

Broj kolonija - parametar kakvoće vode

Vlakančić, Wendy

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:184:360081>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Wendy Vlakančić

BROJ KOLONIJA – PARAMETAR KAKVOĆE VODE

Završni rad

Rijeka, 2016.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Wendy Vlakančić

BROJ KOLONIJA – PARAMETAR KAKVOĆE VODE

Završni rad

Rijeka, 2016.

ZAHVALA

Najviše se zahvaljujem mentorici doc.dr.sc Dariji Vukić Lušić dipl.sanit.ing. na zaista velikoj pomoći oko izrade završnog rada kao i inženjerki Meri Dobrović, med.lab.ing. s Odsjeka za mikrobiologiju okoliša Nastavnog Zavoda za javno zdravstvo PGŽ koja mi je pomogla pri izradi praktičnog dijela ovog rada.

Također, zahvaljujem se svojim najbližim prijateljima i sestri koji su mi svojim savjetima pomogli pri pisanju.

Mentor rada: doc.dr.sc. Darija Vukić Lušić, dipl.sanit.ing.

Završni rad obranjen je dana __23.9.2016.__ u Rijeci na Nastavnom Zavodu za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc.dr.sc. Dražen Lušić, dipl.sanit.ing.
2. doc.dr.sc. Sandra Pavičić Žeželj, dipl.sanit.ing.
3. doc.dr.sc. Darija Vukić Lušić, dipl.sanit.ing.

Rad ima __57__ stranica, __17__ slika, __3__ tablice, __23__ literaturnih navoda.

SAŽETAK

Heterotrofne bakterije (UBB) je zajedničko ime za skupinu bakterija prisutnih u vodi, koje u definiranim uvjetima mogu porasti na hranjivom agaru korištenjem jednostavnih metoda kultivacije. Za svoj rast zahtijevaju organski izvor ugljika. Uloga ovog parametra kroz povijest se mijenjala, a danas se dominantno koristi kao pokazatelj efikasnosti dezinfekcije vode i općih higijenskih uvjeta u distribucijskoj mreži. Ne postoji univerzalna metoda za određivanje heterotrofnih bakterija. Potrebno je primijeniti onu metodu koja će dati najviše rezultate. U ovom radu analizirano je prisustvo UBB/22 i UBB/37 u različitim tipovima vode (sirova, prerađena i bazenska) u Primorsko-goranskoj županiji u periodu 1998.-2015. U sirovoj vodi veći je porast kolonija UBB/22, a u prerađenoj UBB/37. Slatkovodni bazeni u odnosu na morske pokazuju veći porast UBB/37. Također, dodatno su provedena usporedna ispitivanja broja kolonija različitim metodama (vrsta medija, temperatura i vrijeme inkubacije) na uzorcima vode za dijalizu i bazenske vode. U morskoj bazenskoj vodi primjena Marine agara (umjesto YEA) daje značajno veće rezultate broja UBB/37. U vodi za potrebe hemodijalize primjenom TGYA/22°C/7d postignute su najviše vrijednosti broja kolonija, što ukazuje da se primjenom HR EN ISO 6222:2000 vrijednosti broja kolonija u rutini podcjenjuju. Obzirom da je riječ o imunokompromitiranoj skupini populacije, ovaj je rezultat od posebne važnosti. Rezultati ispitivanja ukazuju da izbor metode ima značajan učinak na rezultate ispitivanja (kako kvantitativne tako i kvalitativne), te da su usporedivi samo rezultati dobiveni primjenom iste metode.

Ključne riječi: broj heterotrofnih bakterija, vodeni okoliš, hranjiva podloga, metoda, uvjeti inkubacije, pokazatelj efikasnosti prerade vode

SUMMARY

Heterotrophic plate count (HPC) is the common name for a bacterial group present in the water which, under defined conditions, can grow on nutritive agar by using simple cultivation methods. In order to grow, they need a source of organic carbon. Throughout history, the role of this parameter has been changing. Today, it is predominantly used as an indicator of water disinfection efficiency and common hygienic conditions within a water distribution network. There is no universal method for determining the heterotrophic plate count. The method that provides the best results must be applied. This study analyses the presence of HPC/22 and HPC/37 in different types of water (untreated, processed, and pool water) in Primorje-Gorski Kotar County between 1998 and 2015. Untreated water showed the highest growth in HPC/22 colonies, while processed water showed the highest growth in HPC/37 colonies. Freshwater swimming pools showed higher growth of HPC/37 when compared to the pools filled with seawater. Furthermore, additional parallel tests of colony populations were carried out using different methods (media type, temperature, and incubation time) on water samples used for dialysis and swimming pools. In seawater pools, the application of Marine agar (instead YEA) yields significantly higher amounts of HPC/37. In water used for dialysis, the application of TGYA/22°C/7d yielded the largest number of colonies, indicating the underestimation of the number of colonies obtained by application of HR EN ISO 6222:2000. Because this water is used for a group of immunocompromised people, these results are of special importance. The results of this study indicate that the choice of cultivation method has a significant effect on the results of tests (both quantitative and qualitative), and that the only comparable results are those obtained using the same method.

Keywords: heterotrophic plate count (HPC), water environment, nutritive agar, method, incubation conditions, indicator of treatment efficiency

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	Povijest	1
1.2	Definicija termina "ukupne heterotrofne bakterije"	3
1.3	Svrha praćenja broja heterotrofnih bakterija	4
1.4	Metode	5
1.5	Identifikacija vrsta	7
1.6	Zakonska regulativa	8
1.6.1	Voda za ljudsku potrošnju (NN 125/2013)	8
1.6.2	Voda za potrebe hemodijalize (NN 125/03).....	9
1.6.3	Bazenska voda (NN 107/12)	9
1.6.4	Usporedba kriterija korištenih širom svijeta.....	9
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	11
3	MATERIJALI I METODE	12
3.1	Tehnike	12
3.1.1	Tehnika ulijevanja ("pour plate" tehnika).....	12
3.1.2	Tehnika širenja ("spread plate" tehnika).....	12
3.1.3	Tehnika membranske filtracije.....	13
3.2	Hranjive podloge	14
3.2.1	Yeast Extract Agar (YEA)	14
3.2.2	Tryptic glucose yeast agar (TGYA)	14
3.2.3	Marine Agar	14
3.3	Identifikacija bakterija	15
3.3.1	Priprema preparata	15
3.3.2	Nasađivanje na trostruki šećer.....	16
3.3.3	Nasađivanje na krvni agar	17
3.3.4	Biokemijsko ispitivanje.....	18
3.3.5	Ispitivanje aktivnosti enzima oksidaze.....	18
3.3.6	Ispitivanje aktivnosti enzima katalaze.....	19
3.3.7	API test.....	19
4	REZULTATI.....	22
4.1	Identifikacija bakterija	22
4.2	Sirova voda – PGŽ (1998.-2015.)	23
4.2.1	Ukupna razlika UBB/37 vs UBB/22 u sirovoj vodi	23
4.2.2	Razlika opterećenja UBB/22 i UBB/37 po vodovodima u PGŽ	23
4.2.3	Razlika opterećenja po vodovodima – 37 °C	25
4.2.4	Razlika opterećenja po vodovodima – 22 °C	25
4.2.5	Korelacije mikrobioloških i fizikalno-kemijskih parametara.....	26
4.3	Prerađena voda – PGŽ (1998.-2015.)	28

4.3.1	Ukupna razlika UBB/37 vs UBB/22	28
1.1.1	Korelacije mikrobioloških i fizikalno-kemijskih parametara.....	28
4.4	Voda za potrebe hemodijalize	30
4.5	Rekreacijska voda – bazeni	32
4.5.1	Ukupna razlika UBB/37 vs UBB/22 u bazenima sa slatkom vodom – PGŽ (1998.-2015.).....	32
4.5.2	UBB/37 slatki vs morski bazeni – PGŽ (1998.-2015.).....	32
4.5.3	UBB/37/48 h – Marine agar vs YEA u morskim bazenima	33
<u>5</u>	<u>RASPRAVA</u>	<u>35</u>
<u>6</u>	<u>ZAKLJUČAK</u>	<u>41</u>
<u>7</u>	<u>LITERATURA.....</u>	<u>42</u>

1 UVOD

1.1 Povijest

Povijest upotrebe "broja kolonija" kao parametra kakvoće vode je zaista duga. Davne je 1883. g. Robert Koch objavio članak pod nazivom "O metodama za detekciju mikroorganizama u vodi (eng. "About Detection Methods for Microorganisms in Water") u kojem po prvi puta opisuje metodologiju mjerenja broja kolonija u vodi, nakon čega se ovaj parametar uvodi kao mjera uspješnosti provedbe procesa tretmana vode [1].

Mikroorganizmi normalno rastu u vodi te na površinama koje su u kontaktu s vodom u biofilmovima. Porast bakterija koji se javlja nakon prerade vode, naziva se ponovni rast (eng. "regrowth"). Rast bakterija u vodi odražava se kroz povišene vrijednosti UBB (ukupan broj bakterija). Povišeni UBB javlja se posebice u dijelovima distribucijskog sustava u kojima voda stagnira, kućnim vodovodnim instalacijama, uređajima za vodu poput uređaja za omekšavanje vode, filtera od aktivnog ugljena, automata za vodu. U vodovodnim instalacijama većih zgrada vrijednosti UBB mogu biti povišene, kao posljedica većih zapremina spremnika vode, složene razvodne mreže, kao i efekta utjecaja povišene temperature. Glavni rizik do kojeg pri tome dolazi je rizik od porasta bakterija roda *Legionella*.

Vodom za piće smatra se i voda koja ne potječe iz razvodne mreže, nego direktno iz izvora, bunara, ambalažirana voda, led. Ambalažirana voda (porijeklom iz izvora ili procesirana) pruža mikrobiološkoj flori specifične uvjete za rast. Tako je UBB u ambalažiranoj vodi ponekad značajno viši nego u vodi za piće iz gradskog vodovoda. Parametri UBB i *P. aeruginosa* se za ambalažirane vode koriste kao indikatori uvjeta procesa proizvodnje, a ne kao indikatori rizika za zdravlje.

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO, eng. WHO) smatra da bi "voda za piće trebala biti prikladna za konzumaciju ljudi, kao i za sve uobičajene potrebe u domaćinstvu, uključujući i

održavanje osobne higijene." Od davnina je poznato kako voda koja se smatra kvalitetnom mora sadržavati određene karakteristike. Tako je ispravna voda opisivana kao bistra, dobrog okusa i bez stranog mirisa, no voda navedenih povoljnih karakteristika i dalje je predstavljala izvor zaraze i uzrok brojnih oboljenja, često i sa smrtnim ishodom, kao što je zabilježeno u slučajevima epidemija kolere i trbušnog tifusa. Međutim, u prošlosti nije bilo moguće utvrditi što je uzrok pojave tih epidemija. Tek sredinom 19. st. John Snow prepoznaje kako je epidemija kolere u Londonu povezana s vodom koju je stanovništvo konzumiralo, time postavši ocem moderne epidemiologije. Primijetio je da se epidemija češće javlja kod dijela stanovništva koje je koristilo vodu iz donjeg dijela rijeke Temze, a koja je bila onečišćena gradskim otpadnim vodama, u odnosu na stanovnike koji su koristili vodu iz gornjeg toka Temze. Na temelju primjera širenja kolere, Robert Koch je opisao širenje bolesti putem vode: uzročnik kolere koji se izlučivao fecesom putem otpadnih voda je dospio u riječnu vodu, koju je zatim stanovništvo konzumiralo [2].

Krajem 19. st. došlo je do razvoja jednostavnih želatinoznih, a nešto kasnije i agaroznih, hranjivih podloga za uzgoj bakterija, što je omogućilo kultivaciju pojedinih vrsta bakterija i određivanje njihova broja. 1887. g. Richard Julius Petri uvodi u upotrebu prvu "Petrijevu ploču". Razvojem hranilišta počelo se shvaćati kako voda igra veliku ulogu u prijenosu bolesti. Robert Koch je predložio da gornja granica ukupnog broja bakterija u vodi bude 100 CFU/ml (eng. CFU – colony forming unit, hrv. bik – broj izraslih kolonija) pri temperaturi inkubacije 18-22 °C/48 h, što je postao prvi standard u području ispitivanja voda, baziran na epidemiološkim podacima. Broj izraslih kolonija 18-22 °C tako je postao parametar pomoću kojeg se određivao stupanj čistoće vode kao i učinkovitost vodenih filtera, koji su u to vrijeme ušli u široku uporabu, a tek kasnije primijenjen je za procjenu učinkovitosti dezinfekcije pitke vode. Nakon uvođenja ispitivanja ukupnog broja bakterija na 18-22 °C s inkubacijom od dva dana na želatinoznim hranjivim podlogama, od 1904. g. započela je inkubacija i dodatnog seta

ploča na 37 °C kroz tri dana, uz upotrebu agaroznih hranjivih podloga. Dodatni parametar uveden je jer se smatralo kako postoji vjerojatnost da se bakterije koje porastu pri temperaturi od 37 °C također nalaze i u ljudskom organizmu, pa prema tome mogu služiti kao indikator fekalne kontaminacije. Prve službene upute za provedbu ove metode poznate su kao "Report 71" iz 1934. g. (Ministarstvo zdravlja UK) u kojem su navedeni uvjeti inkubacije koji su i danas aktualni (22 °C/72 h i 37° C/48 h) [2].

