Vibrio cholerae</i> ; serotipovi O1 i O139
Gastroenteritis uzrokovan vibrionima	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Trbušni tifus i ostale salmoneloze	<i>Salmonella enterica</i> ; serotip Paratyphi <i>Salmonella enterica</i> ; serotip Typhi <i>Salmonella enterica</i> ; serotip Typhimurium
Bacilarna dizenterija ili šigeloza	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
Akutni proljev i gastroenteritis	<i>Escherichia coli</i> , posebice serotipovi; O148, O157 i O124

1.1. ZAHTJEVI KVALITETE VODE

Voda za piće može se proizvoditi iz površinske ili podzemne vode što predstavlja jedno od nekoliko sredstava kojima se mogu prenositi različiti zarazni agensi ili kemijski onečišćivači koji uzrokuju razne bolesti koje se prenose vodom (8-10). Postoji nekoliko važnih parametara koji utječu na pojavu mikrobiološke kontaminacije i infekcija koje se prenose vodom: (i) koncentracija patogenih organizama u vodi, (ii) virulencija soja, (iii) količina unosa kontaminirane vode, (iv) zarazna doza specifičnog patogena, (v) osjetljivost pojedinaca, (vi) učestalost infekcije u zajednici, tj. broj patogena koji se izlučuju i prenose drugom domaćinu (11).

Kako bi spriječile ili smanjile pojave bolesti koje se prenose vodom, mnoge zemlje pružaju programe praćenja utemeljene na međunarodnim i / ili nacionalnim regulatornim standardima. U Hrvatskoj voda za piće definirana je Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju N.N. 56/13., 64/15., 104/17. i 115/18. i Pravilnikom o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju N.N. 125/17 (Tablica 2.). Time je postignut cilj konstantnog nadzora i prevencije nad kritičnim točkama u procesu obrade i opskrbe vodom, odnosno opasnost za zdravlje potrošača smanjuje se na najmanju moguću mjeru (12).

Tablica 2. Mikrobiološki parametri zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju (13).

Pokazatelj	Jedinice vode za piće	Maksimalna dopuštena koncentracija (MDK)
E. coli	Broj/100 ml	0
Enterokoki	Broj/100 ml	0
Ukupni koliformi	Broj/100 ml	0
C. perfringens (i spore)	Broj/100 ml	0
Broj kolonija 22°C	Broj/1 ml	100
Broj kolonija 37°C	Broj/1 ml	20

1.2. SASTAV LJUDSKOG IZMETA

Mikrobiološka analiza ljudskog izmeta je važna jer se tako validirala uporaba fekalnih indikatorskih bakterija iz voda okoliša. Bakterije prisutne u izmetu prirodno potječu iz mikroflore ljudskog gastrointestinalnog trakta. Iako su bakterije distribuirane u ljudskom gastrointestinalnom traktu, najveća koncentracija bakterija se može naći u debelom crijevu. Želudac, dvanaesnik i jejunum imaju rijetku mikrofloru sa sadržajem bakterija do 10^5 CFU/ml. Koncentracija bakterija postupno raste od ileuma pa nadalje, dosežući u debelom crijevu 10^{10} do 10^{11} CFU/g (60). Procjenjuje se da u ljudskoj gastrointestinalnoj mikroflori postoji najmanje 500–1000 različitih mikrobnih vrsta, premda obično prevladava 10–20 rodova (14,15).

Mikrofloram ljudskog gastrointestinalnog trakta dominiraju obvezni anaerobi, kojih ima oko 10^3 više nego fakultativnih anaeroba. Glavni anaerobni rodovi su *Bacteroides*, *Eubacterium* i *Bifidobacteria*. Ovi organizmi čine oko 90% kultiviranih ljudskih fekalnih bakterija. Bakteroidi (uglavnom *B. thetaiotaomicron* i *B. vulgatus*) najzastupljeniji su mikroorganizmi u ljudskom izmetu i čine 20-30% kultiviranih bakterija. Najrasprostranjeniji fakultativni anaerobi su *Enterococci* i *Enterobacteriaceae*. *Citrobacter* i *Klebsiella* prisutni su kod većine pojedinaca, iako u malom broju. *Proteus* i *Enterobacter* prisutni su samo kod manjine ljudi (15). Anaerobne bakterije, kao što su *Bacteroides* i *Eubacterium*, nisu jednostavne za uzgoj konvencionalnim tehnikama jer zahtijevaju komore za inkubaciju u atmosferi dušika. *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* podnose male količine kisika, ali vrlo sporo rastu u medijima za uzgoj stoga ova četiri roda nisu prikladna za upotrebu kao pokazatelja fekalnog

onečišćenja. *Citrobacter*, *Klebsiella* i *Enterobacter* prisutni su u malom broju u ljudskom crijevu i rašireni su u vodama okoliša stoga nisu prikladni kao pokazatelji fekalnog onečišćenja. *Clostridium*, *Streptococcus* i *Escherichia*-u ne karakteriziraju prethodno navedeni nedostaci stoga se njihova prikladnost kao fekalnih pokazatelja testira već nekoliko desetljeća. (15)

1.3.MIKROBIOLOŠKI POKAZATELJI U VODI

Tablica 3. Mikrobiološki pokazatelji u vodi (16).

Mikrobiološki pokazatelji u vodi
Escherichia coli
Ukupni koliformi
Enterokoki
Broj kolonija 22°C
Broj kolonija 37°C
<i>Clostridium perfringens</i> (uključujući i spore)

1.3.1. Koliformne bakterije (koliformi)

1.3.1.1.Ukupni koliformi

Ukupni koliformi su gram-negativni štapići koji su fakultativni anaerobi što znači da mogu rasti u prisustvu kisika i bez njegovog prisustva. Fermentiraju laktozu uz proizvodnju plina pri 35–37 °C, nakon 48 sati, u mediju sa žučnim solima i deterdžentima (1,4,6,17).

U skupinu se ubraja 15 vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae*, odnosno rodovi *Citrobacter*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Hafnia* i *Klebsiella*. Oni su primarno nepatogeni i većinom oportunistički patogeni, odnosno, infekcija će se pojaviti u slučaju oslabljenog imuniteta. Koliformi obitavaju u debelom crijevu čovjeka ili toplokrvnih životinja stoga se izlučuju fekalijama i tako dospijevaju u prirodne vode. (16) No, ukupni broj koliformnih bakterija nije nužno mjera fekalnog onečišćenja.

Mnogi od spomenutih mikroorganizama su nekad bili odbačeni kao bezopasni komenzali. Danas je poznato da su odgovorni za velike zdravstvene probleme u cijelom svijetu. Ograničeni broj vrsta, uključujući *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* i *S. marcescens*, odgovorni su za većinu infekcija koje proizvodi ova skupina organizama. Raširena i često neselektivna uporaba antibiotika stvorila je gram-

negativne bacile, otporne na lijekove, koji lako stječu višestruku rezistenciju prijenosom rezistentnog plazmida. Također, razvoj novih kirurških postupaka, tehnologije u zdravstvu i raznih terapijama, omogućio je koliformnim bakterijama nove načine kolonizacije i ugrozio mnoge obrambene snage domaćina (18).

1.3.1.2.Fekalni koliformi

Fekalni koliformi (ili termotolerantni koliformi) spadaju u skupinu ukupnih koliforma. Dobili su naziv termotolerantni jer fermentiraju laktozu na vrlo visokim temperaturama (44,5 ° C) u mediju sa žučnim solima (1,4,17). Nazivaju se i fekalnim bakterijama jer potječu iz crijeva raznih životinja te su zato sadržane u fekalnoj materiji. Rodovi koji čine skupinu fekalnih koliforma su *Escherichia*, *Enterobacter* i *Klebsiella*. Oni su ujedno i pokazatelji fekalne kontaminacije vode iz okoliša, a najreprezentativniji od svih je *Escherichia coli* (19).

Gram-negativni bacili rodova *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* i *Proteus* članovi su normalne crijevne flore ljudi i životinja i mogu biti izolirani iz različitih izvora iz okoliša (19).

1.3.1.3.Epidemiologija

Epidemiologija koliformnih infekcija uključuje više rezervoara i načina prijenosa. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* i *Citrobacter* žive u vodi, tlu i povremeno u hrani te, u mnogim slučajevima, čine crijevnu floru ljudi i životinja (18).

Koliformni organizmi koji uzrokuju infekciju mogu biti egzogeni ili endogeni. Iako se čini da većina bolničkih infekcija proizlazi iz endogene flore, istraživanja koja su provedena na odraslim hospitaliziranim pacijentima i novorođenčadi, pokazala su da s povećanjem duljine hospitalizacije, koliformi progresivno koloniziraju crijevni trakt. Pacijenti koji se liječe antibioticima, teški bolesnici i novorođenčad češće će biti kolonizirani te su skloniji bolničkim infekcijama od pacijenata koji nisu kolonizirani (18).

Bakterije mogu kolonizirati neizravno putem različitih vektora ili izravnim kontaktom. Razni su vektori uključeni u širenje bolničkih patogena. Na primjer, *Klebsiella*, *Enterobacter* i *Serratia* su u velikom broju izolirane iz bolničke hrane, posebno salate, a bolnička kuhinja je primarni izvor zaraze. Izbijanje infekcija mokraćnog sustava zbog *S. marcescens*, koji je višestruko otporan na lijekove, povezano je s kontaminiranim spremnicima za mjerenje urina i urinometrima. Nadalje, bakterijemije uzrokovane koliformima povezane su i s

kontaminacijom intravenskih tekućina i kompleta za primjenu u bolničkom okruženju. Ostali medicinski uređaji i lijekovi su, također, sredstva za širenje bolničkih patogena. Povremeno se prijenos može izvršiti putem članova bolničkog osoblja koji su kolonizirani bolničkim patogenima (20).

Nadalje, određena svojstva koliformnih bakterija mogu biti važna u epidemiologiji bolničkih infekcija. Koliformne bakterije, osim *E. coli*, često se nalaze u vodi iz slavine ili čak destiliranoj ili deioniziranoj vodi. Mogu postojati ili se aktivno razmnožavati u vodi povezanoj s respiratornom terapijom ili opremom za hemodijalizu. *Klebsiella*, *Enterobacter* i *Serratia*, poput *Pseudomonas*-a, mogu pokazivati povećanu otpornost na antiseptike i dezinficijense. Ista skupina koliformnih organizama ima selektivnu sposobnost u odnosu na druge uobičajene bolničke patogene (uključujući *E. coli*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* i stafilokoke), a to je da se brzo šire na sobnoj temperaturi u parenteralnim tekućinama koje sadrže glukozu (18).

1.3.2. Escherichia coli (E. coli)

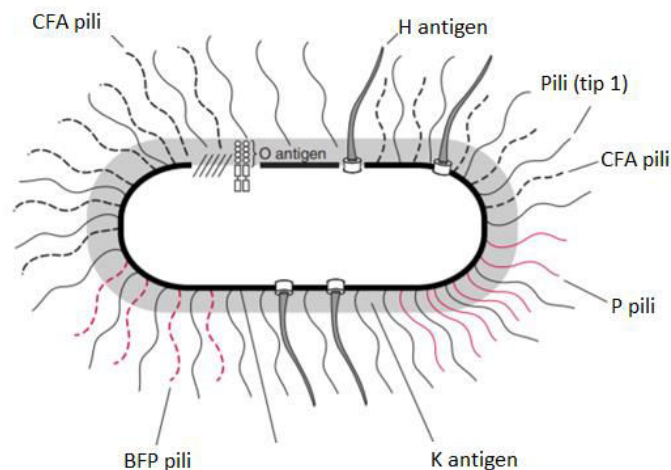
1.3.2.1. Enterobacteriaceae

Oznake roda i vrste temelje se na fenotipskim karakteristikama, poput obrazaca fermentacije ugljikohidrata i razgradnje aminokiselina. O, K i H antigeni koriste se za daljnju podjelu nekih vrsta u više serotipova. Te su vrste izražene slovom i brojem specifičnog antigena, kao što je *Escherichia coli* O157: H7, uzročnik brojnih epidemija koje se prenose hranom. Ove antigenske oznake utvrđene su samo za najvažnije vrste i ograničene su na dotične strukture. Na primjer, mnogim vrstama nedostaju kapsule i / ili bičevi. Posljednjih godina koriste se podaci o homologiji DNA i RNA za potvrđivanje tih odnosa i uspostavljanje novih. Rodovi koji sadrže najvirulentnije vrste za ljude su *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella* i *Yersinia*. Ostali, manje medicinski važni rodovi su *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella* i *Providencia* (20).

1.3.2.2. E. coli

E. coli je specifična vrsta bakterije koja se razlikuje od ostalih po raznim biokemijskim reakcijama (brzo fermentira laktozu te stvara indol). Postoje stotine mogućih serotipova te velik broj K i H antigena i preko 150 različitih O antigena. Serotipovi su opisani antigenskom formulom koja nastaje povezivanjem slova (K, H ili O) s brojem prisutnih antigena (20). Slika 1. prikazuje antigensku strukturu *E. coli*. O antigen je sadržan u ponavljajućim polisaharidnim

jedinicama lipopolisaharida (LPS) u vanjskoj membrani stanične stijenke. H antigen je flagelarni protein. K antigen je polisaharidna kapsula prisutna u nekim sojevima. Većina *E. coli* imaju pile nalik pilima tipa 1 (uobičajenima) koji se protežu duž površine. Neke *E. coli* imaju specijalizirane P pile, pile kolonizacije (CFA) ili pile koji stvaraju snop (BFP), kao i pile tipa 1 (20).



Slika 1. Antigena struktura *E. coli* (20).

E. coli uzrokuje razne oportunističke infekcije, primjerice infekcije mokraćnih putova i meningitis. Osim oportunističkih infekcija, čest je uzrok crijevnih infekcija kod kojih je primarni simptom proljev te se na temelju njega može zaključiti o kojem soju se radi (20).

1.3.2.2.1. Infekcija mokraćnih puteva

Pojam UTI obuhvaća niz infekcija, od jednostavnog cistitisa koji zahvaća mjehur, do potpune infekcije cijelog mokraćnog sustava, uključujući bubrežnu zdjelicu i bubreg (pielonefritis). Primarna značajka cistitisa je često mokrenje kojeg prate i bolovi. Simptomi pielonefritisa uključuju vrućicu, opću slabost i bolove u kukovima uz često mokrenje. Cistitis je obično samoograničavajuć, ali infekcija gornjih mokraćnih putova može dovesti do proširenja u krvotok. Također, vodeći je uzrok Gram negativne sepse i septičkog šoka (20).

1.3.2.2.1.1. Epidemiologija

E. coli čini više od 90% od 7 milijuna slučajeva cistitisa i 250 000 pielonefritisa koji se procjenjuje da se svake godine u Sjedinjenim Državama javlja kod zdravih osoba. UTI su

češći u žena, od kojih 40% ima infekciju tijekom svog života, najčešće u doba kad su seksualno aktivne. Rezervoar za ove infekcije je vlastita crijevna flora. *E. coli* pacijenta kontaminira perinealno i uretralno područje (20).

