

MIKROBIOLOŠKA KONTROLA KVALITETE BUNARSKE VODE U SELIMA OPĆINE BRESTOVAC

Ilić, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Polytechnic in Pozega / Veleučilište u Požegi**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:112:668276>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**



VELEUČILIŠTE U POŽEGI
STUDIA SUPERIORA POSEGANA

Repository / Repozitorij:

[Repository of Polytechnic in Pozega - Polytechnic in Pozega Graduate Thesis Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

VELEUČILIŠTE U POŽEGI



Marko Ilić, 1227/12

MIKROBIOLOŠKA KONTROLA BUNARSKE VODE U SELIMA OPĆINE BRESTOVAC

ZAVRŠNI RAD

Požega, 2017. godine.

Veleučilište u Požegi

Poljoprivredni odjel

Preddiplomski stručni studij Prehrambena tehnologija

**MIKROBIOLOŠKA KONTROLA BUNARSKE VODE
U SELIMA OPĆINE BRESTOVAC**

ZAVRŠNI RAD

IZ KOLEGIJA TEHNOLOGIJA VODE I OBRADA OTPADNIH VODA

Mentor: Ana Mrgan, dipl.ing.

Student: Marko Ilić

Matični broj studenta: 1227/12

Požega, 2017. godine

Sažetak:

Zadatak ovog završnog rada je provesti uzorkovanje i mikrobiološku analizu pitke vode iz privatnih bunara. Uzorci vode za analizu, uzeti su sa šest lokacija Općine Brestovac. Analiza vode za piće je obavljena u ovlaštenom laboratoriju Zavoda za javno zdravstvo Požeško-slavonske županije. Uzorci vode su analizirani na mikroorganizme ukupne koliformne bakterije, *Escherichia coli*, Enterokoke, *Pseudomonas aeruginosa*, te ukupan broj kolonija na 37°C i 22°C. Analizom uzetih uzoraka, utvrđeno je da niti jedan uzorak vode, ne odgovara maksimalno dopuštenim koncentraciji (MDK) iz zakonske regulative.

Ključne riječi: mikrobiološko ispitivanje vode, bunar, *Escherichia coli*, Enterokoki, *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract:

The aim of this final work is to make the sampling and microbiological analysis of drinking water from private wells. Water samples for analysis were taken from six locations Municipality Brestovac. Analysis of drinking water is performed in a certified laboratory for analysis of drinking water in the Institute of Public Health of Pozega-Slavonia County. Water samples were analyzed for micro-organisms total coliforms, *Escherichia coli*, *Enterococci*, *Pseudomonas aeruginosa*, and the total number of bacteria at 37°C and 22°C. The analysis of the samples taken is showed that none of the water samples does not match the maximum permitted concentration of the legislation .

Keywords: microbiological testing of water, wells, *Escherichia coli*, *Enterococci*, *Pseudomonas aeruginosa*.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Voda.....	2
2.2. Zakonska regulativa.....	3
2.3. Rad u laboratoriju	4
2.4. Uzorkovanje vode	4
2.5. Općenito o bakterijama.....	5
2.5.1. Građa bakterije	5
2.5.2. Rast i razmnožavanje bakterija	7
2.5.3. Koliformne bakterije.....	8
2.5.4. <i>Escherichia coli</i>	8
2.5.5. Enterokoki	9
2.5.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.6. Hranjive podloge.....	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Opis bunara.....	10
3.2. Metoda membranske filtracije.....	11
3.3. Detekcija i brojanje <i>Escherichia coli</i> i koliformnih bakterija metodom membranske filtracije	12
3.4. Detekcija i brojane Enterokoka metodom membranske filtracije.....	14
3.5. Priprema podloge i određivanje ukupnog broja kolonija na 22°C i 37°C.....	16
3.6. Metoda detekcije i brojanje <i>Pseudomonas aeruginosa</i> metodom membranske filtracije	18
3.6.1. Oksidaza test	19
3.6.2. King's B medij.....	19
3.6.3. Acetamid bujon	20
4. REZULTATI.....	21
5. RASPRAVA.....	24
6. ZAKLJUČAK	25
LITERATURA.....	26

1. UVOD

Poznato je da je voda jedan od osnovnih uvjeta za život na našoj planeti, jer je neophodna za odvijanje svih vitalnih procesa u biosferi. Uloga vode je nezamjenjiva u razmjeni nutrijenata u čovjekovom organizmu, u održavanju osobne i opće higijene. Osim fiziološke potrebe, voda ima jako značajnu ulogu u ekonomskom smislu, gdje služi u proizvodnji namirnica i u zadovoljenju brojnih potreba u prirodi, poljoprivredi i industriji. Uz sve dobrobiti što donosi voda, ona je vektor za prenošenje ne samo veoma teških zaraza, već i opasnih kemikalija, kancerogenih, radioaktivnih i drugih materijala. Zbog velike onečišćenosti prirodnih voda mnoge države, pa i međunarodna zajednica, nastoje da zaštite vode, a posebno vodu za piće, od bilo kojeg oblika onečišćenja. Onečišćenje vode za piće i utvrđivanje stupnja njene zagađenosti, mnogobrojnim mikrobiološkim i fizičkim zagađivačima i raznovrsnim kemijskim sastojcima, postaje sve veći zdravstveni i općedruštveni problem.

Mikrobiološka ispravnost vode je jedan od najznačajnijih pokazatelja kvalitete vode za piće. Mikroorganizmi u vodu mogu dospjeti putem raznih zagađenja ispiranjem zemljišta, iz zraka ili najčešće ispuštanjem različitih otpadnih voda. Osiguranje zdravstvene ispravnosti vode za piće, jedna je od osnovnih mjera zaštite zdravlja ljudi. Zdravstveno neispravna voda može uzrokovati razne bolesti. Potrebno je zaštititi izvorišta vode za piće, pročišćavati vodu i redovno ispitivati kvalitetu vode, a kontrola zdravstvene ispravnosti vode za piće, u Republici Hrvatskoj provodi se u skladu sa Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju.

Cilj ovog završnog rada je provesti uzorkovanje bunarske vode sa više lokacija općine Brestovac i pomoću analitičkih metoda utvrditi dali je bunarska voda uzetih uzoraka mikrobiološki čista i dali takva voda zadovoljava parametre koji su određeni u zakonskoj regulativi.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Voda

Osnovni kemijski sastav vode (H_2O) čini spoj vodika i kisika. Fizikalna i kemijska svojstva vode omogućavaju razmjenu tvari i stvaranje živih stanica. Voda je bila i ostala osnovni preduvjet za održavanje i razvoj svih organizama na Zemlji. Sastav vode omogućava živim organizmima da dišu, preživljavaju i razmnožavaju se. Na Zemlji preko 70% površine zauzimaju oceani, mora, rijeke, jezera. Ljudskom organizmu je potrebna voda zbog njezinog sastava i sadržaja minerala. Minerali su nužni za zdravlje organizama. Mineralni sastojci i elementi u tragovima, ključni su element kvalitetne vode, a time i ključni za život i neophodni za ljudski organizam, jer ih on sam ne proizvodi. Organizam obavljanjem osnovnih vitalnih funkcija, disanjem i znojenjem, oslobađa minerale i elemente u tragovima. Zato je potrebno da te elemente nadomjesti svakodnevnom konzumacijom dovoljne količine kvalitetne vode, ali i pravilnom i kvalitetnom prehranom (Aqua, 15.8.2016., url).

Voda na zemlji je u stalnom kruženju. Voda na površini zemlje isparava iz mora, kopnenih voda, pa i iz same zemlje i biljaka. Ta voda odlazi u atmosferu, gdje se pod utjecajem atmosferskih aktivnosti ponovno spušta na zemlju u obliku kiše, snijega, magle ili rose. Voda izvire iz dubine zemlje, iz prirodnih izvora ili se crpi iz vodenih bušotina. Ti izvori toliko su duboko u zemlji, da su zaštićeni od zagađivanja i bilo kakvog direktnog utjecaja sa zemljine površine. Zato je voda koja izvire iz zemlje vrlo čista i često ljekovita, jer sadrži minerale, elemente u tragovima i druge sastojke, uzete iz dubine zemlje. Mineralna voda, nastaje u ciklusu kruženja vode na zemlji. Mineralna voda koju danas pijemo je u stvari oborinska voda koja je stotinama tisuća godina unazad prodrla u zemlju. Tijekom prodiranja pročišćavala se prolaskom kroz slojeve zemlje i istovremeno se obogaćivala mineralima, elementima u tragovima i ugljičnim dioksidom iz dolomita karbonatnog podrijetla. Stolna voda je mehanički i kemijski pročišćena voda, koja izvorno ne mora biti čista. Ona se postupcima obrade i dodavanjem dopuštenih kemijskih tvari dovodi u stanje za organizam prihvatljive, pitke vode. Takvu vodu dobivamo iz gradskog vodovoda (Aqua, 15.8.2016., url).

2.2. Zakonska regulativa

Prema Zakonu o vodi za ljudsku potrošnju (2013, 2015), voda za ljudsku potrošnju je sva voda koja je u izvornom stanju ili je obrađena, a namijenjena za piće, kuhanje ili za druge potrebe u kućanstvu, bez obzira potječe li iz javne vodoopskrbe, cisterne ili iz boce. Kako bi se održala kakvoća vode, zdravstvena ispravnost i zaštitili interesi potrošača, provode se redovite analize vode. Analiza vode obuhvaća određivanje senzorskih, fizikalno-kemijskih, kemijskih, mikrobioloških i drugih svojstava vode. Zdravstveno ispravnom vodom za ljudsku potrošnju, smatra se voda koja ne sadrži mikroorganizme, parazite, tvari opasne za zdravlje ljudi, odnosno ne prelaze vrijednosti određenih parametara zdravstvene ispravnosti vode. U svrhu zdravstvene ispravnosti vode rade se redovite analize i monitoring vode za ljudsku potrošnju, koje obavlja Hrvatski zavod za javno zdravstvo, odnosno Zavodi za javno zdravstvo županija (Zakon o vodi za ljudsku potrošnju, 2013, 2015).

U tablici 1 prikazani su parametri zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju sa pripadajućim maksimalno dopuštenim koncentracijama (MDK), koji se prate u cilju zaštite ljudskog zdravlja, od nepovoljnih utjecaja mikrobiološkog onečišćenja vode za ljudsku potrošnju i osiguravanja zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju.

Tablica 1. Osnovni parametri zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju (Pravilnik o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju, 2013a, 2013b, 2015).

Pokazatelj	Jedinice voda za piće	MDK
<i>Escherichia coli (E.Coli)</i>	broj/100 ml	0
Ukupni koliformni	broj/100 ml	0
Enterokoki	broj/100 ml	0
Broj kolonija 22°C	broj/1 ml	100
Broj kolonija 37°C	broj/1 ml	20
<i>Clostridium perfringens (uključujući spore)</i>	broj/100 ml	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	broj/100 ml	0

2.3. Rad u laboratoriju

Laboratorij je organizacijsko-radna cjelina u kojoj se izvode različita ispitivanja, a u njegovom radu se upotrebljavaju posebna oprema i uređaji (Wikipedia, 1.10.2016.,url). Prilikom rada u laboratoriju, potrebno je slijediti određena pravila ili upute, kako bi se održala sigurnost osoblja i okoline. Osoblje koje radi u laboratoriju posebno mora paziti na sigurnost, kako ne bi došlo do laboratorijske nezgode. Laboratorijski prostor i oprema se mora držati tokom rada konstantno čistim kako ne bi došlo do kontaminacije izvana. Kako je najveći broj postupaka u laboratoriju rad s mikroorganizmima, sastavni dio rada je sterilnost prostora i opreme. Prilikom ulaska u laboratorij, treba ostaviti svu garderobu i druge predmeta na za to predviđenom mjestu, nikako na radni stol. Tijekom rada u laboratoriju moraju biti zatvorena sva vrata i prozori u prostoriji, kako bi se spriječila kontaminacija zračnim strujanjem. Prije rada u laboratoriju i obavljanja analiza, potrebno je temeljito oprati ruke s tekućim deterdžentom ili sapunom, te ruke posušiti s papirnatim ručnikom. Osobe koje imaju dugu kosu prije rada trebaju kosu zavezati, ili nositi papirnatu kapu. Tijekom cijelog rada u laboratoriju, analitičar treba nositi kutu radi zaštite odjeće od kontaminacije. Nakon završetka laboratorijskih analiza sav upotrijebljeni materijal, pribor i reagensi odlažu se, na za to predviđeno mjesto. Sve zatvorene epruvete, Petrijeve zdjelice, koje su bile upotrijebljene odlažu se zajedno, radi kasnije sterilizacije u autoklavu. Nakon upotrebe, opasne kemikalije se trebaju spremati u posude koje se mogu zatvoriti prije odlaganja, na predviđeno mjesto (Duraković & Duraković, 1997).

2.4. Uzorkovanje vode

Uzorak vode je količina jednokratno uzete vode na jednom mjestu, na propisani način u svrhu laboratorijske analize. Uzimanje vode na slavinama za potrebne fizikalno-kemijske, kemijske i mikrobiološke analize, vrši se u već pripremljene spremnike u skladu s važećim zakonskim propisima. Treba ukloniti sve nastavke sa slavine, kao što su mrežice, gumena crijeva, prskalice i drugo. Otvori se slavina i pusti da voda teče 3 minute (ispiranje). Kada se ispituje utjecaj materijala na kakvoću vode ili rast mikroorganizama u cjevovodu, tada se uzorkuje početni mlaz. Nakon 3 minute ispiranja slavina se zatvori, te upaljačem ili drugim izvorom plamena spali otvor slavine. Voda za mikrobiološku analizu sipa se direktno iz slavine u spremnik. Nakon stavljanja čepa ostavlja se slobodan prostor ispunjen zrakom, što pomaže miješanju prije ispitivanja i izbjegavanju slučajnog onečišćenja. Pri punjenju treba paziti da ne

dođe do onečišćenja boce, čepa boce i otvora slavine. Tijekom uzorkovanja ne smije se dodirivati grlo boce, vrh čepa boce i otvor slavine (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 20.5.2017., url).

2.5. Općenito o bakterijama

Bakteriologija je znanost koja je dio mikrobiologije i proučava morfološka i uzgojna svojstva bakterija, kao što su rast, metabolizam i genetika. Bakterije su jednostanični organizmi, sa jednim kromosomom bez ovojnice, sa dobro razvijenom staničnom stjenkom i citoplazmatskom membranom, u kojoj se odvija većina sinteza, kao i stvaranje energije. Žive u prirodi, kao veliki skup jedinki, koji je nastao od jedne bakterije (Kalenić et. al., 2013).

Bakterije mogu imati različite oblike. Razlikuju se kuglaste bakterije ili koki, štapičaste bakterije ili bacili, zavojite ili spiralne i bakterije u obliku zareza ili vibrio. Veličina bakterija se mjeri mikrometrima (μm) dok se pojedini dijelovi bakterija mjere nanometrima (nm). Duljina bakterija može biti od 0,3 do 20 μm , dok promjer bakterije može biti od 0,5 do 2,0 μm (Volner et. al., 2005).

2.5.1. Građa bakterije

Slika 1 prikazuje bakterijsku stanicu koja se sastoji od citoplazme, jezgrine tvari ili nukleotida, citoplazmatske membrane i stanične stjenke. U citoplazmi se nalaze plazmidi, ribosomi i citoplazmatska zrnca. Također bakterijska stanica može imati i bičeve, fimbrije, pili, kapsulu i spore.

Citoplazma je najveći dio bakterijske stanice. Prema konzistenciji citoplazma je polutekuća i sadrži oko 70% vode. U citoplazmi su otopljene različite organske i anorganske tvari, enzimi, hranjive tvari i otpadne tvari. U citoplazmi se nalaze nukleotid, plazmidi, ribosomi, inkluzijska tjelašca (Kalenić et. al., 2013).

Nukleotid ili jezgrina tvar, u bakterijskoj stanici se nalazi slobodno rasprostranjen u središnjem dijelu citoplazme, jer bakterije nemaju jasno definiranu jezgru obavijenu opnom, pa se zato ubrajaju u prokariote. Jezgrina tvar u bakterijskoj stanici većinom sadrži deoksiribonukleinsku kiselinu DNA i nešto ribonukleinske kiseline RNA, prema tome je i nositelj nasljednih uputa (Kalenić et. al., 2013).

Plazmidi svojim oblikom i ulogom nalikuju na kromosome. Kružnog su oblika i sadrže u sebi gene. Plazmidi imaju funkciju nasljednog aparata, neovisno o jezgri tvari (Volner et. al., 2005).

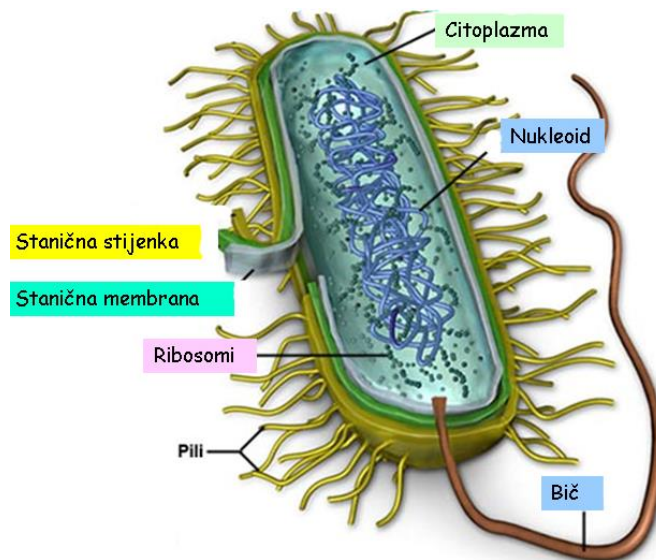
Ribosomi se nalaze u citoplazmi i kuglastog su oblika. Mjesta su gdje se odvija sinteza bjelančevina u bakterijskoj stanici. Većim dijelom se sastoje od RNA, dok su manji dio bjelančevine (Volner, 1996).

Inkluzijska tjelešca se nalaze u citoplazmi u obliku pričuvnih tvari kao zrnca. Mogu biti kao glikogen, polifosfati, sumpor, željezo, plinovi (Kalenić et. al., 2013).

Citoplazmatska membrana omeđuje citoplazmu i sastoji se od lipida i proteina. Lipidi su najvećim dijelom dio fosfolipidnog sloja, dok su proteini integralni dio membrane ili su vezani za površinu membrane (Kalenić et. al., 2013).

Kapsula se sastoji od tanjeg ili debljeg sloja polisaharida na površini bakterijske stanice, omogućuje bakteriji prijanjanje na površine i štiti ih od isušivanja (Kalenić et. al., 2013).

Fimbrije i pili su kratki i nježni, kruti cjevasti nastavci bakterijskih stanica. Fimbrije sudjeluju u adherenciji bakterija na površine. Bičevi ili flageli su organele, s pomoću kojih se bakterije pokreću. To su tanke šuplje cjevčice, promjera 20 nm, a duljine 15-20 μm (Kalinić et. al., 2013).

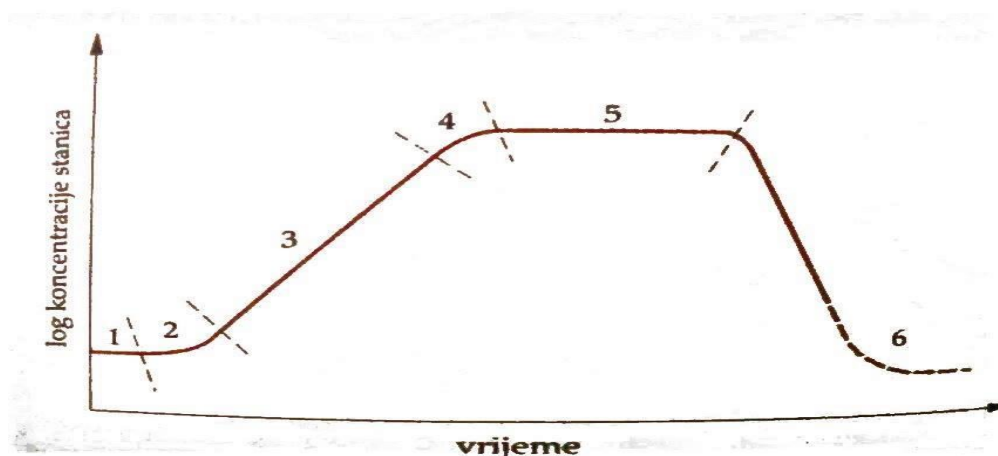


Slika 1. Bakterijska stanica (Anonymous_1, 15.7.2016.,url)

2.5.2. Rast i razmnožavanje bakterija

Kako bi došlo do razmnožavanja bakterija potrebni su povoljni uvjeti, kao što su hranidbeni, energetske, atmosferski i temperaturni uvjeti. Povoljni uvjeti podrazumijevaju dovoljne količine hranjivih tvari, prisutnost ili odsutnost kisika, što ovisi dali su bakterije aerobne ili anaerobne. Također potrebna je optimalna temperatura za razvoj bakterija, povoljna vlaga, kao i pH okoline. Najveći broj bakterija u prirodi, razmnožava se diobom, pri kojoj od jedne bakterijske stanice nespolnim načinom, nastaju dvije stanice kćeri (Volner, 1996). Bakterije u prirodi mogu živjeti kao čiste kulture, međutim uglavnom žive u zajednici s drugim vrstama organizama ili makroorganizmima. U laboratorijskim uvjetima bakterije se uzgajaju kao čiste kulture, odnosno uzgajaju se na različitim hranjivim podlogama gdje se nalaze jedinke iste vrste.

Slika 2 prikazuje krivulju rasta bakterija u vremenu od trenutka kada je bakterija stavljena na hranjivu podlogu. Krivulja rasta se može podijeliti na šest faza. U prvoj fazi odnosno fazi prilagodbe ili suzdržanog rasta bakterije se prilagođavaju na novu sredinu, rastu i pripremaju za diobu. U drugoj fazi odnosno fazi ubrzanog rasta, bakterije imaju dovoljno hranidbenih tvari i stvoreni su optimalni uvjeti za rast. U trećoj fazi dolazi do eksponencijalnog rasta bakterija i do povećanja bakterijske mase. Nakon eksponencijalnog rasta dolazi do smanjenja količine hranidbenih tvari i nastajanja štetnih nusproizvoda, te se zbog njihovog štetnog djelovanja rast i dioba bakterija usporavaju, što se naziva faza usporenog rasta. Poslije faze usporenog rasta bakterije počinju štedjeti hranidbene tvari i energiju te dolazi do faze zastoja rasta. U šestoj fazi dolazi do smanjenja bakterijske mase kao i broja bakterija, te se ta faza može nazvati faza ugibanja (Volner, 1996).



Slika 2. Krivulja rasta bakterija (Volner, 1996).

2.5.3. Koliformne bakterije

Koliformne bakterije su Gram-negativne bakterije (aerobni ili fakultativno anaerobni, sporogeni mikroorganizmi), koji u roku od 48 sati uzgojem u laktoznom bujonu sa Durhamovim cjevčicama proizvode plin i kiselinu, pri temperaturi od 35-37°C. Koliformne bakterije su primarno nepatogene bakterije, koje žive u debelom crijevu čovjeka i toplokrvnih životinja. Koliformne bakterije se izlučuju fekalijama, te dospijevaju u otpadne vode, a preko njih u prirodne vode (E-škola, 12.6.2016., url).



Slika 3. Plavo obojene kolonije *Escherichia coli* i žućkasto obojene kolonije drugih koliformnih bakterija (E-škola, 12.6.2016.,url)

2.5.4. *Escherichia coli*

Rod *Escherichia* ima pet vrsta od kojih je *E. coli* najznačajnija i najprostranjenija. Od svih *Enterobakterija*, *E. coli* je najčešći uzročnik crijevne infekcije kod čovjeka. *E. coli* je po fiziologiji i strukturi tipična *Enterobakterija*. To su kratki Gram-negativni štapići, veličine 2 do 6 µm. *E. coli* može neko vrijeme preživjeti u ljudskom okolišu kao što je voda, zemlja, kao i u hrani. U hrani se lako i brzo razmnožavaju. *E. coli* je osjetljiva na uobičajene dezinficijense (Duraković & Duraković, 1997).

2.5.5. Enterokoki

Enterokoki su Gram-pozitivne bakterije. Stanice enterokoka obično imaju izduženi oblik, ovalnih koka. Dio su normalne flore probavnog sustava i mogu rasti uz prisutnost velike koncentracije žuči i natrijevog klorida. Zbog određenih karakteristika Enterokoki su sposobni rasti i razmnožavati se u nepovoljnim uvjetima, te su rasprostranjeni svugdje u prirodi, biljkama, vodi, tlu i životinjama. Kod ljudi mogu uzrokovati infekcije mokraćnog sustava, kao i respiratorne probleme (Duraković, Duraković, 1997).

2.5.6. *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterije iz roda *Pseudomonas* su aerobni Gram-negativni štapići duljine 1,5 -5 μm , a širine 0,5-1 μm te se pojavljuju pojedinačno, u parovima ili lancima. Mogu se razmnožavati na temperaturi od 4-42°C, dok ih je većina mezofilna i raznožavaju se na temperaturi između 30-35°C. Unutar roda *Pseudomonas* najznačajnija je *Pseudomonas aeruginosa*, koja ima sposobnost naglog rasta, te posjeduje brojne čimbenike virulencije i toksičnosti. *Pseudomonas aeruginosa* najčešće uzrokuje infekcije kod osoba sa oslabljenim imunološkim sustavom i infekcije, respiratornog sustava, kože, oka i mokraćnog sustava (Duraković, Duraković, 1997).

2.6. Hranjive podloge

U laboratoriju se upotrebljavaju različite hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama, ovisno o hranidbenim potrebama mikroorganizama. Različiti mikroorganizmi trebaju različitu okolinu i kombinaciju hranjivih tvari, za svoj rast i razmnožavanje. Hranjive podloge se mogu pripremiti kao tekuće, kao što je hranjivi bujon ili krute kao što je agar. Agar je polisaharid, a koristi se za skrućivanje tekućih podloga. Dobiva se ekstrakcijom crvenih morskih algi. Najvažniji sastojak agara je agaroz, koja je po sastavu spoj sastavljen od jedinica 3,6-anhidro-L-galaktoze, povezanih 1, 4-vezom i D-galaktoze. U upotrebi su i kemijski definirane podloge, koje u svom sastavu imaju jasno definirane sastojke, kao što su glukoza, soli, aminokiseline i vitamini (Duraković, Duraković, 1997).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Opis bunara

U radu se analizirala voda iz nekoliko seoskih bunara sela Pavlovci i Vilić Sela na području Općine Brestovac. Radi se o bunarima u seoskim dvorištima koji su izvori pitke vode za potrebe domaćinstva. Prije izgradnje vodoopskrbne mreže gotovo svako domaćinstvo na području Slavonije, imalo je vlastiti bunar za osobne potrebe. Iako se izgradila vodoopskrbna mreže u nekim naseljima iskorištenost te mreže je u vrlo malom postotku te se voda za piće i druge potrebe koristi iz bunara. U selima koja su obuhvaćena u ovom radu, tek pet posto domaćinstava je priključeno na javni vodoopskrbni sustav, te je iz tih razloga potrebna česta kontrola kvalitete bunarske vode koja se koristi u domaćinstvima. Faktori koji mogu utjecati na zdravstvenu ispravnost vode su; lokacija bunara odnosno udaljenost od mogućih zagađivača, materijali od kojih je bunar izgrađen, vanjska zaštićenost, dubina bunara kao i redovita analiza i dezinfekcija bunarske vode.

Bunar 1.

Lokacija bunara je Požeško-slavonska županija, Općina Brestovac, naselje Pavlovci 55. Bunar je udaljen od rijeke Orljave oko 150 metara, udaljenost od septičke jame je 35 metara. Dubok je oko 5 metara, zidan betonom. Izvana je zaštićen okapnicom i sitnom mrežom. Zadnji put je dezinficiran prije 2 godine. U ljetnim razdobljima bunar ne presušuje i zadržava određeni nivo vode.

Bunar 2.

Lokacija bunara je Požeško-slavonska županija, Općina Brestovac, naselje Pavlovci 18. Bunar je udaljen od rijeke Orljave oko 150 metara, udaljenost od staje je 50 m. Bunar je dubok oko 5 metara, zidan betonom. Izvana je zaštićen okapnicom i sitnom mrežom. Zadnji put je dezinficiran prije 2 godine. U ljetnim razdobljima bunar ne presušuje i zadržava određeni nivo vode.

Bunar 3.

Lokacija bunara je Požeško-slavonska županija, Općina Brestovac, naselje Pavlovci 45. Bunar je udaljen od rijeke Orljave oko 600 metara. Bunar je dubok oko 12 metara, zidan sa betonskim cijevima. Izvana je poklopljen s metalnim poklopcem. Bunar duže vrijeme nije dezinficiran. U ljetnim razdobljima bunar presušuje i nema vode sve do većih padalina.

Bunar 4.

Lokacija bunara je Požeško-slavonska županija, Općina Brestovac, naselje Pavlovci 6. Bunar je udaljen od rijeke Orljave oko 100 metara, udaljenost od septičke jame je oko 25 m. Bunar je dubok oko 5 metara, zidan betonom. Izvana je zaštićen okapnicom i sitnom mrežom. Bunar se duže vrijeme ne koristi i nije dezinficiran. U ljetnim razdobljima bunar ne presušuje i zadržava određeni nivo vode.

Bunar 5.

Lokacija bunara je Požeško-slavonska županija, Općina Brestovac, naselje Pavlovci 23. Bunar je udaljen od rijeke Orljave oko 150 metara, a od septičke jame oko 20 m. Bunar je dubok oko 11 metara, zidan sa betonskim cijevima prije 4 godine. Izvana je zaštićen i zatvoren betonskim poklopcem. Zadnji put je dezinficiran prije 2 godine. U ljetnim razdobljima bunar ne presušuje i zadržava određeni nivo vode.

Bunar 6.

Lokacija bunara je Požeško-slavonska županija, Općina Brestovac, naselje Vilić Selo 55. Bunar je udaljen od rijeke Orljave oko 100 metara. Dubok oko 12 metara, zidan betonom. Izvana je zaštićen drvenim daskama. Zadnji put je dezinficiran prije 2 godine. U ljetnim razdobljima bunar ne presušuje i zadržava određeni nivo vode.

3.2. Metoda membranske filtracije

Uređaj za membransku filtraciju prikazan na slici 4, prije upotrebe potrebno je dezinficirati. Dezinfekcija se radi alkoholom, a potom sterilizacija upotrebom plamenika. Ljevak se ukloni, te se sterilnom pincetom, koja se sterilizira plamenom, aseptički prihvati ispitni filter i sa mrežastim djelom okrenutim prema gore, položi na sredinu osnove držača filtera. Ljevak filtera se postavi na uređaj za filtriranje i učvrsti držačem. Nakon što se postavi filter i ljevak, u ljevak se ulijeva 100 ml uzorka ispitivane vode, uključi vakum i filtrira cijeli sadržaj. Vakum se isključi odmah nakon završene filtracije. Ukloni se ljevak filtera i sterilnom pincetom makne membranski filter s osnove držača filtera, te se stavi na selektivnu podlogu u Petrijevoj zdjelici pazeći da ne zaostanu mjehurići zraka, između membrane i površine agara. Ako zaostanu mjehurići zraka, membranu treba podići i ponovo staviti na agar. Ako se očekuje veći broj kolonija tada treba napraviti razrjeđenje uzorka, na način da se profiltrira 10 ml uzorka i 1 ml uzorka pomiješan sa 10 ml sterilne destilirane vode.



Slika 4. Uređaj za membransku filtraciju (Izvor: autor)

3.3. Detekcija i brojanje *Escherichia coli* i koliformnih bakterija metodom membranske filtracije

Detekcija i brojanje *Escherichia coli* i koliformnih bakterija metodom membranske filtracije, obavlja se prema normi HRN EN ISO 9308-1;2014. Metoda se temelji na membranskoj filtraciji određenog volumena uzorka vode, inkubaciji koncentrata nakon membranske filtracije, na kromogenom agar mediju, pri određenoj temperaturi, te procjena kolonija nakon potvrdnog testa. Da bi se obavila analiza i detekcija *Escherichia coli* i koliformnih bakterija korištena je određena oprema, pribor, podloge i reagensi:

- uređaj za membransku filtraciju, s membranskim filterima, cijevima za vakum i bocom za prihvata tekućine koji se mogu priključiti na vakum,
- uređaj za inkubaciju - termostat ($37 \pm 2^\circ\text{C}$),
- sterilni membranski filteri, s veličinom pora od $0,45 \mu\text{m}$,
- pinceta sa zaobljenim vrhom, za rukovanje sa membranskim filterima,
- plamenik, za sterilizaciju plamenom,
- Chromogenic coliform agar (CCA), diferencijalna podloga za detekciju i brojanje koliformnih bakterija i *E.coli*,
- Trypton soja agar, neselektivna podloga za precjepljivanje tipičnih kolonija za identifikaciju i potvrdu,

- Oksidaza reagens, papirnati diskovi za Oksidaza test.

Nakon filtracije uzorka, sterilnom pincetom makne se membranski filtar s osnovice držača filtera, te se stavi na selektivnu podlogu u Petrijevu zdjelicu - CCA. Treba paziti da ne zaostanu mjehurići zraka između membrane i površine agara. Inkubira se 21 ± 3 sata na temperaturi $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije pobroje se sve kolonije koje daju pozitivnu β -D-galaktozidaza i β -D-glukuronidaza reakciju. Pojava tamnoplave do ljubičaste boje, podrazumjeva se kao prisutnost *E. coli*. Nakon potrebne inkubacije pobroje se sve kolonije koje daju pozitivnu β -D-galaktozidaza reakciju, ružičaste do crvene boje, kao vjerojatne koliformne bakterije koje nisu *E. coli*. Kako bi se potvrdile vjerojatne koliformne bakterije koje nisu *E. coli*, provodi se Oksidaza test. Ispituju se ružičaste do crvene kolonija, tako da se uzme dio kolonije i razmaže na papirnati disk za Oksidaza test. Pojava plavo-ljubičaste boje unutar 30 sekundi smatra se pozitivnom reakcijom. Koliformne bakterije su oksidaza negativne. Ako je na membranskom filteru porastao veliki broj kolonija ili ako se vjerojatne kolonije nalaze uz druge kolonije, napravi se subkultura vjerojatni kolonija, na neselektivnom Trypton soja agaru (TSA), kako bi se dobila čista kultura, te nakon inkubacije provodi se Oksidaza test.

Iz broja tipičnih kolonija izbrojanih na filterima i rezultata potvrđnih testova, procjeni se broj koliformnih bakterija, te *E. coli*. Procijenjen broj tipičnih kolonija izražava se kao cfu/100 ml, a izračunava se prema formuli:

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}} * V_s \quad (1.)$$

C_s je procijenjen broj tipičnih kolonija – cfu u 100 ml

Z je suma kolonija izbrojanih na svim filterima

V_{tot} je ukupni profiltrirani volumen uzoraka

V_s je referencirani volumen 100 ml



Slika 5. Koliformne bakterije i *Esherichia coli* (Izvor :autor)

3.4. Detekcija i brojanje Enterokoka metodom membranske filtracije

Metoda detekcije i brojanje Enterokoka metodom membranske filtracije, provodi se prema normi HRN EN ISO 7899-2;2000. Metoda se temelji na membranskoj filtraciji određenog volumena uzorka vode, inkubaciji koncentrata nakon membranske filtracije, na kromogenom agar mediju, pri određenoj temperaturi, te procjena kolonija nakon potvrdnog testa. Potrebna oprema, pribor podloge i reagensi za detekciju i brojanje Enterokoka su:

- uređaj za membransku filtraciju, s membranskim filterima, cijevima za vakum i bocom za prihvatanje tekućine koji se mogu priključiti na vakum,
- uređaj za inkubaciju, termostat ($37\pm 2^{\circ}\text{C}$),
- uređaj za inkubaciju, termostat ($44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$),
- sterilni membranski filteri, sa porama veličine $0,45\ \mu\text{m}$,
- pinceta sa zaobljenim vrhom, za rukovanje sa membranskim filterima,
- plamenik, za sterilizaciju plamenom,
- Slanetz Bartley agar, selektivna podloga za brojanje i detekciju Enterokoka,
- Bile aesculin azide agar iso form, selektivna podloga sa Na-azidom za potvrđni test.

Nakon membranske filtracije uzorka, sterilnom pincetom se makne membranski filter sa osnovice držača filtera i stavi na selektivnu podlogu u Petrijevu zdjelicu sa Slanetz Bartley agarom, pazeci da ne zaostanu mjehurići zraka između membrane i površine agara. Inkubacija traje 44 ± 4 sata na temperaturi $36\pm 2^{\circ}\text{C}$. Nakon inkubacije pobroje se sve kolonije kesten, crvene ili ružičaste boje, kao tipične kolonije. Dokazivanje Enterokoka provodi se tako da se filter sa

kolonijama prenese na ploču sa Bile aesculin azide agarom, koji je zagrijan na 44°C, te inkubira 2 sata pri 44±0,5°C. Nakon inkubacije pobroje se sve kolonije tamnosmeđe ili crni boje, kao kolonije Enterokoka. Rezultati se izražavaju tako da se iz broja tipičnih kolonija izbrojanih na filterima i rezultata potvrđnih testova, procjeni broj kolonija Enterokoka. Procijenjeni broj tipičnih kolonija izražava se u cfu/100 ml, a izračunava se prema formuli:

$$Cs = \frac{Z}{V_{tot}} * Vs \quad (2.)$$

Cs je procijenjen broj tipičnih kolonija – cfu u 100 ml

Z je suma kolonija izbrojanih na svim filterima

Vtot je ukupni profiltrirani volumen uzoraka

Vs je referencirani volumen 100 ml

Broj potvrđenih kolonija po ploči nakon identifikacije i potvrde izračunava se prema formuli:

$$X = \frac{k}{n} * z \quad (3.)$$

X je procijenjen broj potvrđenih kolonija na ploči

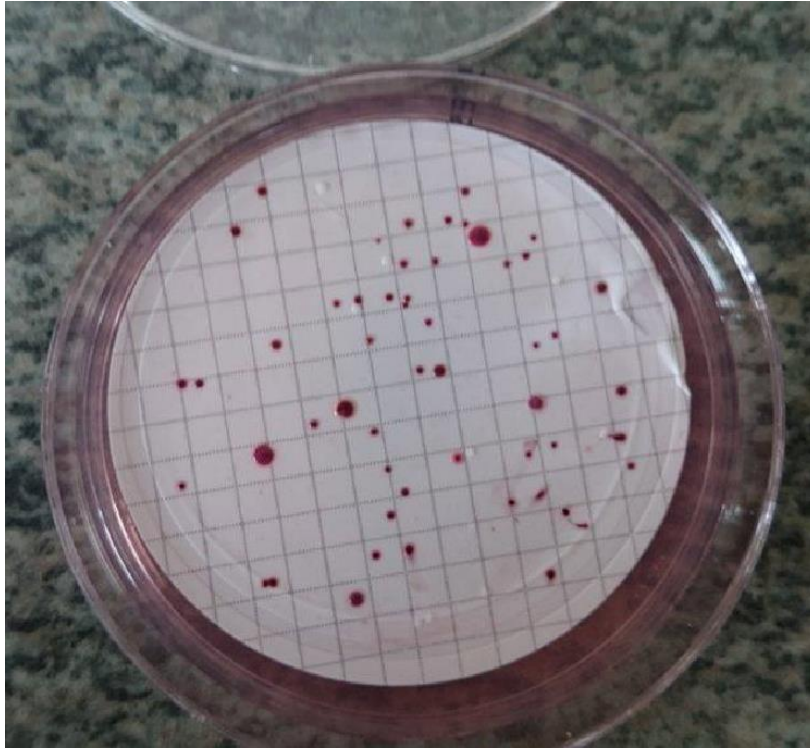
k je broj potvrđenih kolonija (dobivenih identifikacijom i potvrdom)

n je broj ispitanih kolonija

z je procijenjen broj tipičnih kolonija po ploči

Procijenjen broj potvrđenih kolonija nakon identifikacije i potvrde izražava se kao cfu/100 ml a izračunava se prema formuli:

$$Cs = \frac{X}{V_{tot}} * Vs \quad (4.)$$



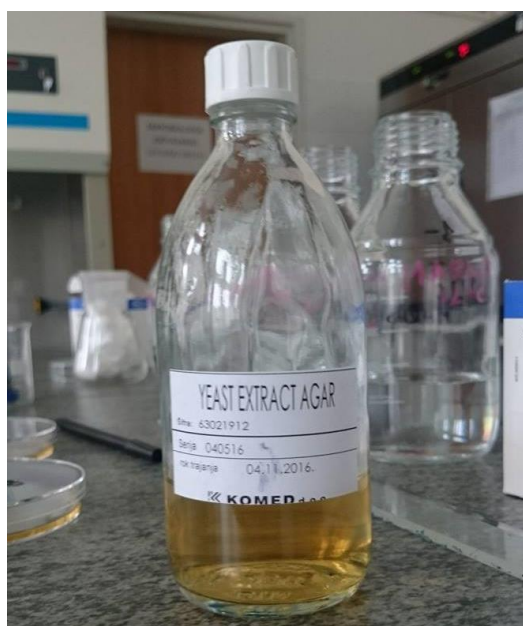
Slika 6. Enterokoki (Izvor: autor)

3.5. Priprema podloge i određivanje ukupnog broja kolonija na 22°C i 37°C

Metoda se temelji na miješanju određenog volumena uzorka vode (1 ml ili 0,1 ml) sa hranjivim agarom u Petrijevoj zdjelici, inkubacija je 44±4 sata pri temperaturi 37±2°C i 68±44 sati pri temperaturi 22±2°C, te procjena broja kolonija po ml uzorka. Oprema, pribor, podloge i reagensi potrebni za detekciju i brojanje broja kolonija su:

- termostat, uređaj za inkubaciju (37±2°C),
- termostat, uređaj za inkubaciju (22±2°C),
- sterilne Pasteur pipete, za pipetiranje uzorka,
- plamenik za sterilizaciju plamenom,
- Yeast ekstrakt agar (Agar sa ekstraktom kvasca), neselektivna podloga za uzgoj i brojenje kolonija.

Sterilnom Pasteur pipetom odpipetira se po 1 ml uzorka u dvije Petrijeve zdjelice te se zalije po 15-20 ml Yeast ekstrakt agara otopljenog i ohlađenog na 45°C. Pažljivo se izmiješa blagom rotacijom. Ostavi se da se podloga skrutne, zatim preokrene zdjelica i inkubira 44 sata, pri temperaturi od 37°C i 68 sati pri temperaturi na 22°C.



Slika 7. Yeast ekstrakt agar (Izvor: autor)

Nakon inkubacije pobroje se sve kolonije prisutne na svakoj ploči te procjeni, broj kolonija u 1 ml. Procijenjen broj kolonija izražava se kao cfu/1 ml, a izračunava se prema formuli:

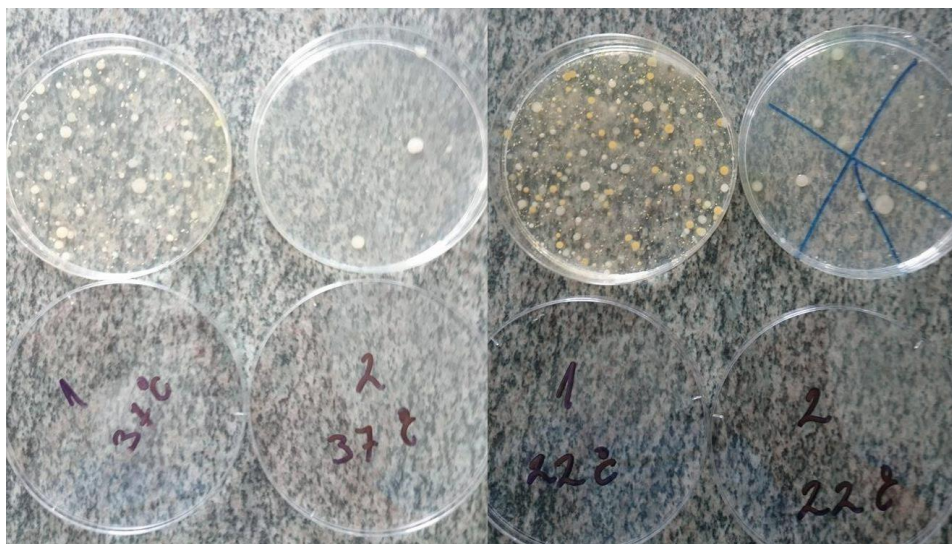
$$Cs = \frac{Z}{V_{tot}} * Vs \quad (5.)$$

Cs je procijenjen broj kolonija u cfu/1 ml

Z je suma kolonija izbrojani na svim pločama

Vtot je ukupni nacjepljeni volumen uzorka

Vs je referentni volumen (1 ml)



Slika 8. Porasle kolonije na 37°C i 22°C (Izvor: autor)

3.6. Metoda detekcije i brojanje *Pseudomonas aeruginosa* metodom membranske filtracije

Metoda detekcije i brojanje *Pseudomonas aeruginosa* metodom membranske filtracije provodi se prema normi HRN EN ISO 16266;2008. Metoda se temelji na membranskoj filtraciji određenog volumena uzorka vode, inkubaciji koncentrata nakon membranske filtracije na određenom selektivnom mediju, pri određenoj temperaturi, te procjena kolonija nakon potvrdnog testa. Za detekciju i brojanje *Pseudomonas aeruginosa* metodom membranske filtracije, potrebni su određena oprema, pribor, podloge i reagensi:

- uređaj za membransku filtraciju, s membranskim filterima, cijevima za vakum i bocom za prihvatanje tekućine koji se mogu priključiti na vakum,
- termostat, uređaj za inkubaciju ($37\pm 2^{\circ}\text{C}$),
- termostat, uređaj za inkubaciju ($44,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$),
- sterilni membranski filteri, sa porama veličine od $0,45\ \mu\text{m}$,
- pinceta sa zaobljenim vrhom, za rukovanje sa membranskim filterima,
- plamenik za sterilizaciju plamenom,
- *Pseudomonas* CN agar - selektivna podloga za detekciju i brojanje *Pseudomonas aeruginosa*,
- Nutrient agar - neselektivna podloga za precjepljivanje tipičnih kolonija za identifikaciju i potvrdu,
- Acetamid bujon - selektivna podloga sa Na –azidom za potvrdni test stvaranja amonijaka,
- Bios discs O - papirnati diskovi za Oksidaza test,
- King's B medij - podloga za potvrdni test fluorescencije oksidaza pozitivnih kolonija,

- Nessler reagens - reagens za test stvaranja amonija.

Nakon membranske filtracije uzorka vode, sterilnom pincetom makne se membranski filter s osnovice držača filtera i stavi se na selektivnu podlogu u Petrijevu zdjelicu s *Pseudomonas* CN agarom, pazeći da ne zaostanu mjehurići zraka između membrane i površine agara i inkubira 44 ± 4 sata, na temperaturi $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Nakon potrebne inkubacije pobroje se sve plavozelene kolonije kao potvrđene kolonije *Pseudomonas aeruginosa*. Nakon toga filter se pogleda pod UV lampom i pobroje sve kolonije koje fluoresciraju, kao vjerojatne kolonije *Pseudomonas aeruginosa*, koje se zatim dokazuju sa Acetamid bujonom. Također se pobroje sve crveno smeđe pigmentirane kolonije, kao vjerojatne kolonije *Pseudomonas aeruginosa*, koje se potvrđuju Oxidaza testom, Acetamid bujonom i King's B medijem. Crveno-smeđe kolonije i kolonije koje fluoresciraju pod UV lampama, precijepe se na Nutrient agar i inkubiraju 22 ± 2 sata na temperaturi $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije precjepljenih crveno-smeđih kolonija, provodi se Oxidaza test. Nakon inkubacije precjepljenih kolonija, koje fluoresciraju pod UV lampom, porasle kolonije se precjepljuju u Acetamid bujon. Iz broja vjerojatnih kolonija, izbrojenih na filtrima i rezultata potvrđenih testova, procjeni se broj kolonija *Pseudomonas aeruginosa*.

3.6.1. Oxidaza test

Provodi se tako da se uzme dio kolonije i razmaže na papirnati disk, za oxidaza test. Pojava plavo-ljubičaste boje unutar 30 sekundi smatra se pozitivnom reakcijom (oxidaza pozitivna reakcija).

3.6.2. King's B medij

Oxidaza pozitivne crveno-smeđe kolonije precijepe se na King's B medij i inkubiraju do 5 dana na $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Najčešće je dovoljna inkubacija od 24 sata. Svakodnevno se treba pregledavati pod UV lampom i zabilježiti prisutnost bilo kakve fluorescencije u periodu do 5 dana.

3.6.3. Acetamid bujon

Kolonije porasle na Nutient agaru precijepe se na Acetamid bujon inkubiraju 22±2 sata na temperaturi 37±2°C. Doda se 1-2 kapi Nessler reagensa. Promjena boje iz žute u cigla-crvenu dokaz je stvaranja amonija.

Procijenjen broj kolonija *Pseudomonas aeruginosa* (C_s) izražava se kao cfu/100 ml i izračunava se prema formuli:

$$C_s = P + F \left(\frac{C_F}{n_F} \right) + R \left(\frac{C_R}{n_R} \right) \quad (6.)$$

P - broj plavo/zelenih kolonija

F - broj fluorescentnih kolonija

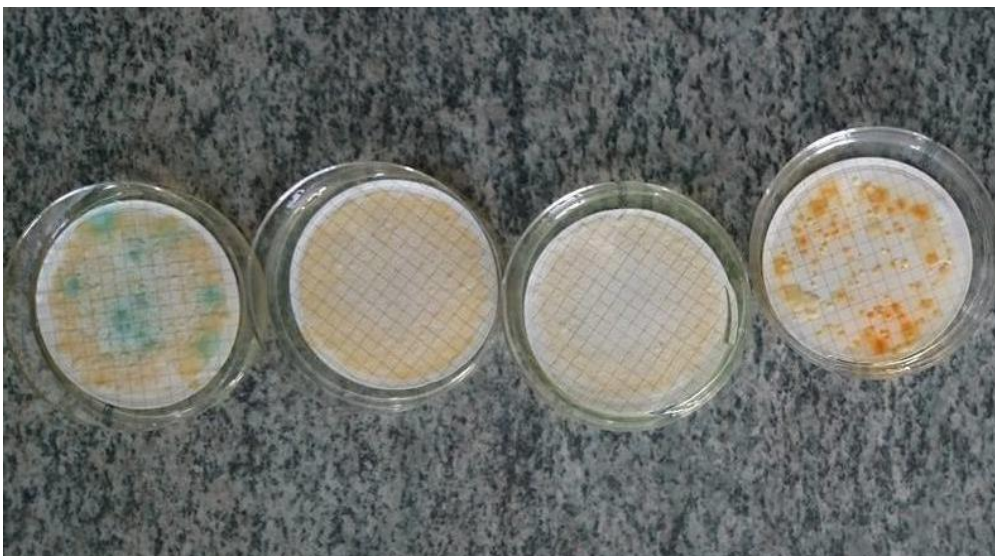
R - broj crveno-smeđih kolonija

C_F - broj fluorescentnih kolonija testiranih koje stvaraju amonija

n_F - broj fluorescentnih kolonija testiranih na stvaranje amonija

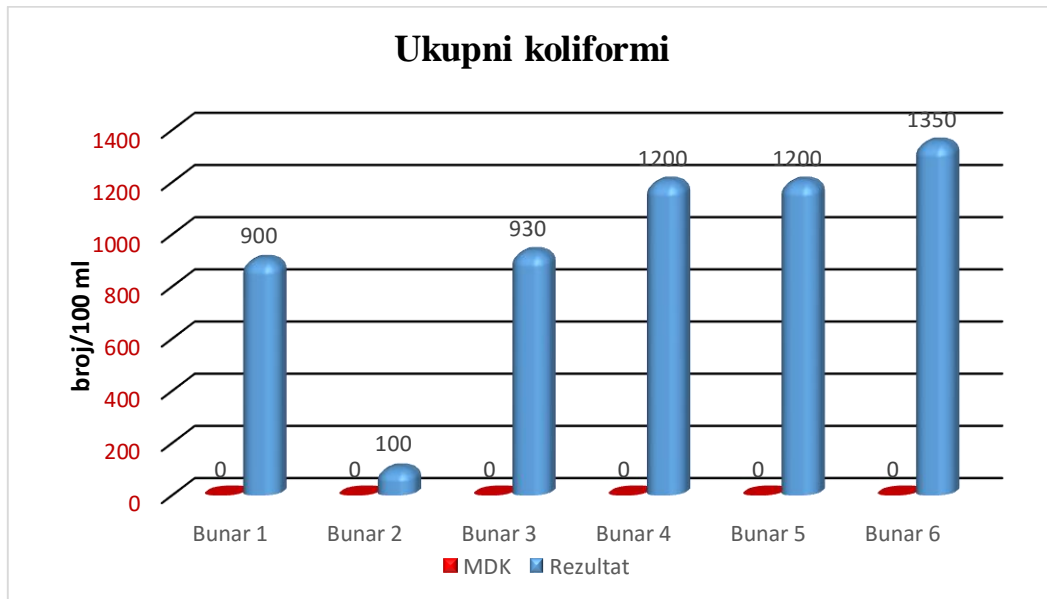
C_R - broj crveno smeđih kolonija koje su oxidaza pozitivne , stvaraju amonij i fluoresciraju na King's B mediju

n_R - broj crveno smeđih kolonija testiranih na stvaranje oxidaze i i fluoresciraju na King's B mediju

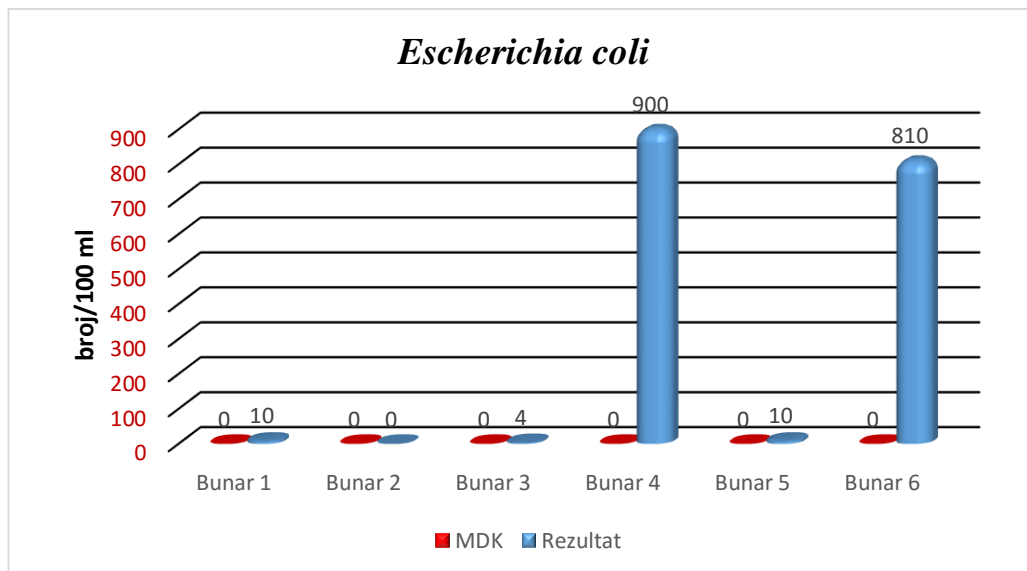


Slika 9. *Pseudomonas aeruginosa* (Izvor: autor)

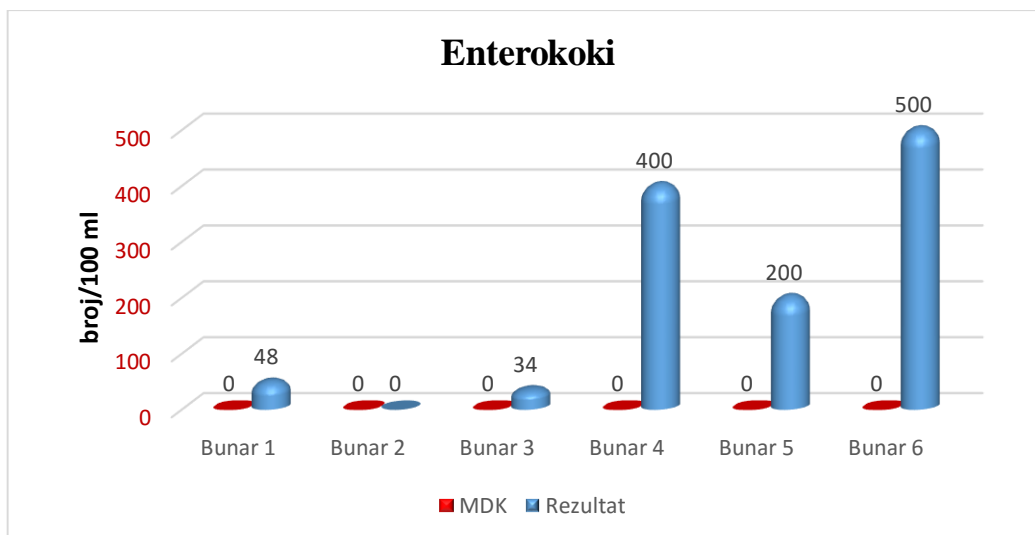
4. REZULTATI



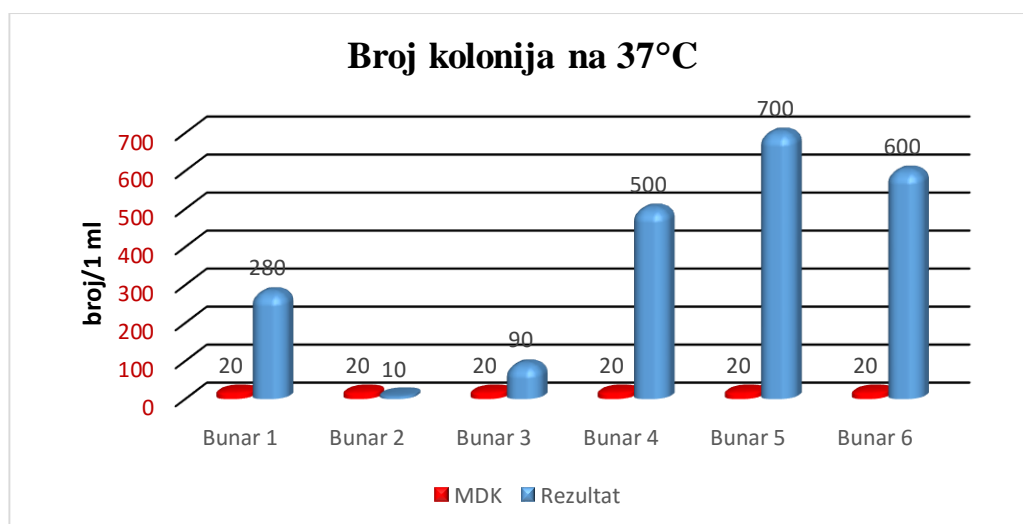
Slika 10. Ukupni koliformi u uzorcima



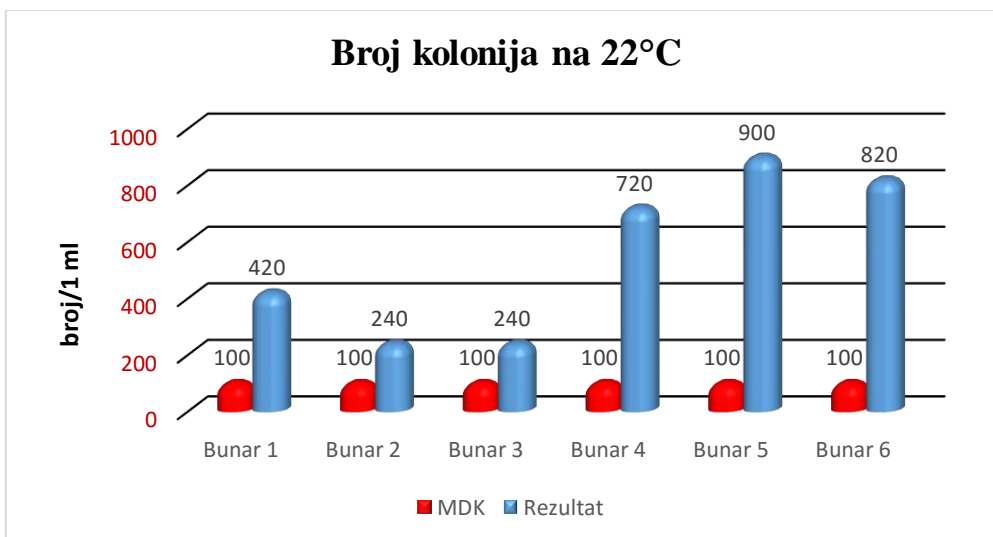
Slika 11. *Escherichia coli* u uzorcima



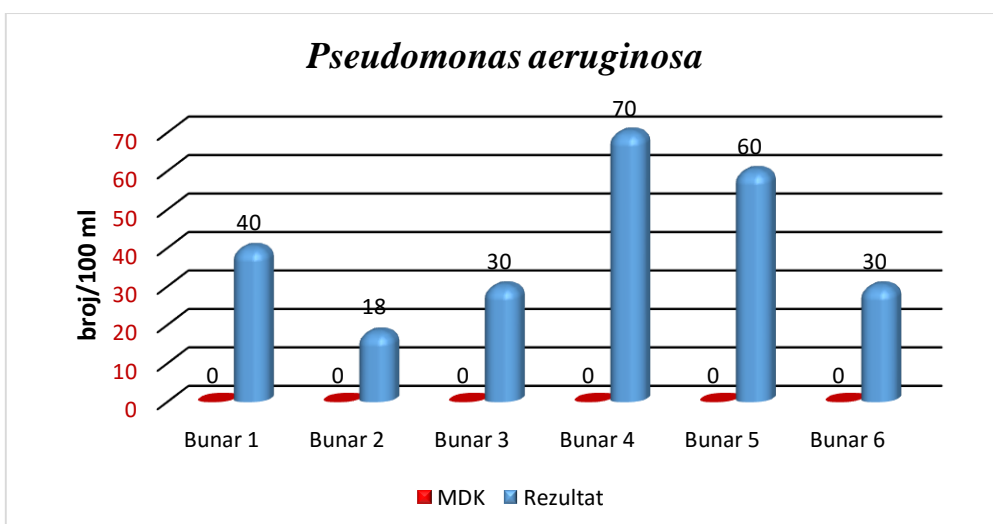
Slika 12. Enterokoki u uzorcima



Slika 13. Broj kolonija na 37°C u uzorcima



Slika 14. Broj kolonija na 22°C u uzorcima



Slika 15. *Pseudomonas aeruginosa* u uzorcima

5. RASPRAVA

Slika 10 prikazuje ukupan broj kolonija koliformnih bakterija u 100 ml vode, koja je uzorkovana iz šest različitih bunara. Iz rezultata je vidljivo da broj ukupnih kolonija u većini uzoraka prelazi 900 cfu/100 ml, jedino uzorak 2 pokazuje daleko manji broj kolonija u odnosu na ostale uzorke. Budući da je MDK za ukupane koliforme 0, rezultati pokazuju da se radi o zdravstveno neispravnoj vodi na koliformne bakterije.

Slika 11 prikazuje broj kolonija *Escherichie coli* u 100 ml uzoraka bunarske vode. Rezultati pokazuju da je jedino voda iz bunara 2 zdravstveno ispravna s obzirom na prisutnost *Escherichie coli*, jer su MDK za *Escherichia coli* 0. Rezultati bunara 4 i 6 pokazuju veliku zagađenost vode *Escherichiom coli*, dok voda iz bunara 1, 3 i 5, pokazuje relativno malu zagađenost vode *Escherichiom coli*, ali s obzirom na zakonske propise i ta voda je zdravstveno neispravna.

Slika 12 prikazuje broj Enterokoka u 100 ml uzorkovane vode. Prema zakonskim propisima MDK vrijednosti za Enterokoke iznosi 0. Na slici je vidljivo da od šest uzetih uzoraka vode samo uzorak vode iz bunara 2 zadovoljava zakonske propise. Također se može vidjeti da uzorci 4, 5 i 6, sadrže znatno veći broj kolonija Enterokoka od maksimalno dopuštene koncentracije.

Slika 13 prikazuje broj poraslih kolonije u 1 ml uzorka, na hranjivoj podlozi pri temperaturi od 37°C. Rezultati pokazuju da samo voda iz bunara 2 zadovoljava zadane MDK vrijednosti, dok ostali uzorci vode ne zadovoljavaju, s tim da voda iz bunara 4, 5 i 6 pokazuje veliko odstupanje od MDK vrijednosti.

Slika 14 prikazuje broj poraslih kolonije u 1 ml uzorka vode, na hranjivoj podlozi pri temperaturi od 22°C. Iz rezultata se vidi da niti jedan uzorak vode ne zadovoljava zadane MDK vrijednosti, a bunari 4, 5 i 6 pokazuju veliko odstupaju od MDK, odnosno vidljivo je da se radi o velikoj mikrobiološkoj zagađenosti vode.

Slika 15 prikazuje broj bakterija *Pseudomonas aeruginosa* u 100 ml vode, koje su porasle na hranjivom agaru. MDK vrijednosti za *Pseudomonas aeruginasa* je 0, iz rezultata je vidljivo da svi ispitivani uzorci vode, ne zadovoljavaju zakonske propise, odnosno da se radi o zdravstveno neispravnoj vodi.

6. ZAKLJUČAK

- prema rezultatima analiziranih uzoraka vode, može se zaključiti da niti jedan uzorak vode ne udovoljava mikrobiološkim uvjetima iz Pravilnika o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju
- u svim analiziranim uzorcima nalaze se koliformne bakterije
- većina analiziranih uzoraka vode sadrži bakteriju *E. coli* i Enterokoke
- svi uzorci vode sadrže bakteriju *Pseudomonas aeruginosa*
- bunari u domaćinstvima nisu dovoljno zaštićeni od vanjskog onečišćenja
- prema raspoloživim podacima, lokacije bunara i njihove zaštićenosti od onečišćenja, možemo zaključiti da su glavni izvori kontaminacije uzrokovani blizinom septičkih jama i staja
- rezultati ispitivanih uzoraka pokazuju da se neredovito provodi postupak dezinfekcije vode, kao i nepoznavanje važnosti dezinfekcije
- preporuka je izvršiti dezinfekciju vode s Izosanom G u količini od 2 g/1000 L vode, te iza toga ponoviti analize odnosno provjeriti učinak dezinfekcije

LITERATURA

1. Duraković, S.; Duraković, L. (1997) *Priručnik za rad u mikrobiološkom laboratoriju. I.dio-knjiga prva*. Zagreb: Biblioteka udžbenici i priručnici Sveučilišta u Zagrebu.
2. Volner, Z. (1996) *Opća medicinska bakteriologija s epidemiologijom i imunologijom: za medicinske škole. 2.(prerađeno i dopunjeno) izdanje*. Zagreb: Školska knjiga.
3. Kalenić, S i suradnici. (2013) *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada
4. Volner, Z; Batinić, D i suradnici. (2005) *Opća medicinska mikrobiologija i imunologija: udžbenik Visoke zdravstvene škole*. Zagreb: Školska knjiga.
5. Duraković S.; Redžepović S. (2002) *Uvod u opću mikrobiologiju: knjiga prva*. Zagreb: Kugler.
6. Zakonu o vodi za ljudsku potrošnju, NN 56/13, 64/15.
7. Pravilnik o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju, NN 125/13,141/13,128/15.
8. <http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor258.htm>
9. Aqua. <http://www.aqua.hr/a/sve-sto-treba-znati-o-vodi> (15.8.2016)
10. Wikipedia. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Laboratorij> (1.10.2016.)
11. Anonymous_1. 15.7.2016.
https://www.google.hr/search?q=gra%C4%91a+bakterijske+stanice&espv=2&biw=1920&bih=974&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjklemAubnPAhUkCMAKHAWtCl4Q_AUICCGB#tbm=isch&q=+bakterijske+stanice&imgrc=cvYRE0W-MvkVoM%3A
12. Anonymus_2. 15.7.2016.
https://www.google.hr/search?q=krivulja+rasta+bakterije&espv=2&biw=1920&bih=974&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiOipb4ubnPAhVBK8AKHXSSC8gQ_AUIBigB#imgrc=Opoe1ZfY62NZ9M%3A
13. E-škola. <http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor258.htm> (12.6.2016.)
14. Upute za uzimanje uzoraka vode, Hrvatski zavod za javno zdravstvo. www.hzjz.hr (20.5.2017.)

POPIS SLIKA

Slika 1. Bakterijska stanica

Slika 2. Krivulja rasta bakterija

Slika 3. Plavo obojene kolonije *Escherichia coli* i žućkasto obojene kolonije drugih koliformnih bakterija

Slika 4. Uređaj za membransku filtraciju

Slika 5. Koliformne bakterije i *Escherichia coli*

Slika 6. Enterokoki

Slika 7. Yeast ekstrakt agar

Slika 8. Porasle kolonije na 37°C i 22°C

Slika 9. *Pseudomonas aeruginosa*

Slika 10. Ukupni koliformi u uzetim uzorcima

Slika 11. *Escherichia coli* u uzetim uzorcima

Slika 12. Enterokoki u uzetim uzorcima

Slika 13. Broj kolonija na 37°C u uzetim uzorcima

Slika 14. Broj kolonija na 22°C u uzetim uzorcima

Slika 15. *Pseudomonas aeruginosa* u uzetim uzorcima

POPIS TABLICA

Tablica 1. Parametri zdravstvene ispravnosti vode

POPIS KRATICA I SIMBOLA

MDK- maksimalno dopuštena koncentracija

H₂O - voda

°C – stupanj celzijus

µm - mikrometar

nm - nanometar

NN - Narodne Novine

E.coli- *Escherichia coli*

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

RNA - ribonukleinska kiselina

HRN – Hrvatska norma

EN –Europska norma

ISO - *International Organization for Standardization*, Međunarodna organizacija za standardizaciju

UV zračenje- *ultraviolet*, ultraljubičasto zračenje

CCA - *Chromogenic coliform agar*, diferencijalna podloga za detekciju i brojanje koliformnih bakterija i *E. coli*

TSA – Trypton soja agar

ml - mililitar

cfu – *Colony forming unit*

IZJAVA O AUTORSTVU RADA

Ja, **Marko Ilić**, pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor završnog rada pod naslovom: **Mikrobiološka kontrola bunarske vode u selima Općine Brestovac**, te da u navedenom radu nisu na nedozvoljen način korišteni dijelovi tuđih radova.

U Požegi, 06.06.2017.

Marko Ilić