Do današnjeg je dana granica od 100 CFU/ml pri 22 °C ukupnog broja bakterija u vodi namijenjenoj za ljudsku potrošnju ostala nepromijenjena, kao i ispitivanje ukupnog broja bakterija pri 37 °C [3]. Sagledavajući izloženost heterotrofnim bakterijama, konzumacijom hrane unosimo mnogostruko više vrijednosti u odnosu na unos vodom (legislativa iz područja hrane propisuje znatno više granične vrijednosti). Za veliki broj namirnica ograničenje je čak 1 000 000 cfu/g heterotrofnih kolonija, a u industriji hrane ovaj se parametar koristi kao mjera degradacije hrane, a ne u cilju zaštite zdravlja potrošača. Osim konzumacijom hrane i vode, heterotrofnim bakterijama izloženi smo i putem zraka, kao i putem drugih sastavnica okoliša.

1.2 Definicija termina "ukupne heterotrofne bakterije"

Heterotrofi se definiraju kao široka skupina mikroorganizama koja za rast zahtjeva organski izvor ugljika. Skupina heterotrofa uključuje bakterije, kvasce i plijesni.

Zajedničkim imenom "broj heterotrofnih bakterija" naziva se široki spektar mikroorganizama prisutnih u vodi, koji mogu primjenom jednostavnih metoda kultivacije u definiranim uvjetima porasti na hranjivom agaru. Nazivi koji se također koriste su: "ukupan broj bakterija - UBB", "broj izraslih kolonija", "broj kolonija", "broj aerobnih mezofilnih bakterija" (eng. HPC – "heterotrophic plate count", "total viable count", "total count", "plate count", "total bacterial count", "bacterial count", "water plate count", "colony count", "aerobic, mesophilic viable bacteria", " autochthonous flora"). Dakle, termini "heterotrofi" i "broj heterotrofnih bakterija" ne predstavljaju sinonime [4,5].

Mikroorganizmi koji se detektiraju kao UBB generalno uključuju organizme koji predstavljaju dio prirodno prisutne mikrobne populacije (autohtone vodene bakterije), međutim, ponekad mogu porasti i mikroorganizmi koji potječu iz određenih izvora onečišćenja, kao što su ljudske ili životinjske fekalije (alohtoni mikroorganizmi).

1.3 Svrha praćenja broja heterotrofnih bakterija

Uloga ovog parametra u monitoringu kakvoće vode mijenjala se kroz povijest. Krajem 19. st. ovaj je parametar korišten kao pokazatelj efikasnosti procesa pročišćavanja (osobito pješčanih filtera), odnosno kao indirektan parametar sigurnosti vode. Međutim, uvođenjem specifičnih indikatora fekalnog onečišćenja tijekom 20. st., uloga UBB kao parametra sigurnosti vode gubi na važnosti, iako se u mnogim zemljama i dalje zadržava kao obavezni parametar rutinskog ispitivanja vode. Danas se UBB prati kao:

- indikator efikasnosti primijenjenih tretmana prerade vode (koagulacija, flokulacija, sedimentacija, filtracija i dezinfekcija), što je u UK dominantna uloga, odnosno, kao indirektni pokazatelj uspješnosti uklanjanja patogena
- mjera broja naknadno poraslih (eng. regrowth) organizama u distribucijskom sustavu nakon postupka obrade, koji mogu ali i ne moraju biti od sanitarne važnosti
- mjera moguće interferencije (pojave lažno-negativnih rezultata) pri određivanju broja koliformnih bakterija metodama koje se temelje na fermentiranju laktoze (UBB ima ulogu surogat indikatora za koncentraciju rezidualnog klora); ova uloga dominirala je u SAD-u, međutim značaj ove primjene također se smanjuje, obzirom da se klasične metode bazirane na fermentaciji laktoze sve više zamjenjuju alternativnim metoda (temeljenim na aktivnosti enzima).

U sustavima za distribuciju vode parametar UBB se prati u cilju *validacije* i *verifikacije* kao pokazatelj:

- učinka filtracije ili dezinfekcije
- uvjeta u distribucijskom sustavu (stagnacija, gubitak rezidualnog klora, povišene količine dostupnog organskog ugljika u vodi, povišena temperatura, dostupnost određenih hranjivih soli)
- u provedbi validacije (odnosno u nekim državama također i verifikacije) kao pokazatelj uspješnosti različitih postupaka čišćenja (automata za piće, aparat za pripremu hrane, medicinskih instrumenata).

Validacija – provedba istraživačkih aktivnosti čiji je cilj utvrditi učinkovitost kontrolnih mjera. Aktivnosti validacije intenzivno se provode obično u fazi izgradnje dijela vodoopskrbnog sustava ili njegove rekonstrukcije.

Verifikacija – uz praćenje izvedbe pojedinih komponenti distribucijskog sustava, neophodno je, u cilju dodatnog potvrđivanja sigurnosti cijelog sustava, provesti finalnu verifikaciju. Ovisno o legislativi pojedinih zemalja, verifikacija može biti provedena od strane distributera, neovisnog vanjskog tijela ili njihove kombinacije. Može uključivati ispitivanje fekalnih indikatora, patogena i opasnih kemijskih spojeva.

Ukupan broj bakterija u vodi koristan je podatak kojim možemo procijeniti kakvoću vode i efikasnost provedenih sanitarno – higijenskih mjera, kao i higijenske uvjete u distribucijskom sustavu. Odstupanje od maksimalno dozvoljenog broja bakterija, koji je propisan predmetnom regulativom, može ukazivati na pojavu onečišćenja, koje zahtijeva reakciju nadležnih službi [6].

1.4 Metode

Ne postoji univerzalna metoda određivanja UBB-a. Iako su određeni protokoli standardizirani (HRN EN ISO 6222:2000), ispitivanje je moguće provoditi u različitim testnim uvjetima koji posljedično imaju različite, kako kvalitativne tako i kvantitativne, rezultate. Temperaturni

uvjeti inkubacije kreću se od 20 do 40 °C, vrijeme inkubacije od nekoliko sati do nekoliko tjedana, a nutritivni uvjeti od siromašnih do bogatih. Test ne uključuje identifikaciju detektiranih vrsta. Važno je za naglasiti da je primjenom ovog testa moguće detektirati samo mali udio metabolički aktivnih mikroorganizama prisutnih u vodi, te da će se sastav porasle populacije značajno razlikovati, ovisno o primijenjenim uvjetima kultivacije. Istraživanje navodi da se ovim testom može dokazati samo oko 0,01% (do nekoliko %) ukupne populacije vodenih mikroorganizama. U sustavima za distribuciju vode za piće broj kulturabilnih bakterija može biti nekoliko redova veličina manji od ukupnog broja bakterija prisutnih u vodi [7].

Test ne pruža informaciju koji smo udio subpopulacije kultivacijom uspjeli uzgojiti, kao niti jesu li su porasle vrste potencijalno patogene. Preostali dio populacije neće biti detektiran zato što bakterije ili uopće ne mogu porasti u danim im uvjetima, ili je riječ o mikroorganizmima koji vrlo sporo rastu te ih nije moguće detektirati u primijenjenom vremenu inkubacije (kolonije su nevidljive/presitne). Vrste organizama, čiji porast će biti detektiran u uvjetima testa, variraju između pojedinih lokacija, između sezona pa čak i između uzastopnih uzoraka na određenoj lokaciji.

Postupci pripreme uzoraka vode i nasađivanja na hranjivu podlogu su određeni ISO normama (ISO 8199, EN ISO 5667-3, ISO 6887, ISO 8199) . Uzorak vode (ili adekvatno razrjeđenje) iz kojeg će se određivati ukupan broj bakterija može se nasađivati na hranjivu podlogu "pour plate" tehnikom (tehnika ulijevanja), "spread plate" (tehnika širenja) tehnikom ili tehnikom membranske filtracije. Hranjive podloge koje se koriste kod određivanja ukupnog broja bakterija mogu biti s višom ili s nižom razinom hranjivih tvari. Hranjive podloge s višom razinom hranjivih tvari pogodnije su za kultivaciju bakterija koje potječu iz ljudskog ili životinjskog organizma, dok su one s nižom razinom hranjivih tvari pogodnije za kultivaciju bakterija koje rastu u vodi te se mogu naći u vodenim sustavima [5].

Niti za jednu vrstu medija i određene uvjete inkubacije ne treba očekivati da će podržati rast svih živih bakterija prisutnih u uzorku vode. Međutim, potrebno je primijeniti medij i uvjete koji će se omogućiti rast najvećeg broja heterotrofnih bakterija.

Ovim načinom kultivacije bakterija nije moguće identificirati o kojim se vrstama bakterija radi. Međutim, metoda se ipak može smatrati selektivnom jer definirani uvjeti inkubacije na određenoj hranjivoj podlozi podržavaju rast samo određenih bakterija. Mnoge bakterije koje se nalaze u vodi primjenom ove metode nisu kultivabilne. Npr. *Mycobacterium avian* i *Legionella* su heterotrofne bakterije koje nisu sposobne porasti na medijima koji se koriste za uzgoj ukupnog broja kolonija [5].

U heterotrofne bakterije također spadaju i sve patogene bakterije kao i oportunistički patogeni, od kojih neke mogu porasti na hranjivim podlogama koje se koriste za određivanje ukupnog broja bakterija. Bakterije koje se obično smatraju oportunističkim, a koje se mogu porasti kao UBB su: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Klebsiella pneumoniae*, itd. Međutim ne postoje jasni dokazi o povezanosti ovih vrsta s gastrointestinalnim infekcijama u generalnoj populaciji.

1.5 Identifikacija vrsta

Brojne studije navode praktički isti profil heterotrofnih bakterijskih vrsta. Dominantne vrste su slijedeće [8,9].

PROFIL heterotrofnih bakterija u vodi	INFEKTIVNA DOZA
<ul style="list-style-type: none">• <i>Acinetobacter</i> spp.• <i>Aeromonas</i> spp.• <i>Alcaligenes</i> spp.• <i>Arthrobacter</i> spp.• <i>Comamonas</i> spp.• <i>Corynebacterium</i> spp.• <i>Citrobacter</i> spp.• <i>Enterobacter</i> spp.• <i>Flavobacterium</i> spp.• <i>Yersinia</i> spp.	<i>A. hydrophila</i> >10 ¹⁰ cfu

- *Hafnia* spp.
- *Klebsiella* spp.
- *Serratia* spp.
- *Moraxella* spp.
- *Pseudomonas* spp. *P. aeruginosa* 10⁸-10⁹ cfu
- *Spingomonas* spp.
- *Stenotrophomonas* spp.
- atipične *Mycobacterium* spp. *M. avium* 10⁴-10⁷ cfu
- *Micrococcus* spp.
- *Bacillus* spp.
- *Nocardia* spp.

Međutim, obzirom da baza podataka za okolišne izolate ne raspolaže dovoljnim brojem informacija, ne podržava pouzdanu identifikaciju bakterijskih izolata koji potječu iz okoliša. Čak se smatra da je moguće da je većina identifikacija navedenih u literaturi tijekom prethodnih godina netočna. 80-tih godina 20. stoljeća za veliku većinu identifikacija korišteni su klinički protokoli, čije baze podataka nisu bile odgovarajuće i za okolišne sojeve. Razvoj i sve šira primjena molekularnih metoda svakako omogućuju dublji pogled u profil vrsta, koje zajedničkim imenom nazivamo UBB. Stoga se u svrhu identifikacije danas preporučuju molekularne metode, koje pružaju potpuno novi uvid u postojeće vrste (sekvencioniranje gena za 16S rRNA) [10].

1.6 Zakonska regulativa

1.6.1 Voda za ljudsku potrošnju (NN 125/2013)

Prema Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju (NN 125/2013, 141/2013, 128/2015) koji se temelji na Zakonu o vodi za ljudsku potrošnju (NN 56/2013) kriteriji zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju, što se ukupnog broja bakterija u vodi tiče su: za ukupan broj kolonija na hranjivim podlogama koje su inkubirane pri 22 °C maksimalna dozvoljena količina iznosi 100 kolonija u 1 ml dok za hranjive podloge inkubirane pri 37 °C maksimalna dozvoljena količina iznosi 20 kolonija u 1

ml vode [3]. Pravilnikom propisana metoda opisana je u normi HRN EN ISO 6222 (Brojenje uzgojenih mikroorganizama) u kojoj je kao medij kultivacije naveden YEA (Yeast extract agar).

1.6.2 Voda za potrebe hemodijalize (NN 125/03)

Prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za potrebe hemodijalize (NN 125/03) koji se temelji na članku 58. Zakona o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti (NN 60/92 i NN26/93) propisano je kako ukupan broj bakterija u 1 ml vodu ne smije biti veći od 100 za vodu za potrebe hemodijalize koja je tretirana kao i za vodu za ispiranje, a kod dijalizne otopine maksimalni dozvoljeni broj bakterija u 1 ml vode je 1000. Temperatura, vrijeme inkubacije, kao ni vrsta hranjivog medija nisu propisani [11].

1.6.3 Bazenska voda (NN 107/12)

Prema pravilniku o sanitarno – tehničkim i higijenskim uvjetima bazenskih kupališta te o zdravstvenoj ispravnosti bazenskih voda (NN 107/12) koji je temeljen na članku 10. stavku 8. Zakona o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti (NN 79/2007, 113/08 i NN 43/09) određeno je kako dozvoljeni ukupan broj aerobnih bakterija pri 37 °C kroz 48 sati iznosi 200 CFU/ml. Hranjivi medij propisan Pravilnikom, koji se koristi kod određivanja zdravstvene ispravnosti bazenskih voda je kvašćev agar [12].

1.6.4 Usporedba kriterija korištenih širom svijeta

U Tablici 1 navedeni su kriteriji koji se koriste širom svijeta za ocjenu parametra broj heterotrofnih bakterija na temperaturi 22 °C i 37 °C [13].

Tablica 1 Različiti kriteriji za broj hetrotrofnih bakterija kao indikatorskog parametra zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju, koji su u primjeni širom svijeta

	UBB/22	UBB/37
Hrvatska	100	20

EU	Bez značajne promjene	-
Njemačka	Bez značajne promjene	Bez značajne promjene (36 °C)
Nizozemska	100	-
Slovenija	Bez značajne promjene	100
BIH	Bez značajne promjene	-
Srbija	-	10
SAD	-	-
WHO	-	-

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Broj heterotrofnih bakterija rutinski je parametar kakvoće vode koji ukazuje na efikasnost dezinfekcije i higijenske uvjete unutar određenog sustava. Ne postoji univerzalna metoda, već je za ispitivanje broja kolonija na raspolaganju više različitih hranjivih medija, uz primjenu različitih uvjeta kultivacije (temperatura, vrijeme, tehnika nasadivanja).

Ovim radom ispitano je kako različiti uvjeti inkubacije (temperature i trajanje inkubacije) kao i izbor određene hranjive podloge utječu na rezultat analize. Iako određivanje broja heterotrofnih bakterija ne uključuje identifikaciju vrsta, porasle su kolonije, u okviru postojećih tehničkih mogućnosti, dodatno ispitane.

Također, analizirani su rezultati ispitivanja vode u Primorsko-goranskoj županiji u periodu od 1998. do 2015. g., u cilju uočavanja pojavnosti pojedinog parametra (UBB/22 i UBB/37), ovisno o tipu vode.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Tehnike

Tehnike koje se koriste kod određivanja ukupnog broja bakterija su "pour-plate" tehnika odnosno tehnika razlijevanja po podlozi, "spread plate" tehnika odnosno tehnika širenja po podlozi i membranska filtracija. Primjena određene tehnike utječe na rezultat ispitivanja [5]. "Pour plate" tehnika općenito daje slabije rezultate, odnosno manji broj poraslih bakterija, bez obzira na hranjivi medij i vrijeme inkubacije, a također je ograničena na volumen uzorka od 0,1 – 10 ml. "Spread plate" tehnika daje bolje rezultate, veći broj poraslih bakterija ali je također ograničena na volumen uzorka 0,1 – 1,0 ml. Metoda membranske filtracije mnogo je fleksibilnija jer omogućuje analizu uzoraka većih od 1,0 ml.

3.1.1 Tehnika ulijevanja ("pour plate" tehnika)

Tehnika ulijevanja se izvodi tako da se 1 ml uzorka ili njegovog razrjeđenja prenese u Petrijevu zdjelicu, prelije sa 15 – 20 ml otopljenog i na 45°C temperiranog kvašćevog agara, te se Petrijeva zdjelica pažljivo homegenizira kružnim pokretima. Veoma je bitno da je Petrijeva zdjelica cijelo vrijeme na čvrstoj i ravnoj površini. Vrijeme koje protekne između prijenosa uzorka u Petrijevu zdjelicu i ulijevanja kvašćevog agara ne bi smjelo biti dulje od 15 minuta. Nakon hlađenja agara, Petrijeva zdjelica se preokrene i inkubira. Petrijeva ploča inkubira se na 22°C/72 sata i 37°C/48 sati.

3.1.2 Tehnika širenja ("spread plate" tehnika)

Kod tehnike širenja 0,1 ml uzorka ili njegovog razrjeđenja prenese se na sredinu hranjivog agara, ukoliko se uzorak ručno širi po agaru, ili na točno označeno mjesto na agaru, ukoliko se uzorak širi automatski uređajem za širenje. Nakon širenja uzorka po hranjivom agaru, pusti se da se apsorbira u hranjivi medij, ploče se preokrenu te se inkubiraju na temperaturi od 35°C 48 – 72 sata.

3.1.3 Tehnika membranske filtracije

Tehnika za membransku filtraciju izvodi se na način da se filter papir postavi na držač u sustavu za filtraciju na koji se postavi i pričvrsti lijevak. Uzorak vode se zatim ulijeva u lijevak te se filtrira pomoći vakuuma. Lijevak se potom ispire 0,1% peptonskom vodom. Filter papir se pomoću pincete prenosi s držača na površinu hranjive podloge, vodeći pri tome računa da se između filter papira i hranjive podloge ne zadrže mjehurići zraka. Petrijeva ploča se zatim inkubira na 35°C 48 – 72 sata ili na 20 – 28°C 5 do 7 dana, ovisno o vrsti hranjive podloge.

3.2 Hranjive podloge

3.2.1 Yeast Extract Agar (YEA)

Yeast extract Agar (YEA, Biolife), odnosno kvašćev agar hranjiva podloga je koja se koristi prema normi HR EN ISO 6222:2000 za analizu voda. Sadrži pepton, kvašćev ekstrakt i agar. Kvašćev agar, u odnosu na TGYA agar koji se koristi u području ispitivanja hrane, sadrži nisku razinu hranjivih tvari. Ne sadrži glukozu, pa prema tome služi za uzgoj mikroorganizama koji zahtijevaju nižu razinu hranjivih tvari, kao što su bakterije koje obitavaju u vodi. Međutim, u usporedbi YEA s R2A hranjivim agarom, koji je posebno dizajniran za potrebe bakterijskih vrsta koje potječu iz vode s niskim sadržajem nutijenata, YEA medij smatramo nutrijentima bogatom hranjivom podlogom. Također, mogu se kultivirati kvasci i plijesni. Koristi se pri temperaturama inkubacije od 22°C i 36°C [14].

3.2.2 Tryptic glucose yeast agar (TGYA)

Tryptic glucose yeast agar (TGYA, Biolife) hranjiva podloga je s visokom razinom hranjivih tvari koja se koristi za analizu vode, hrane, zraka, mlijeka i mliječnih proizvoda. Služi za uzgoj aerobnih i fakultativno anaerobnih heterotrofnih mikroorganizama. Sastoji se od kazeina, kvašćevog ekstrakta, glukoze i agara [15].

3.2.3 Marine Agar

Marine agar (BD Difco) hranjiva podloga je namijenjena kultivaciji heterotrofnih bakterija iz morskih uzoraka. Medij sadrži minerale u gotovo dvostruko većoj koncentraciji nego što su prisutni u moru, pepton i kvašćev ekstrakt. Koristi se pri temperaturama inkubacije od 20°C do 25°C u vremenu od 40 do 72h [16].

3.3 Identifikacija bakterija

3.3.1 Priprema preparata

Za izradu preparata odabrano je devet kolonija poraslih na hranjivom agaru (Slika 1) namijenjenom za određivanje ukupnog broja bakterija u vodi (YEA, Slika 1). Preparati su obojani metodom po Gramu (Slika 2) te su mikroskopirani pod uljnom imerzijom, odnosno pod najvećim povećanjem.



Slika 1. Odabrane kolonije



Slika 2. Preparati obojeni po Gramu

3.3.2 Nasađivanje na trostruki šećer

Za nasađivanje na trostruki šećer odabrano je šest kolonija, također s YEA hranjivog medija.

Trostruki šećer (Slika 3) se sastoji od tri šećera: glukoze, saharoze, laktoze te od željeznog sulfata. Služi za diferencijaciju bakterijskih vrsta koje fermentiraju laktozu od onih koje su laktoza negativne. Ukoliko bakterija fermentira glukozu, proizvodi kiselinu, što se očituje na trostrukom šećeru kao promjena dna podloge iz crvene u žutu boju. Ako fermentira laktozu, također proizvodi kiselinu te se to vidi kao promjena boje na kosini podloge iz crvene u žutu boju. Indikator promjene pH u podlozi je fenolno crvenilo, koje je zaslužno za promjenu boje kod fermentacije. Neke bakterije reduciraju tiosulfatni anion do sulfida (H_2S), koji u reakciji s željeznim sulfatom iz podloge boji dno epruvete u crno. Također, bakterija može producirati ugljični dioksid (CO_2), pa se u tom slučaju podloga odvoji od stjenki epruvete na dnu [17, 18].

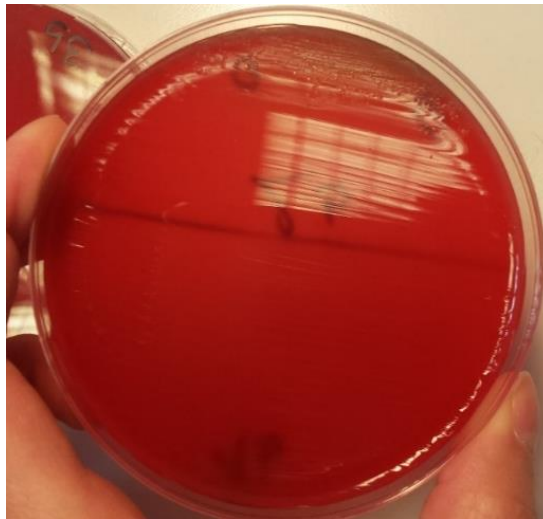


Slika 3. Trostruki šećer

3.3.3 Nasađivanje na krvni agar

Za nasađivanje na krvni agar odabrano je šest kolonija s hranjivog agara koji se koristi za određivanje ukupnog broja bakterija u vodi (YEA). Uzorak je presađen na krvni agar u jednom aktu.

Krvni agar (Slika 4) je prirodna, kruta, složena i diferencijalna hranjiva podloga koja sadrži krv neke životinje, najčešće ovce ili konja. Koristi se za izolaciju bakterija koje zahtijevaju posebne uvjete (hemoglobin iz krvi) kao i za detekciju hemolitičke aktivnosti koja može biti α (djelomična hemoliza), β (potpuna hemoliza) ili γ (nema hemolize) [19].

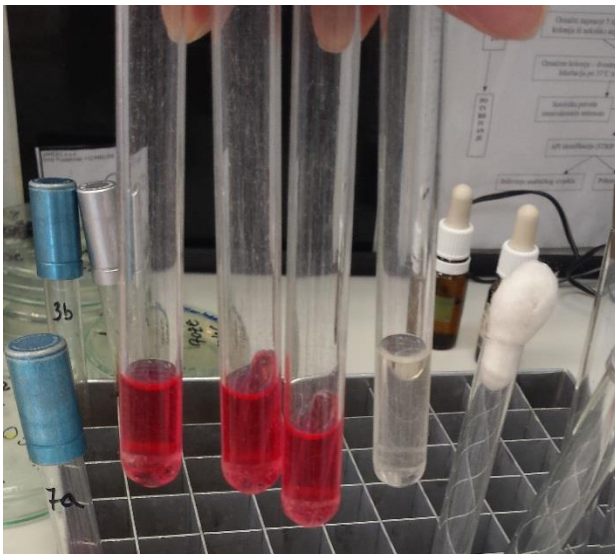


Slika 4. Krvni agar

3.3.4 Biokemijsko ispitivanje

S obzirom na pozitivan porast na jednom od trostrukih šećera, napravljeni su biokemijski testovi, tzv. biokemijski niz, kako bi se pokušalo utvrditi o kojoj baktrijskoj vrsti radi. Ispitivala se metabolička aktivnost u saharozi, manitu, laktozi, indolu, urei, KCN-u te moguća pokretljivost (Slike 5 i 6).

Biokemijski testovi su niz metoda i postupaka koji služe za identifikaciju metaboličkih aktivnosti bakterija [20].



Slika 5. Saharozu, manitu, laktozu, indol



Slika 6. Urea, KCN, pokretljivost

3.3.5 Ispitivanje aktivnosti enzima oksidaze

Ispitivanje aktivnosti enzima oksidaze temelji se na sposobnosti bakterija da oksidiraju određene aromatske amine. Indofenol oksidaza u prisutnosti kisika oksidira fenilendiamin, koji je prisutan u oksidaza reagensu, u tamnoljubičasti spoj indofenol [17]. Enterobakterije su oksidaza-negativne, što znači da ne koriste kisik kao elektron akceptor u transportu elektrona ili koriste druge citokrom enzime za transport elektrona na kisik.

Jedan od dodatnih biokemijskih testova je ispitivanje aktivnosti enzima oksidaze. Na filter papir navlažen destiliranom vodom plastičnom ežom se nanese kolonija, stavi se kap reagensa

te se rezultat očita unutar 10 sekundi. Ukoliko je rezultat pozitivan, dolazi do tamnoljubičastog obojenja.