1.3.2.2.2. Crijevne infekcije

Proljev je univerzalni nalaz kod sojeva *E. coli* koji su u stanju izazvati crijevne bolesti. Priroda proljeva varira ovisno o patogenom mehanizmu. Enterotoksični i enteropatogeni sojevi proizvode vodeni proljev, enterohemoragični sojevi proizvode krvavi proljev, a enteroinvazivni sojevi mogu uzrokovati dizenteriju s krvlju i gnojem u stolici. Proljev obično prestaje nakon 1 do 3 dana. Iznimka su enterohemoragične *E. coli* koje izvan gastrointestinalnog trakta mogu stvarati Shiga toksin koji je opasan po život (20).

1.3.2.2.2.1. Epidemiologija

Sojevi *E. coli* izolirani tijekom crijevnih bolesti, grupirani su na temelju epidemioloških podataka, kliničke slike bolesti, čimbenika virulencije i fenotipskih svojstava u najmanje šest glavnih skupina. Od toga su enterotoksični (ETEC), enterohemoragični (EHEC) i enteroinvazivni serotipovi (EIEC) od izuzetne važnosti te se mogu prenijeti putem kontaminirane vode (18).

1.3.2.2.2.2. Enterotoksični sojevi *E. coli* (ETEC)

Enterotoksični serotipovi *E. coli* (ETEC) mogu uzrokovati dječji gastroenteritis. Broj izvještaja o njihovom pojavljivanju u razvijenim zemljama je relativno malen, ali je izuzetno važan uzrok proljeva u zemljama u razvoju, gdje nema odgovarajuće čiste vode i vladaju loši sanitarni uvjeti. U zemljama u razvoju su ti sojevi najčešće izolirani bakterijski enteropatogen kod djece mlađe od 5 godina i čine nekoliko stotina milijuna slučajeva proljeva i nekoliko deset tisuća smrtnih slučajeva svake godine. Bolest uzrokovana ETEC-om prati gutanje kontaminirane hrane ili vode, a karakterizira je obilan vodeni proljev koji traje nekoliko dana i često dovodi do dehidracije i pothranjenosti male djece. ETEC su također najčešći uzrok "proljeva putnika" koji pogađa pojedince iz industrijaliziranih zemalja koji putuju u regije svijeta u razvoju (21,22).

1.3.2.2.2.3. Enterohemoragična *E. coli* (EHEC)

Prijavljeni epidemiološki slučajevi trovanja enterohemoragičnom *E. coli* povezani su s konzumacijom kontaminirane hrane. Uglavnom su uzrokovani kontaminacijom sirovog ili nedovoljno kuhanog mljevenog mesa te sirovog mlijeka. (23,24,25).

Serotip *E. coli* O157: H7 stvara toksine poput Shiga toksina. Razdoblje inkubacije traje 3-4 dana, a simptomi poput bolova u trbuhu i krvavog proljeva su prisutni 7-10 dana. *E. coli* O157: H7 može uzrokovati i hemolitičko uremički sindrom, a smatra se da 2-7% infekcija uzrokovanih navedenom bakterijom rezultira akutnim zatajenjem bubrega (23,24,25).

Uobičajeno, *E. coli* O157: H7 ne predstavlja prijetnju u pročišćenoj vodi za piće, no, utvrđeno je da je primarni rezervoar stoka što posljedično dovodi do onečišćenja vode izmetom stoke ili ljudskom kanalizacijom. Nadalje, sve se veći broj epidemija povezuje s konzumacijom kontaminiranog voća i povrća kao primjerice klica, zelene salate, kupus salate itd. Do kontaminacije dolazi izmetom divljih ili domaćih životinja tijekom procesa uzgoja ili rukovanja voćem i povrćem. EHEC je također izoliran iz vodnih tijela (bare, potoci), bunara i vodnih korita, a utvrđeno je da mjesecima opstaje u sedimentima gnoja i korita (24,25).

1.3.2.2.4. Enteroinvazivna *E.coli* (EIEC)

Gotovo sve karakteristike EIEC infekcija ukazuju na povezanost roda *Shigella* i enteroinvazivne *E.coli*. (Sherris). Imaju sposobnost invazije i razmonažavanja u epitelnim stanicama distalnog debelog crijeva kod ljudi (21,23,26). Jedini poznati rezervoari su ljudi. (Sherris) Nadalje, hrana kontaminirana ljudskim izmetom zaražene osobe, izravno ili putem onečišćene vode, može dovesti do bolesti kod ljudi koji ju konzumiraju. Epidemije su najčešće kod konzumacije junećeg mesa i nepasteriziranog mlijeka (26). Bolest je karakterizirana proljevom, povraćanjem, grčevima u trbuhu, povišenom tjelesnom temperaturom, generaliziranom slabošću, osjetom hladnoće i pojavom sluzi i krvi u stolici zaraženih osoba (21,23,26).

Prema epidemiološkim podacima, najčešće infekcije EIEC-om zabilježene su kod djece koja žive u zemljama u razvoju i spadaju u dobnu skupinu do 5 godina. Međutim, dokumentirane su povremene infekcije u industrijaliziranim zemljama za koje se smatra da su povezane s kontaminiranom vodom ili hranom. Uspoređujući infekcije uzrokovane EIEC-om i *Shigellom*, veća zarazna doza za EIEC infekciju korelira s opažanjem da je niža učestalost prijenosa s osobe na osobu kod infekcija uzrokovanih EIEC-om (20).

Primjerice, EIEC je izolirana kod 28 ispitanika u okrugu Jesreel u Izraelu tijekom trajanja vrhunca epidemije dizenterije. Istraživanja u Hrvatskoj pokazala su da se *Escherichia coli* O124 može izolirati kod slučajeva enterokolitisa, gastroenteritisa i dizenterije. Enterokolitis i gastroenteritis je bio prisutan među pripadnicima svih dobnih skupina, dok se dizenterija češće javljala među pripadnicima starijih dobnih skupina. Na Tajlandu je 1985. provedeno

istraživanje u kojem je ispitana prisutnost sojeva *Shigelle* i EIEC-a kod 410 djece s proljevom i kontrolne skupine, odnosno 410 djece bez proljeva. Utvrđeno je da je EIEC izolirana kod 17 djece iz prve skupine i 6 djece iz kontrolne skupine bez proljeva (21,23).

1.3.2.2.2.5. Enteroagregacijska *E. coli* (EAEC)

Infekciju uzrokovanu EAEC-om karakterizira produljeni vodenasti proljev (traje duže od 14 dana) kod novorođenčadi i djece u zemljama u razvoju. Prema epidemiološkim podacima nedavne epidemije, EAEC infekcija svrstava se u bolesti koje se prenose hranom u industrijaliziranim zemljama. Patogeneza infekcije uzrokovane EAEC-om nije jasno razumljiva, ali pretpostavlja se da EAEC adherira na crijevnu sluznicu i razrađuje citotoksine i enterotoksine pri čemu dolazi do sekretornog proljeva i oštećenja sluznice. EAEC ima sposobnost stimulacije oslobađanja medijatora upale te tako može imati ulogu u crijevnim bolestima (18).

1.3.2.2.2.6. Enteropatogena *E. coli* (EPEC)

Enteropatogena *E. coli* (EPEC) je prvi put identificirana kao uzrok burnih i masovnih proljeva u bolničkim jaslicama u Velikoj Britaniji i SAD-u tijekom 1950-ih. Bolest uzrokovanu EPEC-om je teško dijagnosticirati zbog čega se ne može sa sigurnošću reći da je nestala u industrijaliziranim zemljama. U zemljama u razvoju širom svijeta EPEC čini do 20% proljeva u dojenčadi, mlađih od godinu dana, koji su hranjeni na bočicu. Infekcija se prenosi fekalno-oralnim putem. Izbijanje epidemija u jaslicama pokazuje da je zarazna doza za dojenčad vrlo niska. Dokumentirani slučajevi infekcije kod odraslih osoba su obično bili u okolnostima kada je unesena velika količina uzročnika (18.)

1.3.3. Rod *Clostridium*

1.3.3.1. Anaerobne bakterije

Klostridiji spadaju u skupinu anaerobnih bakterija odnosno bakterija koje zahtijevaju anaerobne uvjete za rast. U spomenutu skupinu se svrstavaju organizmi iz više rodova i svih kategorija Gramovih obojenja. Većina ih uzrokuje endogene infekcije na površinama sluznice, gdje su inače dio normalne mikroflore. Klostridiji tvore spore nakon onečišćenja tkiva ili hrane, koje im omogućuju stvaranje bolesti, poput tetanusa i botulizma (20).

Anaerobni uvjeti su potrebni anaerobima, osim za opstanak, i za pokretanje i održavanje rasta. Prema definiciji, anaerobi ne uspijevaju rasti u prisutnosti od 10% kisika, ali neki su osjetljivi na koncentracije kisika od samo 0,5% stoga ne preživljavaju čak ni pri kratkom izlaganju zraku. Međutim, tolerancija na kisik je promjenjiva i mnogi organizmi mogu preživjeti u prisutnosti od 2 do 8% kisika, uključujući većinu patogenih vrsta (20).

Anaerobima nedostaju citokromi, potrebni da bi se kisik koristio kao terminalni akceptor elektrona u egzotermnim reakcijama, stoga, energiju proizvode samo fermentacijom. Neki anaerobi neće rasti, osim ako je potencijal oksido-redukcije izuzetno nizak (300 mV), jer kritični enzimi moraju biti u reduciranom stanju da bi bili aktivni, a aerobni uvjeti stvaraju metabolički blok (20).

Sljedeća karakteristika anaerobnih bakterija je izravna osjetljivost na kisik. Kod većine aerobnih i fakultativnih bakterija, katalaza i / ili superoksid dismutaza neutraliziraju toksičnost kisikovih spojeva, vodikovog peroksida i superoksida. Neki od najvirulentnijih anaerobnih patogena mogu proizvesti katalazu ili superoksid dismutazu. Većini anaeroba nedostaju spomenuti enzimi i oštećuju se pri stvaranju kisikovih spojeva u njihovom mikrookolišu (18).

1.3.3.2. Rod *Clostridium*

Rod *Clostridium* jedan je od najvećih rodova prokariota koji sadrži 168 objavljenih vrsta. Od toga se 77 vrsta (uključujući *C. perfringens*) smatra ujedinjenom skupinom - *Clostridium sensu stricto* (27,28,29).

Klostridiji su gram-pozitivni štapići koji tvore endospore. Većina vrsta roda *Clostridium* je pokretna s peritričnim bičevima. Stanice su katalaza negativne i ne provode disimilacijsku redukciju sulfata. Klostridiji obično proizvode mješavine organskih kiselina i alkohola iz ugljikohidrata i bjelančevina. Mnoge vrste su saharolitičke i proteolitičke. Neke vrste fiksiraju atmosferski dušik (27,28,29).

Rod *Clostridium* uključuje psihrofilne, mezofilne i termofilne vrste. Oni su sposobni preživjeti godinama u okolišu i vratiti se u vegetativni oblik nakon stvaranja povoljnih uvjeta. Oblik stanice i smještaj spora razlikuju se ovisno o vrsti, ali same spore rijetko se mogu vidjeti u kliničkim uzorcima (20).

Medicinski važni klostridiji snažni su proizvođači jednog ili više egzotoksina. Histotoksična skupina koja uključuje *Clostridium perfringens* i pet drugih vrsta stvara hemolizine na mjestu akutnih infekcija koje imaju litički učinak na širok spektar stanica. Neurotoksična skupina koja uključuje *C. tetani* i *C. botulinum* stvara neurotoksine koji svoj učinak vrše na neuronskim mjestima udaljenim od bakterija. *C. difficile* stvara enterotoksine i uzročnik je bolesti u crijevnom traktu. Osim navedenih vrsta, 80 drugih *Clostridium* vrsta je, također, povezano s raznim bolestima (20).

1.3.3.3. *Clostridium perfringens*

C. perfringens je gram-pozitivan, nepokretan štapić (Sherris) koji proizvodnjom plina fermentira laktozu, saharozu i inozitol (29,30). *C. perfringens* proizvodi višestruke egzotoksine koji imaju različito patogeno djelovanje u različitim životinjskim vrstama i služe kao osnova za klasifikaciju pet tipova (A-E). (Sherris) Smatra se da je *C. perfringens* univerzalna komponenta ljudskog i životinjskog crijeva jer je izolirana iz crijevnog sadržaja svake životinje koja je proučavana. Tip A je daleko najvažniji kod ljudi i stalno je prisutan u debelom crijevu, a često se nalazi i u tlu te probavnom sustavu životinja, naročito ptica. Za razliku od tipa A, tipovi B, C, D i E su obvezni paraziti životinja te se povremeno mogu naći kod ljudi (29,30). Najvažniji egzotoksin je α -toksin, odnosno fosfolipaza koja hidrolizira lecitin i sfingomijelin, narušavajući tako stanične membrane različitih stanica domaćina, uključujući eritrocite, leukocite i mišićne stanice. θ -toksin mijenja kapilarnu propusnost i toksičan je za srčani mišić. Također, usko je povezan sa streptolizinom O. *C. perfringens* uzrokuje širok spektar infekcija rana i mekih tkiva, od kojih se mnoge ne razlikuju od onih uzrokovanih drugim oportunističkim bakterijama. Najopasnija od njih, plinska gangrena, započinje kao infekcija rane, ali za nekoliko sati preraste u šok i smrt. Druga bolest uzrokovana *C. Perfringens*-om, trovanje hranom, karakterizirana je proljevom bez temperature ili povraćanja (20).

1.3.3.3.1. Epidemiologija

1.3.3.3.1.1. Plinska gangrena

Plinska gangrena razvija se u traumatičnim ranama s oštećenjem mišića koje su onečišćene prljavštinom, odjećom ili drugim stranim materijalom koji sadrži *C. perfringens* ili drugu vrstu histotoksičnih klostridija. Klostridiji potječu iz probavnog sustava pacijenta ili spora u

okolišu. Složeni prijelomi, rane od metka ili ostale vrste ratnih rana prototipi su ove infekcije. Dodatni uvjet razvitka bolesti je dugo vremensko razdoblje između ozljede i konačnog kirurškog liječenja. Treba uzeti u obzir da će se, vjerojatnije, ovi uvjeti dogoditi u mirno vrijeme u planinarskoj nesreći na udaljenom području, a ne u automobilskoj nesreći na autocesti (20).

1.3.3.3.1.2. Trovanje hranom

U slučaju unosa velikog broja soja *C. perfringens*-a koji proizvodi enterotoksin, može doći do trovanja hranom. Izbijanje bolesti obično uključuje mesna jela poput variva, juha ili umaka. Trovanje hranom klostridijima jedna je od najčešćih bolesti koje se prenose hranom u razvijenim zemljama (18,20).

1.3.3.3.2. Klinička slika

1.3.3.3.2.1. Plinska gangrena

Simptomi plinske gangrene razvijaju se 1 do 4 dana nakon ozljede, ali mogu i u roku od 10 sati. Najraniji zabilježeni pokazatelj bolesti je jaka bol na mjestu rane popraćena osjećajem težine ili pritiska. Tada bolest brzo napreduje pojavom edema, osjetljivošću i bljedilom, što dovodi do promjene boje i hemoragične bule. Plin je očit kao krepitacija u tkivu, no, smatra se kasnim pokazateljem bolesti. Sustavni nalazi pokazuju šok s intravaskularnom hemolizom, hipotenzijom i zatajenjem bubrega što dovodi do kome i smrti (20).

1.3.3.3.2.2. Trovanje hranom

Razdoblje inkubacije je od 8 do 24 sata te je praćeno mučninom, bolovima u trbuhu i proljevom. Groznica nije prisutna, a povraćanje je rijetko. Oporavak se obično dogodi u roku od 24 sata (31).

1.3.3.3.3. Patogeneza

1.3.3.3.3.1. Plinska gangrena

Ako je oksidacijsko-redukcijski potencijal u rani dovoljno nizak, spore *C. perfringens*-a mogu klijati i razmnožavati se tako što razgrađuju α -toksin. Proces prolazi duž mišićnih snopova, uzrokujući brzo širenje edema i nekroze, kao i uvjete koji su povoljniji za rast bakterija. Kako bolest napreduje, povećana vaskularna propusnost i sistemska apsorpcija toksina i medijatora upale dovodi do šoka. Manjak kisika uzokovan metaboličkim aktivnostima *C. perfringens*-a je

dodatan doprinositelj šoku. Osnova za dubinske sustavne učinke nije poznata, ali apsorpcija toksina stvara probleme jer se smrtni slučajevi javljaju i bez bakterijemije (20).

1.3.3.3.2. Klostridijalno trovanje hranom

Spore nekih sojeva *C. perfringens*-a često su posebno otporne na toplinu i mogu podnijeti temperaturu od 100 ° C u vremenskom razdoblju od sat vremena ili duže. Dakle, spore koje prežive tijekom početnog kuhanja mogu prijeći u vegetativni oblik. Mogu se i razmnožavati u slučaju ako je hrana čuvana izvan hladnjaka ili ako je ponovno zagrijavana. Nakon gutanja, enterotoksin se oslobađa u gornji dio probavnog trakta, što uzrokuje izljev tekućine u kojem je ileum najteže zahvaćen (31).

1.3.4. Rod *Enterococcus*

Dugo se pokušalo razlikovati vrste *Enterococcus*-a od vrsta *Streptococcus*-a. Naposljetku, 1937. godine Sherman je razvrstao vrste *Streptococcus*-a u četiri podskupine: fekalni streptokoki (enterokoki), mliječni streptokoki, skupina viridans i piogeni streptokoki (32). Najčešće enterokokne vrste dijele bakteriološke karakteristike s piogenim streptokokima, uključujući i prisutnost antigena skupine Lancefield. Pojam enterokoki potječe od njihove prisutnosti u crijevnom traktu te mnogih biokemijskih i kulturnih obilježja koja odražavaju to stanište. To uključuje sposobnost rasta u prisutnosti visokih koncentracija žučnih soli i natrijevog klorida. Većina enterokoka stvara nehemolitičke ili α -hemolitičke kolonije koje su veće od većine streptokoka. *E. faecalis*, *E. faecium* i nekoliko drugih vrsta prepoznaju se na temelju biokemijskih i kulturnih obilježja, ali enterokoki, općenito, nisu specifičirani u kliničkom laboratoriju (20).

Rod *Enterococcus* sastoji se od gram-pozitivnih, katalaza negativnih, fakultativnih anaerobnih bakterija koje ne tvore spore i pojavljuju se kao pojedinačni koki ili u lancima. Enterokoki pripadaju skupini organizama poznatih kao bakterije mliječne kiseline (LAB) koje proizvode bakteriocine (32).

Većina vrsta roda *Enterococcus* dio je crijevne flore sisavaca, gmazova, ptica i drugih životinja. U ljudskom probavnom traktu *E. faecalis* je prevladavajuća vrsta, iako u određenim situacijama *E. faecium* može prevladavati. Vode u okolišu nisu prirodno stanište enterokoka i njihovo prisustvo u vodama se smatra rezultatom fekalnog onečišćenja. Najčešće vrste

pronađene u vodama okoliša su *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* i *E. hirae*, a rjeđe *E. avium*, *E. cecorum*, *E. columbae* i *E. gallinarum*. Međutim, zabilježeno je da netaknute vode u Finskoj sadrže *E. casseliflavus* (64,71).

1.3.4.1. Patogeneza

Enterokoki su čest uzrok bolesti u specijaliziranim bolničkim uvjetima (Sherris), odnosno, vrste enterokoka s najvećom virulencijom su medicinski izolati, slijede izolati hrane, a zatim početni sojevi (Busani i sur., 2004.; Ben Omar i sur., 2004.). Mnogi čimbenici određuju virulenciju vrsta *Enterococcus*-a, na primjer: (1) sposobnost koloniziranja gastrointestinalnog trakta, (2) sposobnost prijanjanja na niz proteina izvanstaničnog matriksa, uključujući trombospondin, laktoferin i vitronektin; i (3) sposobnost adherencije na epitel mokraćnog sustava, epitel usne šupljine i stanica bubrega humanog embrija. Smatra se da je većina infekcija endogena. Nastaju translokacijom bakterija kroz epitelne stanice crijeva, zatim uzrokuju infekciju preko limfnih čvorova i tako se šire na druge stanice u tijelu (Franz i sur., 1999.). Kod infekcija rana i mekih tkiva se obično miješaju s ostalim članovima crijevne flore. Neki su čak sumnjali u njihov značaj nakon što su izolirani zajedno s virulentnijim članovima *Enterobacteriaceae*-om ili *Bacteroides fragilis*-om. Iako su neki površinski proteini kandidatni adhezini, nisu otkriveni faktori virulencije.

1.3.4.2. Epidemiologija

Prema epidemiološkim podacima o enterokokima, *E. faecalis* i *E. faecium* se redovito izoliraju iz sira, ribe, kobasica, mljevene govedine i svinjetine (Foulquie Moreno i sur., 2006; Klein, 2003). Navedene namirnice preživljavaju proces zagrijavanja stoga su često povezane s kontaminacijom vrstama *Enterococcus*-a. Rasprostranjenost vrsta *Enterococcus*-a varira u cijeloj Europi. U Španjolskoj i Velikoj Britaniji, *E. faecalis* i *E. faecium* najčešće su izolirane vrste i iz kliničkih i iz okolišnih izvora. Švedska ima nižu incidenciju *E. faecium*, dok je u Danskoj *E. hirae* dominantna vrsta i izolirana je uglavnom iz zaklanih životinja.

Enterokoki uzrokuju oportunističke infekcije mokraćnog sustava (UTI) i povremeno infekcije rana i mekih tkiva, na sličan način kao i pripadnici *Enterobacteriaceae*. Infekcije su često povezane s bolestima mokraćnog sustava, zloćudnim bolestima, bolestima žučnih puteva i gastrointestinalnim poremećajima. Vaskularni ili peritonealni kateteri često su ulazne točke.

Infekcije respiratornog trakta su rijetke. Ponekad postoji pridružena bakterijemija, koja može rezultirati razvojem endokarditisa na prethodno oštećenim srčanim zaliscima. (27,33).

1.3.5. Aerobne mezofilne bakterije

Aerobne mezofilne bakterije rastu u temperaturnom rasponu od 20-45 °C odnosno mezofilno, uz prisustvo kisika (aerobno). Većini ovih bakterija je optimalna čovjekova tjelesna temperatura (37 °C), što znači da u skupinu aerobnih mezofilnih bakterija spada većina patogenih bakterija. Povećan broj aerobnih mezofilnih bakterija indikator je starosti i smanjene mikrobiološke kakvoće (kontaminacije ili početka kvarenja). Ukazuje i na nedovoljno čišćenje, pranje i dezinfekciju.

Povećan ukupan broj aerobnih mezofilnih mikroorganizama ne predstavlja opasnost po zdravlje ljudi. Aerobne bakterije se lako uklanjaju iz vode raznim metodama (18).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mikrobiološku ispravnost 4 uzorka vode na području Zadra. Proučavana voda je uzeta iz podzemnog izvora, površinskog izvora i sustava sakupljanja kišnice. Ispitivanje mikrobiološke ispravnosti se provelo indikatorima fekalne kontaminacije, metodom membranske filtracije te nacjepljivanjem na agare s kvašćevim ekstraktom.

3. MATERIJALI I METODE

U radu su korištena 4 uzorka vode iz kojih su dokazane fekalne indikatorske bakterije i određen je broj indikatorskih bakterija metodom membranske filtracije. Uz to, određen je i broj ukupnih bakterija na 22°C i 37 °C naciepljivanjem na ploče agara s kvaščevim ekstraktom.

3.1. MATERIJALI

3.1.1. UZORCI VODE

Uzorci vode su uzeti s područja Ninskog zaljeva odnosno područja grada Nina i općine Vrsi (Slika 2.)



Slika 2. Lokacije uzetih uzoraka (Izvor: Autor)

3.1.1.1. Uzorak 1: bunar tzv. Bunarić“ (Slika 3.a)

„Bunarić“ se nalazi u sjeverozapadnom dijelu općine Vrsi. Nepresušan je izvor vode te višak vode otječe prema zapadu i ulijeva se u more. Bunar je uklesan u kamen te ima pumpu koja direktno crpi podzemnu vodu stoga se često koristi kao voda za ljudsku potrošnju. U prošlosti se bunar koristio za napajanje stoke (34).

3.1.1.2. Uzorak 2: kućni zdenac (gusterna)

Gusterna je po definiciji kućni zdenac koji služi za skupljanje kišnice u primorskim krajevima (35).

Spomenuti zdenac se nalazi na obiteljskom posjedu, dubok je 3,5 metara i star oko 60 godina. Izrađen je ručnim kopanjem nakon čega je unutrašnjost ožbukana. Spojen je s olucima, a oluci su dio sustava koji sakupljaju vodu i usmjeravaju kišnicu sa krova građevine (Slika 3.b). Osim za skupljanje kišnice, oluci služe i za sprječavanje erozije, curenja u podrumima te štite obojene površine. Zdenac je povezan s hidroforom preko kojeg je spojen s vodovodnim instalacijama u kući. Sakupljena voda se koristi za polijevanje vrta.

3.1.1.3. Uzorak 3: poljski bunar (Slika 3.c)

Uzorak 3 je uzet iz nepresušnog poljskog bunara na području općine Vrsi. Voda potječe iz žile Golubinka koja spada u slivno područje Bokanjac-Poličnik gdje se zahvaća voda iz izvora Golubinka u svrhu opskrbe stanovništva pitkom vodom. Bunar je dubok oko 3,5 metara, iskopan je prije približno 80 godina u svrhu napajanja stoke i kao izvor pitke vode ljudima koji su tada radili u polju. Danas se više ne koristi.

3.1.1.4. Uzorak 4: rijeka Miljašić Jaruga, Nin (Slika 3.d)

Uzorak 4 je uzet iz donjeg toka rijeke Miljašić Jaruge koja se nalazi u gradu Ninu. Tekućica se ulijeva u Jadransko more, a predmetna dionica vodotoka iz koje je uzet uzorak je udaljena oko 1 km istočno od centra grada Nina. Trenutna funkcija navedenog vodotoka je plovidba i privez manjih brodica za obalu. Duljina navedenog vodotoka iznosi 25 km, slivna površina iznosi 131 km² te vodotok karakterizira slabi protok vode. Uz lošu izmjenu vode, povećane količine hranjivih tvari te ispuštanje otpadnih komunalnih voda, Ninski zaljev se svrstava u osjetljivo i eutrofno područje (36).



Slika 3. Uzorci vode: a. bunar tzv. „Bunarić“, b. oluci koji služe za sakupljanje kišnice (moram ponovno ići slikati), c. poljski bunar, d. rijeka Miljašić Jaruga (Izvor: Autor)

3.1.2. HRANJIVE PODLOGE

3.1.2.1. Les endo agar

Les endo agar je diferencijalna i selektivna podloga za uzgoj koliformnih bakterija (37).

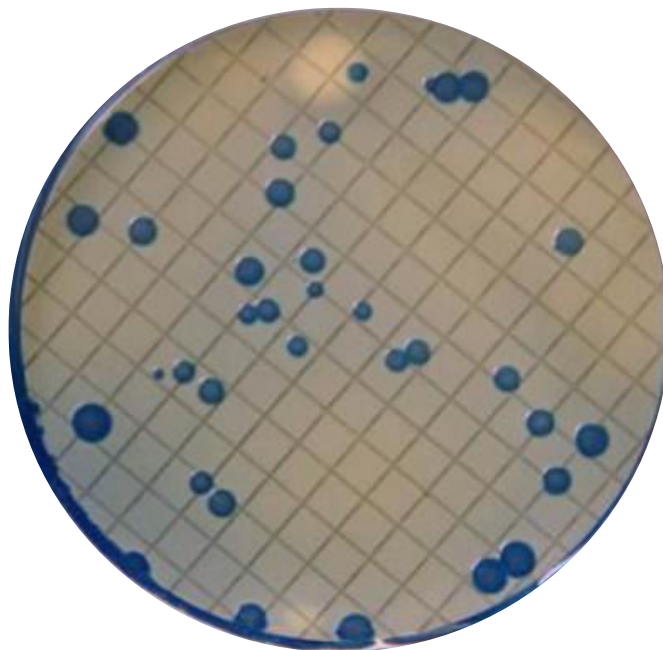
Vitamin B-kompleksa stimulira rast bakterija, a izvor vitamina je ekstrakt kvasca. Podloga od ugljikohidrata sadrži laktozu, a fosfati su pufferi. Natrijev klorid održava osmotsku ravnotežu medija. Natrijev dezoksilat i natrijev lauril sulfat su inhibitori, a fuksin je pH indikator. Natrijev sulfit se dodaje zbog dekolorizacije otopine fuksina. Laktoza fermentirajuće bakterije proizvode acetaldehid koji reagira s natrijevim sulfitom i fuksinom tvoreći crveno obojene kolonije. Bakterije proizvode i aldehid koji vrlo brzo fermentira laktozu te dolazi do razvoja metalnog sjaja (Slika 2.) (16).



Slika 4. Kolonije *Escherichia coli* zlatnometalnog sjaja i ružičaste kolonije ostalih koliformnih bakterija porasle na Endo agaru (37).

3.1.2.2. m-FC agar

m-FC agar je selektivna podloga za uzgoj fekalnih koliforma. Podloga sadrži ekstrakt kvasaca i pepton. Ekstrakt kvasaca služi kao izvor nutrijenata za rast bakterija, a žučne soli djeluju kao inhibitori rasta konkurentne gram-pozitivne flore. Pri temperaturi od 44°C, fekalni koliformi mogu fermentirati laktozu te formirati plavo obojene kolonije (Slika 3.). Ostale prisutne bakterije formiraju sive kolonije (16).



Slika 5. Plavo obojene kolonije fekalnih koliforma na m-FC agaru (38).

3.1.2.3. Slanetz-bartley agar (SBA)/eskulin žuč azid agar (KEA)

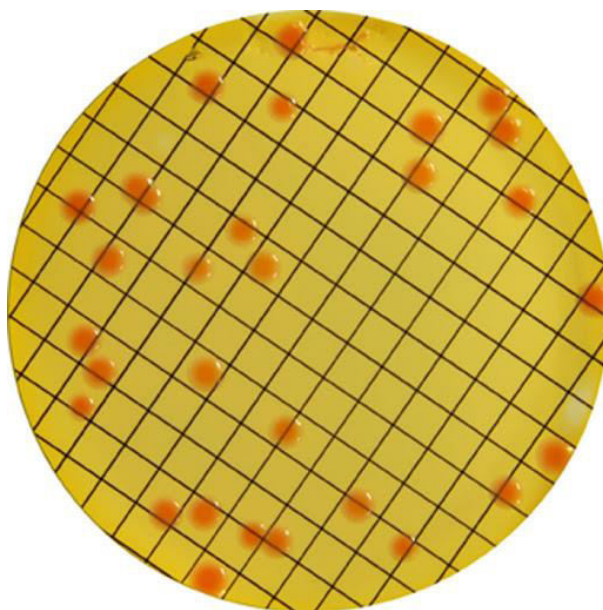
SBA je selektivna podloga koja sadrži 2,3,5-trifeniltetrazolium klorid (reducira se u crveno obojeni formazan u prisutnosti enterokoka) i natrijev azid (inhibira rast gram-negativnih bakterija). U slučaju da na SBA agaru narastu crveno obojene kolonije membranu je potrebno premjestiti na eskulin žuč azid agar kojeg je prethodno potrebno zagrijati na 44°C. Enterokoki hidroliziraju eskulin u spomenutom agaru u vremenskom razdoblju od 2 sata. Konačni produkt hidrolize je 6,7-dihidroksikumarin koji se veže s željezo (III) ionima. Naposljetku nastaje tamno obojeni, odnosno crni kompleks koji difundira u podlogu (Slika 4.) (16).



Slika 6. Tamno obojene kolonije enterokoka na KEA agaru (Izvor: Autor)

3.1.2.4. Laktoza TTC agar s Tergitol-7 (TTC agar)

TTC agar je selektivna podloga za uzgoj *E. coli* koja sadrži Tergitol-7 (natrijev heptadecil sulfat). Tergitol-7 ima inhibitorski učinak na gram pozitivne bakterije. TTC je osjetljiv dehidrogenaza indikator. *E. coli* je laktoza pozitivna te koliformne bakterije slabo reduciraju TTC. Redukcijom nastaju žuto-narančaste kolonije (Slika 5.).



Slika 7. Žuto-narančaste kolonije *E.coli* na TTC agaru (38).

3.1.2.5. Triptoza sulfid cikloserin agar (TSN agar)

TSN agar je selektivna podloga za uzgoj *C. perfringens* koja se inkubira u anaerobnim uvjetima. Sadrži triptozu, pepton i ekstrakt kvasca koji su izvor osnovnim nutrijentima za rast bakterija (dušik, minerali, vitamini i aminokiseline). Indikatori za H_2S su željezo-amonijev-citrat i dinatrij-sulfit. Bakterije pri proizvodnji H_2S reduciraju sulfit u sulfid. Pri redukciji uz prisutnost željezo-amonij-citrata formiraju se crne kolonije (Slika 6.), a cikloserin djeluje inhibitorno na rast konkurentne mikrobne flore (16).



Slika 8. Crno obojene kolonije *C. perfringens*-a na TSN agaru (38).

3.2. METODE

3.2.1. UZORKOVANJE VODE

Međunarodne norme za uzorkovanje (EN) ISO 5667 daju upute za uzorkovanje voda (16,39).

Uzorkovanje se temelji na izuzimanju dijela iz većine na način da se osigura reprezentativnost uzorka. Transport do laboratorija mora biti adekvatan odnosno treba se održati nepromijenjenost u svim dijelovima uzorka. Nepromijenjen sastav se treba zadržati, osim za vrijeme transporta, i tijekom uzorkovanja i tijekom analize. Analiza uzorka se ne provodi u slučaju nereprezentativnog uzorka zbog mogućnosti dobivanja netočnih i nepouzdanih rezultata (16,39).

3.2.1.1. UZORKOVANJE IZ SLAVINE

Uzorak 2 je uzorkovan prema uputama za uzimanje uzoraka iz slavine jer je kućni zdenac spojen s instalacijskim sustavom kuće. Prije uzorkovanja vode potrebno je ukloniti rešetke sa slavine. Nakon uklanjanja rešetke, boca je isprana tri puta s uzorkom. Voda je puštena da teče određeno vremensko razdoblje nakon čega je napunjena ambalaža. Utočen je tri puta veći volumen od ambalaže radi istiskivanja već natočene vode (39).

3.2.1.2. UZORKOVANJE PODZEMNIH VODA

Za uzorkovanje podzemnih voda koristi se pumpa koja služi i za pumpanje vode. Pumpa mora biti čista te se treba koristiti isključivo samo za pumpanje vode za piće. Pri uzorkovanju podzemnih voda može doći do raznih fizikalno-kemijskih promjena vode. Dodir s atmosferskim kisikom može potaknuti povećanje mikrobiološke aktivnosti, a promjena meteoroloških uvjeta, također, utječe na kvalitetu vode (39).

3.2.1.3. UZORKOVANJE POVRŠINSKIH VODA

Uzorak 4 uzet je s donjeg toka rijeke. Sterilna boca je isprana tri puta s uzorkom nakon čega je napunjena tri puta većim volumenom radi istiskivanja već natočene vode.

Uzorkovani uzorci sačuvani su i spremljeni na 4°C. Tijekom transporta i čuvanja uzoraka treba paziti na izloženost svjetlu, temperaturu, osobine ambalaže i vremenski period do analize uzorka. Spomenuti vremenski period treba biti što kraći radi izbjegavanja nepoželjnih fizikalno-kemijskih i bioloških procesa (39).

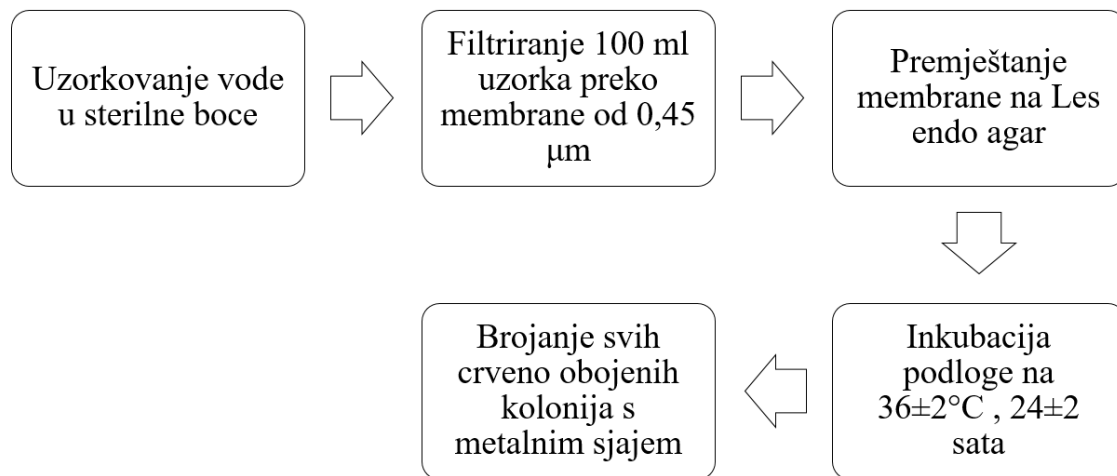
3.2.3. MEMBRANSKA FILTRACIJA

Tehnika membranske filtracije je jednostavna, praktična, ekonomična i ponovljiva. Kvalitativna je i kvantitativna metoda te se koristi u mikrobiologiji voda. Princip metode je koncentriranje mikroorganizama iz uzorka s površine membranskog filtera, te naciepljivanje mikroorganizama na hranjivu podlogu (Slika 7.). Prisutnost i broj bakterija se određuje u 100 ml uzorka vode. Odabrani volumen vode (većinom se uzima 100 ml uzorka) filtrira se preko membranskih filtera. Cilj filtracije je zadržavanje bakterija na filteru što ovisi o veličini pora (u radu je korišten filter pora veličine 0,45 μm . Nakon filtracije, membrana se prenosi s metalnog držača na hranjivu podlogu i inkubira na temperaturi i u vremenskom razdoblju koje ovise o definiranoj metodi. Metaboliti i nutrijenti se izmjenjuju kroz pore membranskog filtera. Kolonije, porasle tijekom inkubacije na površini membranskog filtera, se broje i rezultat se izražava s obzirom na volumen uzorka. Prednost metode membranske filtracije je mogućnost ispitivanja većeg volumena uzorka, dok kod direktne metode to nije moguće. Koncentracija uzorka povećava točnost detekcije. Još jedna prednost ove tehnike je što se porasle kolonije mogu direktno preračunati na određeni volumen uzorka. Membranski filter se može osušiti nakon obrade i sačuvati kao dokaz testa (39).



Slika 9. Sustav za membransku filtraciju (Izvor: Autor)

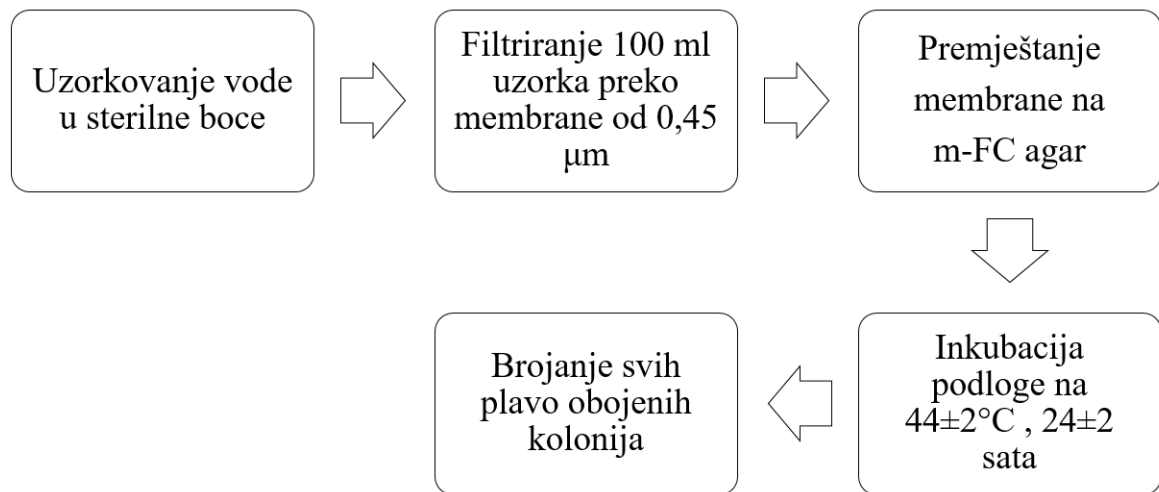
3.2.4. DOKAZIVANJE I ODREĐIVANJE BROJA UKUPNIH KOLIFORMA METODOM MEMBRANSKE FILTRACIJE



Slika 10. Shematski prikaz dokazivanja i određivanja ukupnih koliforma metodom membranske filtracije (Izvor: Autor)

Na Slici 10. prikazan je postupak dokazivanja i određivanja broja ukupnih koliforma metodom mebranske filtracije. Nakon uzorkovanja vode u sterilne boce, 100 ml uzorka filtrirano je preko membranskog filtera od 0,45 μm, odnosno filtera kroz kojeg bakterije ne mogu proći. Membranski filter je smješten na Les endo agar (hranjivu selektivnu podlogu) uz izbjegavanje formiranja zraka između površine podloge i filter papira. Potom, nacijepljena podloga je inkubirana na 36±2 °C u vremenskom razdoblju od 24±2 sata. Naposljetku, izbrojene su sve crveno obojene kolonije s metalnim sjajem i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 ml (40).

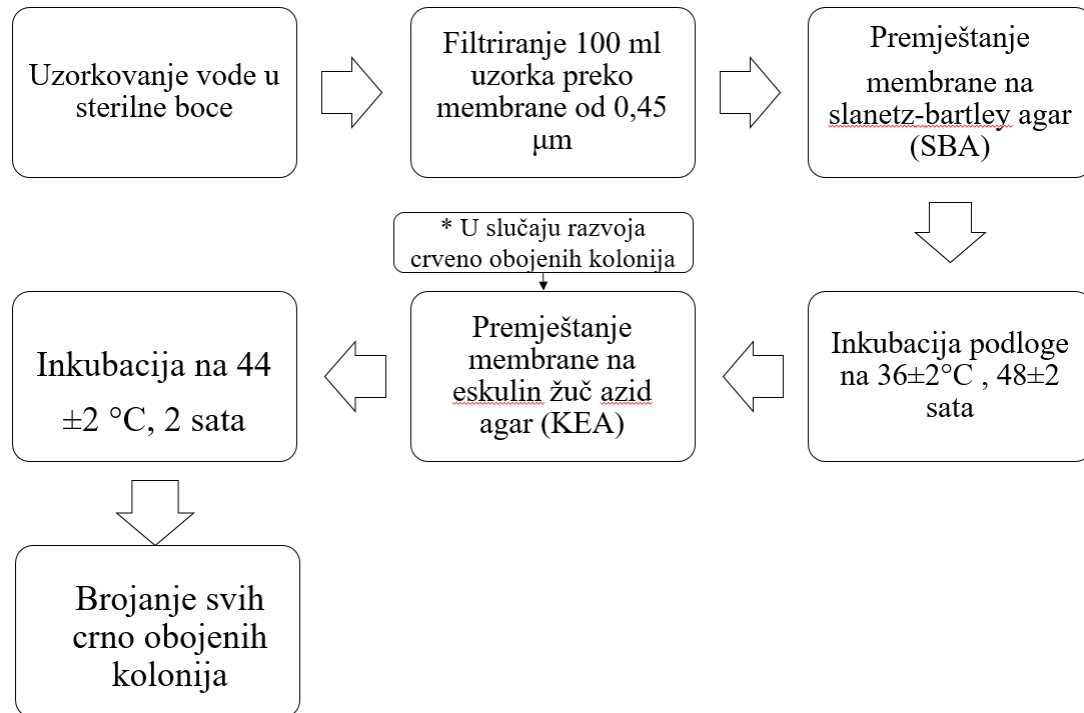
3.2.5. DOKAZIVANJE I ODREĐIVANJE BROJA FEKALNIH KOLIFORMA METODOM MEMBRANSKE FILTRACIJE



Slika 11. Shematski prikaz dokazivanja i određivanja broja fekalnih koliforma metodom membranske filtracije (Izvor: Autor)

Na slici 11. prikazan je postupak dokazivanja i određivanja broja fekalnih koliforma metodom mebranske filtracije. Nakon uzorkovanja vode u sterilne boce, 100 ml uzorka filtrirano je preko membranskog filtera od 0,45 μm, odnosno filtera kroz kojeg bakterije ne mogu proći. Membranski filter je smješten na m-FC agar (hranjivu selektivnu podlogu) uz izbjegavanje formiranja zraka između površine podloge i filter papira. Potom, naciepljena podloga je inkubirana na 44±2 °C u vremenskom razdoblju od 24±2 sata. Naposljetku, izbrojene su sve plavo obojene kolonije i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 ml (40).

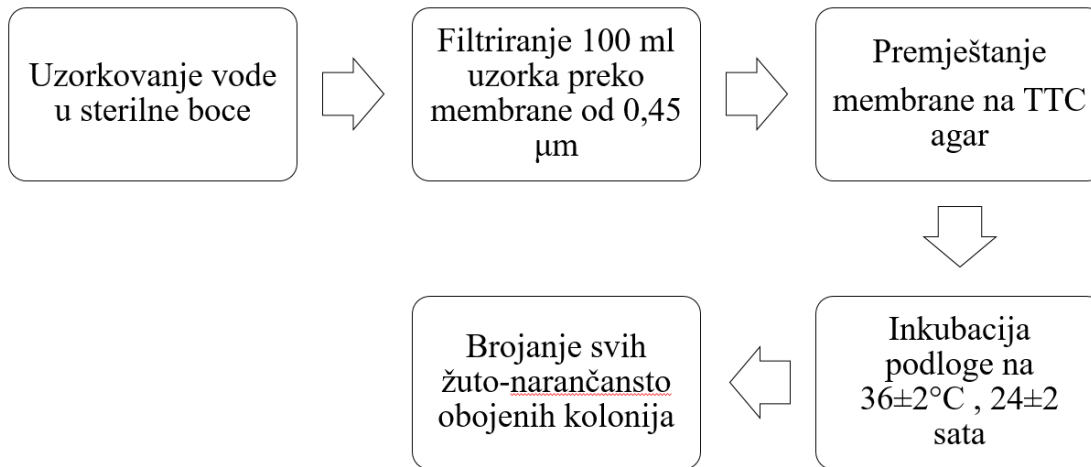
3.2.6. DOKAZIVANJE I ODREĐIVANJE BROJA ENTEROKOKA METODOM MEMBRANSKE FILTRACIJE



Slika 12. Shematski prikaz dokazivanja i određivanja broja enterokoka metodom membranske filtracije (Izvor: Autor)

Na Slici 12. prikazan je postupak dokazivanja i određivanja broja enterokoka metodom mebranske filtracije. Nakon uzorkovanja vode u sterilne boce, 100 ml uzorka filtrirano je preko membranskog filtera od 0,45 μm , odnosno filtera kroz kojeg bakterije ne mogu proći. Membranski filter je smješten na SBA agar (hranjivu selektivnu podlogu) uz izbjegavanje formiranja zraka između površine podloge i filter papira. Potom, nacijepljena podloga je inkubirana na $36\pm 2^\circ\text{C}$ u vremenskom razdoblju od 48 ± 2 sata. Na hranjivoj podlozi narasle su crveno obojene kolonije stoga je membrana premještena na KEA agar te inkubirana na temperaturi od $44\pm 2^\circ\text{C}$ tijekom 2 sata. Naposljetku, izbrojene su sve crno obojene kolonije i kolonije s tamnim prstenom. Rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 ml (41).

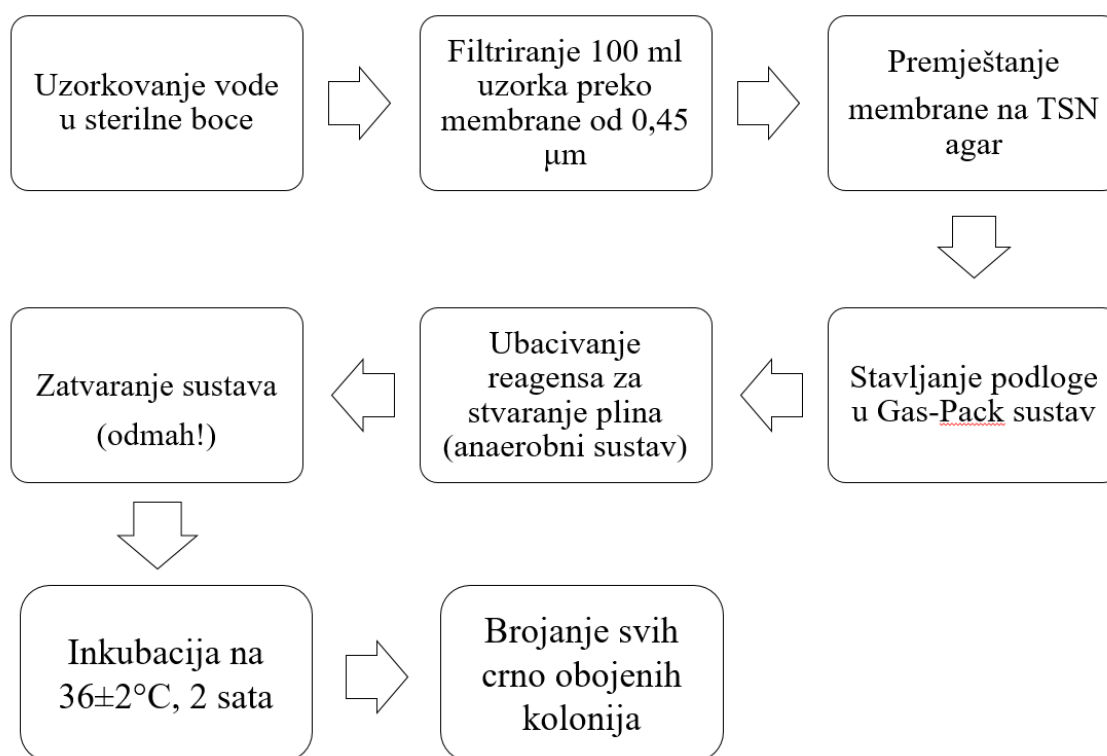
3.2.7. DOKAZIVANJE I ODREĐIVANJE BROJA *E. coli* METODOM MEMBRANSKE FILTRACIJE



Slika 13. Dokazivanje i određivanje broja *E. coli* metodom membranske filtracije (Izvor: Autor)

Na Slici 13. prikazan je postupak dokazivanja i određivanja broja *E. coli* metodom membranske filtracije. Nakon uzorkovanja vode u sterilne boce, 100 ml uzorka filtrirano je preko membranskog filtera od 0,45 μm, odnosno filtera kroz kojeg bakterije ne mogu proći. Membranski filter je smješten na TTC agar (hranjivu selektivnu podlogu) uz izbjegavanje formiranja zraka između površine podloge i filter papira. Potom, nacijepljena podloga je inkubirana na 36±2 °C u vremenskom razdoblju od 24±2 sata. Naposljetku, izbrojene su sve žuto-narančasto obojene kolonije i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 ml (40).

3.2.8. DOKAZIVANJE I ODREĐIVANJE BROJA *C. perfringens*-a METODOM MEMBRANSKE FILTRACIJE



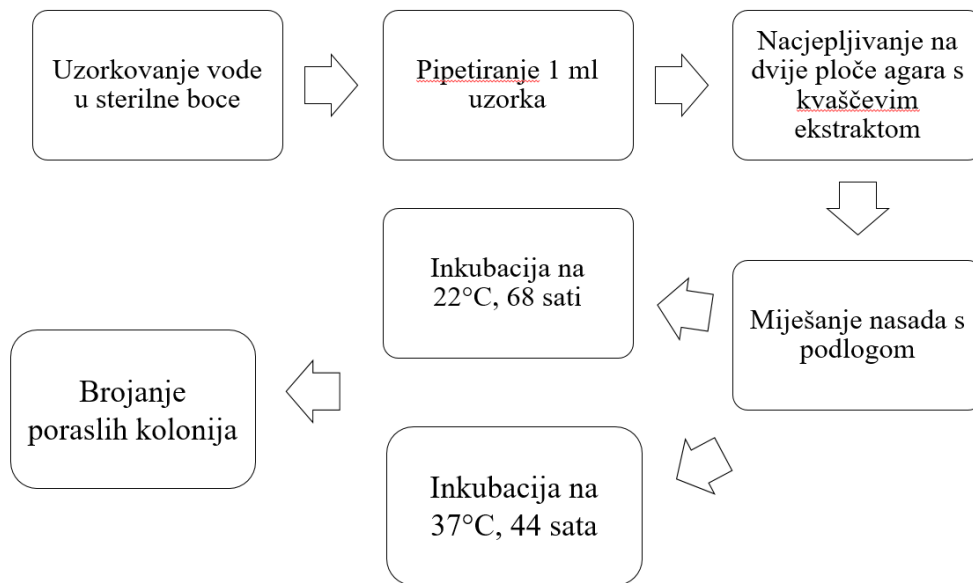
Slika 14. Dokazivanje i određivanje broja *C. perfringens*-a metodom membranske filtracije (Izvor: Autor)

Na slici 14. prikazan je postupak dokazivanja i određivanja broja *C. perfringens*-a metodom membranske filtracije. Nakon uzorkovanja vode u sterilne boce, 100 ml uzorka filtrirano je preko membranskog filtera od 0,45 µm, odnosno filtera kroz kojeg bakterije ne mogu proći. Membranski filter je smješten na TSN agar (hranjivu selektivnu podlogu) uz izbjegavanje formiranja zraka između površine podloge i filter papira. Nakon nacijepljivanja podloga je stavljena u Gas-Pack sustav u koji je ubačen reagens za stvaranje plina. Time je stvoren anaerobni sustav koji je zatvoren u što kraćem roku te je nacijepljena podloga inkubirana na 36±2 °C u vremenskom razdoblju od 20±2 sata. Naposljetku, izbrojene su sve crno obojene kolonije i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 ml (42).

3.2.9. ODREĐIVANJE UKUPNOG BROJA BAKTERIJA

Osim dokazivanja i određivanja broja indikatorskih bakterija, u radu je određen i broj ukupnih bakterija u uzorcima vode.

Na slici 15. je prikazan postupak određivanja ukupnog broja bakterija u vodi. Sterilnom pipetom odpipetiran je po 1 ml uzorka i naciepljen na dvije ploče agara s kvašćevim ekstraktom. Jedna ploča je inkubirana na 22°C tijekom 68 sati, a druga ploča je inkubirana na 37°C tijekom 44 sata. Nakon inkubacije izbrojane su porasle kolonije i izražen je rezultat kao broj bakterija u 1 ml (43,44).



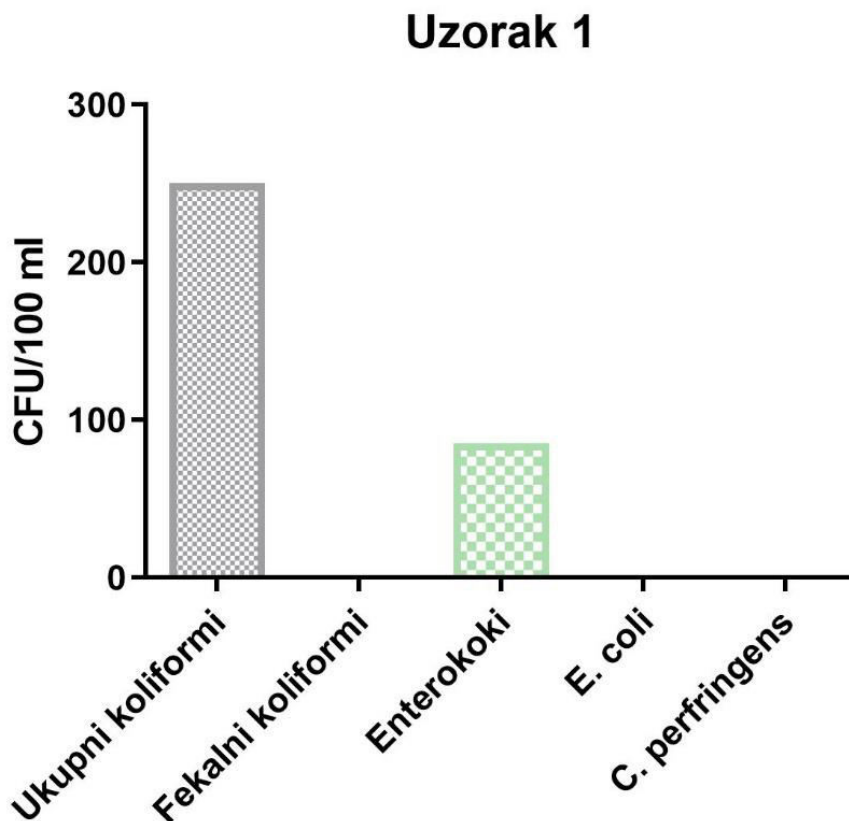
Slika 15. Određivanje broja ukupnih bakterija (Izvor: Autor)

4. REZULTATI

U eksperimentalnom dijelu ovog rada ispitana je mikrobiološka ispravnost 4 različita uzorka vode. Analiza je provedena indikatorima fekalne kontaminacije (ukupni koliformi, fekalni koliformi, enterokoki, *E. coli* i *C. perfringens*). Prisutnost i broj spomenutih bakterija u 100 ml uzorka određen je metodom membranske filtracije. Osim indikatora fekalne kontaminacije, određen je i broj ukupnih bakterija pri 22°C i 37°C naciepljivanjem na agare s kvašćevim ekstraktom.

4.1. Prisutnost i broj bakterija u uzorku 1 (bunar tzv. „Bunarić“)

Na Slici 16. prikazani su rezultati dobiveni mikrobiološkom analizom uzorka 1. Ispitana je prisutnost i broj ukupnih koliforma, fekalnih koliforma, enterokoka, *E. coli* i *C. perfringens*-a u 100 ml uzorka 1.

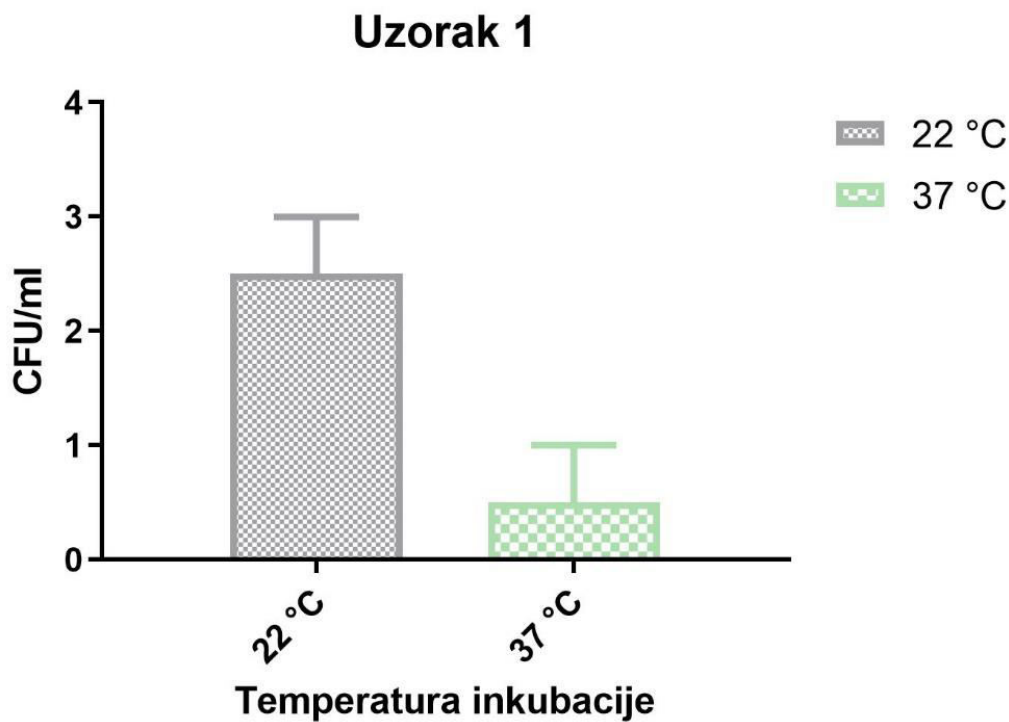


Slika 16. Prisutnost i broj ukupnih koliforma, fekalnih koliforma, enterokoka, *E. coli* i *C. perfringens*-a u 100 ml uzorka 1.

Iz Slike 16. je vidljiv pozitivan rast ukupnih koliforma i enterokoka u 100 ml uzorka 1. Ukupni koliformi su inkubirani na 36±2 °C tijekom 24±2 sata. Porasle crvene kolonije s karakterističnim sjajem ukazuju na pozitivan rast ukupnih koliforma (Slika 24.a). Prosječan

broj ukupnih koliforma u 100 ml uzorka iznosi 250 CFU/100 ml. Enterokoki su inkubirani na 36 ± 2 °C tijekom 48 ± 2 sata na SBA, a potom 2 sata na 44 ± 2 °CP na KEI. Porasle crne kolonije i kolonije s tamnim prstenom na KEI ukazuju na pozitivan rast enterokoka (Slika ?). Prosječan broj enterokoka u 100 ml uzorka 1 iznosi 85 CFU/100 ml. Također, iz Slike 16. je vidljiv negativan porast fekalnih koliforma, *E. coli* i *C. perfringensa*-a u 100 ml uzorka 1, odnosno prosječan broj spomenutih bakterija u 100 ml uzorka 1 iznosi 0 CFU/100 ml.

Na Slici 17. prikazani su rezultati dobiveni mikrobiološkom analizom aerobnih mezofilnih bakterija na 22°C i 37°C. Ispitan je broj ukupnih bakterija u 1 ml uzorka 1.

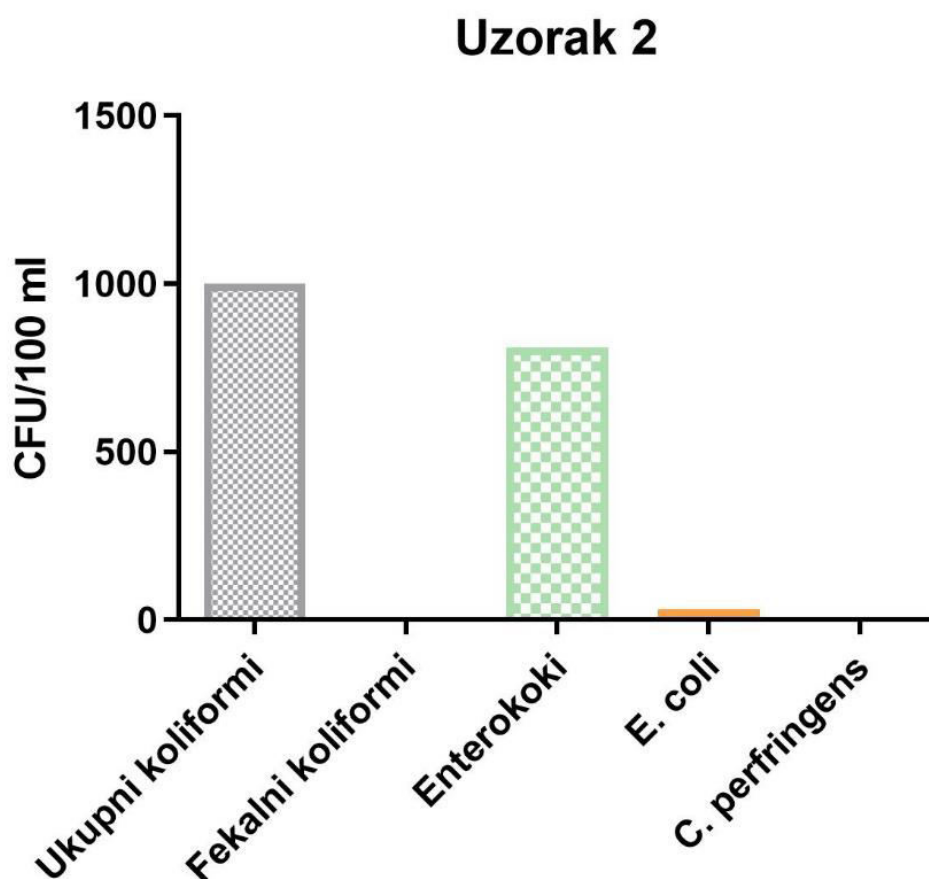


Slika 17. Broj aerobnih mezofilnih bakterija u 1 ml uzorka 1.

Iz slike 17. je vidljiv pozitivan porast aerobnih mezofilnih bakterija na 22 °C i 37 °C. Nacijepljene ploče su inkubirane na 68 ± 4 sata i 44 ± 4 sata. Prosječan broj poraslih bakterija na 22 °C iznosi 2.50 CFU/ml, a prosječni broj poraslih bakterija na 37 °C iznosi 1 CFU/ml.

4.2. Prisutnost i broj bakterija u uzorku 2 (kućni zdenac)

Na Slici 18. prikazani su rezultati dobiveni mikrobiološkom analizom uzorka 2. Ispitana je prisutnost i broj ukupnih koliforma, fekalnih koliforma, enterokoka, *E. coli* i *C. perfringens*-a u 100 ml uzorka 2.

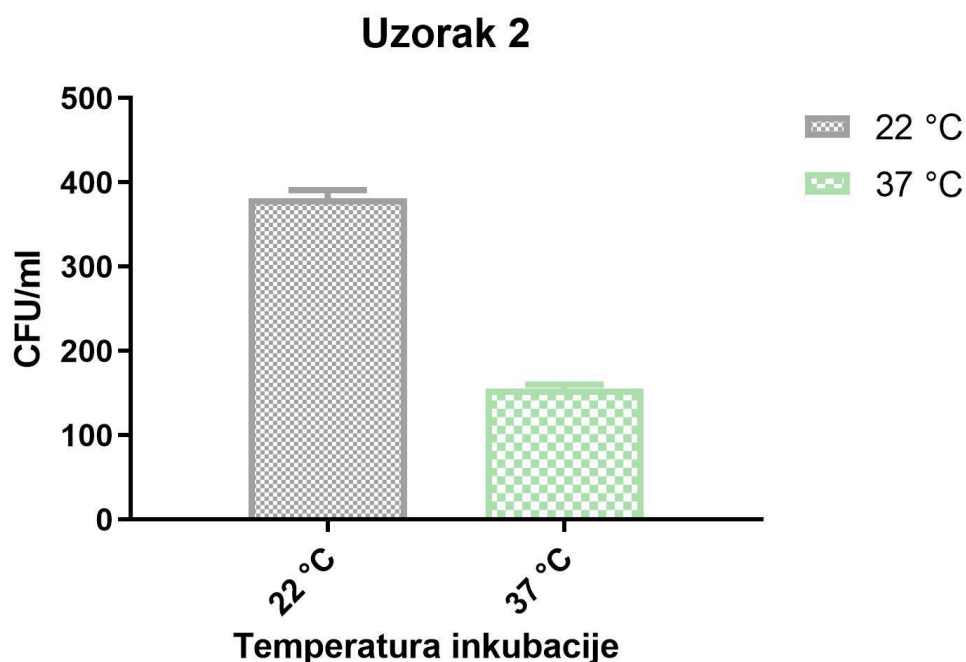


Slika 18. Prisutnost i broj ukupnih koliforma, fekalnih koliforma, enterokoka, *E. coli* i *C. perfringens*-a u 100 ml uzorka 2.

Iz Slike 18. je vidljiv pozitivan porast ukupnih koliforma, enterokoka i *E. coli* u 100 ml uzorka 2. Ukupni koliformi su inkubirani na 36 ± 2 °C tijekom 24 ± 2 sata. Porasle crvene kolonije s karakterističnim sjajem ukazuju na pozitivan rast ukupnih koliforma (Slika 24.b). Prosječan broj ukupnih koliforma u 100 ml uzorka iznosi 1000 CFU/100 ml. Enterokoki su inkubirani na 36 ± 2 °C tijekom 48 ± 2 sata na SBA, a potom 2 sata na 44 ± 2 °C na KEI. Porasle crne kolonije i kolonije s tamnim prstenom na KEI ukazuju na pozitivan rast enterokoka. Prosječan broj enterokoka u 100 ml uzorka 2 iznosi 810 CFU/100 ml. *E. coli* je inkubirana na 36 ± 2 °C tijekom 24 ± 2 sata. Porasle crne kolonije ukazuju na pozitivan rast *E. coli*. Prosječan

broj *E. coli* u 100 ml uzorka 2 iznosi 32 CFU/ml. Također, iz Slike 18. je vidljiv negativan porast fekalnih koliforma i *C. perfringens*-a u 100 ml uzorka 2, odnosno prosječan broj spomenutih bakterija u 100 ml uzorka 2 iznosi 0 CFU/100 ml.

Na Slici 19. prikazani su rezultati dobiveni mikrobiološkom analizom aerobnih mezofilnih bakterija na 22°C i 37°C. Ispitan je broj ukupnih bakterija u 1 ml uzorka 2.



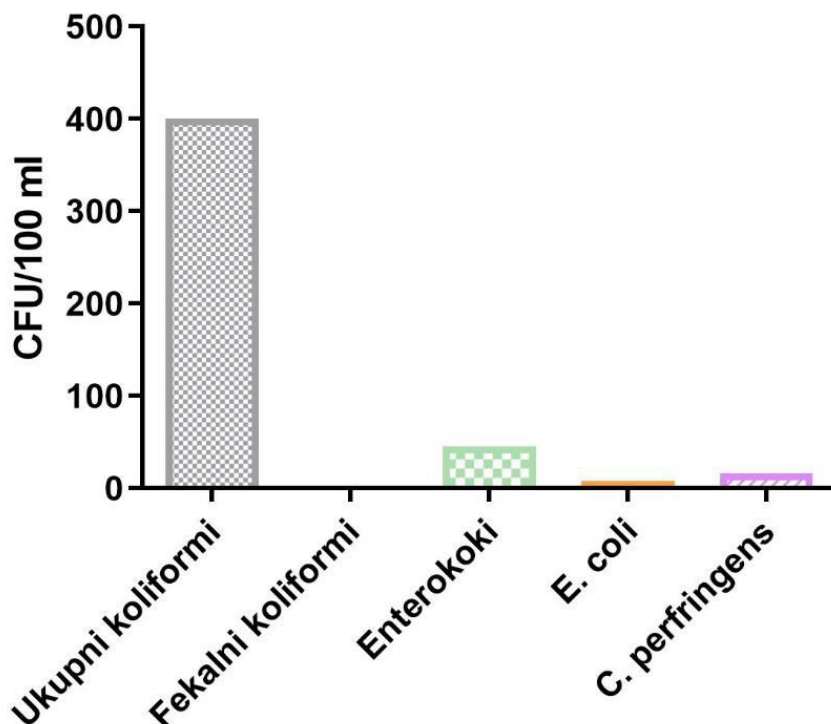
Slika 19. Broj aerobnih mezofilnih bakterija u 1 ml uzorka 2.

Iz slike 19. je vidljiv pozitivan porast aerobnih mezofilnih bakterija na 22 °C i 37 °C. Nacijepljene ploče su inkubirane na 68 ± 4 sata i 44 ± 4 sata. Prosječan broj poraslih bakterija na 22 °C iznosi 381 CFU/ml, a prosječni broj poraslih bakterija na 37 °C iznosi 155 CFU/ml.

4.3. Prisutnost i broj bakterija u uzorku 3 (poljski bunar)

Na Slici 20. prikazani su rezultati dobiveni mikrobiološkom analizom uzorka 3. Ispitana je prisutnost i broj ukupnih koliforma, fekalnih koliforma, enterokoka, *E. coli* i *C. perfringens*-a u 100 ml uzorka 3.

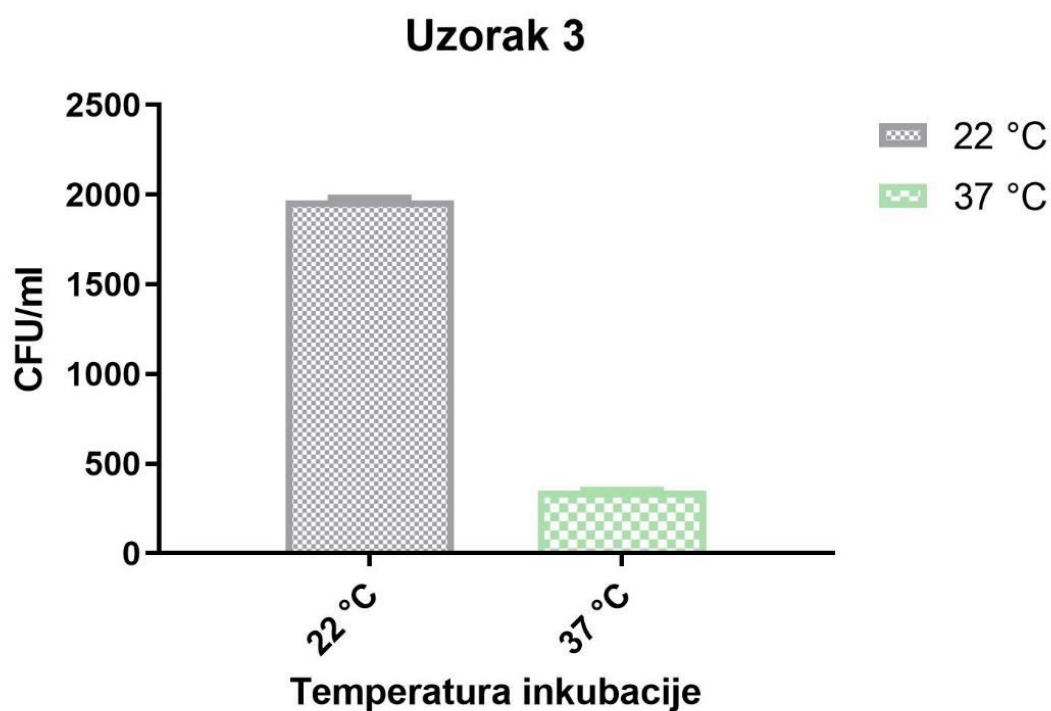
Uzorak 3



Slika 20. Prisutnost i broj ukupnih koliforma, fekalnih koliforma, enterokoka, *E. coli* i *C. perfringens*-a u 100 ml uzorka 3.

Iz Slike 20. je vidljiv pozitivan porast ukupnih koliforma, enterokoka, *E. coli* i *C. perfringens*-a u 100 ml uzorka 3. Ukupni koliformi su inkubirani na 36 ± 2 °C tijekom 24 ± 2 sata. Porasle crvene kolonije s karakterističnim sjajem ukazuju na pozitivan rast ukupnih koliforma (Slika 24.c). Prosječan broj ukupnih koliforma u 100 ml uzorka 3 iznosi 400 CFU/100 ml. Enterokoki su inkubirani na 36 ± 2 °C tijekom 48 ± 2 sata na SBA, a potom 2 sata na 44 ± 2 °C na KEI. Porasle crne kolonije i kolonije s tamnim prstenom na KEI ukazuju na pozitivan rast enterokoka. Prosječan broj enterokoka u 100 ml uzorka 3 iznosi 45 CFU/100 ml. *E. coli* je inkubirana na TTC agaru na 36 ± 2 °C tijekom 24 ± 2 sata. Porasle žuto-narančaste kolonije ukazuju na pozitivan rast *E. coli*. Prosječan broj *E. coli* u 100 ml uzorka 3 iznosi 8 CFU/ml. *C. perfringens* je inkubiran na 36 ± 2 °C tijekom 20 ± 2 sata. Porasle crne kolonije ukazuju na pozitivan rast *C. perfringens*. Prosječan broj *C. perfringens*-a u 100 ml uzorka 3 iznosi 16. Također, iz Slike 20. je vidljiv negativan porast fekalnih koliforma u 100 ml uzorka 3, odnosno prosječan broj fekalnih koliforma u 100 ml uzorka 3 iznosi 0 CFU/100 ml.

Na Slici 21. prikazani su rezultati dobiveni mikrobiološkom analizom aerobnih mezofilnih bakterija na 22°C i 37°C. Ispitan je broj ukupnih bakterija u 1 ml uzorka 3.



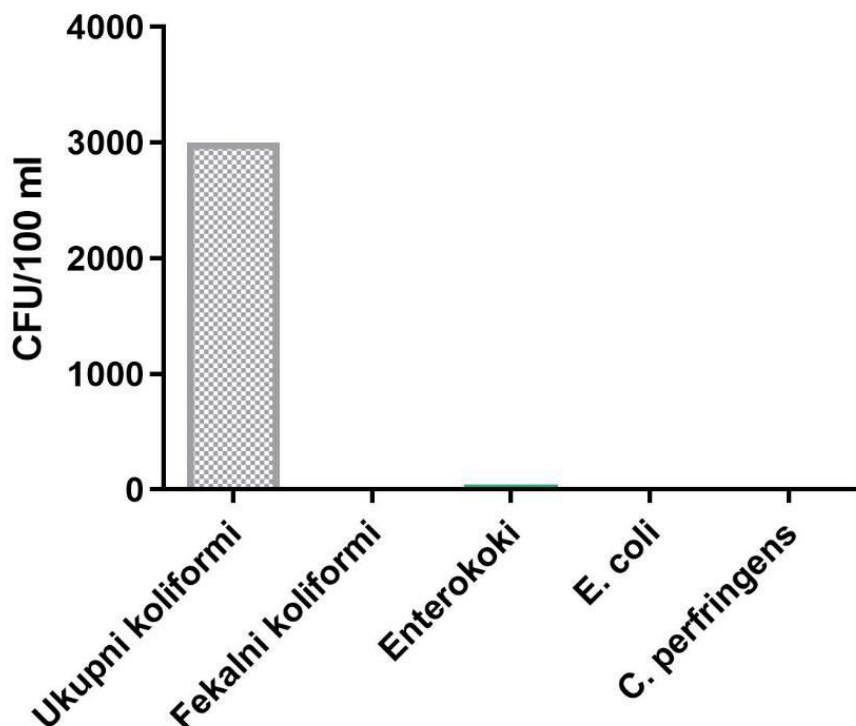
Slika 21. Broj aerobnih mezofilnih bakterija u 1 ml uzorka 3.

Iz slike 21. je vidljiv pozitivan porast aerobnih mezofilnih bakterija na 22 °C i 37 °C. Nacijepljene ploče su inkubirane na 68 ± 4 sata i 44 ± 4 sata. Prosječan broj poraslih bakterija na 22 °C iznosi 1969 CFU/ml, a prosječni broj poraslih bakterija na 37 °C iznosi 347 CFU/ml.

4.4. Prisutnost i broj bakterija u uzorku 4 (rijeka Miljašić Jaruga)

Na Slici 22. prikazani su rezultati dobiveni mikrobiološkom analizom uzorka 4. Ispitana je prisutnost i broj ukupnih koliforma, fekalnih koliforma, enterokoka, *E. coli* i *C. perfringens*-a u 100 ml uzorka 4.

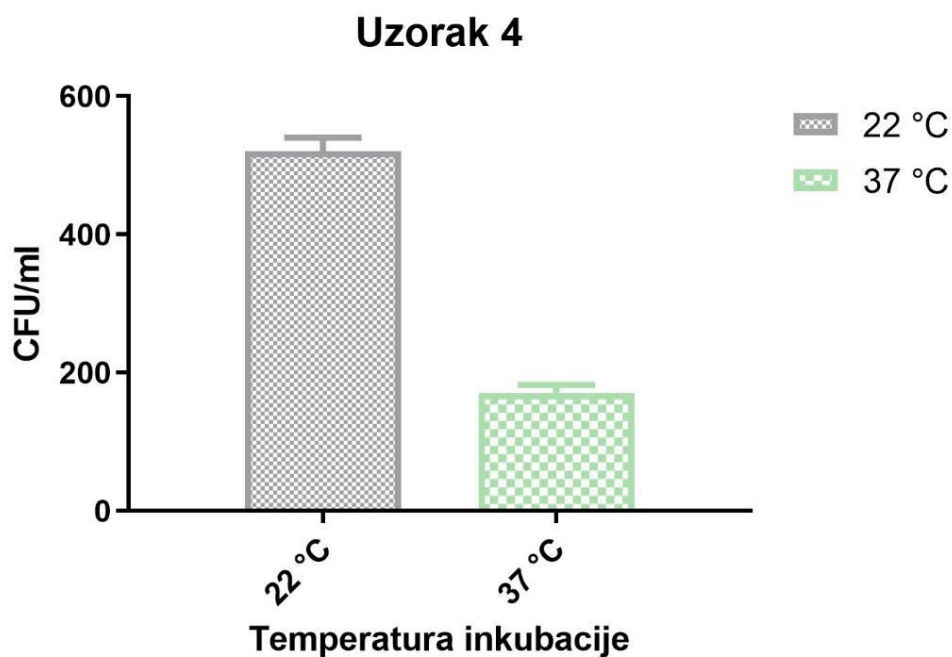
Uzorak 4



Slika 22. Prisutnost i broj ukupnih koliforma, fekalnih koliforma, enterokoka, *E. coli* i *C. perfringens*-a u 100 ml uzorka 4.

Na Slici 22. vidljiv pozitivan porast ukupnih koliforma i enterokoka u 100 ml uzorka 4. Ukupni koliformi su inkubirani na 36 ± 2 °C tijekom 24 ± 2 sata. Porasle crvene kolonije s karakterističnim sjajem ukazuju na pozitivan rast ukupnih koliforma (Slika 24.d). Prosječan broj ukupnih koliforma u 100 ml uzorka 4 iznosi 3000 CFU/100 ml. Enterokoki su inkubirani na 36 ± 2 °C tijekom 48 ± 2 sata na SBA, a potom 2 sata na 44 ± 2 °CP na KEI. Porasle crne kolonije i kolonije s tamnim prstenom na KEI ukazuju na pozitivan rast enterokoka. Prosječan broj enterokoka u 100 ml uzorka 4 iznosi 40 CFU/100 ml. Također, iz Slike 22. je vidljiv negativan porast fekalnih koliforma, *E. coli* i *C. perfringens*-a u 100 ml uzorka 4, odnosno prosječan broj spomenutih bakterija u 100 ml uzorka 4 iznosi 0 CFU/100 ml.

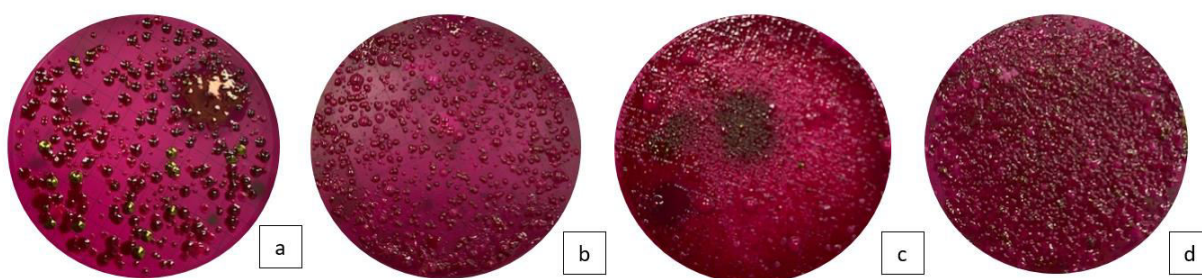
Na Slici 23. prikazani su rezultati dobiveni mikrobiološkom analizom aerobnih mezofilnih bakterija na 22°C i 37°C. Ispitan je broj ukupnih bakterija u 1 ml uzorka 4.



Slika 23. Broj aerobnih mezofilnih bakterija u 1 ml uzorka 4.

Iz slike 23. je vidljiv pozitivan porast aerobnih mezofilnih bakterija na 22 °C i 37 °C. Nacijepljene ploče su inkubirane na 68 ± 4 sata i 44 ± 4 sata. Prosječan broj poraslih bakterija na 22 °C iznosi 520 CFU/ml, a prosječni broj poraslih bakterija na 37 °C iznosi 171 CFU/ml.

Iz prikazanih rezultata je vidljivo da su ukupni koliformi narasli u najvećem broju u sva 4 uzorka. Njihov porast je prikazan na Slici 24.



Slika 24. Porasle kolonije ukupnih koliforma (crveno obojene kolonije s karakterističnim sjajem) na Les endo agaru u 100 ml uzorka: a. 1, b. 2, c. 3, d. 4.

Na Slici 24. vidljiv je pozitivan porast ukupnih koliforma u sva 4 uzorka vode. Najmanji broj poraslih kolonija je u 100 ml uzorka 1 i iznosi 250 CFU/100 ml, a najveći broj poraslih kolonija ukupnih koliforma je u 100 ml uzorka 4 i iznosi 3000 CFU/100 ml vode.

5. RASPRAVA

Uspoređujući dobivene rezultate s maksimalno dopuštenim koncentracijama u vodama za piće prema Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju N.N. 125/17, sva 4 uzorka vode nisu prikladna za piće (Tablica 2.) (13.)

Brojni su potencijalni izvori onečišćenja proučavanih voda u ovom radu. Prisutnost bakterija u podzemnim vodama (uzorku 1 i uzorku 3) posljedica su onečišćenja podzemnih voda. Septičke jame (koriste se za skladištenje i pročišćavanje otpadnih voda) su najčešći izvor onečišćenja podzemnih voda. Voda koja prodire iz ovih objekata sadrži bakterije, poput koliformnih bakterija, enterokoka i *E. coli*, koje mogu kontaminirati zalihe podzemne vode, odnosno najčešći izvor onečišćenja podzemnih voda su fekalne otpadne vode (45). Iz rezultata je vidljivo da su ukupni koliformi prisutni u najvećem broju u sva 4 uzorka. Oni su primarno nepatogeni i većinom oportunistički patogeni. Koliformi obitavaju u debelom crijevu čovjeka ili toplokrvnih životinja stoga se izlučuju fekalijama i tako dospijevaju u prirodne vode (16). No, ukupni broj koliformnih bakterija nije nužno mjera fekalnog onečišćenja.

Osim ukupnih koliforma, i enterokoki su prisutni u sva 4 uzorka. Većina vrsta roda *Enterococcus* dio je crijevne flore sisavaca, gmazova, ptica i drugih životinja. U ljudskom probavnom traktu *E. faecalis* je prevladavajuća vrsta, iako u određenim situacijama *E. faecium* može prevladavati. Vode u okolišu nisu prirodno stanište enterokoka i njihovo prisustvo u vodama se smatra rezultatom fekalnog onečišćenja (27,33). Na temelju ovih podataka, očekivana je prisutnost enterokoka u uzorcima 1 i 3 jer se pašnjaci nalaze u blizini bunara iz kojih su uzeti uzorci.

Nadalje, mnogi poljoprivrednici koriste podrume, spremnike ili odlagališta za skladištenje stajskog gnoja. Ispiranje vode s ovih skladišnih mjesta, također, može kontaminirati podzemne vode, posebice tijekom razdoblja kiše. Primjena stajskog gnoja na poljoprivrednom zemljištu, kao gnojivo, uobičajena je praksa u cijelom svijetu. Bakterije prisutne u gnoju mogu se isprati u podzemnu vodu (45). U jednom istraživanju u Velikoj Britaniji utvrđeno je da su uzorci uzeti s poljoprivrednih površina, koja su bila tretirana svinjskim gnojem, 100% pozitivni na vrste *Enterococcus*-a. U usjevima na kojima nisu primijenjena životinjska gnojiva, učestalost vrsta *Enterococcus*-a smanjena je na 33% (46).

Ako uspoređujemo uzorke analiziranih podzemnih voda, odnosno uzorak 1 i uzorak 3, uočavamo da je veći broj ukupnih koliforma u 100 ml uzorka 3. Također, u uzorku 3 su prisutne i *E. coli* i *C. perfringens*, uz ukupne koliforme i enterokoke koji su prisutni i u

uzorku 1. *E. coli* je bakterija koja je široko rasprostranjena u prirodi te je uobičajeni stanovnik crijeva mnogih ljudi i životinja, a smatra se da je *C. perfringens* univerzalna komponenta ljudskog i životinjskog crijeva jer je izolirana iz crijevnog sadržaja svake životinje koja je proučavana (29,30).

Razlika u preživljavanju bakterija u ova dva uzorka (1 i 3) se može pripisati različitim uvjetima u vodama. Na preživljavanje bakterija u podzemnoj vodi utječe nekoliko čimbenika, prvenstveno utječe preživljavanje u tlu, jer da bi dospjele u podzemnu vodu, bakterije moraju proći kroz tlo. Općenito, preživljavanje u tlu (i istodobno u podzemnoj vodi) poboljšavaju niske temperature, visoka vlažnost tla, neutralni ili alkalni pH tla i prisutnost organskog ugljika (45).

Većina crijevnih bakterija koje zagađuju vode u okolišu nisu u stanju preživjeti i razmnožiti se u ovom okruženju. Stope preživljavanja se vrlo razlikuju među fekalnim bakterijama koje se unose u vode okoliša (45). Patogene crijevne bakterije i *E. coli* pokazuju nisku stopu preživljavanja. Time se može objasniti mali broj kolonija *E. coli* u uzorku 2 i 3 te negativan porast u uzorcima 1 i 4. Ova razlika, također, može i ukazivati na fekalno onečišćenje životinjskim izmetom, što je i za očekivati, jer ptice provode velik dio dana na krajevima krova pokraj oluka koji služe za sakupljanje kišnice što znači da je ta voda stalno izložena ptičjem izmetu. Također, mjesto uzorkovanja uzorka 3 je izloženo raznim životinjama, većinom stoki čiji izmet može dospjeti iz tla u podzemnu vodu.

U istraživanju koje su proveli Doran i Linn (47), otjecanje s pašnjaka krava u istočnoj Nebraski praćeno je tijekom trogodišnjeg razdoblja. Oborinsko otjecanje s pašenog područja sadržavalo je 5 do 10 puta više koliformnih bakterija od otjecanja s ograđenog, nepašenog područja. Međutim, broj enterokoka bio je veći u otjecanju s nepašenog područja i odražavao je utjecaj divljih životinja.

Uzorak 4 se svrstava u površinske vode te su u njemu prisutni ukupni koliformi i enterokoki. Njihova prisutnost je očekivana jer se u rijeci Miljašić Jaruga ispuštaju otpadne komunalne vode (36).

Nadalje, fekalne bakterije ulaze u površinske vode izravnim taloženjem izmeta i kopnenim otjecanjem. Ispust životinjskog otpada u površinske vode može biti glavni čimbenik koji doprinosi zagađivanju dostupne vode u mnogim regijama (45).

Enterokoki i *E. coli* mogu se naći u velikom broju u većini olujnih odvoda i rijeka. U južnoj Kaliforniji (SAD) Ferguson i sur. (48) pronašli su visoku razinu enterokoka (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus casseliflavus* i *Enterococcus mundtii*) u sedimentima u sezonskoj rijeci i olujnim odvodima.

Prema usporednom istraživanju Baudišove (49) o preživljavanju ukupnih koliformnih bakterija i *E. coli* u sterilnoj i nesterilnoj riječnoj vodi, u sterilnoj vodi su sve bakterije preživjele dugi niz mjeseci. Međutim, u nesterilnim uvjetima (bliže istinskim uvjetima okoline), brzina eliminacije svih bakterija bila je znatno brža. Ukupni su koliformi preživjeli najdulje, a *E. coli* najkraće što može biti razlog negativnog porasta *E. coli* u 100 ml uzorka 4.

Nadalje, u sva 4 uzorka je zabilježen negativan porast fekalnih koliforma što je za očekivati s obzirom da prema Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju N.N. 125/17 maksimalna dopuštena koncentracija fekalnih koliforma u 100 ml vode iznosi 0 CFU/100 ml (13).

Prema Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju N.N. 125/17 (Tablica 2.) porast aerobnih mezofilnih bakterija pri 22 °C i 37 °C u 1 ml uzorka 1 je ispod maksimalne dopuštene koncentracije (13). Svi ostali uzorci premašuju maksimalne dopuštene koncentracije aerobnih mezofilnih bakterija u 1 ml.

Iz dobivenih rezultata je uočen i veći porast aerobnih mezofilnih bakterija na 22 °C nego na 37 °C kod sva 4 uzorka. Naime, razlog ovog rasta je taj što su uvjeti pri 22 °C pogodniji bakterijama, odnosno sličniji su uvjetima u vodenim ekosustavima.

Zdravstveno ispravna voda za piće je za sve jedan od glavnih izazova 21. stoljeća. Potrebno je provesti više istraživanja kako bi se provjerilo je li amonijak pouzdan za preliminarni pregled epidemija fekalnog onečišćenja. Financijske resurse treba posvetiti boljem razumijevanju ekologije i ponašanja ljudskih i životinjskih fekalnih bakterija u vodama okoliša.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja mikrobiološke ispravnosti različitih tipova vode na području Zadra mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Ukupni koliformi i enterokoki prisutni su u sva 4 uzorka vode.
- Prisutnost *E. coli* je dokazana u sustavu sakupljanja kišnice i podzemnoj vodi.
- Prisutnost *C. perfringens*-a je dokazana u podzemnoj vodi.
- Prisutnost fekalnih koliforma nije dokazana u nijednom tipu vode.
- Najčešći izvor onečišćenja analiziranih voda je fekalno onečišćenje.
- Aerobne mezofilne bakterije su u većem broju porasle na temperaturi od 22 °C nego na temperaturi od 37 °C u sva 4 uzorka vode zbog pogodnijih uvjeta.
- Prema Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju N.N. 125/17, sva 4 uzorka vode nisu prikladna za piće.
- Zdravstveno ispravna voda za piće je jedan od glavnih izazova 21. stoljeća. Buduća istraživanja treba posvetiti daljnjim testiranjima određenih bakterija koje su potencijalno prikladne kao fekalni pokazatelji.

7. LITERATURA

1. WHO (World Health Organization) *Guidelines for Drinking-water Quality, Incorporating 1st and 2nd Addenda, Volume 1, Recommendations*. 3rd ed. WHO; Geneva, Switzerland: 2008.
2. Fenwick A. Waterborne Diseases—Could they be Consigned to History? *Science*. 2006;313:1077–1081.
3. George I, Crop P, Servais P. Use of β -D-Galactosidase and β -D-Glucuronidase Activities for Quantitative Detection of Total and Faecal Coliforms in Wastewater. *Can. J. Microbiol.* 2001;47:670–675.
4. Grabow WOK. Waterborne Diseases: Update on Water Quality Assessment and Control. *Water SA*. 1996;22:193–202.
5. Seas C, Alarcon M, Aragon JC, Beneit S, Quiñonez M, Guerra H, Gotuzzo E. Surveillance of Bacterial Pathogens Associated with Acute Diarrhea in Lima, Peru. *Int. J. Infect. Dis.* 2000;4:96–99.
6. Medema GJ, Payment P, Dufour A, Robertson W, Waite M, Hunter P, Kirby R, Anderson Y. *Assessing Microbial Safety of Drinking Water Improving Approaches and Method*. WHO & OECD, IWA Publishing; London, UK: 2003. Safe drinking water: an ongoing challenge; pp. 11–45.
7. Cabral J. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2010. Vol. 7, p: 3657-3703.
8. Hruday S.E., Hruday E.J. (2007): Published case studies of waterborne disease outbreaks-evidence of a recurrent threat, *Water Environ. Res.* 79, 233-245.
9. Reynolds, K.A., Mena, K.D., Gerba, C.P. (2007): Risk of waterborne illness via drinking water in the United States, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192, 117-158.
10. Poma, H.R., Gutiérrez Cacciabue, D, Garcé, B., Gonzo, E.E., Rajal, V.B. (2012): Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters, *Sci. Total Environ.* 433, 98-109.
11. NHMRC and NRMMC, National Health and Medical Research Council and Natural Resource Management Ministerial Council (2011): Australian Drinking Water Guidelines, Chapter 5 – Microbial quality of drinking water. 70-77.

12. Vodovod d.o.o. Zadar. Vodoopskrbni sustav zadarskog Vodovoda. Dostupno na: <https://www.vodovod-zadar.hr/voda/kvaliteta-vode/vodoopskrbni-sustav-zadarskog-vodovoda>
Pristupljeno: 14.06.2021.
13. Pravilnik o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju
Narodne Novine 125/17.
14. Saarela M, Lähteenmäki L, Crittenden R, Salminen S, Mattila-Sandholm T. Gut Bacteria and Health Foods—The European Perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 2002;**78**:99–117.
15. Wilson M. *Microbial Inhabitants of Humans Their Ecology and Role in Health and Disease*. Cambridge University Press; Cambridge, UK: 2005.
16. Šantić M., Gobin I., Ožanić M., Marečić V., Mikrobiologija hrane i vode za studente preddiplomskog studija sanitarnog inženjerstva, Rijeka, Medicinski fakultet sveučilišta u Rijeci, Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, 2014.
17. Payment P, Waite M, Dufour A. *Assessing Microbial Safety of Drinking Water Improving Approaches and Method*. WHO & OECD, IWA Publishing; London, UK: 2003. Introducing parameters for the assessment of drinking water quality; pp. 47–77.
18. Baron Samuel i sur. *Medical microbiology* 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Pristupljeno: 21.06.2021. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/> (Pristupljeno: 15.06.2021.)
19. Cabral JP, Marques C. Faecal Coliform Bacteria in Febros river (Northwest Portugal): Temporal Variation, Correlation with Water Parameters, and Species Identification. *Environ. Monit. Assess.* 2006;**118**:21–36.
20. Kenneth J. Ryan and C. George Ray, McGraw. Sherris Medical Microbiology—International Edition, 6th Edition. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014. p:994.
21. World Health Organization Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) *Diarrhoeal Diseases*. Dostupno na: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index4.html (Pristupljeno: 23.06.2021.)

22. Scheutz F, Strockbine NA. Genus *Escherichia*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Part B. Vol. 2. Springer; New York, NY, USA: 2005. pp. 607–623.
23. Bettelheim KA. The genus *Escherichia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, editors. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. 3th ed. Springer-Verlag; New York, NY, USA: 2003.
24. Health Canada . *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document. Bacterial Waterborne Pathogens. Current and Emerging Organisms of Concern*. Health Canada; Ottawa, ON, Canada: 2006.
25. World Health Organization. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Fact sheet N°125; Dostupno na: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/> (Pristupljeno: 23.06.2021.)
26. Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC); US Department of Health & Human Services, U.S. Food and Drug Administration. Dostupno na: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm071298.htm> (Pristupljeno: 23.06.2021.)
27. Wilson M. *Microbial Inhabitants of Humans Their Ecology and Role in Health and Disease*. Cambridge University Press; Cambridge, UK: 2005.
28. Hippe H, Andreesen JR, Gottschalk G. The genus *Clostridium*—Nonmedical. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, editors. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. 3th ed. Springer-Verlag; New York, NY, USA: 2003.
29. Rainey FA, Hollen BJ, Small A. Genus *Clostridium*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Vol. 3. Springer; New York, NY, USA: 2009. pp. 738–828.
30. Smith LDS. The genus *Clostridium*—Medical. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, editors. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. 3th ed. Springer-Verlag; New York, NY, USA: 2003.
31. Charles L. Hatheway. Toxigenic Clostridia. *Clinical microbiology reviews*. Jan. 1990. p. 66-98.

32. Klein P. i sur. (2003) Mathematical modeling suggests cooperative interactions between a disordered polyvalent ligand and a single receptor site. *Curr Biol* 13(19):1669-78
33. Švec P, Devriese LA. Genus *Enterococcus*. In: DE Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Vol. 3. Springer; New York, NY, USA: 2009. pp. 594–607.
34. Matijević Ante. Povijest i korijeni Župe sv. Mihovila u Vrsima, 2018.
35. Hrvatski jezični portal. Pojam „gusterna“. Dostupno na:
https://hjp.znanje.hr/index.php?show=search_by_id&id=fV5mXBY%3D&keyword=gusterna
(Pristupljeno: 17.06.2021.)
36. Vranješ D. i sur. Elaborat zaštite okoliša za ocjenu o potrebi procjene utjecaja na okoliš za zahvat: Uređenje ušća vodotoka Miljašić Jaruge u Ninu. *Vita projekt*, prosinac 2018.
37. Hrenović, J.; Šimunović, S. (2010.): Pogodnost komercijalnih krutih hranjivih podloga za kultivaciju ukupnih koliformnih bakterija iz površinskih voda. *Hrvatske vode*, 18(71), 35-40.
38. Merck Microbiology Manual 12th Edition. Jan. 2010. p. 688.
39. Frece J. i Markov K. Uvod u mikrobiologiju i fizikalno-kemijsku analizu voda. Institut for Food Safety and Environmental Health, 2015.
40. HRN EN ISO 9308-1. Detekcija i brojanje *E. coli* i koliformnih bakterija metodom membranske filtracije.
41. HRN EN ISO 7899-2. Detekcija i brojanje *Enterococcus* spp. Metodom membranske filtracije.
42. ISO6461/2:1986: Detekcija i brojanje sulfid reducirajućih klostridija (SRK).
43. HRN EN ISO 6222: Određivanje ukupnog broja mikroorganizama u vodi na 22 °C.
44. HRN EN ISO 6222: Određivanje ukupnog broja mikroorganizama u vodi na 37 °C.
45. Medema GJ, Shaw S, Waite M, Snozzi M, Morreau A, Grabow W. *Assessing Microbial Safety of Drinking Water Improving Approaches and Method*. WHO & OECD, IWA Publishing; London, UK: 2003. Catchment characteristics and source water quality; pp. 111–158.

46. Kuhn i sur. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment. *Int J Food Microbiol*, 2003 Dec 1;88(2-3):133-45.
47. 108. Doran JW, Linn DM. Bacteriological Quality of Runoff Water from Pastureland. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979;37:985–991.
48. Ferguson DM, Moore DF, Getrich MA, Zhouandai MH. Enumeration and Speciation of Enterococci Found in Marine and Intertidal Sediments and Coastal Water in Southern California. *J. Appl. Microbiol.* 2005;99:598–608.
49. Baudišová D. Evaluation of *Escherichia coli* as the Main Indicator of Faecal Pollution. *Water Sci. Technol.* 1997;35:333–336.

8. ŽIVOTOPIS

Zovem se Ivona Perković. Rođena sam 19. rujna 1997. godine u Zadru, a živim u mjestu Vrši. Pohađala sam „Osnovnu školu Petra Zoranića Nin“, od 2004. do 2012. godine. Nakon osnovne škole, upisala sam opću gimnaziju Vladimira Nazora u Zadru. Maturirala sam 2016. godine te krenula pohađati Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Završni rad, „Fiziološki pristup određivanja antioksidacijskog kapaciteta maslinovog i arganovog ulja metodom globalnog antioksidacijskog odgovora“ obranila sam 2019. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci pod vodstvom mentora doc.dr.sc. Jelene Marinić. Time sam stekla akademski naziv Sveučilišna prvostupnica sanitarnog inženjerstva. Iste godine, 2019., upisala sam Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci.