

Osnove rada u mikrobiološkom laboratoriju Vodovod-Osijek d.o.o.

Jager, Nina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:804833>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Nina Jager

Osnove rada u mikrobiološkom laboratoriju

Vodovod-Osijek d.o.o.

završni rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Završni rad

Osnove rada u mikrobiološkom laboratoriju

Vodovod-Osijek d.o.o.

Nastavni predmet

Opća mikrobiologija

Predmetni nastavnik: Dr. sc. Lidija Lenart, docent

Student/ica: Nina Jager

(MB: 3001/08)

Mentor: dr. sc. Lidija Lenart, docent

Predano (datum):

Pregledano (datum):

Ocjena:

Potpis mentora:

Osnove rada u mikrobiološkom laboratoriju Vodovod-Osijek d.o.o.

SAŽETAK

Mikroorganizmi su normalni stanovnici prirodnih voda te imaju izrazitu ulogu u vodenom okolišu. Neki od njih imaju životno važne uloge u vodenom ekosustavu, ostali su važni i zanimljivi zbog rasta u otpadnim vodama te stoga i predstavljaju potencijalne opasnosti u zalihama vode. Mikrobna populacija tj. njihova prisutnost u vodenom okolišu ovisi o fizičkim i kemijskim faktorima kao što su: svjetlo, hidrostatski tlak, pH, koncentracija soli i temperatura. Voda kontaminirana otpadnom vodom sadrži relativno velik broj mikroorganizama. Neki od prisutnih mikroorganizama u vodi mogu biti i patogeni. Koliformne bakterije koje uključuju *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, služe kao indikatori za fekalnu kontaminaciju. Za određivanje koliformnih bakterija u vodi primjenjuju se dva postupka; određivanje najvjerojatnijeg broja (Most Probable Number ili MPN) i membranska filtracija. Osim koliformnih bakterija kao indikatori fekalne kontaminacije mogu se upotrijebiti i bakterije vrsta *Clostridium perfringens* i *Streptococcus faecalis*. U vodi koja je kontaminirana primjenjuju se određeni zahvati. Tvrtka Vodovod-Osijek d.o.o. provodi kontrolu zdravstvene ispravnosti vode za piće u internom laboratoriju tvrtke, koji posjeduje ovlaštenja za rad odobreno od Ministarstva zdravstva. Od mikrobioloških analiza rade se slijedeće: ukupni broj bakterija, ukupne i fekalne koliformne bakterije, fekalni streptokoki, bakterije vrsta *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, bakterije roda *Salmonella* i druge enterobakterije.

Ključne riječi: Vodeni okoliš, kontaminirana voda, indikatori za fekalnu kontaminaciju, mikrobiološke analize.

Basics of work in microbiology lab Vodovod-Osijek Ltd.

SUMMARY

Microorganisms are normal inhabitants of natural water and have a distinct role in the aquatic environment. Some of them have a vitally important role in the aquatic ecosystem, other important and interesting because of the growth in wastewater and therefore represent a potential threat to water supplies. Microbial populations. Their presence in the aquatic environment depends on the physical and chemical factors including light, hydrostatic pressure, pH, salt concentration and temperature. Water contaminated waste water contains a relatively large number of microorganisms. Some of the microorganisms present in the water can be pathogenic. Coliform bacteria include *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, serve as indicators for faecal contamination. For the determination of coliform bacteria in the water are two usual procedures; determine the most probable number of Most Probable Number (MPN) or) and membrane filtration. Besides coliform bacteria as indicators of faecal contamination can be used *Clostridium perfringens*, *Streptococcus faecalis*. The water that is contaminated apply certain procedures. Vodovod-Osijek Ltd. Carried out medical control of drinking water in the internal laboratory of the company, which owns the authority of the Ministry of Health. From microbiological analyzes are performed as follows: total bacteria, total and fecal coliforms, faecal streptococci, bacteria of species *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, bacteria from rod of *Salmonella* and other enterobacteria.

Keywords: aquatic environment, contaminated water, indicators of faecal contamination, microbiological analysis

SADRŽAJ

1. UVOD.....	5
2. GLAVNI DIO.....	6
2.1. OPĆENITO O VODOVOD-OSIJEK d.o.o.....	6
2.1.1. Organizacijska struktura Vodovod-Osijek d.o.o.....	7
2.1.2. PJ Vodoopskrba.....	8
2.1.3. Kvaliteta vode.....	10
2.2. MIKROBIOLOŠKA KONTROLA PITKIH VODA.....	12
2.2.1. Bakteriološka (standardna) analiza vode za piće.....	13
2.3. STANDARDI ZA VODE I PRIMJENA MIKROORGANIZAMA KAO INDIKATORA.....	16
2.3.1. Membranska filtracija.....	16
2.3.2. Najvjerojatniji broj (MPN).....	19
2.3.3. Standardna metoda za određivanje broja živih bakterija.....	21
2.3.4. Pravila rada i mjere sigurnosti u bakteriološkom laboratoriju.....	21
2.3.5. Uzimanje uzoraka vode za bakteriološku analizu.....	22
2.3.6. Metode za određivanje ukupnih koliforma u vodi MPN metodom...23	
2.3.7. Metoda za određivanje ukupnih koliforma u vodi membranskom filtracijom.....	26
2.3.8. Metode za određivanje broja aerobnih mezofilnih mikroorganizama u vodi.....	27
2.3.9. Metode za određivanje fekalnih streptokoka u vodi membranskom filtracijom.....	28
2.3.10. Određivanje <i>Pseudomonasaeruginosa</i> u vodi MPN metodom.....	31
2.3.11. Određivanje <i>Pseudomonasaeruginosa</i> u vodi membranskom filtracijom.....	33
3. ZAKLJUČAK.....	35
4. LITERATURA.....	36

1.UVOD

Voda ima izuzetnu ulogu u okolišu. Voda kao namirnica mora zadovoljavati norme propisane Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće. Voda za piće mora biti bez boje, okusa i mirisa, te ne smije sadržavati štetne kemikalije niti patogene mikroorganizme. Mikrobiologija vode istražuje mikroorganizme i njihova djelovanja u vodama. Velik broj organizama u vodi ukazuje na veliku količinu nutrijenata u vodi, također je pokazatelj kontaminirane vode. Posebno nas zanima kontaminacija patogenim mikroorganizmima. Mikroorganizmi u vodi ovise o različitim kemijskim i fizičkim parametrima kao što su hidrostatski tlak, svjetlo, pH, koncentracija soli i temperatura. Tvrtka Vodovod-Osijek d.o.o. provodi kontrolu zdravstvene ispravnosti vode za piće u internom laboratoriju tvrtke, koje posjeduje ovlaštenja za rad Ministarstva zdravstva. Dodatna kontrola ispravnosti pitke vode osigurana je kontinuiranim kontrolama Županijskog zavoda za javno zdravstvo, kao i analizama zatraženim od sanitarne inspekcije. U Laboratoriju se godišnje analizira oko 4350 uzoraka vode prema različitim stručnim i zakonodavnim kriterijima, te se na taj način dobiva fond od cca 60000 podataka o kvaliteti vode. Od mikrobioloških metoda radi se: ukupni broj bakterija u 1ml na 37°C i ukupni broj bakterija u 1ml na 22°C, ukupne i fekalne koliformne bakterije u 100ml, fekalni streptokoki u 100ml, *Pseudomonas aeruginosa* u 100ml i sulfitoreducirajuće klostridije u 20ml. Bakteriološka pretraga vode ima 3 osnovna cilja: odrediti je li voda kontaminirana ljudskim fekalijama, odrediti stupanj zaštite vodonosnog sloja, istražiti djelotvornost tehnološkog postupka pročišćavanja vode.

Kontinuiranu opskrbu potrošača zdravstveno ispravno pitkom vodom kao i tehnologiju proizvodnje vode te njenog transporta do potrošača u dovoljnim količinama, jedne su od glavnih smjernica tvrtke.

2. GLAVNI DIO

2.1. OPĆENITO O VODOVOD-OSIJEK d.o.o.

„Čovjekov život nemoguć je bez vode, dakako, takve vode koja mu zaista zadovoljava životne potrebe. A takve vode ima na Zemlji otprilike tek 1% od sve vode oko nas. Od sve vode na Zemlji (i u njoj), morske ima oko 97%, a od preostala tri postotka, čije su dvije trećine led (ledeni pokrivači na polovima i glečeri – a i jedni i drugi tope se zbog klimatskih promjena) te snijeg pa čovjeku ostaje tek – jedan postotak sve vode. A i ta voda koja mu je dostupna ne jamči – ni svagdje ni uvijek – sigurnost; ni taj dio vodenih resursa nije – ni svagdje, ni uvijek – zajamčeno pouzdane kakvoće (jednostavno: zdrava) za ljudsku upotrebu.

Vodovod-Osijek d.o.o. moderno je trgovačko društvo koje se kao osnovnom djelatnošću bavi vodnim uslugama u koje prvenstveno spadaju pročišćavanje i distribucije pitke vode te odvodnja otpadnih voda.

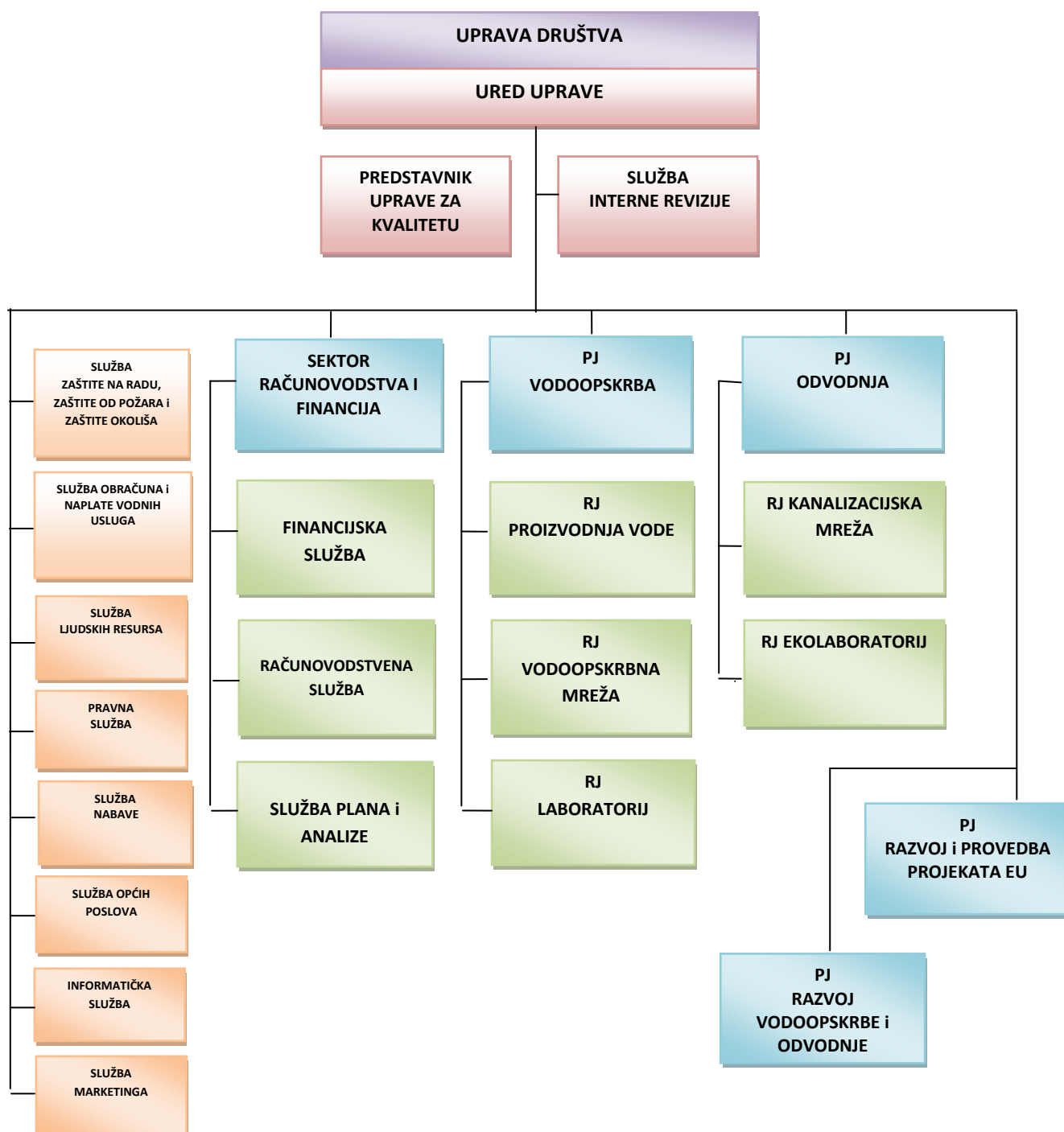
U vlasništvu je grada Osijeka i lokalnih općina u kojima distribuira pitku vodu. Na današnjoj lokaciji, Poljski put 1 je od sedamdesetih godina prošloga stoljeća.

Kontinuiranu opskrbu potrošača zdravstveno ispravnom pitkom vodom kao i tehnologije proizvodnje vode te njenog transporta do potrošača u dovoljnim količinama, jedne su od glavnih smjernica tvrtke.

Vodovod-Osijek d.o.o. vlasnik je još 4 tvrtke kćeri. Vodovod-Montaža d.o.o., Vodovod Graditeljstvo d.o.o., Vodovod-Hidrogeološki radovi d.o.o. i Vodovod-Projektni biro d.o.o.

Danas u Vodovod-Osijek d.o.o. radi 352 radnika od čega 77 sa visokom i višom stručnom spremom, 193 sa srednjom stručnom spremom i oko 82 sa nižom stručnom spremom.

2.1.1. Organizacijska struktura Vodovod-Osijek d.o.o.



2.1.2. PJ Vodoopskrba

Poslovna jedinica Vodoopskrba organizacijska je cjelina trgovačkog društva Vodovod-Osijek d.o.o., a sastoji se od tri radne jedinice :

- RJ Proizvodnja vode
- RJ Laboratorij
- RJ Vodoopskrbna mreža

RJ Laboratorij

Tvrtka Vodovod-Osijek d.o.o. provodi kontrolu zdravstvene ispravnosti vode za piće u internom laboratoriju tvrtke, koji posjeduje ovlaštenja za rad Ministarstva zdravstva.

Dodatna kontrola ispravnosti pitke vode osigurana je kontinuiranim kontrolama Županijskog zavoda za javno zdravstvo, kao i analizama zatraženim od sanitarne inspekcije.

U laboratoriju se godišnje analizira oko 4350 uzoraka vode prema različitim stručnim i zakonodavnim kriterijima, te se na taj način dobiva fond od cca 60000 podataka o kvaliteti vode.

Svakodnevno se vrše ispitivanja sljedećih parametara: mutnoća, boja, miris, pH, amonijak; nitriti, nitrati, utrošak KMnO_4 , isparni ostatak, alkalitet, otopljeni kisik, slobodni CO_2 , fluoridi, fosfati, provodljivost, mangan, željezo, kalcij, magnezij, kloridi, sulfati, ukupna tvrdoća, ukupni klor (DPD), slobodni klor (DPD) i arsen.

Od mikrobioloških analiza radi se slijedeće: ukupni broj bakterija u 1 ml na 37 °C i ukupni broj bakterija u 1 ml na 22 °C, ukupne i fekalne koliformne bakterije u 100 ml, fekalni streptokoki u 100 ml, *Pseudomonas aeruginosa* u 100 ml i sulfitoreducirajuće klostridije u 20 ml.

RJ Ekolaboratorij

U okviru djelatnosti PJ Odvodnja , uz službu RJ " Kanalizacijska mreža " , egzistira i RJ "Ekolaboratorij"

Radna jedinica Ekolaboratorij ovlaštena je za ispitivanje i ocjenu sastava i kakvoće voda, te poslova uzorkovanja, analize i obradu podataka pokazatelja. Također je ovlaštena za uzorkovanje i ispitivanje kakvoće vlastitih otpadnih voda.

RJ Ekolaboratorij, uz osnovnu ulogu praćenja sastava otpadnih voda javnog odvodnog sustava grada Osijeka, provodi ispitivanja mogućih tehnologija pročišćavanja otpadnih voda kroz praćenje učinkovitosti rada uređaja za vrijeme probnog rada, te ispitivanja ekotoksikoloških pokazatelja na otpadne vode i kemijske pripravke.

Obavlja ispitivanja na pokazatelje:

– **za otpadne vode na pokazatelje:** raspršene krutine, pH, KPKCr, BPK5, amonij -ion, nitrati, ortofosfat – ion, ukupni fosfor, Kjeldahl dušik, kloridi, sulfati, ukupni fenoli, ukupni cijanidi, ukupna ulja i masnoće, PCB, LHKU, aldrin, dieldrin, DDD, DDE, heptaklor, klordan, anionske tenzide, TOC, kadmij, olovo, bakar, cink, ukupni krom, željezo, mangan, kobalt, nikal, živa, arsen, molibden, silicij, aluminij, antimon, barij i srebro, kationske detergente, otopljeni kisik, taložive tvari i isparni ostatak.

– **mikrobiološki pokazatelji:** ukupni koliformi, ukupni broj bakterija (kod 22°C i 37°C) , fekalne koliformne bakterije, fekalni streptokoki, stafilokoki, *E.coli*, *Salmonella* i druge enterobakterije.

–**ekotoksikološki pokazatelji za otpadne vode i kemijske pripravke** :test toksičnosti na bakterije , *Daphniamagna*, te brzina i stupanj biološke razgradljivosti.

(<http://www.vodovod.com>)

2.1.3. Kvaliteta vode

Kakvoća vode se ispituje prema preporukama, smjernicama i pravilnicima mjerodavnih ustanova i zavoda na međudržavnoj i državnoj razini. U Hrvatskoj kakvoća vode za piće propisana je Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće (NN, 46/94) koji je u suglasju s istovrsnim pravilnicima Europske Unije. Ovim se pravilnikom propisuje:

- zdravstvena ispravnost vode koja služi za javnu vodoopskrbu stanovništva kao voda za piće ili za proizvodnju namirnica i pripremu hrane;
- vrste, obujam i standardni postupci analize uzoraka vode za piće;
- učestalost i način uzimanja (uzorkovanje) vode za piće.

Pravilnikom su dodatno za vrijeme izvanrednog stanja, ratnog stanja ili neposredne ratne opasnosti propisane maksimalno dopuštena koncentracija bojnih otrova u vodi za piće i radiološka svojstva vode za piće. Kakvoću vode za piće treba ispitivati na izvoru, nakon postupka pročišćavanja i dezinfekcije, u vodospremi i vodu u razdjelnoj mreži (na određenim mjestima vodovoda). Voda se ispituje terenskim uviđajem i analizom pojedinih uzoraka u laboratoriju. Kontrola zdravstvene ispravnosti vode za piće provodi se u internom laboratoriju tvrtke Vodovod-Osijek d.o.o. koji posjeduje ovlaštenja za rad Ministarstva zdravstva. Dodatna kontrola ispravnosti pitke vode osigurana je kontinuiranim kontrolama Županijskog zavoda za javno zdravstvo, kao i analizama zatraženim od sanitarne inspekcije. U laboratoriju se godišnje analizira oko 4350 uzoraka vode prema različitim stručnim i zakonodavnim kriterijima, te se na taj način dobiva fond od cca 60000 podataka o kvaliteti vode. (https://www.hr.wikipedia.org/wiki/Kakvoća_vode)

Svakodnevno se vrše ispitivanja sljedećih parametara: mutnoća, boja, miris, pH, amonijak, nitriti, nitrati, utrošak KMnO_4 , isparni ostatak, alkalitet, otopljeni kisik, slobodni CO_2 , fluoridi, fosfati, provodljivost, mangan, željezo, kalcij, magnezij, kloridi, sulfati, ukupna tvrdoća, ukupni klor, slobodni klor i arsen. Od mikrobioloških analiza radi se sljedeće:

- ukupni broj bakterija u 1 ml vode na 37 °C,
- ukupni broj bakterija u 1 ml vode na 22 °C,
- ukupne koliformne i fekalne koliformne bakterije u 100 ml vode,
- fekalni streptokoki u 100 ml vode,
- bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa* u 100 ml
- sulfitoreducirajuće klostridije u 20 ml.

KUPALIŠTE	DATUM UZORKOVANJA	OCJENA KAKVOĆE VODE	
		Crijevni enterokok	Escherichia coli
Drava Copacabana	29.05.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	12.06.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	27.06.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	08.07.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	21.07.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	04.08.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	22.08.2014.	DOBRA	DOBRA
	09.09.2014.	DOBRA	IZVRSNA
Drava Donji grad – željeznički most	29.05.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	12.06.2014.	DOBRA	DOBRA
	27.06.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	08.07.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	21.07.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	04.08.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	22.08.2014.	DOBRA	IZVRSNA
	09.09.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
Drava Pampas	-		
	-		
	-		
	14.07.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	22.07.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	04.08.2014.	DOBRA	DOBRA
	22.08.2014.	DOBRA	DOBRA
Bajer Jug II	29.05.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	12.06.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	27.06.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	07.07.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA
	22.07.2014.	IZVRSNA	IZVRSNA

Tablica 1. Rezultati ispitivanja kakvoće vode za kupanje tijekom sezone kupanja

(<https://www.zzizosijek.hr/index.php?page=kakvoca-kupalisnih-voda>)

Rezultate ispitivanja kakvoće voda za kupanje tijekom sezone kupanja sukladno Uredbi o kakvoći voda za kupanje (Narodne novine 51/14).

	IZVRSNA
	DOBRA
	ZADOVOLJAVAJUĆA (SAMO ZA GODIŠNJU I KONAČNU OCJENU)
	NEZADOVOLJAVAJUĆA

Standardi za ocjenu kakvoće voda nakon svakog ispitivanja (Prema Uredbi, NN 51/2014)

A	B	C	F
POKAZATELJ	OCJENA		
	IZVRSNA	DOBRA	METODA ISPITIVANJA
Crijevni enterokoki (BIK/100ML)*	≤ 200	≤ 400	HRN EN ISO 7899-2
<i>Escherichiacoli</i> (BIK/100ML)*	≤ 500	≤ 1000	HRN EN ISO 9308-1

* akreditirana metoda prema HRN EN ISO/IEC 17025:2007
<https://www.zzizosijek.hr/index.php?page=kakvoca-kupalisnih-voda>

2.2. MIKROBIOLOŠKA KONTROLA PITKIH VODA

Pitka voda mora biti bistra, hladna, bez neugodna okusa i mirisa i ne smije sadržavati kemijske štetne tvari za zdravlje čovjeka, odnosno mikroorganizme. Najbolji način za utvrđivanje higijenske ispravnosti vode sastoji se u dokazivanju patogenih mikroorganizama. Njihovo izravno dokazivanje izuzetno je teško jer ih u vodi ima toliko malo da ih je praktički nemoguće izolirati. Mnoge se metode primjenjuju za određivanje bakteriološke kontrole vode, a odabiru se u suglasju s mogućnostima laboratorijskog testiranja. Primjenjuju se praktični testovi za dokazivanje odabranih bakterija kao indikatora, a koje se kao normalna mikroflora nalaze u probavnom sustavu ljudi. Kao bakteriološki indikatori fekalne kontaminacije odabrane su one vrste koje se kao normalna mikroflora nalaze u ljudskim fekalijama, a ima ih toliko da se mogu dokazati i u velikim razrjeđenjima. Među takve ubrajamo koliformne bakterije, fekalne streptokoke, sulfito-redukcijske klostridije, bakterijeroda *Salmonella* i bakterijeroda *Proteus*. Ako se te bakterije dokažu, nema sumnje

da se dogodila fekalna kontaminacija vode, dakle postoji velika vjerojatnost da su u vodi nazočni i patogeni koji žive u probavnom sustavu čovjeka. Bakteriološka pretraga vode stoga ima tri osnovna cilja:

1. odrediti je li voda kontaminirana ljudskim fekalijama;
2. odrediti stupanj vodonosnog sloja;
3. istražiti djelotvornost tehnološkog postupka pročišćavanja vode. (Duraković, 1996.)

2.2.1. Bakteriološka (standardna) analiza vode za piće

Ova analiza podrazumijeva:

1. Određivanje ukupnog broja živih bakterija u 1 ml vode;
(Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija);
2. Dokazivanje prisustva koliformnih bakterija (*E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* i *Citrobacter*) i određivanje njihovog ukupnog broja;
3. Dokazivanje fekalnih streptokoka (*Enterococcus faecalis*);
4. Dokazivanje *Proteus* vrsta;
5. Dokazivanje *Pseudomonas aeruginosa*.
6. Dokazivanje sulfitoreducirajućih spirogenih anaeroba (SSA): *Clostridium perfringens*;
7. Dokazivanje bakteriofaga;

Specijalna ispitivanje patogenih bakterija u vodama za piće su: dokazivanje *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, vibriona, legionela, leptospira, bakterija dušičnog ciklusa, željezne bakterije i dr.

Bakteriološki pregled vode za piće ima tri cilja:

- 1) Odrediti je li voda kontaminirana ljudskim fekalijama;
- 2) Odrediti stupanj zaštite vode;
- 3) Ustanoviti efikasnost tehnološkog procesa prečišćavanja vode.

Mikrobiološka ispravnost vode za piće utvrđuje se: **osnovnim, proširenim i periodičnim pregledima vode.**

Osnovni pregled vode za piće (redovna mikrobiološka kontrola) radi se neprekidno u jednakim razmacima u toku mjeseca, odnosno godine, kao i izvanredno, kada to zahtjeva epidemiološka situacija. Ova kategorija pregleda vode za piće obuhvaća sljedeće analize:

- Utvrđivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija;
- Utvrđivanje ukupnog broja koliformnih bakterija;
- Utvrđivanje prisustva koliformnih bakterija fekalnog porijekla.

Prošireni pregled vode za piće (dopunska mikrobiološka analiza) radi se kada se osnovnim pregledom ili na drugi način utvrdi fekalno zagađenje vode. Ova analiza treba da utvrdi sljedeće:

- ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija;
- ukupan broj koliformnih bakterija;
- prisustvo koliformnih bakterija fekalnog porijekla;
- prisustvo streptokoka fekalnog porijekla;
- bakterije roda *Proteus*;
- bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa*;
- sulfitoreducirajuće klostridije.

Periodični pregled vode (kompletna bakteriološka kontrola) se obavlja samo u najrazvijenijim laboratorijama u određenim vremenskim razmacima. Može se obavljati svakih 12 mjeseci. Broj osnovnih i periodičnih pregleda u toku mjeseca i godine propisani su Pravilnikom, a proračunati su na osnovu broja stanovnika koji koriste vodu. (Čoha, 1990.)

Vrste mikroorganizama	Prečišćena i dezinficirana voda i flaširana voda na izvoru	Prirodna voda	
Zatvorena	Otvorena	voda	izvorišta
dopušteni broj mikroorganizama			
1.Bakterija rodova <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Proteus</i> , i dr. patogeni mikroorganizmi, koliformne bakterije i streptokoke fekalnog porijekla, bakterije vrsta <i>Pseudomonas aeruginosa</i> i <i>Vibrio cholerae</i>	Ne smije sadržavati		
2.Crijevne protozoe, crijevni helminti i njihovi razvojni oblici			
3.Vibrioni			
4. Bakteriofagi			
5.Alge i drugi organizmi, koji mogu da izmjene izgled, miris i ukus vode	10	100	300
6.Aerobne mezofilne bakterije na agaru nakon inkubacije od 48 sati na 37 °C u 1 ml vode, do	0	100	100
7.Ukupne koliformne bakterije određene kao najvjerojatniji broj u 100 ml vode	0	5	10
	0	1	10
8.Ukupne koliformne bakterije određene metodom membranske filtracije u 100 ml vode	0	1	1
9.Sulfitoreducirajuće klostridije u 1 ml vode			
10.Broj infektivnih jedinica enterovirusa u 10 ml vode			

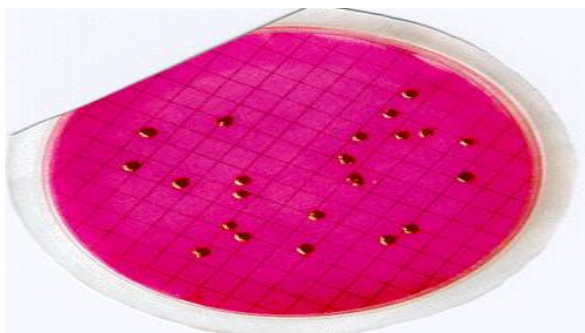
Tablica 2. Mikrobiološke osobine vode za piće

2.3. STANDARDI ZA VODE I PRIMJENA MIKROORGANIZAMA KAO INDIKATORA

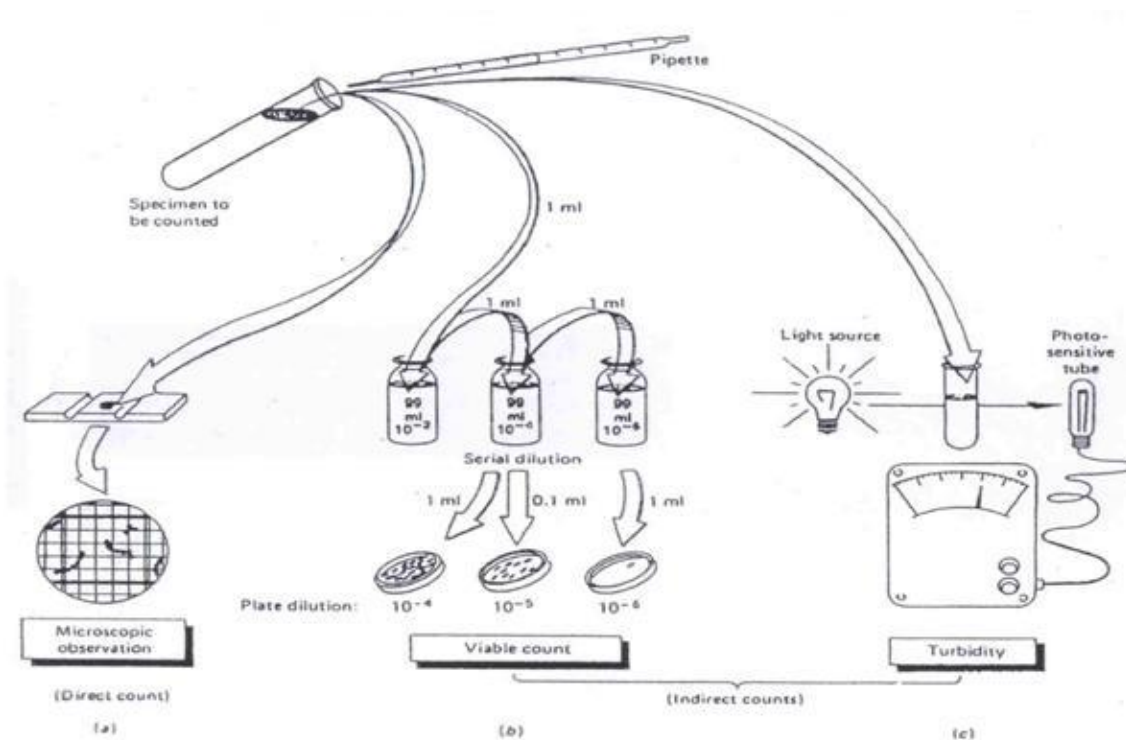
Standardi za kakvoću vode u pravilu se odnose na broj koliformnih bakterija. Kada se rezultati bakterioloških istraživanja vode pojavljuju kao neprihvatljive razine fekalne kontaminacije, istražuje se podrijetlo kontaminacije ili propusti u sustavu pročišćavanja vode. Osim koliforma kao indikator fekalne kontaminacije javljaju se sojevi bakterija *Streptococcus faecalis*. Za određivanje tih mikroorganizama upotrebljavaju se metode membranske filtracije, određivanje MPN vrijednosti te metode određivanja broja pojedinih vrsta bakterija na selektivnim čvrstim podlogama. (Duraković, 1996.)

2.3.1. Membranska filtracija

Membranska filtracija vrlo je popularan test u mikrobiologiji voda. Budući da je iznimno jednostavan, taj se test može uspješno upotrebljavati i na terenu. Postupak uključuje posebno oblikovane boce za uzorkovanje u koje se uzima najčešće po 100 ml uzorka vode. Upotrebom membranskih filtrata može se odrediti prisutnost i broj koliforma. Odabrani se volumen vode filtrira, a na filtru zaostane svaka prisutna bakterija. Filtar se potom izvadi iz lijevka, stavlja na čvrstu selektivnu podlogu u petrijevoj zdjelici (najčešće EMB ili endoagar), a potom inkubira pri 35 – 37°C ili pri 44,5°C. Kolonije prisutnih koliforma porastu na filtru unutar 24 – 48h. Porasle kolonije se broje na uobičajen načinposlije inkubacije.Kada se izbroje, dalje se ispituju u cilju identifikacije na uobičajen način.Mutni uzorci vode ovom se metodom ne mogu testirati, jer će suspendirani materijal začepiti filtarske pore. Čak i sa tim ograničenjem metoda membranske filtracije ima značajne prednosti, što je nužno za provođenje svih testova za određivanje mikrobiološke kvalitete vode. (Duraković, 1996.)



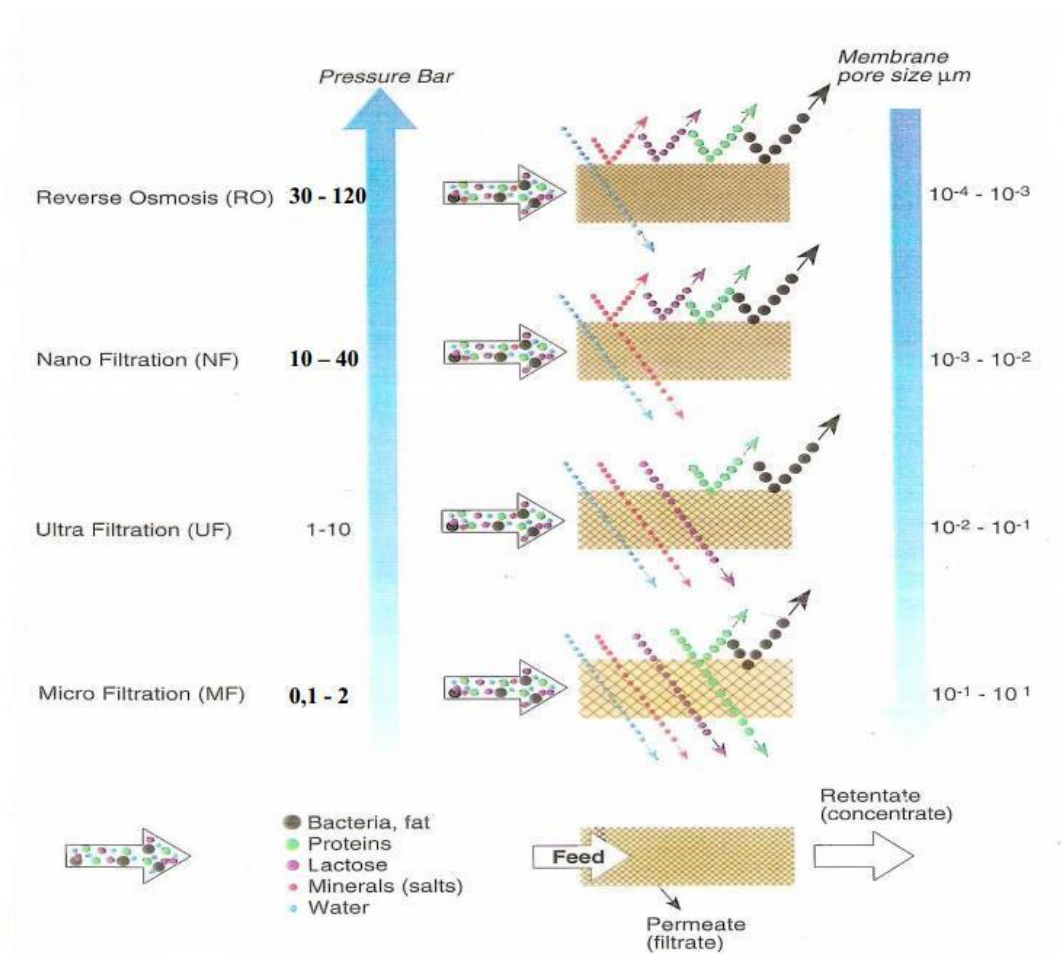
Slika 1. Bakterije vrste *Escherichia coli* porasle na filtru na endo agaru



Slika 2. Određivanje bakteriološke kvalitete vode membranskom filtracijom



Slika 3. Metoda određivanja živih bakterija pomoću membranske filtracije



Slika 4. Vrste membranskih procesa

([http://studenti.ptfos.hr/Preddiplomski studij/Procesi u prehrambenoj industriji/](http://studenti.ptfos.hr/Preddiplomski_studij/Procesi_u_prehrambenoj_industriji/))

2.3.2. Najvjerojatniji broj (MPN)

Određivanje najvjerojatnijeg broja koliformnih bakterija (MPN) statistička je metoda koja se osniva na teoriji vjerojatnosti. Određivanje se provodi u nekoliko serija razrjeđenja. Jedan od načina MPN – vrijednosti upotreba je 15 epruveta s brilijant-zelenim laktoza-žučnim bujonom u kojima se nalaze Durchamove epruvetice. Pet od njih inokulira se sa po 10 ml uzorka istraživane vode, drugih pet sa po 1 ml i trećih pet sa po 0,1 ml. Nakon inkubacije na 37°C tijekom 48h izbroje se epruvete s pozitivnom reakcijom (pojava CO₂ u Durchamovim epruvetama). Dobiveni rezultati uspoređuju se sa statističkim tablicama (tablice prema Swaroopu) iz kojih se iščitava broj koliformnih bakterija. Drži se da je uzorak vode koji sadrži 2,2 koliformne bakterije (ili više) u 100 ml vode, kontaminiran. (Duraković, 1996.)

Postupak za određivanje najvjerojatnijeg broja koliformnih bakterija (Most probable Number ili MPN) odvija se sljedećim redoslijedom:

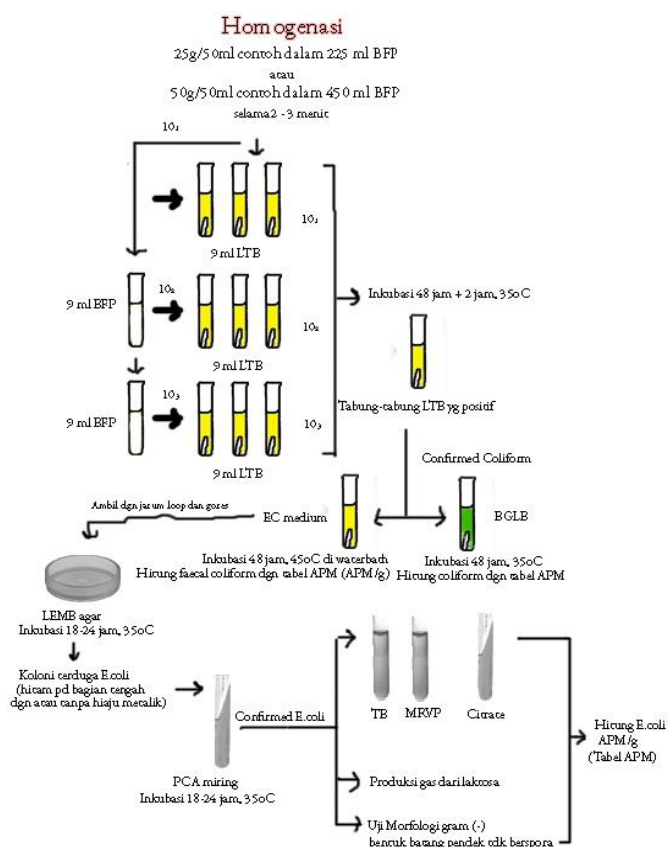
1. inokulacija serije epruveta (nacijepljivanje uzorka vode);
2. inkubacija;
3. određivanje broja pozitivnih epruveta;
4. traženje dobivenih vrijednosti u MPN tablicama;
5. određivanje MPN vrijednosti.

Broj epruveta sa pozitivnom reakcijom od 5 naciepljenih s 10 ml vode	Najvjerojatniji broj koliformnih bakterija u 100 ml vode (MPN)	granične vrijednosti	
		donja granica	gornja granica
0	0	0	6,0
1	2,2	0,1	12,6
2	5,1	0,5	19,2
3	9,2	1,6	29,4
4	16,0	3,3	52,9
5	beskrajan	8,0	beskrajan

Tablica 3. Najvjerojatniji broj koliformnih bakterija u 100 ml vode (upotrebljava se u kolimetriji pročišćenih voda,metodom po Swaroopu)

Epruveta sa pozitivnom reakcijom		MPN	Granične vrijednosti	
1 epruveta od 50 ml	5 epruveta od 10 ml		donja granica	gornja granica
0	1	1	0,5	4
0	2	2	0,5	6
0	3	4	0,5	11
0	4	5	1	13
1	0	2	0,5	6
1	1	3	0,5	9
1	2	6	1	15
1	3	9	2	21
1	4	16	4	40

Tablica 4. Najvjerojatniji broj koliformnih bakterija u 100 ml vode (upotrebljava se u kolimetriji prečišćenih voda i prirodnih voda zatvorenog tipa)



Slika 5. Postupak za određivanje najvjerojatnijeg broja (MPN)

(<https://daengsituju.wordpress.com/>)

2.3.3. Standardna metoda za određivanje broja živih bakterija

Iako nema posebno reguliranog propisa u pogledu kakvoće vode s obzirom na broj aerobnih bakterija, standardno se upotrebljava postupak poznat kao metoda brojenja kolonija na čvrstoj podlozi. Postupak uključuje pripremu čvrste podloge miješanjem 1 ml izvornog uzorka vode ili njegova alikvotnog razrijeđenja, s rastaljenom i na 45°C ohlađenom podlogom (najčešće s hranjivim agarom). Nakon skrućivanja, podloga se inkubira pri 35 - 37°C tijekom 24h i izbroje se porasle kolonije. Nalazi od 100 ili manje jedinica koje tvore kolonije u 1 ml uzorka, prihvatljiv je sigurnosni standard za pitku vodu. Značaj brojanja svih živih bakterija u vodi je znatno veći u ocjeni kvaliteta efikasnosti tehnološkog procesa pročišćavanja voda (filtracija, kloriranje, ozonizacija i dr.) U ovom slučaju brojanje bakterija treba obavljati prije i poslije primjena tehnološkog procesa pročišćavanja. (Duraković, 1996.)

2.3.4. Pravila rada i mjere sigurnosti u mikrobiološkom laboratoriju

U mikrobiološkom laboratoriju radi se u čistom bijelom mantilu i zaštitnoj obući.

Da bi se rad u bakteriološkom laboratoriju uspješno provodio moramo se pridržavati određenih pravila:

1. u laboratorij je zabranjeno unositi hranu i jesti;
2. tijekom rada ne smije se dodirivati lice, usta i oči;
3. ne smije se piti voda iz laboratorijskih čaša ili drugog laboratorijskog posuđa, kao ni sa slavine u laboratoriju;
4. čistoća laboratorija i namještaja je osnova za uspješan rad;
5. prije početka, kao i poslije rada, treba radnu površinu dezinficirati na najpogodniji način, oprati ruke toplom vodom i sapunom, te izvršiti dezinfekciju ruku (5% otopina „ASEPSOLA“)
6. prije i poslije nanošenja kulture mikroorganizama potrebno je mikrobiološku ušicu kojom se vrši prenošenje mikroorganizama, sterilizirati u plamenu;
7. upotrijebljene kulture stavljati u plastične vrećice i sterilizirati;
8. upotrijebljene pipete stavljati u posebne posude sa dezinfekcijskim sredstvom;

9. neinficirane otpatke (papir, šibice, vata....) bacati u korpu za otpatke;
10. jednom mjesečno kontrolirati atmosferu u laboratoriju, a jednom tjedno u laminarnom kabinetu.

2.3.5. Uzimanje uzoraka vode za bakteriološku analizu

Osnovni uvjet za dobivanje pouzdanih rezultata o kvalitativnom bakteriološkom stanju vode jest da se ispitivana voda uzima i šalje na pregled tako da se pri tome ne kontaminira i da se onemogući razmnožavanje onih bakterija koje u njoj već postoje, ali da one u njoj ostanu žive i sposobne za razmnožavanje. Zbog toga je neophodno da se uzimanju i slanju vode za bakteriološki pregled posveti najveća pažnja. Uzorci se transportiraju u rashladnim uređajima i donose u laboratoriju najkasnije 6 sati poslije uzimanja. Uzorci vode koji će se zasijati u roku od jednog sata poslije uzimanja ne moraju se transportirati u hladnjaku. Primljeni uzorci u laboratoriji se odmah zasijavaju, u protivnom se moraju držati u frižideru na temperaturi od 40°C. Tako čuvani uzorci se moraju zasijati u roku od 12 sati. Na bocu za uzimanje uzoraka stavlja se naljepnica sa sljedećim podacima: naziv objekta iz kojeg je uzorak uzet, mjesto i datum. Kad posebni okolnosti zahtijevaju, uzorak vode se može dostavljati i pod šifrom, ali se mora naznačiti koja se vrsta analiza traži, u skladu sa propisom o higijenskoj ispravnosti vode za piće. Ako se u nalogu ne naznači koja se analiza traži izvršit će se samo osnovna analiza vode.

Uzorkovanje vode obavlja se na slijedeći način:

- Uzorci vode za analizu uzimaju se u odgovarajuće sterilne boce od 250ml;
- U boce namijenjene za uzimanje kloriranih voda prije sterilizacije dodaje se 1 ml 3%-tne otopine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- Prije uzimanja cijev iz koje se voda uzima mora biti opaljena plamenom vate natopljene u etanolu
- Zatim se pusti da voda teče 3-5 min. da bi se cijev ohladila tj. da bi otekla ona količina vode koja je bila sadržana u cijevi
- Tada se čep sa boce za bakteriološku analizu pažljivo skine pazeći pri tom da se ne

dodiruje unutrašnja strana čepa i grlića boce, te se boca brzo podmetne ispod cijevi

- Kada se boca napuni (nikada ne puniti do vrha) treba ju odmah zatvoriti
- Ako se voda uzima sa slavine s mrežicom obavezno ju treba skinuti

Reference:

1. APHA (1985) Standard methods for the examination of water and waste water. American Public Health Association, Washington D.C. (16. edition)
2. Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće -prilog II. Način uzimanja uzoraka vode za analizu -N.N. br.46/94
3. Šobot S. (1996) Osiguranje kvalitete rada kod mikrobiološkog ispitivanja voda, XXIII.Stručni sastanak (zbornik radova), Hrvatsko farmaceutsko društvo, Stubičke Toplice

2.3.6. Metode za određivanje ukupnih koliforma u vodi MPN metodom

Koliformne bakterije su glavna skupina bakterija u kontaminiranoj vodi. Zajednički su naziv za mikroorganizme čija prisutnost u pitkim vodama, u broju koji prelazi dopuštenu razinu, signalizira kontaminaciju fekalnog podrijetla. Aerobni su ili fakultativno anaerobni, gram-negativni nesporigeni štapići, koji fermentiraju laktozu i tvore CO₂ i kiselinu tijekom 24 – 48 sati, kada rastu pri 35-37 °C. Ta skupina uključuje različite vrste :

- *Eschericia coli*
- *Enterobacter aerogenes*
- *Klebsiella pneumoniae*.

Ti su mikroorganizmi normalna mikroflora probavnog sustava sisavaca gdje se nalaze u velikim količinama, a u vodi preživaljavaju mnogo duže od nekih drugih patogenih mikroorganizama. Prisutnost velikog broja koliforma u vodi u pravilu indicira nedavnu kontaminaciju, relativno niski broj odražava naknadne probleme kontaminacije.

1. Priprema i inokulacija

- uzeti tri epruvete selektivne hranjive podloge dvostruke snage (Tryptozni bujon s lauril- sulfatom)
- aseptično prenijeti sterilnom pipetom po 10 ml uzorka u svaku epruvetu i promiješati
- tri epruvete selektivne hranjive podloge jednostruke snage nacijepiti sa po 1 ml uzorka vode
- za svako slijedeće razrijeđenje postupiti kao u opisanim slučajevima

2. Inkutracija i ispitivanje

- epruvete staviti u temostat i inkubirati pri 30°C, 35°C ili 37°C (prema dogovoru), 24+/- 2h

3. Potvrdni test

- nakon inkubacije iz svake epruvete s hranjivom podlogom dvostruke snage nacijepiti ušicom potvrdnu hranjivu podlogu Brilijant zelenog laktoza žučnog bujona
- inkubirati na 30°C, 35°C ili 37°C (prema dogovoru), 24 ili 48 +/- 2 h (ako nema plina)
- provesti isti postupak i za inkubirane epruvete s hranjivom podlogom jednostruke snage koje ukazuju tvorbu plina ili opalesciranja, kada se bilo koja od ovih osobina prvaprimjeti (tj. nakon 24 ili 48 +/- 2h)

4. Izražavanje rezultata

- nakon pozitivnog testa za svako razrijeđenje izbrojiti ukupan broj epruveta u kojima se primjećuje tvorba plina (nakon 24 ili 48 +/- 2h)
- prema tablici, ovisno o razrijeđenju i broju pozitivnih epruveta očitati MPN

KOLIFORMNE BAKTERIJE (KOLIMETRIJA)

PRETHODNI TEST:
BRILJANT ZELENI LAKTOZA
ŽUCNI BUJON (BZLŽB)



NEGATIVNO:
NEMA PLINA
CO₂



POZITIVNO:
IMA PLINA
CO₂

POTVRDNI TEST:
LJUBIČASTO CRVENI
ŽUCNI AGAR (LJCŽA)



POZITIVNO:
SITNE LJUBIČASTE
KOLONIJE METALNOG
SJAJA

ZAVRŠNI TEST:

BZLŽB



POZITIVNO:
IMA PLINA
CO₂

KOSI
HRANJIVI
AGAR



POZITIVNO:
PORAST
KOLONIJA

IMViC TEST:
PODLOGE ZA IMViC
TEST PRIJE
NACJEPLJIVANJA



I MC/VP C

TEST NA INDOL:
POZITIVNO – POJAVA
CRVENO OBOJANOG
PRSTENA



NEGATIVNO POZITIVNO

TEST METILNIM
CRVENILOM:
POZITIVNO – CRVENO
OBOJENJE PODLOGE



NEGATIVNO POZITIVNO

VOGES-PROSKAUER-OV TEST:
POZITIVNO – CRVENO OBOJENJE
PODLOGE



NEGATIVNO POZITIVNO

TEST NA CITRAT:
POZITIVNO – PLAVO OBOJENJE
PODLOGE



POZITIVNO NEGATIVNO

Slika 6. Koliformne bakterije

([www.pbf.unizg.hr/.../MBN+\(2011.-2012.\)+-+SKRIPTA+ZA+VJEŽBE](http://www.pbf.unizg.hr/.../MBN+(2011.-2012.)+-+SKRIPTA+ZA+VJEŽBE))

2.3.7. Metoda za određivanje ukupnih koliforma u vodi membranskom filtracijom

1. Filtriranje i inokulacija

- sterilnom pincetom položiti sterilni membranski filter na poroznu ploču aparata za filtraciju
- učvrstiti lijevak i uliti 100 ml uzorka vode
- profiltrirati uzorak i isprati sa 20-30 ml fosfatnog pufera
- filter prenijeti na površinu podloge (Les Endo agar Medium - u izvorniku) u Petrijevoj zdjelici pazeći da ispod filtra ne ostanu mjehurići zraka

2. Inkubacija i ispitivanje

- preokrenute zdjelice se inkubiraju 24h na 37+/-0,5°C

3. Brojanje kolonija

- broje se crvene kolonije sa zlatno-metalnim sjajem na površini

4. Potvrdni test

- aseptično se prenese sterilnom ušicom sumnjiva kolonija sa membranskog filtra u epruvetu s Mac Conkey bujonom i inkubira 24h na 37+/- 0.5°C

5. Izražavanje rezultata

- izbrojati kolonije na membranskom filtru i izraziti rezultat kao broj ukupnih koliforma u 100 ml uzorka pomoću jednadžbe:

ukupni koliformi u 100 ml = broj pozitivnih kolonija x 100 /ml filtriranog uzorka
(ISO, 1990)

Reference:

- 1 . Internacionalni standard ISO 9308- 1 : 1 990
2. APHA (1995) Standard methods for the examination of water and waste water.
American Public Health Association, Washington D.C. (19th edition)

2.3.8. Metode za određivanje broja aerobnih mezofilnih mikroorganizama u vodi

To su bakterije koje rastu u temperaturnom rasponu od 20-45 °C (mezofilno), uz prisustvo kisika (aerobno). Većini ovih bakterija je optimalna temperatura 37 °C (čovjekova tjelesna temperatura), što znači da skupini aerobnih mezofilnih bakterija pripada većina patogenih bakterija.

Aerobne mezofilne bakterije nisu opasne za zdravlje ljudi.

1. Priprema i inokulacija

- prema potrebi napraviti razrjeđenje ispitivanog uzorka vode u sterilnoj fiziološkoj otopini ili (prije inokulacije razrjeđenje dobro promućkati)
- aseptično prenijeti sterilnom pipetom u sterilne Petrijeve zdjelice po 1 ml uzorka ili određenog razrjeđenja (početi sa najvećim razrjeđenjem)
- dodati 15-20 ml rastopljene podloge (hranjivi agar) i oprezno kružno pomiješati i pustiti podlogu da se skrutne. Vrijeme između dodavanja uzorka i dodavanja podloge ne treba biti duže od 15 minuta

2. Inkubacija i ispitivanje

- Petrijeve zdjelice sa naciepljenim uzorkom preokrenuti i staviti u termostat
- inkubirati jednu zdjelicu pri $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ kroz 44 ± 4 h, a drugu pri $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ kroz 68 ± 4 h

3. Brojanje kolonija

- za "ukupan" broj mikroorganizama na neselektivnoj podlozi treba brojiti sve kolonije unutar i na površini podloge, a rezultat izraziti kao broj formiranih kolonija na mililitar uzorka, uzimajući u obzir razrjeđenje (ISO, 1999.), (APHA, 1995)

2.3.9. Metode za određivanje fekalnih streptokoka u vodi membranskom filtracijom

Fekalni streptokoki ili enterokoki podrazumijevaju bakterije roda *Streptococcus*, grupe D.

Njih se može naći u crijevima, stoga i u fekalijama čovjeka i toplokrvnih životinja pa se koriste kao indikatori fekalne kontaminacije vode.

Fekalni streptokoki se uzgajaju na selektivnom prema Slanetz-u i Bartley-u na 35°C za vrijeme od 48 h.

Najvažniji predstavnik fekalnih streptokoka je bakterija vrste *Streptococcus faecalis* koja može uzrokovati gnojne infekcije, bakterijski endokarditis i infekcije urinarnog trakta. Fekalni streptokoki ili enterokoki su najpodobnija grupa bakterija za vrednovanje higijenske kvalitete npr. vode. Broj fekalnih streptokoka je u korelaciji s brojem prisutnih patogenih bakterija izrodova *Campylobacter*, *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, fekalnih i ukupnih koliformnih bakterija i enterovirusa. Jedina negativna strana ove indikatorske grupe bakterija je što se ne mogu dokazati u okolišu temperature iznad 55°C jer te temperature pogubno djeluju na navedene grupe bakterija. Rast popratnih Gram-negativnih bakterija u uzorku inhibiran je Na-azidom u podlozi, dok fekalni streptokoki nesmetano rastu u njegovoj prisutnosti. Fekalni streptokoki reduciraju 2,3,5-trifeniltetrazolium klorid u podlozi do crvenog spoja formazana, te su njihove kolonije stoga crveno obojene.



Slika 7. Fekalni streptokokina agarnoj podlozi

(<https://www.e-skola.biol.pmf.unizg.hr>)

1. Filtriranje i inokulacija

- sterilnom pincetom položiti sterilni membranski filter na poroznu ploču aparata za filtraciju
- učvrstiti lijevak i uliti 100 ml uzorka vode
- profiltrirati uzorak i isprati sa 20 ml pufera
- filter prenijeti na površinu agara po Slanetz-u i Bartley-u u Petrijevoj zdjelici pazeći pritom da ispod filtra ne ostanu mjehurići zraka

2. Inkubacija i ispitivanje

- preokrenute zdjelice inkubirati 48 h pri $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ili $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

3. Brojanje kolonija

- broje se kolonije koje imaju crvenu, smeđe-ljubičastu i ljubičastu boju

4. Potvrdni test (prema ISO 789912)

- aseptično prenijeti sterilnom ušicom sumnjivu koloniju sa membranskog filtra na eskulin žučni agar i inkubirati 48 h na $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

5. Katalaza test

- slaviti kapljicu 3% - tnehidrogen-peroksidne otopine na kolonije koje su izrasle na eskulin žučnom agarui provjeriti pojavom stvaranja (samo katalaza negativne kolonije mogu sesmatrati fekalnim streptokokima);
- moguće je učiniti i potvrdni test prema APHA (1995).

6. Izražavanje rezultata

- izbrojati kolonije na membranskom filtru i izraziti rezultat kao broj fekalnih streptokoka u 100 ml uzorka pomoću jednadžbe:

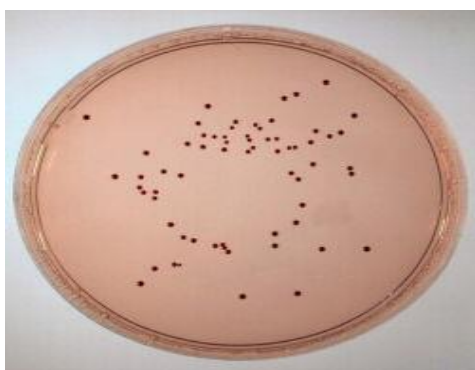
fekalni streptokoki u 100 ml : broj pozitivnih kolonija x 100 /ml filtriranog uzorka

Eskulin azidni žučni agar je selektivna podloga koja se koristi za izolaciju i brojanje enterokoka u prehrani i farmaceutskim proizvodima. Također se koristi za brojenje crijevnih enterokoka u vodi.



Slika 8. Kolonije enterokoka na Eskulin azidni žučnom agaru

Agar po Slanetz-u i Bartley-u je selektivna podloga koja se koristi za brojanje enterokoka u vodi za kupanje, vodi za piće, napitcima, otpadnim vodama i raznim biološkim produktima životinjskog podrijetla metodom membranske filtracije (Duraković, 1996.).



Slika 9. Enterokoki na agaru po Slanetz-u i Bartley-u

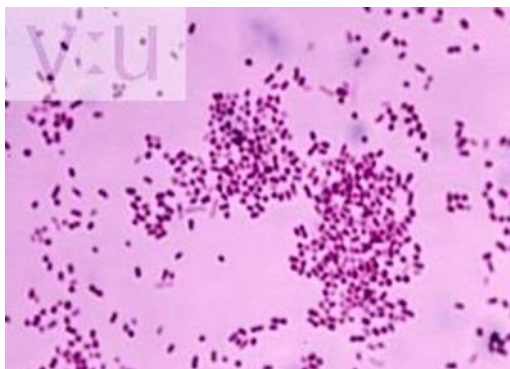
2.3.10. Određivanje bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa* u vodi MPN metodom

Voda može postati sredstvo za prijenos velikog broja različitih mikrobnih bolesti. Poseban problem predstavlja bakterija vrste *Pseudomonas aeruginosa*.

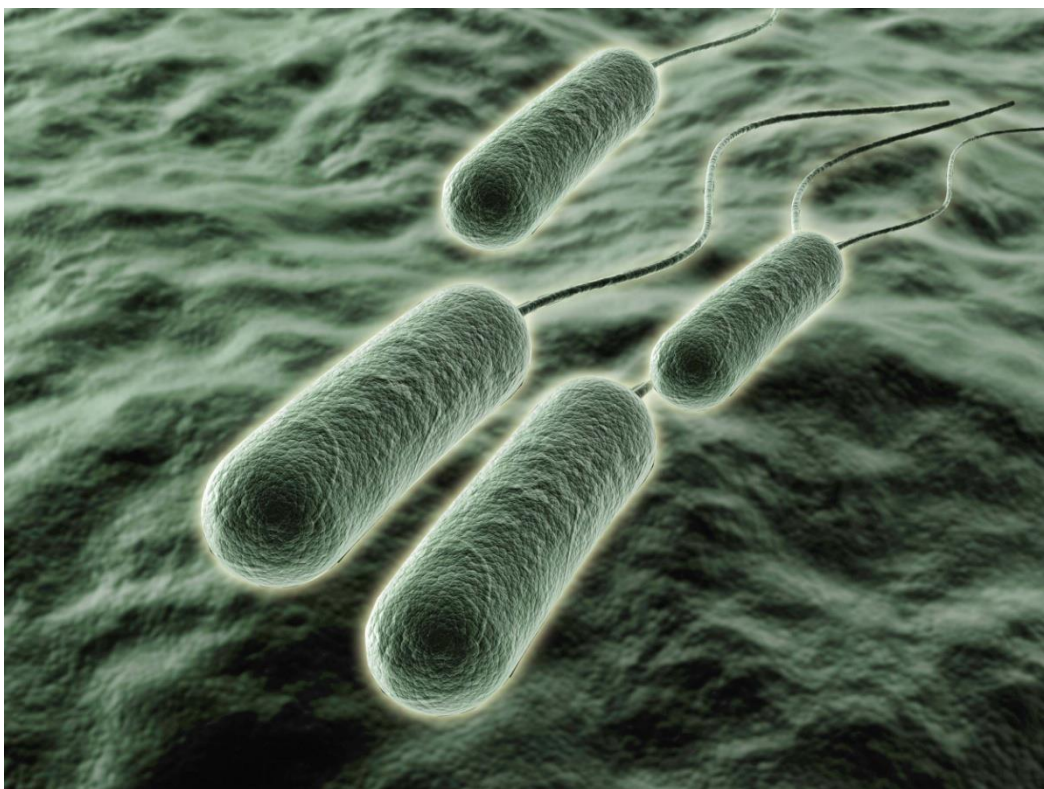
U svibnju 1983. godine ta je bakterija izazvala osip i uhololju kod 265 gostiju koji su se kupali u bazenima države Utah, nakon što se pokvario uređaj za filtriranje vode (Duraković, 1996.).

Pseudomonas aeruginosa je asporogena Gram-negativna, široko rasprostranjena i izrazito otporna bakterija. Striktni je aerob i brzo se kreće pomoću polarno raspoređenih flagela.

Ima brojne čimbenike virulencije, uključujući enzime i toksine.



Slika 9. Mikroskopska slika enterokoka



Slika 10. Morfološki izgled bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa*

(<https://www.pharmamicroresources.com>)

MPN metoda ili membranska filtracija na odgovarajućim podlogama za *P. aeruginosa* – potvrda sumnjivih kolonija.

1. Priprema i inokulacija

- nacijepiti 5 epruveta u kojima se nalazi po 10 ml tekuće podloge Asparagin bujona (u izvorniku) s po 10 ml uzorka vode
- ako je uzorak jače zagađen može se nacijepiti i 5 epruveta sa po 1 ml uzorka i 5 epruveta sa 0,1 ml uzorka

2. Inkubacija i ispitivanje

- epruvete protresti i inkubirati 48 h na 35°C

3. Izražavanje rezultata

- služeći se statističkim tablicama (u izvorniku) iz broja epruveta koje daju pozitivne rezultate izračunati najvjerojatniji broj *P.aeruginosa*

MPN: $(\text{broj epruveta} \times \text{volumen uzorka}) / (\text{volumen uzorka u svim epruvetama sa negativnim reakcijama} \times \text{volumen uzorka u svim epr. sa pozitivnim reakcijama})$

4. Potvrdni test

- iz epruvete s pozitivnom reakcijom aseptično prenijeti sterilnom pipetom koloniju na krutu podlogu Pseudomonas agar P. i inkubirati 72 h na 32-37°C
- sumnjive kolonije staviti na biokemijski niz (sumnjive kolonije imaju zeleni pigment a pod UV lampom plavi) (APHA, 1985.).

2.3.11. Određivanje bakterija vrste *Pseudomonas aeruginosa* u vodi metodom membranske filtracijom

1. Filtriranje i inokulacija

- sterilnom pincetom položiti sterilni membranski filter na poroznu ploču aparata za filtraciju;
- učvrstiti lijevak i uliti 100 ml uzorka vode;
- profiltrirati uzorak i filter prenijeti na površinu Pseudomonas selektivnog agara u Petrijevoj zdjelici pazeći da ispod filtera ne ostanu mjehurići zraka;

2. Inkubacija i ispitivanje

- preokrenute zdjelice inkubirati 44+/-4 h na 36+/- 2°C

Tumačenje bakteriološkog nalaza u vodama za piće

- 1) Nalaz bakterije vrste *Escherichia coli* sa nekom drugom bakterijom, indikatorom fekalnog zagađenja upućuje na skorašnje zagađenje izmetom. Takva voda je epidemiološki opasna.
- 2) Nalaz bakterije vrste *Escherichia coli* bez drugih bakterija indikatora fekalnog zagađenja ukazuje na vremenski neodređeno, ali sigurno zagađenje vode izmetom.
- 3) Nalaz koliformnih bakterija u vodi bez bakterije vrste *Escherichia coli*, udruženih sa drugim bakterijama indikatorima fekalnog zagađenja ukazuje nesumnjivo na skorije fekalno zagađenje.
- 4) Nalaz bakterije vrste *Enterococcus faecalis* u vodi bez bakterije vrste *Escherichia coli*, usamljene ili udružene sa bakterijom vrste *Clostridium perfringens* ili bakteriofagomentero bakterija ukazuje na starije fekalno zagađenje.
- 5) Nalaz usamljenog bakteriofagaentero bakterija sigurno ukazuje na staro fekalno zagađenje.
- 6) Nalaz usamljene bakterijske vrste *Clostridium perfringens* ukazuje na sasvim staro fekalno zagađenje, bez epidemiološkog značaja. Takvu vodu treba češće kontrolirati.
- 7) Odsustvo bakterija indikatora fekalnog zagađenja u vodi za piće je idealan slučaj komu treba težiti! (Čoha, 1990.)

3. ZAKLJUČAK

Voda je najvažniji faktor u nastajanju života. Ima izuzetnu ulogu u okolišu. Čak je 80% zemljine površine pokriveno vodom, a naše je tijelo sadrži još više - 90%. Dakle, sav je život nastao i održava se u vodi. Čovjek bez vode može živjeti svega 72 sata, ali, nažalost, posljednji podaci pokazuju da je svega 1% pitke vode na Zemlji ispravno i potpuno neškodljivo za čovjeka. U Hrvatskoj se još uvijek može piti voda iz slavina, iako je potrebna stroga kontrola kakvoće pitke vode mikrobiološkim i kemijskim analizama. U sustavu vodoopskrbe pitka se voda kontinuirano kontrolira. Mnoge se metode primjenjuju za određivanje bakteriološke kontrole vode, a odabiru se u suglasju s mogućnostima laboratorijskog testiranja.

U internom laboratoriju tvrtke Vodovod-Osijek d.o.o. u kojem se provode kontrole zdravstvene ispravnosti vode za piće, obavljaju se ispitivanja sljedećih parametara: mutnoća, boja, miris, pH, amonijak, nitriti, nitrati, alkalitet, otopljeni kisik, fluoridi, fosfati, mangan, željezo, arsen, itd., kao i mikrobiološke analize.

Obavljena mjerenja i dosadašnji rezultati pokazali su da navedeni parametri ne prelaze maksimalno dozvoljene koncentracije, te da imamo zdravstveno ispravnu vodu. Laboratorij je opremljen modernom tehnologijom i opremom.

4. LITERATURA

APHA, *Standard methods for the examination of water and waste water*. American Public Health Association, Washington D.C. (16th edition), 1985.

Čoha F: *Voda za piće – Standardne metode za ispitivanje higijenske ispravnosti*, Privredni pregled, Beograd, 1990.

Duraković S: *Primijenjena mikrobiologija*, Prehrambeno tehnološki inženjering Zagreb, 1996.

Duraković S: *Opća mikrobiologija*, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.

Hach D: *Spektrophotometer Handbook*, 2000.

Internacionalni standard ISO 6222:1999 (E)

Internacionalni standard ISO 4831: 1991 (E)

Kerže-Živaković Z: *Od močvara do oranica*, Osječki zbornik, 27, Osijek, 2004.

Korać V: *Tehnologija vode za potrebe industrije*, Zagreb, 1985.

Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske: *Zdravstvena ispravnost hrane*, Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće -prilog II. Način uzimanja uzoraka vode za analizu - N.N. br. 46 /94

Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće, Narodne novine 46, 1994.

Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće, Narodne novine 47, 2008.

Šobot S: *Osiguranje kvalitete rada kod mikrobiološkog ispitivanja voda*, Hrvatsko farmaceutsko društvo, Stubičke Toplice, 1996.

<https://daengsituju.wordpress.com/>

<https://www.e-skola.biol.pmf.unizg.hr>

[https://www.hr.wikipedia.org/wiki/Kakvoća_vode\)\(https://www.zzizosijek.hr/index.php?page=kakvoca-kupalisnih-voda](https://www.hr.wikipedia.org/wiki/Kakvoća_vode)(https://www.zzizosijek.hr/index.php?page=kakvoca-kupalisnih-voda)

[www.pbf.unizg.hr/.../MBN+\(2011.-2012.\)+--+SKRIPTA+ZA+VJEŽBE](http://www.pbf.unizg.hr/.../MBN+(2011.-2012.)+--+SKRIPTA+ZA+VJEŽBE)

<https://www.pharmamicroresources.com>

[http://studenti.ptfos.hr/Preddiplomski studij/Procesi u prehrambenoj industriji/](http://studenti.ptfos.hr/Preddiplomski_studij/Procesi_u_prehrambenoj_industriji/)

<http://www.vodovod.com> [20.11.2014]