3.3.6 Ispitivanje aktivnosti enzima katalaze

Ispitivanje aktivnosti enzima katalaze temelji se na sposobnosti bakterija da razgrade vodikov peroksid. Vodikov peroksid u reakciji s enzimom katalaza stvara produkte vodu i kisik [17].

Test se može raditi na predmetnom stakalcu ili u epruveti.

Aktivnost enzima katalaze provedena je na način da se na predmetno stakalce nanese kap vodikovog peroksida, te se ezom suspektne kolonije razmute u kapljici vodikovog peroksida.

Ukoliko dođe do stvaranja mjehurića, katalaza test je pozitivan.

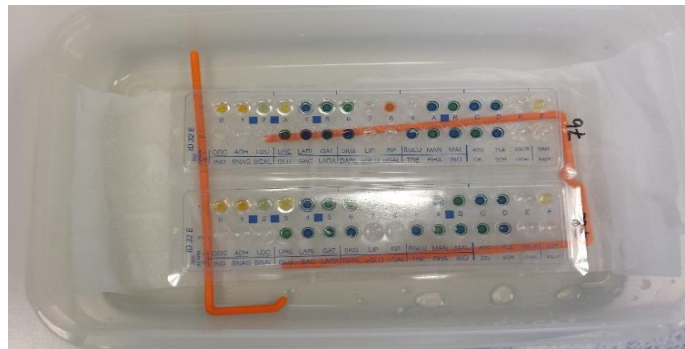
3.3.7 API test

API test (eng. Analytical Profile Indeks) je komercijalno dostupan standardizirani manualni test koji omogućava identifikaciju širokog spektra klinički značajnih bakterijskih vrsta do razine vrste. API tehnika razvijena je 70-tih godina u SAD-u kao minijaturizirani oblik postojećih testova, a identifikacija bakterija temelji se na širokoj bazi podataka biokemijskih reakcija, svojstvenih pojedinim vrstama mikroorganizama. Plastične sterilne trake (API testovi) općenito sadrže 20 minijaturnih jažica koje se inokuliraju s izoliranom čistom kulturom suspenzije mikroorganizama te inkubiraju 24 sata (ili kraće) u vlažnoj komori. Jažice sadrže dehidrirani supstrat za detekciju enzimske aktivnosti, obično povezane s fermentacijom ugljikohidrata ili razgradnjom proteina ili aminokiselina.

Postoji više vrsta API testova (API-20E za dokazivanje enterobakterija i drugih Gram-negativnih vrsta, API-Staph za dokazivanje stafilokoka), a u ovom ispitivanju koristio se test 32E. Sastoji od 32 jažice i primjenjuje se za ispitivanje bakterija iz porodice enterobakterija. S krvnog agara ili trostrukog šećera bakterijska kultura prenesena je u 2 ml 0,85%-tne fiziološke

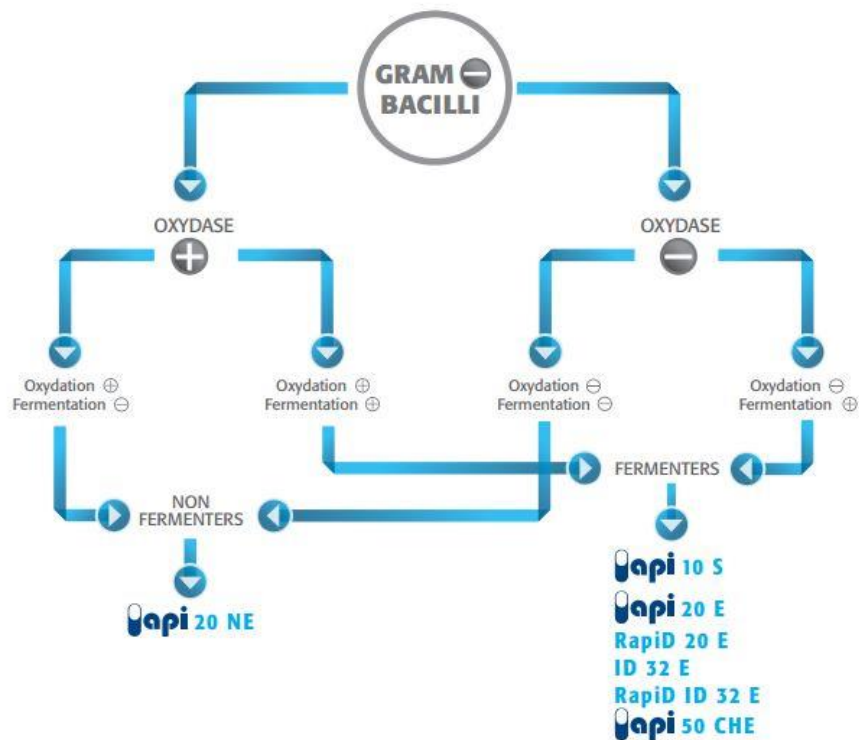
otopine (NaCl), u komercijalno proizvedenim bočicama koje se distribuiraju zajedno s API testom. Nakon razmućivanja, uz pomoć denzitometra provjerimo gustoću. Ukoliko gustoća zadovoljava preporučene vrijednosti, dvije kapi suspenzije ukapaju se u svaku jažicu, u odrežene jažice doda se parafinsko ulje kako bi se stvorili anaerobni uvjeti, te se API traka prenese u posudu u kojoj su stvoreni vlažni uvjeti, kako bi se spriječilo sušenje testa. Posuda se nakon toga zatvori i inkubira na 37 °C kroz 24 sata.

Pod djelovanjem metaboličke aktivnosti bakterija dolazi do promjene boje u jažicama, bilo spontano ili pod utjecajem reagensa (Slika 7). Npr., tijekom fermentacije ugljikohidrata, pH vrijednost u jažici pada, što se očitava kao promjena boje pH indikatora.



Slika 7. API test prije inkubacije

Nakon 18-24 h rezultat se očitava na način da se sve pozitivne/negativne reakcije konvertiraju u profilni broj, koji se tada uspoređuje s profilnim brojevima u bazi podataka proizvođača.



Slika 8. Prikaz izbora testne kartice za Gram-negativne štapiće
<http://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9308960-002-gb-b-apiweb-booklet.pdf>

4 REZULTATI

4.1 Identifikacija bakterija

Identifikacija poraslih bakterija provedena je pomoću komercijalnog testa za biokemijsko ispitivanje bakterija (API-testa). U ukupno 3 uzorka identificirano je nekoliko različitih vrsta bakterija. U prvom uzorku rezultati ispitivanja potvrdili su izolaciju bakterije roda *Pseudomonas*. Najveća vjerojatnost (71,8%) je da se radi o vrsti *Pseudomonas putida*, zatim slijedi *Pseudomonas fluorescens* (22%), *Pseudomonas/Comamonas spp.* (4,0%) i *Pseudomonas aeruginosa* (1,9%) (PRILOG 1). Rezultat je ocijenjen kao "low discrimination", odn. kao niska razina identifikacije.

U drugom uzorku dokazana je vrsta *Sphingomonas paucimobilis* (99,4%) (PRILOG 2). Rezultat je ocijenjen kao "very good identification", odn. vrlo sigurnim rezultatom.

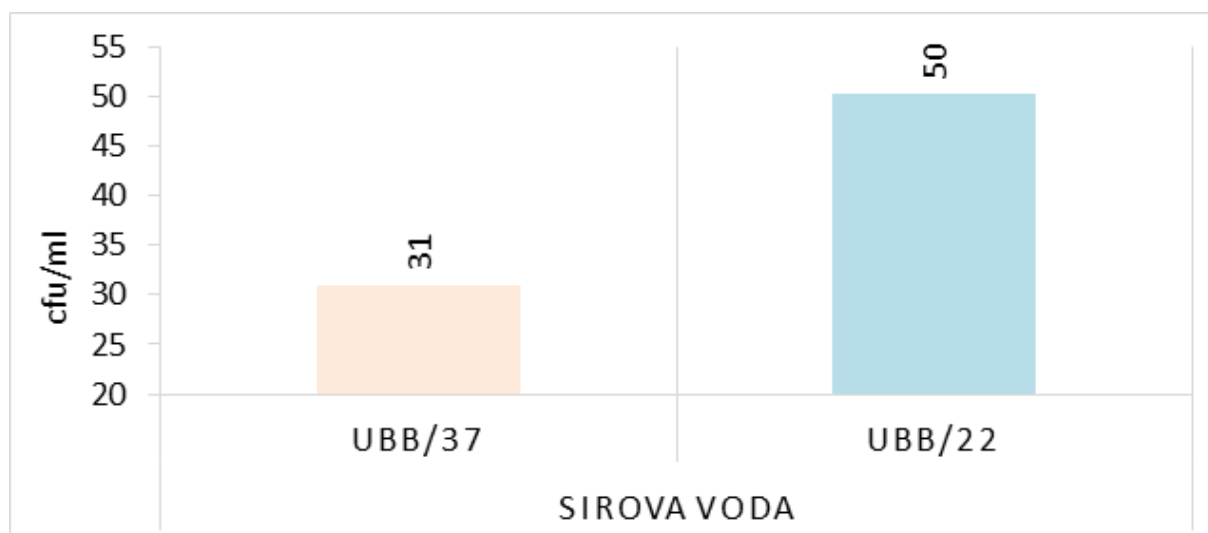
Rezultat trećeg uzorka bio je vrlo sličan drugom uzorku, *Sphingomonas paucimobilis* (96,4%), a uz manju mogućnost (3,5%) identifikacije vrste *Agrobacterium radiobacter* (PRILOG 3). Rezultat je također ocijenjen vrlo pouzdanim.

4.2 Sirova voda – PGŽ (1998.-2015.)

Pod terminom "sirova voda" podrazumijevamo vode iz okoliša (izvorske vode, rijeke, jezera, akumulacije) koje se ispituju prije određenog tretmana obrade/dezinfekcije.

4.2.1 Ukupna razlika UBB/37 vs UBB/22 u sirovoj vodi

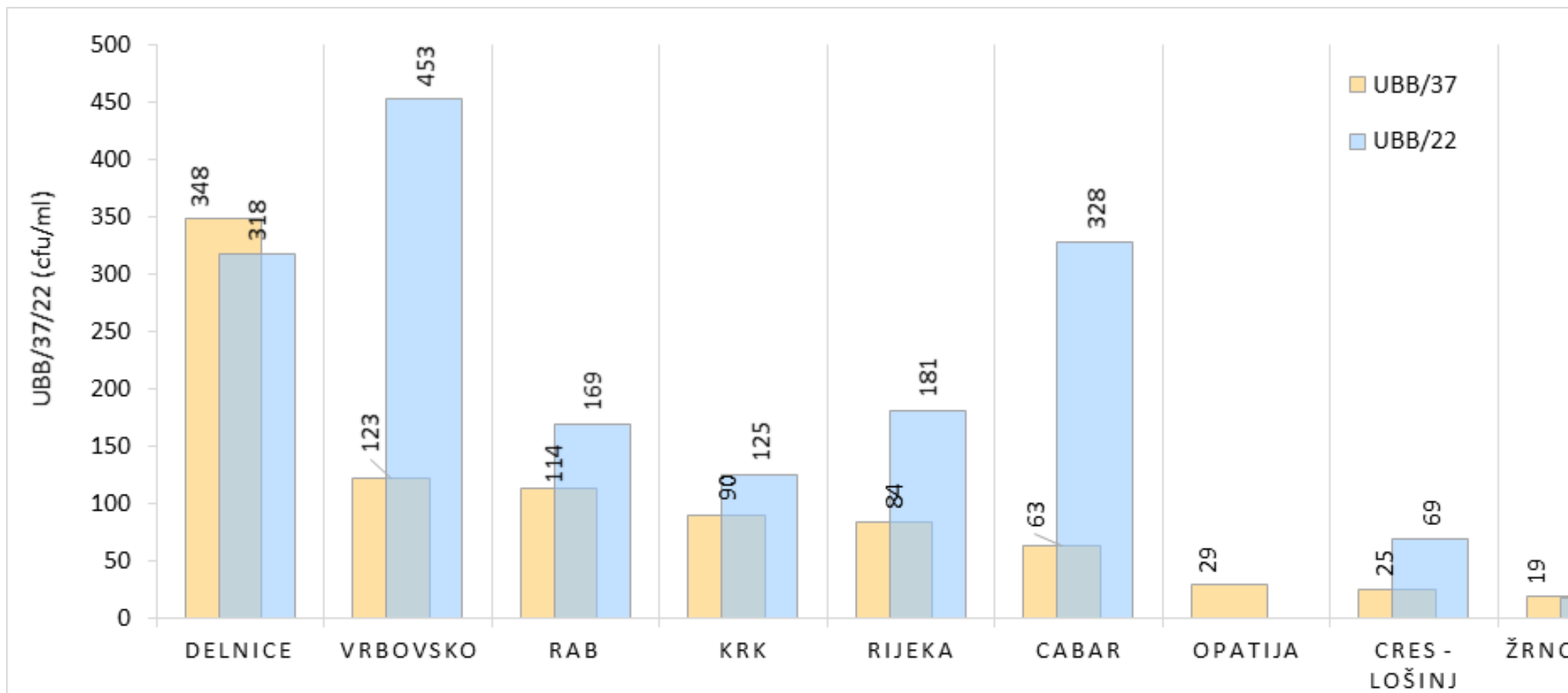
T-test je pokazao da je kod uzoraka sirove vode utjecaj temperature inkubacije statistički značajan ($p < 0,001$). Slika 9 prikazuje da je srednja vrijednost ukupnog broja bakterija u sirovoj vodi veća pri temperaturi 22 °C (50 cfu/ml) nego pri 37 °C (31 cfu/ml).



Slika 9. Srednje vrijednosti UBB/37 i UBB/22 u sirovoj vodi (N= 3.071)

4.2.2 Razlika opterećenja UBB/22 i UBB/37 po vodovodima u PGŽ

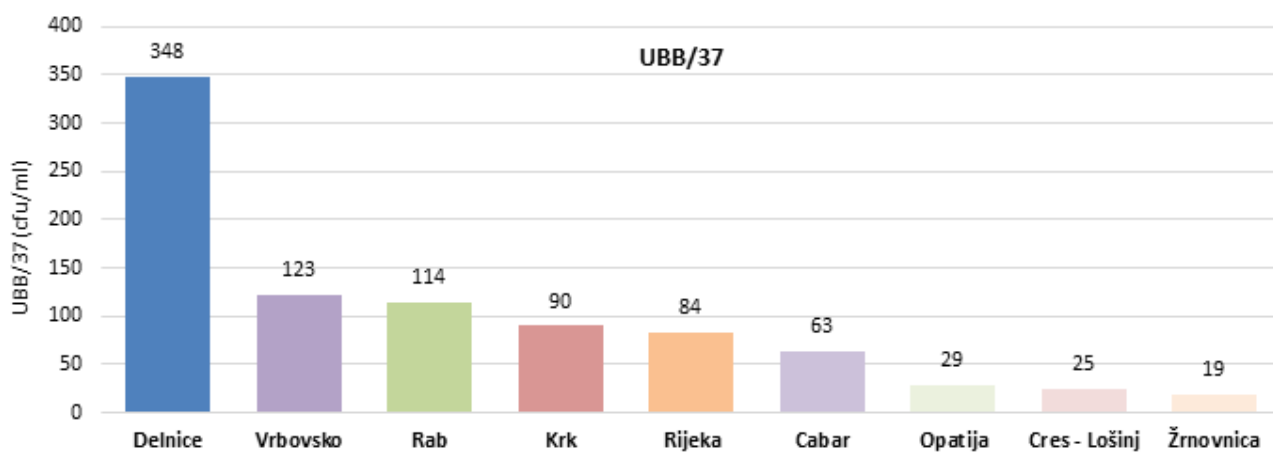
Ukupan broj bakterija pri 22 °C i pri 37 °C u sirovoj vodi razlikuje se po vodovodima u PGŽ. Na slici 10 se može vidjeti kako su srednje vrijednosti UBB/22 veće u sirovoj vodi u gotovo svim vodovodima, osim u Delnicama i Žrnovnici (za Opatiju podaci o UBB/22 nisu bili dostupni). Također, primjetna je razlika u srednjim vrijednostima UBB/22 i UBB/37 između pojedinih vodovoda.



Slika 10. Srednje vrijednosti UBB/37 i UBB/22 u sirovoj vodi po pojedinim vodovodima u PGŽ ($N_{UBB/37}=4.842$, $N_{UBB/22}=3.071$)

4.2.3 Razlika opterećenja po vodovodima – 37 °C

Slika 11 prikazuje srednje vrijednosti broja heterotrofnih bakterija na 37 °C u sirovoj vodi u vodovodima u PGŽ (raspon kretanja 19-348 cfu/ml). Analiza varijance (ANOVA) dostupnih podataka broja kolonija na 37 °C u periodu 1998.-2015. (N = 4.833) u sirovoj vodi 9 vodovoda u PGŽ, pokazala je da se vodovodi prema parametru UBB/37 statistički značajno razlikuju. *Post-hoc* Tukey testom je uočeno da vodovod Žrnovnica ima značajno manju srednju vrijednost (19 cfu/ml), a vodovod Delnice značajno veću srednju vrijednost UBB/37 (348 cfu/ml) od ostalih vodovoda (Rijeka, Opatija, Čabar, Vrbovsko, Cres-Lošinj, Krk, Rab) (ANOVA, $F_{8,4833}=86,02$, $p<0,001$).

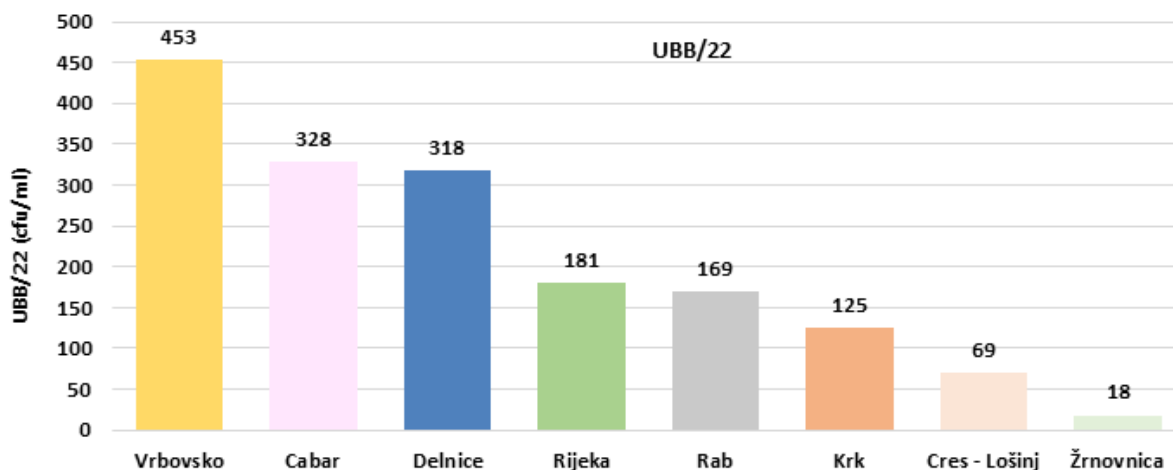


Slika 11. Srednje vrijednosti UBB/37 u 9 vodovoda u PGŽ (N=22.856)

4.2.4 Razlika opterećenja po vodovodima – 22 °C

Na slici 12 prikazani su vodovodi i raspon kretanja prema srednjim vrijednostima UBB/22 (18-453 cfu/ml). ANOVA test je pokazao da između vodovoda postoji statistički značajna razlika u odnosu na predmetni parametar. Prema rezultatima Tukey testa slika je u odnosu na najopterećenije vodovode nešto drugačija nego kod UBB/37.

Razmatrajući UBB/22 po opterećenosti se izdvajaju se 3 vodovoda u G. kotaru (Vrbovsko, Čabar i Delnice). Najmanji broj kolonija na 22 °C, kao i kod UBB/37, je u vodovodu Žrnovnica (ANOVA, $F_{7,3063}=72,93$, $p<0,001$).



* vrijednosti za vodovod Opatija nisu bile dostupne

Slika 12. Srednje vrijednosti UBB/22 u 8 vodovoda u PGŽ (18222)

4.2.5 Korelacije mikrobioloških i fizikalno-kemijskih parametara

U Tablici 2 prikazane su koeficijenti korelacije ispitanih mikrobioloških i fizikalno-kemijskih parametara u sirovoj vodi. UBB/37 i UBB/22 međusobno su u značajnoj pozitivnoj korelaciji ($r=0,78$, $p<0,05$). UBB/22 je dobroj pozitivnoj korelaciji s brojem koliformnih bakterija i *E. coli* ($r=0,40-0,44$, $p<0,05$), dok je kod UBB/37 korelacije nešto slabija ($r=0,30-0,33$, $p<0,05$). UBB/37 i UBB/22 pokazuju sličnu korelaciju s ENT ($r=0,30-0,36$, $p<0,05$) i PA ($r=0,20-0,21$, $p<0,05$), a s mutnoćom vode jače je povezan UBB/22 ($r=0,32$, $p<0,05$) u odnosu na UBB/37 ($r=0,17$, $p<0,05$).

Tablica 2. Matrica linearne korelacije između mikrobioloških i fizikalno-kemijskih parametara

	UBB/ 37	UBB/ 22	KB	EC	ENT	PA	M	Rez Cl	Tv	TZ
UBB/ 37	1,00									
UBB/ 22	0,78	1,00								
KB	0,30	0,40	1,00							
EC	0,33	0,44	0,92	1,00						
ENT	0,30	0,36	0,62	0,78	1,00					
PA	0,21	0,20	0,25	0,24	0,24	1,00				
M	0,17	0,32	0,73	0,32	0,19	0,23	1,00			
Rez Cl	-0,05	-0,05	-0,07	-0,07	-0,05	-0,12	-0,12	1,00		
Tv	0,10	0,04	0,02	-0,01	0,07	0,47	-0,03	0,21	1,00	
Tz	0,10	0,03	0,00	-0,02	0,08	0,34	-0,05	-	0,40	1,00

UBB/37 – ukupni broj bakterija na temperaturi inkubacije 37°C (cfu/ml); UBB/22 – ukupni broj bakterija na temperaturi inkubacije 22°C (cfu/ml); KB – koliformne bakterije (cfu/100 ml); EC – *Escherichia coli* (cfu/100 ml); ENT – enterokoki (cfu/100 ml); PA – *P. aeruginosa* (cfu/100 ml); M – mutnoća (NTU); Rez Cl – koncentracija rezidualnog klora (mg/l); TZ – temperatura zraka (°C); Tv – temperatura vode (°C);
cfu – colony forming unit – broj izraslih kolonija

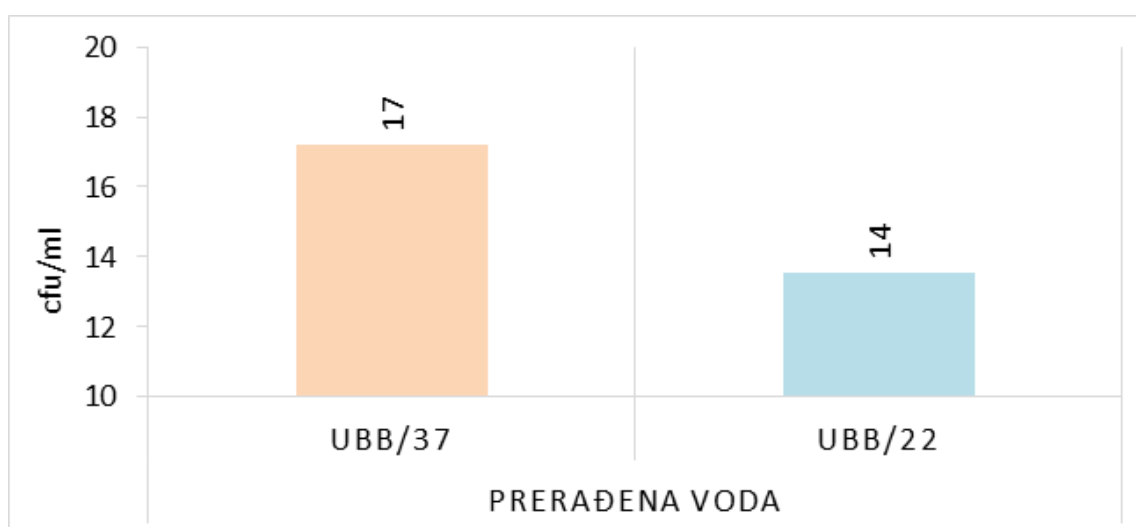
* podebljani koeficijenti korelacije su statistički značajni; crveno su označene korelacije UBB/22 i UBB/37 s koeficijentom >0,40

4.3 Prerađena voda – PGŽ (1998.-2015.)

Termin prerađena voda koristi se za vodu koja je prošla određeni tretman prerade, najčešće dezinfekciju kloriranjem, te se nalazi u razvodnoj mreži distribucijskog sustava.

4.3.1 Ukupna razlika UBB/37 vs UBB/22

T-test je pokazao značajan utjecaj promjene temperature inkubacije na porast broja kolonija u prerađenoj vodi vodovoda u PGŽ ($p < 0,001$; $N = 41.076$). Na Slici 13 se vidi da je srednja vrijednost UBB/37 (17 cfu/ml) veća od srednje vrijednosti UBB/22 (14 cfu/ml).



Slika 13. Srednje vrijednosti UBB/37 i UBB/22 u prerađenoj vodi ($N = 41.076$)

1.1.1 Korelacije mikrobioloških i fizikalno-kemijskih parametara

Tablica 3 prikazuje koeficijente korelacije između ispitanih mikrobioloških i fizikalno-kemijskih parametara u prerađenoj vodi. UBB/37 i UBB/22 međusobno su u značajnoj pozitivnoj korelaciji ($r = 0,51$, $p < 0,05$). UBB/37 je dobroj pozitivnoj korelaciji s brojem koliformnih bakterija, fekalnim koliformni bakterijama i enterokokima ($r = 0,50-0,57$, $< 0,05$) UBB/22 pokazuje jaku korelaciju s fekalnim koliformnim bakterijama ($r = 0,82$, $p < 0,05$), dok je korelacija s koliformnim bakterijama slabija ($r = 0,45$, $p < 0,05$). S koncentracijom rezidualnog klora UBB na obje temperature pokazuje značajnu negativnu korelaciju ($r = -0,16$ do $-0,22$, $< 0,05$).

Tablica 3. Matrica linearne korelacije između mikrobioloških i fizikalno-kemijskih parametara

	UBB/ 37	UBB/ 22	KB	FKB	EC	ENT	PA	M	Rez Cl	Tv	TZ
UBB/ 37	1,00										
UBB/ 22	0,51	1,00									
KB	0,57	0,45	1,00								
FKB	0,57	0,82	0,90	1,00							
EC	0,35	0,40	0,90	-	1,00						
ENT	0,50	0,39	0,71	0,67	0,44	1,00					
PA	0,14	0,14	0,04		0,04	0,001	1,00				
M	0,16	0,13	0,16	0,36	0,15	0,22	-0,02	1,00			
Rez Cl	- 0,16	-0,22	-0,04	-	-0,04	-0,03	0,04	0,01	1,00		
Tv	-0,18	-0,02	0,03	0,03	0,37	0,07	0,03	-0,02	-0,08	1,00	
Tz	0,21	-0,06	0,03	0,03	-0,31	0,03	-	-0,05	-	0,50	1,00

UBB/37 – ukupni broj bakterija na temperaturi inkubacije 37°C (cfu/ml); UBB/22 – ukupni broj bakterija na temperaturi inkubacije 22°C (cfu/ml); KB – koliformne bakterije (cfu/100 ml); FKB – fekalne koliformne bakterije (cfu/100 ml); EC – *Escherichia coli* (cfu/100 ml); ENT – enterokoki (cfu/100 ml); PA – *P. aeruginosa* (cfu/100 ml); M – mutnoća (NTU); Rez Cl – koncentracija rezidualnog klora (mg/l); TZ – temperatura zraka (°C); Tv – temperatura vode (°C); cfu – colony forming unit – broj izraslih kolonija

* podebljani koeficijenti korelacije su statistički značajni; crveno su označene korelacije UBB/22 i UBB/37 s koeficijentom >0,40

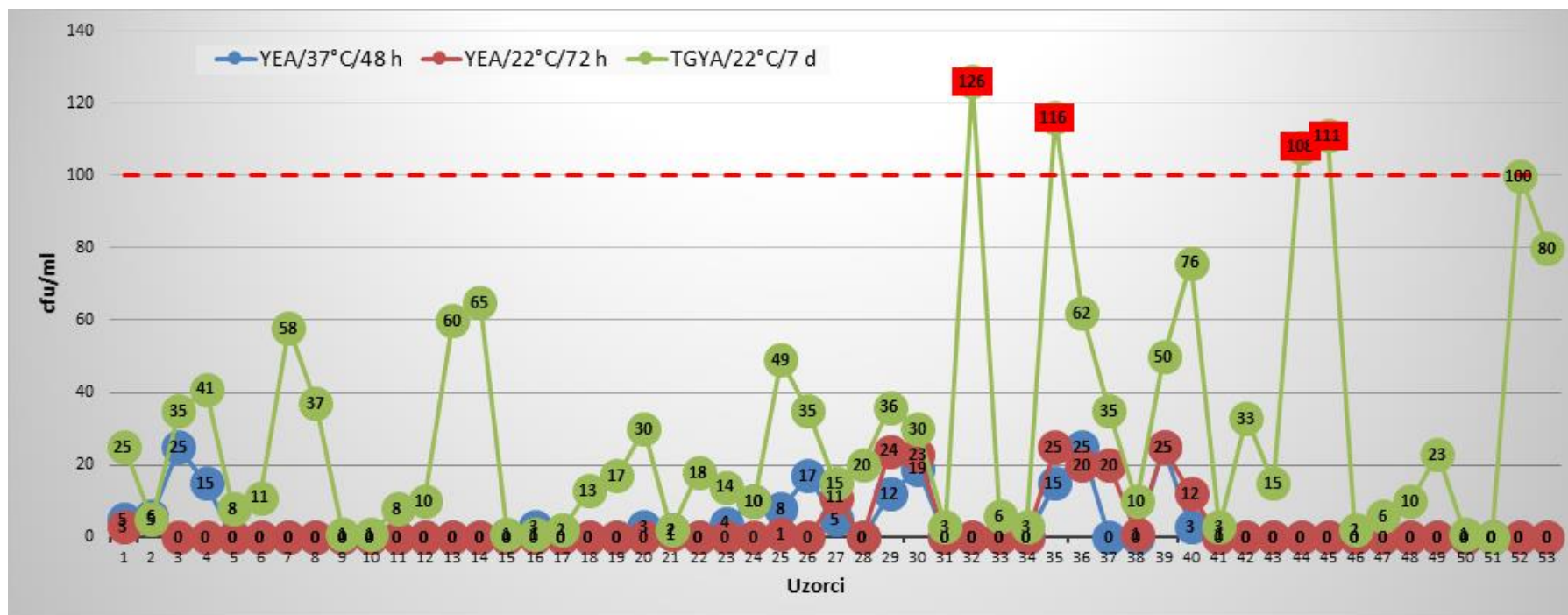
4.4 Voda za potrebe hemodijalize

Tijekom ispitivanja broja kolonija (N=138) u vodi za potrebe hemodijalize primijenjena su:

- 2 medija
 - 1) YEA
 - 2) TGYA
- 2 temperature inkubacije
 - 1) 37 °C
 - 2) 22 °C
- 3 perioda inkubacije
 - 1) 48 h
 - 2) 72 h
 - 3) 7 dana.

Statistička obrada rezultata usporednih analiza pokazala je da se srednje vrijednosti UBB primjenom YEA medija na temperaturi 22 °C i 37 °C razlikuju minimalno, što nije statistički značajno (UBB/22=3,6 cfu/ml i UBB/37=4,3 cfu/ml), a dobivene vrijednosti daleko su ispod propisane MDK. Međutim, rezultati dobiveni primjenom TGYA medija na temperaturi od 22 °C i vremenu inkubacije od 7 dana daju značajno više brojeve heterotrofnih bakterija (ANOVA, $F_{2,138}=27,01$, $p<0,001$) u odnosu na rezultate dobivene korištenjem YEA hranjivog medija (sr. vr. = 30,3 cfu/ml).

Na slici 14 je vidljivo kako su primjenom TGYA kao hranjive podloge srednje vrijednosti UBB-a u pravilu više u odnosu na YEA. Vrlo je signifikantno da u 4 slučaja (4/138, 2,8% rezultata) vrijednosti dobivene primjenom TGYA medija premašuju MDK vrijednost (100 cfu/ml) definiranu Pravilnikom (NN 125/03).

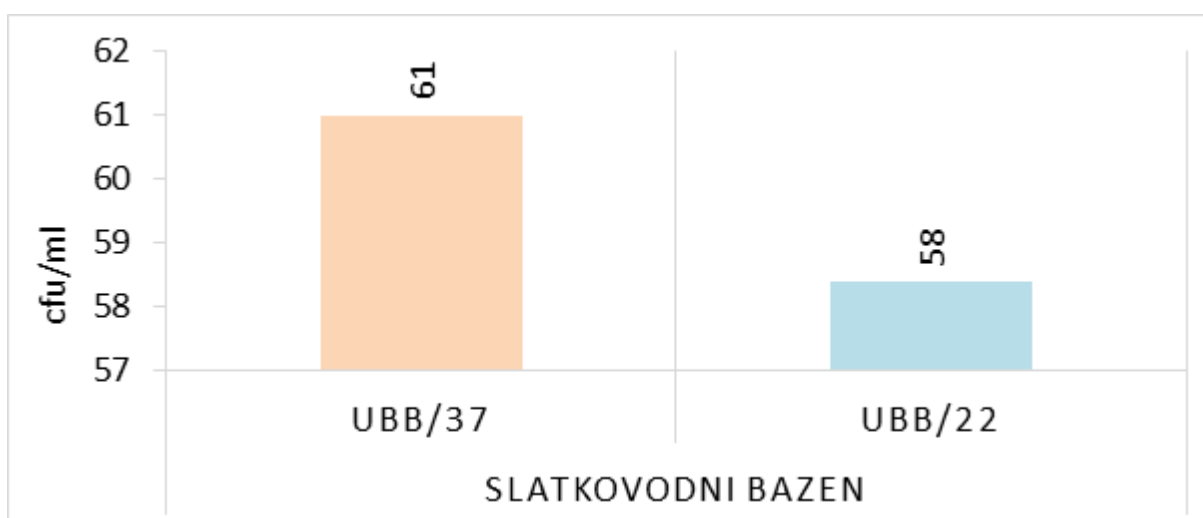


Slika 14. Srednje vrijednosti UBB na različitim temperaturama inkubacije (37 i 22°C), vremenu inkubacije (48 h , 72 h i 7 dana) i različitim hranjivim medijima (YEA i TGYA) u vodi za potrebe hemodijalize (N=47; na grafu nisu prikazani rezultati kod kojih su sva tri ispitana parametra iznosila "0")

4.5 Rekreativna voda – bazeni

4.5.1 Ukupna razlika UBB/37 vs UBB/22 u bazenima sa slatkom vodom – PGŽ (1998.-2015.)

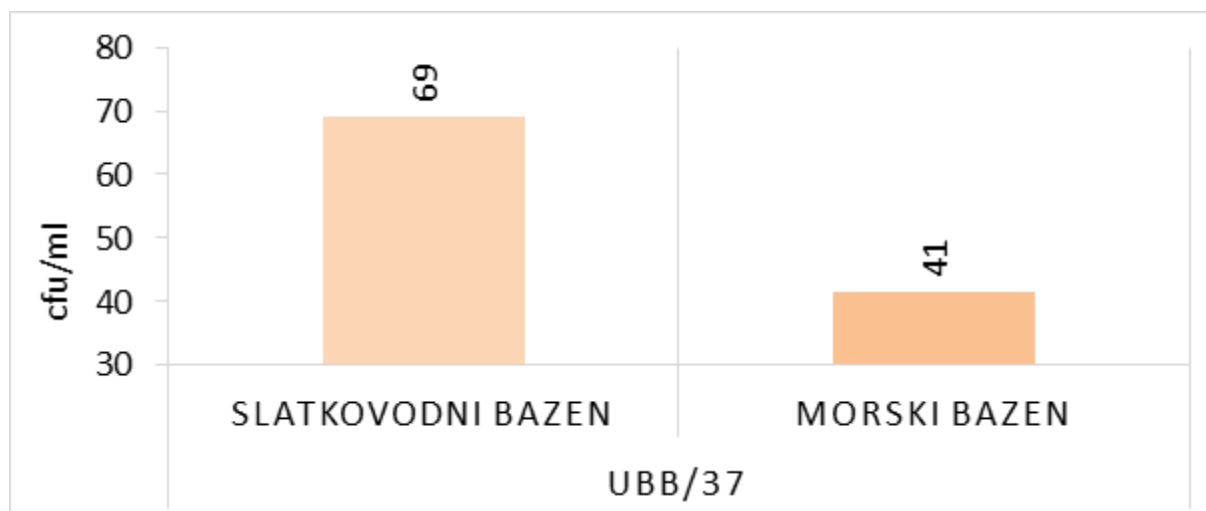
Prema rezultatima t-testa uzorci slatkovodnih bazena značajno se ne razlikuju prema broju UBB na temperaturi inkubacije od 22 °C i 37 °C (N = 8.379). Slika 15 prikazuje da je srednja vrijednost ukupnog broja bakterija u sirovoj vodi neznatno veća pri temperaturi 37 °C (61 cfu/ml) nego pri 22 °C (58 cfu/ml).



Slika 15. Srednje vrijednosti UBB/37 i UBB/22 u vodi slatkovodnih bazena (N = 8.379)

4.5.2 UBB/37 slatki vs morski bazeni – PGŽ (1998.-2015.)

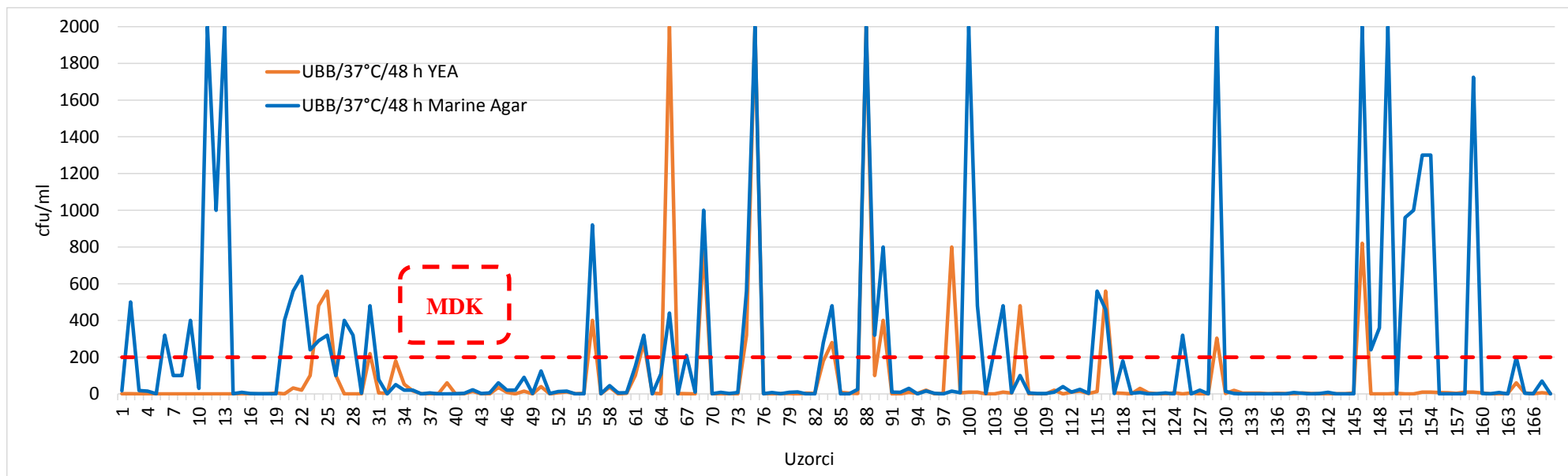
Na Slici 16 prikazane su srednje vrijednosti UBB/37 u bazenima punjenim morskom i slatkom vodom. Statistička obrada rezultata (N=6.930) je pokazala da su srednje vrijednosti UBB/37 značajno veće u slatkovodnim bazenima (69 cfu/ml) u odnosu na morske (41 cfu/ml) (ANOVA, $F_{1,6930}=13,12$, $p<0,001$).



Slika 16. Srednje vrijednosti UBB/37 u vodi slatkovodnih i morskih bazena (N = 6.930)

4.5.3 UBB/37/48 h – Marine agar vs YEA u morskim bazenima

Slika 17 prikazuje više vrijednosti broja kolonija primjenom Marine agar medija u odnosu na YEA medij, u istim uvjetima inkubacije (N=686, 37 °C/48 h). ANOVA analiza podataka je pokazala da su vrijednosti statistički značajno različite (ANOVA, $F_{1,686}=10,11$, $p<0,002$).



Slika 17. Srednje vrijednosti UBB-a na različitim hranjivim medijima (YEA i Marine agar, isti uvjeti inkubacije 37 °C/48 h) u vodi morskih bazena (N = 166)

5 RASPRAVA

Ukupan broj bakterija predstavlja koristan parametar kakvoće vode. Praćenjem promjena u broju poraslih kolonija tijekom dugoročnog monitoringa, mogu se uočiti promjene u flori pitke vode [1]. Istraživanja provedena u ovom radu su pokazala da dobivene vrijednosti ukupnog broja bakterija u istom uzorku vode variraju, ovisno o uvjetima njihova uzgoja, što treba uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata.

Prema dobivenim rezultatima kod sirove vode utjecaj temperature na vrijednosti broja UBB/22 i UBB/37 pokazao se statistički značajnim. Veća srednja vrijednost dobivena je pri temperaturi inkubacije od 22 °C što, ukazuje na prisutnost onih bakterijskih vrsta kojima odgovaraju niže temperature inkubacije, dakle onih vrsta koje normalno obitavaju u vodenom okolišu. Vrijednosti UBB/22 u odnosu na UBB/37 su više kod svih vodovoda u PGŽ, izuzev kod onog najopterećenijeg (Delnice, UBB/22=318 cfu/ml) kao i najmanje opterećenog vodovoda (Žrnovnica, UBB/22=18 cfu/ml). Što se tiče omjera poraslih kolonija na 22 °C i 37 °C tiče, najveći su u Čabru ($\frac{UBB/22}{UBB/37} = 5,2$) i u Vrbovskom ($\frac{UBB/22}{UBB/37} = 3,7$), što može ukazivati na onečišćenje saprofitnim bakterijama iz čistog tla, koje su od malog značaja [21]. Međutim, upravo se na području Čabra i Vrbovskog heterotrofne bakterije redovito javljaju uz indikatore fekalnog onečišćenja (*E. coli* i enterokoki), čiju je detekciju lakše interpretirati.

Istraživanje provedeno u Austriji pokazalo je da na nižim temperaturama (22 °C) prevladavaju Pseudomonadaceae i Aeromonadaceae, a na višoj temperaturu (37 °C) dominiraju Enterobacteriaceae, *Citrobacter* spp. i Bacilli [10]. To je u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da tjelesna temperatura potiče rast bakterija fekalnog podrijetla (enterobakterija) dok će okolišna temperatura dominantno omogućiti oporavak *Aeromonas* spp [5].

Što se tiče prerađene vode iz razvodne mreže svih vodovoda, porast broja kolonija na 37 °C je značajno veći od 22 °C, što također može značiti da se u vodi nalaze bakterije koje se mogu naći u ljudskom organizmu, kao što su primjerice koliformne bakterije ili crijevni enterokoki.

Iako nema dokaza da su, u odsutnosti fekalne kontaminacije, vrijednosti broja heterotrofnih bakterija direktno povezane s zdravstvenim rizikom, u nekim slučajevima povišene vrijednosti (pogotovo pri temperaturama od 37°C), mogu indicirati na fekalnu kontaminaciju. Osim toga, organizmi rasli u okruženju s niskim hranjivim vrijednostima pokazuju veću rezistenciju na dezinficijense od onih koji su rasli u laboratorijskim uvjetima, pa se rezultati ispitivanja rasta i preživljavanja bakterija u vodi za piće trebaju oprezno interpretirati. Potrebno je imati u vidu da se metodama dokazivanja ukupnog broja bakterija u vodi detektira samo manji udio od ukupnog broja bakterija u vodi [1].

Parametri UBB/22 i UBB/37 su međusobno dobro korelirani ($r=0,78$ u sirovoj i $r=0,51$ u prerađenoj vodi), a značajne korelacije uočene su i sa koliformnim bakterijama, *E. coli*, enterokokima i *P. aeruginosa*. Od fizikalno-kemijskih parametara postoji značajna povezanost s mutnoćom. U prerađenoj vodi postoji statistički značajna negativna korelacija broja kolonija i koncentracije rezidualnog klora.

Promatrajući parametre pojedinačno uočavamo da je UBB/37 najviši u sirovoj vodi vodovoda Delnice (348 cfu/ml) a najmanji u Žrnovnici (19 cfu/ml), dok se UBB/22 dominantno javlja u svim vodovodima G. kotara (Vrbovsko, Čabar i Delnice, 318-453 cfu/ml), a najmanje vrijednosti opet se bilježe u vodovodu Žrnovnica (18 cfu/ml).

Tijekom ispitivanja broja kolonija (N=138) u vodi za potrebe hemodijalize primijenjena su 2 medija: 1) YEA i 2) TGYA; 2 temperature inkubacije: 1) 37 °C i 2) 22 °C; 3 perioda inkubacije: 1) 48 h, 2) 72 h i 3) 7 dana. Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti vode za potrebe hemodijalize (NN 125/03) nije propisana metoda ispitivanja (temperatura, vrijeme inkubacije, kao ni vrsta agara).

Rezultati usporednog ispitivanja pokazuju da je za kultivaciju uzoraka vode za hemodijalizu prikladniji medij TGYA, primjenom kojeg se dobivaju značajno viši rezultati. Dobiveni rezultati ukazuju da su u uzorcima prisutne bakterijske vrste kojima za porast najviše odgovara visoko hranjivi medij, okolišna temperatura inkubacije (22 °C) kao i produženo vrijeme inkubacije (7 dana). U navedenim uvjetima kultivacije određeni udio uzoraka (2,8%) nije zadovoljio propisane standarde (NN 125/03), dok su korištenjem rutinske metode HRN EN ISO 6222:2000 svi uzorci zadovoljili, što indicira da primjena standardne metode podcjenjuje rezultate.

Obzirom da je riječ o vrsti uzoraka koja zahtijevaju posebnu pažnju, ovaj rezultat je uznemirujući. Pacijenti na hemodijalizi pripadaju skupini imunokompromitiranih ljudi, koji se mogu zaraziti oportunističkim patogenima iz vode, a koji za zdrave osobe ne predstavljaju rizik [2]. Prilikom interpretacije rezultata ispitivanja potrebno je kod svih vrsta voda, a posebice specifičnih uzoraka poput vode za hemodijalizu, pratiti trend dugoročnih rezultata, bez obzira na propisanu MDK vrijednost, kako bi se mogle uočiti nagle promjene ili trend porasta broja kolonija u određenom periodu. Osim jedinica za hemodijalizu, područja povećanog rizika su i druge zdravstvene ustanove i stomatološke ordinacije. U cilju osiguranja kakvoće vode, a zbog izrazite osjetljivosti korisnika ovih ustanova, potrebna je izrada plana sigurnosti vode (eng. WSP – Water Safety Plan), te uz praćenje broja heterotrofnih bakterija, dodatno kontrolirati rast *Legionella* i *P. aeruginosa*. Detekcija rodova *Pseudomonas* spp., *Burkholderia* i *Stenotrophomonas* može predstavljati povećan zdravstveni rizik za osjetljive pacijente.

Porast UBB/37 bio je značajno veći u bazenima sa slatkom vodom u odnosu na bazene punjene morskom vodom. Mogući razlog značajno većeg porasta broja kolonija na 37 °C u slatkim bazenima je primjena hranjivog agara koji svojim sastavom više odgovara potrebama bakterija prisutnim u slatkovodnim sustavima (medij YEA definiran Pravilnikom NN 107/12).

Obzirom da se morskim bakterijama ne osiguravaju optimalni uvjeti kultivacije, moguće je da su u rutini vrijednosti UBB/37 u uzorcima bazena punjenim morskom vodom podcijenjeni. Predmetnim Pravilnikom (NN 107/12) bilo bi korisno za ispitivanje uzoraka morskih bazena propisati upotrebu Marine agara, što bi omogućilo porast kolonija u broju koji što vjernije odražava "pravi broj ukupnih kolonija" u uzorku.

Obzirom na navedeno, morski bazeni dodatno su ispitani usporednom primjenom dva hranjiva agara: 1) YEA medij, koji se koristi u rutini i propisan je Pravilnikom NN 107/12 i 2) Marine agar, koji je svojim sastavom prilagođen potrebama bakterija koje žive u morskoj vodi. Primijenjeni su isti uvjeti inkubacije (37 °C/48 h). Prema rezultatima ispitivanja kultivacija na Marine agaru daje značajno više rezultate u odnosu na YEA hranjivi medij. Kod 8,4% uzoraka (29/344), primjenom Marine agara došlo je do prekoračenja MDK (200 cfu/ml) za UBB/37 u bazenskoj vodi, propisane Pravilnikom NN 107/12. Značajno je da je u čak 5 uzoraka (5/29, 17,3%) broj kolonija na Marine agaru veći za čak tri reda veličine.

Za identifikaciju poraslih kolonija primijenjen je API test. U uzorcima vode morskog bazena identificirana je *Pseudomonas putida* (71,8%) i *Sphingomonas paucimobilis* (99,4% i 96,4%). *P. putida* je Gram-negativna bakterija koja se najčešće može naći u tlu i vodi. S obzirom na to da je ova bakterijska vrsta karakteristična po tome što kolonizira korijen biljke te je na taj način štiti od patogena, često se koristi u bioinženjerstvu za proizvodnju pesticida. Također, sposobna je razgraditi razne organske tvari te polistiren, za kojeg se smatralo da nije biorazgradiv, te se stoga koristi u istraživanjima procesa bakterijske bioremedijacije tla. *P. putida* se smatra ne-patogenom vrstom iz roda *Pseudomonas*, međutim izolirana je iz uha, grla i nosa kod desetak pacijenata koji su bolovali od kroničnog sinusitisa [22].

P. aeruginosa je najpoznatiji i vrlo česti oportunistički patogen te ubikvintarna bakterija pa se stoga može često naći u vodama. Sposoban rasti u uvjetima s niskim hranjivim vrijednostima, iako ne postoje dokazi o povezanosti konzumiranja pitke vode s gastrointestinalnim

infekcijama *Pseudomonas*om. Dokazano je da u količinama većim od 10^6 CFU/ml kolonizira crijeva, ali bez pojave simptoma. Ipak, *P. aeruginosa* normalno nije prisutan u tretiranoj vodi, jer se ne može natjecati s *P. fluorescens*, kojem za rast i razvoj odgovaraju niže temperature [1]. Broj dozvoljenih kolonija *P. aeruginosa* u vodi namijenjenoj za ljudsku potrošnju, prema pravilima Europske unije, pa tako i prema pravilima Republike Hrvatske, je 0, dok se u Sjedinjenim Američkim Državama ovaj parametar ne koristi kao pokazatelj kakvoće vode. S obzirom na to da je riječ o ubikvintarnoj bakteriji smatra se kako je ne samo nepraktično eliminirati *P. aeruginosa* iz vode i hrane, nego da takvi pokušaji mogu proizvesti dezinfekcijske nusprodukte, mnogo opasnije od same bakterije [8].

S. paucimobilis je Gram-negativna, nesorogena bakterija. Bakterije iz roda *Sphingomonas* mogu se naći u slatkoj i slanoj vodi te za svoj rast i razvoj mogu iskorištavati onečišćujuće tvari, primjerice pesticide, pa se istražuje njihova moguća primjena u biotehnologiji, bioremedijaciji i prehrambenim tehnologijama. Neke vrste iz roda *Sphingomonas* pokazale su se patogenima, posebice vrsta *S. paucimobilis*, izolirana iz bolničke opreme, vode, zraka, boca vode, koje su se nalazile pokraj bolničkih kreveta itd. Može izazvati bakterijemiju, upalu potrbušnice, ulkuse na nogama, meningitis, urinarne infekcije itd. [23].

Iako bakterije vrste identificirane u uzorcima vode iz morskog bazena (*P. putida* i *S. paucimobilis*) u velikim koncentracijama predstavljaju zdravstveni rizik, ipak, u praksi nema jasnih dokaza da ingestijom heterotrofnih bakterija dolazi do pojave bolesti. Neke heterotrofne bakterije mogu biti uzročnici bolničkih i ostalih infekcija ali u rijetkim (slučajevima 1/10 000) [1]. Zabilježeni su slučajevi kada su pacijenti liječeni na odjelu intenzivne njege kolonizirani ili zaraženi bakterijom *S. paucimobilis*. Većinom je pronađen koloniziran u sputumu, dok je jedna osoba preboljela simptomatsku urinarnu infekciju [1].

Brojne heterotrofne bakterije kao što su *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* su ubikvintarne. Mogu biti prisutne u vodi za

piće, te kolonizirati imunokompromitirane osobe i kod njih izazvati bolničke i ne-bolničke infekcije, odnosno predstavljati zdravstveni rizik. Međutim istraživanja pokazuju kako se ne prenose pitkom vodom. Infektivna doza oportunističkih patogena niža je za imunokompromitirane osobe ili osobe koje su na terapiji antibioticima [1].

Što se tiče različitih kriterija ocjene zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju koji se koriste širom svijeta vezano za UBB/22, većina zemalja nema propisanu numeričku vrijednost. Konkretno, za UBB/22 izjednačeni smo s Nizozemskom, dok ostale uspoređene zemlje/regije/organizacije (EU, Njemačka, Slovenija, BIH, Srbija, SAD, WHO) ili nemaju definiran kriterij ili je on izražen kao "bez značajne promjene".

Sagledavajući UBB/37, stroži kriterij od našega ima Srbija (10 cfu/ml), dok je u Sloveniji u primjeni blaži standard (100 cfu/ml). U ostalim uspoređenim područjima kriterij ili ne postoji ili je također izražen kao "bez značajne promjene". IWA monografija navodi kako značenje termina "bez značajne promjene" odnosno "nagle promjene broja bakterija" nije definirano, kao niti te postupak procjene. Opisani su primjeri na koji način pojedini distributeri vode za ljudsku potrošnju procjenjuju situacije kada je došlo do *naglih* promjena u broju kolonija. Tako je npr. za pojedine sustave definirano da se mjere poduzimaju u slučaju kada se broj kolonija poveća u rasponu 0,5 log do > 2,3 log. Neki primjenjuju usporedbu rezultata sa srednjim vrijednostima (različitog perioda, od nekoliko tjedana do godine dana) [1].

6 ZAKLJUČAK

- U sirovoj vodi veći je porast UBB/22, a u prerađenoj UBB/37
- Uzorci vode za hemodijalizu pokazuju najveći broj kolonija na TGYA/22 °C/7 dana – standardna HRN EN ISO 6222 podcjenjuje rezultate
- UBB/37 uz medij YEA pokazuje značajno veći porast iz uzoraka slatkih u odnosu na uzorke morskih bazena – medij YEA bolje je prilagođen nutritivnim potrebama slatkovodnih bakterija
- Uzorci morske bazenske vode daju veći porast UBB/37 na Marine agaru nego na YEA (koji je propisan Pravilnikom NN 107/12) – za ispitivanje morske vode prikladnije je koristiti Marine agar
- Kod određivanja UBB promjena metode ima značajan utjecaj na broj poraslih kolonija i sastav mikrobne populacije – potrebno je primijeniti medij i uvjete koji će se omogućiti rast najvećeg broja heterotrofnih bakterija
- Samo su rezultati dobiveni primjenom iste metode (vrste medija, temperature i vremena inkubacije te tehnike inokuliranja) usporedivi
- Nema dokaza da heterotrofne bakterije mogu izazvati bolesti u općoj populaciji, osim kod imunokompromitiranih pacijenata
- Za uspješnu identifikaciju vrsta potrebno je primijeniti nove molekularne metode
- Buduća uloga parametra UBB je dominantno u validacijske i verifikacijske svrhe i u postupku održavanja vodoopskrbnog sustava

7 LITERATURA

1. Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C., Glasmacher, A., Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety, IWA Publishing, 2003., 1- 243.
2. Payment, P, Sartory, D.P., and Reasoner, D.J., The history and use of HPC in drinking – water quality management, IWA Publishing, 2003., 20-45.
3. "Narodne novine" 56/2013, Pravilnik o paramterima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju, Zagreb, 20. studenog 2013.
4. Heterotrofne bakterije, Dostupno na https://sh.wikipedia.org/wiki/Bakterija#Heterotrofne_bakterije. Pristup: 11. srpnja 2016.
5. Allen, M.J., Edberg, S.C. and Reasoner, D.J., Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water? International Journal of Food Microbiology, 2004., 92(3), 265-274
6. HR EN ISO 6222:2000, Brojanje uzgojenih mikroorganizama
7. Reasoner, D.J., Geldreich, E.E., A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water., Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(1), 1-7
8. Hardalo, C. and Edberg, S.C., Pseudomonas aeruginosa: Assessment of Risk from Drinking Water, Critical Reviews in Microbiology, 1997, 23(1):47-75 .
9. Norton, C.D., LeChevallier, M.W., A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution, Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1), 268-76

10. Gesenberg, E.T., Gossel, E.M., Antonielli, L., Sessitsch, A., Kostić, T., 2015., Effect of different heterotrophic plate count methods on the estimation of the composition of the culturable microbial community. PeerJ 3, e862
11. "Narodne novine" 125/03, Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za potrebe hemodijalize, Zagreb, 28. srpnja 2003.
12. " Narodne novine" 79/2007, 113/08, 43/09, Pravilnik o sanitarno – tehničkim i higijenskim uvjetima bazenskih kupališta te o zdravstvenoj ispravnosti bazenskih voda, Zagreb, 23. srpnja 2014.
13. Ljubas D., Seminar: Propisi i norme iz područja pitka voda/potrošna topla voda/leginele), 2016.
14. HR EN ISO 6222, Yeast extract agar (YEA)
15. Difco™ & BBL™ Manual, Marine agar 2216
16. Biolife, Yeast extract agar
17. TSI slant, Dostupno na https://en.wikipedia.org/wiki/TSI_slant, Pristup: 14.srpnja 2016.
18. Vježbenica iz kolegija "Mikrobiologija s parazitologijom", Katedra za mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet u Rijeci
19. Krvni agar, Dostupno na https://en.wikipedia.org/wiki/Agar_plate#Types, Pristup: 14. srpnja 2016.
20. Doc.dr.sc. Ivana Gobin, Fizikalni uvjeti bakterijskog rasta; Metabolizam bakterija, predavanje iz kolegija "Mikrobiologija s parazitologijom"
21. Anonymous (1934) The Bacteriological Examination of Water Supplies, 1st edn. Reports on Public Health and Medical Subjects No. 71, HMSO, London

22. *Pseudomonas putida*, Dostupno na

https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_putida, Pristup:

22.kolovoz 2016.

23. *Sphingomonas*, Dostupno na

<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Sphingomonas>, Pristup: 22.kolovoz

2016.

PRILOG 1

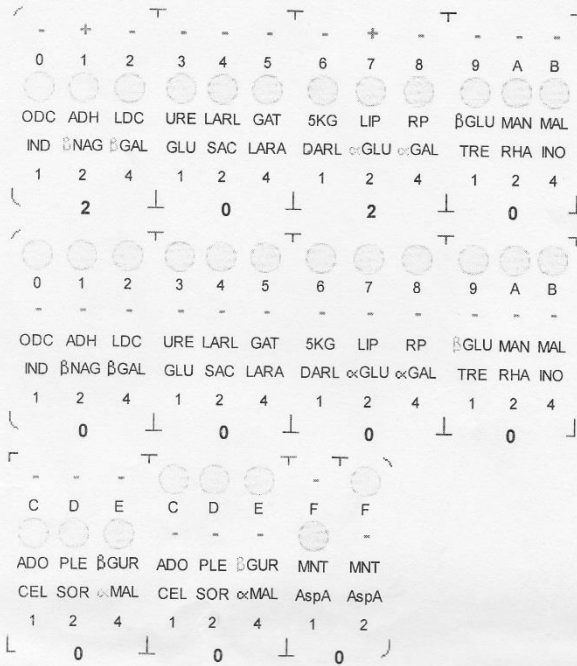
apiweb - Identification result

75

http://localhost/servlet/Identify



ID 32 E V2.0



REFERENCE DATE
4/28/16

COMMENT

LOW DISCRIMINATION

Strip ID 32 E V2.0
 Profile 20200000000
 Note

Significant taxa	% ID	T	Tests against
<i>Pseudomonas putida</i>	71.8	1.0	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	22.0	0.94	
<i>Pseudomonas/Comamonas spp</i>	4.0	0.84	ADH 16% LIP 21%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.9	0.81	URE 78% MNT 81%

Next taxon	% ID	T	Tests against
<i>Acinetobacter/Moraxella spp</i>	0.1	0.57	ADH 0%

Complementary test(s)	42°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0%
<i>Pseudomonas putida</i>	0%
<i>Pseudomonas spp</i>	+(-)
<i>Comamonas spp</i>	v

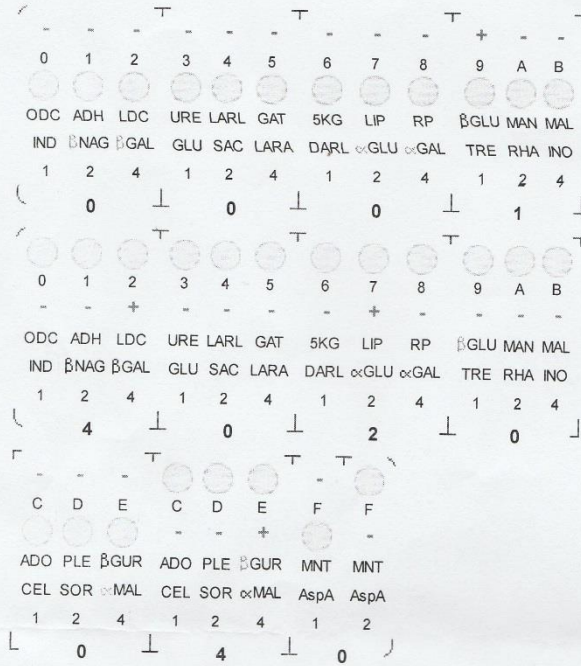
PRILOG 2

apiweb - Identification result

http://localhost/servlet/Identify



ID 32 E V2.0



REFERENCE DATE
4/29/16
COMMENT

VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip ID 32 E V2.0
Profile 00014020040
Note

Significant taxa	% ID	T	Tests against
<i>Sphingomonas paucimobils</i>	99.4	0.85	AspA 85%
Next taxon	% ID	T	Tests against
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	0.2	0.5	URE 100% αGAL100%

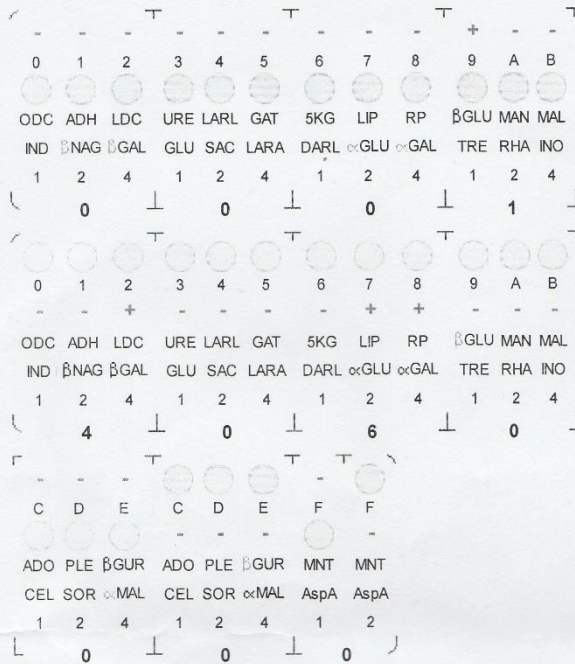
Close

Print

PRILOG 3



ID 32 E V2.0



REFERENCE DATE
4/29/16
COMMENT

GOOD IDENTIFICATION

Strip ID 32 E V2.0
Profile 00014060000
Note

Significant taxa	% ID	T	Tests against
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	96.4	0.91	AspA 85%
Next taxon	% ID	T	Tests against
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	3.5	0.69	URE 100% alpha-MAL 75%

Close

Print

ŽIVOTOPIS

Wendy Vlakančić rođena je 27.8.1992. godine u Rijeci. Nakon završene srednje Medicinske škole u Rijeci 2011. godine, smjer zdravstveno – laboratorijski tehničar, zapošljava se u Nastavnom Zavodu za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije kao pripravnica na radnom mjestu zdravstveno – laboratorijski tehničar. Po završetku staža 2012. godine upisuje Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva.