

# Selektivnost komercijalnih krutih medija za izolaciju ukupnih koliformnih bakterija iz površinskih voda

---

Šimunović, Senka

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:154892>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**Senka Šimunović**

**Selektivnost komercijalnih krutih medija za izolaciju  
ukupnih koliformnih bakterija iz površinskih voda**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2009. godina**

Ovaj rad, izrađen u Botaničkom zavodu pod neposrednim vodstvom doc. dr. sc. Jasne Hrenović, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

*Najljepše se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Jasni Hrenović na pruženoj pomoći, strpljenju, idejama i korisnim savjetima prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Srdačno zahvaljujem tehničarki Renati na strpljenju, pomoći te na opskrbljivanju potrebnim sredstvima prilikom provođenja eksperimentalnog rada..*

*Hvala kolegici Ivani na suradnji i podršci tijekom provođenja eksperimentalnog rada.*

*Veliko hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje te na njihovom strpljenju i potpori tijekom studija.*

*Hvala svim kolegicama i kolegama na razumijevanju, podršci, pomoći i zabavi tijekom studiranja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Selektivnost komercijalnih krutih medija za izolaciju ukupnih koliformnih bakterija iz površinskih voda

Senka Šimunović

Botanički zavod, Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Istraživanje selektivnosti komercijalnih krutih medija za izolaciju ukupnih koliformnih bakterija iz površinskih voda provedeno je na uzorku čiste kulture vrste *Escherichia coli* i 19 uzoraka vode prikupljenih iz 7 potoka grada Zagreba, jezera Botaničkog vrta i pet maksimirskih jezera. Uzorci su nacijepljeni na istraživane medije metodom širenja razmaza. Cilj ovog rada bio je istražiti učinkovitost izolacije ukupnih koliformnih bakterija i vrste *Escherichia coli* na četiri komercijalna kruta medija: EC-X Gluc agar, Endo agar, m-Faecal Coliform agar i MacConkey agar.

Uspoređujući podatke dobivene brojanjem izraslih kolonija koliformnih bakterija ustanovljeno je da se mediji razlikuju po broju izraslih kolonija. MacConkey agar je medij na kojemu je izraslo najviše kolonija te je to ujedno i najbolji medij za izolaciju ukupnih koliformnih bakterija. Slijede ga Endo agar i m-Faecal Coliform agar koji se jako malo razlikuju u rezultatima. Najlošija podloga za izolaciju ukupnih koliformnih bakterija je EC-X Gluc agar. Kako su mediji diferencijalni, posebno su pobrojane i kolonije vrste *Escherichia coli*. Najselektivniji podloga za izolaciju vrste *Escherichia coli* je, prema dobivenim rezultatima, MacConkey agar. Slijede ga m-Faecal Coliform agar i Endo agar. Najlošija podloga za izolaciju vrste *Escherichia coli* je EC-X Gluc agar.

(48 stranica, 57 slike, 7 tablica, 41 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: koliformne bakterije/ *Escherichia coli* / hranjive podloge

Voditelj: Dr.sc. Jasna Hrenović, doc.

Ocijenitelji: Dr.sc. J. Hrenović, doc.

Dr.sc. Z. Mihaljević, doc.

Dr.sc. D. Mrvoš – Sermek, doc.

Dr.sc. D. Kovačević, izv.prof.

Rad prihvaćen: 03. lipnja 2009.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### SELECTIVITY OF COMMERCIAL SOLID MEDIA FOR ISOLATION OF TOTAL COLIFORM BACTERIA FROM SURFACE WATER

Senka Šimunović

Department of Botany, Division of Biology, Faculty of Science  
University of Zagreb  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Selectivity of commercial media for isolation of total coliform bacteria from surface water, was investigated on sample of clean culture of *Escherichia coli* and 19 samples of water, collected at seven brooks of Zagreb, at lake of Botanical Garden and five lakes of Maksimir. Samples were inoculated on investigated media with Plate Streak Method. The aim of this research was to investigate efficiency of isolation of total coliform bacteria and *Escherichia coli* on four commercial solid media: EC-X Gluc agar, Endo agar, m-Faecal Coliform agar and MacConkey agar.

The data comparison established that the media are different by the number of grown colonies. MacConkey agar is media where the most colonies were grown, this is at the same time the best media for isolation of total coliform bacteria. The following two are Endo agar and m-Faecal Coliform agar, which results are not that different. The worst medium for isolation of coliform bacteria is EC-X Gluc agar. Because the media are differential, the colonies of *Escherichia coli* were separately counted. The results show that the most selective medium for isolation of *Escherichia coli* is MacConkey agar. It's followed by m-Faecal Coliform agar and Endo agar. The worst medium for isolation of *Escherichia coli* is EC-X Gluc agar.

(48 pages, 57 figures, 7 tables, 41 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: coliform bacteria /*Escherichia coli*/ solid media

Supervisor: Dr.sc. J. Hrenović, Asst. Prof.

Reviewers: Dr.sc. J. Hrenović, Asst. Prof.

Dr.sc. Z. Mihaljević, Asst. Prof.

Dr.sc. D. Mrvoš – Sermek, Asst. Prof.

Dr.sc. D. Kovačević, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 3<sup>th</sup> June 2009.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. OPĆE ZNAČAJKE KOLIFORMNIH BAKTERIJA</b> .....	2
1.1.1. PORODICA ENTEROBACTERIACEAE .....	2
1.1.2. ESCHERICHIA COLI .....	3
<b>1.2. HRANJIVE PODLOGE</b> .....	5
1.2.1. EC-X GLUC AGAR .....	6
1.2.2. ENDO AGAR .....	7
1.2.3. m-FAECAL COLIFORM AGAR .....	8
1.2.4. MACCONKEY AGAR .....	9
<b>1.3. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	10
<b>2. MJESTO I VRIJEME ISTRAŽIVANJA</b> .....	11
<b>2.1. OPIS ISTRAŽIVANIH POSTAJA</b> .....	15
2.1.1. POTOCI MEDVEDNICE .....	15
2.1.2. POTOCI I JEZERA PARKA MAKSIMIR.....	17
2.1.3. BOTANIČKI VRT .....	20
<b>3. MATERIJALI I METODE RADA</b> .....	21
<b>3.1. PRIKUPLJANJE UZORAKA</b> .....	21
<b>3.2. OBRADA UZORAKA</b> .....	21
<b>3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA</b> .....	21
<b>4. REZULTATI</b> .....	22
<b>5. RASPRAVA</b> .....	44
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	46
<b>7. LITERATURA</b> .....	47

## 1. UVOD

Voda je vrlo povoljna okolina za život mikroorganizama. Osim mikroorganizama koji stalno postoje u vodi, poput razlagača (saprofagi) te proizvođača (producenti) nove organske tvari, u vode dospijevaju i mikroorganizmi iz probavnog sustava životinja i ljudi, ispiranjem zemljišta te s otpadnim vodama. Neki su od fekalnih mikroorganizama patogeni, tj. izazivaju bolesti kod ljudi i životinja (Tedeschi, 1997). Stanje kakvoće vode u mikrobiološkom smislu utvrđuje se „organizmom pokazateljem“. Postojanje organizama pokazatelja u vodnom sustavu upućuje na to da se u vodnom sustavu mogu nalaziti patogeni organizmi, odnosno ako nije nađen organizam pokazatelj, pretpostavlja se da voda nije onečišćena patogenim mikroorganizmima. Kao organizam pokazatelj u mnogim se zemljama primjenjuju koliformni organizmi, i to kao „ukupni koliformi“ i „fekalni koliformi“ (Tedeschi, 1997).

Pod ukupnim koliformnim organizmima razumijevaju se fekalne bakterije kao *Escherichia coli* koja potječe iz probavnog sustava, ali i druge koliformne bakterije koje se mogu razvijati i na tlu, kao na primjer *Enterobacter*, *Serratia marcescens*, *Providentia* i drugi. Zbog toga se pri utvrđivanju ukupnih koliformnih bakterija ne može sa sigurnošću utvrditi njihovo porijeklo. Primjenom pokazatelja „fekalni koliformi“ može se s više sigurnosti utvrditi da je mikrobiološka onečišćenost nastala unošenjem u vodu otpada iz probavnog sustava ljudi i životinja (Tedeschi, 1997).

60-90% ukupnih koliforma su fekalni koliformi, a 90% i više fekalnih koliforma su vrste roda *Escherichia*.



## 1.1. OPĆE ZNAČAJKE KOLIFORMNIH BAKTERIJA

Koliformne bakterije su grupa Gram-negativnih, fakultativno anaerobnih štapićastih bakterija koje fermentirajući šećer laktozu proizvode kiselinu i plin.

Primarno su nepatogene i normalno obitavaju u donjem intestinalnom traktu (debelom crijevu) čovjeka i toplokrvnih životinja, gdje su odgovorne za pravilnu probavu hrane. Izlučuju se fekalijama, te dospijevaju u otpadne vode, a preko njih u prirodne vode recipijente otpadnih voda.

Koliformne bakterije uključuju 15 vrsta bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* (obuhvaća 30 rodova) koja spada u 5. grupu Bergey-evog priručnika za determinativnu bakteriologiju (fakultativno anaerobni Gram-negativni štapići). Uključuju *Escherichia coli* i srodne vrste koje normalno obitavaju u debelom crijevu kao što su vrste rodova *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (Stilinović i Hrenović, 2009).

Laktozu fermentiraju mješovito-kiselim putem fermentacije, gdje su završni produkti fermentacije etanol, mliječna, jantarna, octena kiselina, ugljični dioksid (CO<sub>2</sub>) i vodik (H<sub>2</sub>). Samo vrste roda *Enterobacter* provode butandiolnu fermentaciju, pri kojoj su završni produkt fermentacije etanol, mliječna, mravlja kiselina, butandiol, CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>.

Ukupne koliformne bakterije razgrađuju laktozu na 35 ± 0,5 °C / 48 h, a fekalne koliformne bakterije razgrađuju laktozu na 44,5 ± 0,2 °C / 24 h, što znači da imaju sposobnost termotolerancije. (Stilinović i Hrenović, 2009).

### 1.1.1. Porodica *Enterobacteriaceae*

*Enterobacteriaceae* su velika porodica Gram-negativnih štapićastih bakterija. Rastu brzo u aerobnim i anaerobnim uvjetima, metabolički su aktivne i razgrađuju različite tvari. Mnoge vrste su pokretne, ne stvaraju spore. Neki članovi žive slobodno u prirodi uz prisutnost vode i minimalnih izvora energije. Mnogi članovi porodice *Enterobacteriaceae* su primarno stanovnici donjeg probavnog sustava ljudi i životinja, te čine dio fiziološke flore istoga (Kučišec-Tepeš, 1994).

To su bakterije duljine 2 - 4 µm, širine 0,4 - 0,6 µm, koje variraju od kokobacilnih oblika do izduženih i nitastih. Krajevi su im zaobljeni. Pokretni oblici imaju peritrihijalne flagele koje pripadaju staničnoj stijenci. Mnogi sojevi imaju površinske fimbrije ili pile koje ne služe za pokretanje, već za prihvaćanje na površine epitelnih stanica, i to na specifične

receptore. Neki oblici imaju kapsulu. Mnogi sojevi sadrže ekstracelularnu staničnu tvar koju zovemo sluzava ovojnica, koja je često slabo povezana sa samom bakterijskom stanicom i lagano se oslobađa u okolinu. Stanična stijenka, stanične membrane i unutrašnja struktura morfološki su slične u svih članova porodice *Enterobacteriaceae* (Kučišec-Tepeš, 1994).

Neki od rodova porodice *Enterobacteriaceae* su: *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Hafnia* i dr.

Za ovo istraživanje najznačajnija je vrsta *Escherichia coli*.

### 1.1.2. *Escherichia coli*

Koljeno: PROTEOBACTERIA

Razred: GAMMAPROTEOBACTERIA

Red: ENTEROBACTERIALES

Porodica: ENTEROBACTERIACEAE

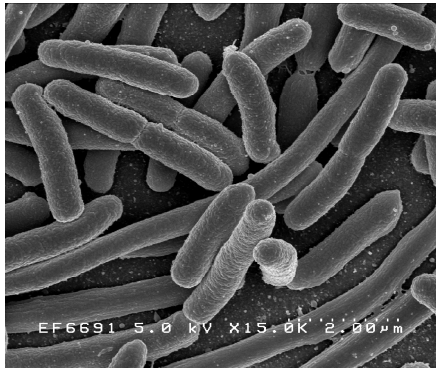
Rod: ESCHERICHIA

Vrsta: *Escherichia coli*

([www.eol.org](http://www.eol.org))

*Escherichia Coli* (Slika 1) (skraćeno *E. coli*) je vrsta bakterije iz roda *Escherichia* i porodice *Enterobacteriaceae* i široko je rasprostranjena u prirodi. Ime potječe od 1958. godine prema Theodoru Escherichu (njemački liječnik) koji je 1885. godine opisao te bakterije te prema grč. kólon, dio debelog crijeva.

Najčešći je član porodice, i to kao član fiziološke flore crijeva i kao uzročnik oportunističkih infekcija. Stanice su štapićastog oblika, dužine oko 1 - 3  $\mu\text{m}$ , 0,4 - 0,7  $\mu\text{m}$  u promjeru. Većinom su pokretne, okružene bičevima. Veliki postotak sojeva posjeduje i fimbrije, a neki sojevi posjeduju i kapsulu. (Weisglass, 1988).



**Slika 1.** Escherichia coli (SEM)

(Foto: [www.molecularstation.com](http://www.molecularstation.com))

U vrsti *E. coli* nalazi se veliki broj raznih serotipova od kojih neke mogu izazvati bolesti kod ljudi. Bakterije se mogu lako uzgajati u laboratorijskim uvjetima, većini serotipova je optimalna temperatura za razmnožavanje oko 37 °C. Pripada prilično otpornim bakterijama, mjesecima može živjeti u vodi i zemlji, a dugo na raznim predmetima ([www.zdravlje.hr](http://www.zdravlje.hr)). U kontaminiranim živežnim namirnicama brzo se množi. Ugiba na temperaturi od 60 °C za 15 minuta, a niske temperature dobro podnosi. Osjetljiva je na spojeve klora (Weisglass, 1988).

*Escherichia coli* igra u intestinalnom traktu važnu ulogu u cijepanju nekih supstancija koje organizam nije u stanju fermentirati; zatim ima sposobnost sinteze vitamina, osobito nekih iz grupe B- kompleksa (tiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), piridoksin (B6), folna kiselina) i vitamina K, kao i stvaranja antibiotskih supstancija koje koče da se patogeni i nepoželjni mikrobi ne nastane u lumenu gastrointestinalnog trakta ([www.lzmk.hr](http://www.lzmk.hr)). *Escherichia coli* nije uvijek ograničena na crijeva, i njezina sposobnost preživljavanja na kratak period izvan tijela je čini idealnim indikator organizmom za testiranje okolišnih uzoraka za fekalnu kontaminaciju ([en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org)).

*Escherichia coli* je bolji specifični indikator fekalne kontaminacije u vodi od ostalih koliformnih bakterija. To je bakterija koja fermentira laktozu na 44 °C i producira indol od triptofana. Enzimatski se razlikuje od ostalih koliforma po prisutnosti  $\beta$  - D -glukuronidaze dok je osnovna karakteristika koliformnih bakterija posjedovanje gena za kodiranje  $\beta$  - D galaktozidaze. (Bonadonna, Cataldo, Semproni, 2006).

## 1.2. HRANJIVE PODLOGE

Koristeći znanje o značajkama koliformnih bakterija kao i vrste *E. coli*, bakterije možemo uzgajati u laboratorijskim uvjetima, a time ih odmah i dokazati. Prisutnost koliformnih bakterija u vodi vrlo se pouzdano dokazuje na selektivnim podlogama. Pri tome je inhibiran rast drugih bakterija, prvenstveno Gram-pozitivnih. Podloge su i diferencijalne, kako bi se istovremeno moglo detektirati i razlikovati *E. coli* od ostalih koliformnih bakterija. Podloge sadrže enzimske supstrate za detekciju  $\beta$ -D-galaktozidaze (dokaz prisutstva koliformnih bakterija) i  $\beta$ -D-glukuronidaze (dokaz prisutstva *E. coli*). Taj supstrat je u MacConkey, m-Faecal Coliform i Endo agaru laktoza, a u EC-X Gluc agaru X-GLUC (5-bromo-4-kloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glukuronid).

U ovom radu korištene su četiri različite hranjive podloge za uzgoj koliformnih bakterija.

### 1.2.1. EC-X-GLUC AGAR

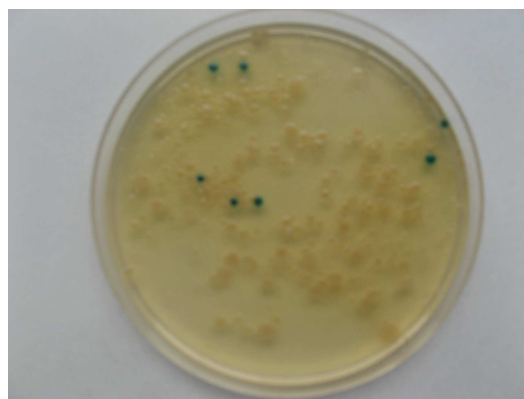
EC-X Gluc agar je visoko selektivna diferencijalna kromogena podloga za uzgoj koliformnih bakterija te za izravnu identifikaciju *E. coli*. Medij (Tablica 1) sadrži žučne soli za potpunu inhibiciju Gram-pozitivnih bakterija i X-GLUC (5-bromo-4-kloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glukuronid), za detekciju  $\beta$ -glukuronidaze. Od svih bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* samo *Escherichia coli* zajedno sa nekim sojevima roda *Salmonella* i *Shigella* je  $\beta$ -glukuronidaza pozitivna. Takve kolonije na podlozi će biti plave ili zeleno-plave boje (Slika 2).

$\beta$  - glukuronidaza negativne bakterije rastu kao žućkaste kolonije ( [www.microtradeuk.com](http://www.microtradeuk.com)).

**Tablica 1.** Sastav EC-X GLUC agara

([www.biolifeit.com](http://www.biolifeit.com))

Tripton	20,0 g
Ekstrakt kvasca	5,0 g
NaCl	5,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
Triptofan	1,0 g
X-GLUC	0,06 g
Žučne soli	1,5 g
Agar	12,0 g
Destilirana voda	1000 mL
pH = 7,0 ±0,2	



**Slika 2.** Tipične plave kolonije *E. coli* i žućkaste kolonije ostalih koliformnih bakterija porasle na EC X-GLUC agaru.

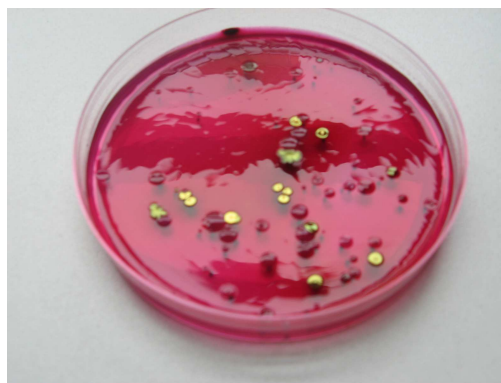
### 1.2.2. ENDO AGAR

Endo agar (Tablica 2) je selektivna podloga za uzgoj koliformnih bakterija. Na-sulfit i bazični fuksin inhibiraju rast Gram-pozitivnih bakterija. Bakterije koje intenzivno fermentiraju laktozu kao međuprodukt stvaraju acetaldehid koji se fiksira pomoću Na-sulfita, a reakcija s bazičnim fuksinom daje metalni sjaj zbog reduciranog fuksina (Stilinović i Hrenović, 2008.). Kolonije fekalne koliformne bakterije vrste *E. coli* na Endo agaru su crvene karakterističnog metalno - zlatnog sjaja (Slika 3), a kolonije ostalih koliforma su roza do crveno obojene.

**Tablica 2.** Sastav Endo agara

(www.biol.pmf.hr)

Tripton	10,0 g
Laktoza	10,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,5 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	2,5 g
Bazični fuksin	0,4 g
Agar	15,0 g
Destilirana voda	1000 mL
pH = 7,5 ± 0,2	



**Slika 3.** Kolonije *E. coli* zlatnog metalnog sjaja i roze kolonije ostalih koliformnih bakterija porasle na Endo agaru

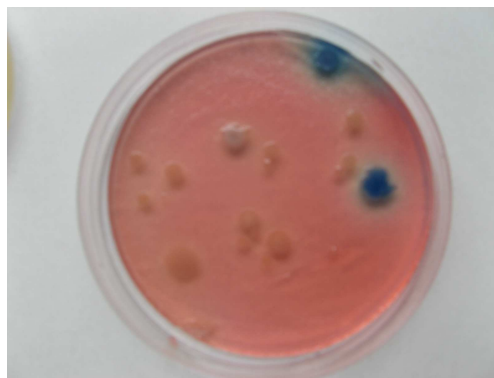
### 1.2.3. m-FAECAL COLIFORM AGAR

m-Faecal Coliform agar (m-FC agar) (Tablica 4) je selektivna podloga za izolaciju fekalnih koliforma. Fekalni koliformi rastu u plavim kolonijama, a drugi organizmi, čiji je rast dozvoljen kraj žučnih soli, rastu u žućkastim kolonijama (Slika 5)( [www.biolifeit.com](http://www.biolifeit.com)).

**Tablica 4.** Sastav m-FC agara

([www.biolifeit.com](http://www.biolifeit.com))

Triptoza	10,0 g
Peptocomplex	5,0 g
Ekstrakt kvasca	3,0 g
NaCl	5,0 g
Laktoza	12,5 g
Žučne soli	1,5 g
Anilin blue	0,1 g
Agar	13,0 g
Rozalična kiselina	1,0 g
Destilirana voda	1000 mL
pH = 7,4 ± 0,2	



**Slika 5.** Tipične plave kolonije E.coli i žućkaste kolonije ostalih koliformnih bakterija porasle na m-FC agaru

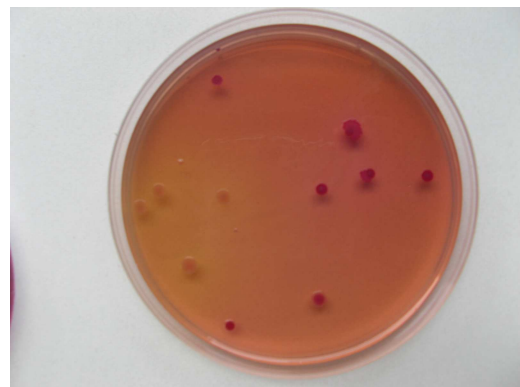
#### 1.2.4. MACCONKEY AGAR

MacConkey agar (Tablica 3) je selektivna podloga koja omogućava rast pripadnika porodice *Enterobacteriaceae*, a rast Gram-pozitivnih bakterija inhibiran je žučnim solima i kristal violetom. Kao izvor ugljikohidrata nalazi se laktoza, a fermentacija laktoze uzrokuje zakiseljavanje medija s popratnom precipitacijom žučnih soli i apsorpcijom neutralnog crvenila. Bakterije rastu kao kolonije različitih nijansi crvene do žute boje ovisno o tome pokazuju li jaku ili slabu fermentaciju. Kolonije *Escherichia coli* rastu kao kolonije crvene boje s crvenom zonom precipitacije, a kolonije drugih koliformnih bakterija su roze boje (Slika 4). Eventualno porasle kolonije bakterija roda *Salmonella* i *Shigella* su prozirne.

**Tablica 3.** Sastav MacConkey agara

(www.biolifeit.com)

Pankreasni digest želatine	17,0 g
Peptocomplex	3,0 g
Laktoza	10,0 g
Žučne soli	1,5 g
NaCl	5,0 g
Neutralno crvenilo	0,03 g
Kristal violet	0,001 g
Agar	13,5 g
Destilirana voda	1000 mL
pH = 7,1 ± 0,2	



**Slika 4.** Tipične crvene kolonije *E. coli* i roze kolonije ostalih koliformnih bakterija porasle na MacConkey agaru



### **1.3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti četiri hranjive podloge za uzgoj koliformnih bakterija iz površinskih voda i usporediti koja je od njih najbolja za uzgoj koliformnih bakterija, te koja je najbolja za uzgoj vrste *Escherichia coli*.

## 2. MJESTO I VRIJEME ISTRAŽIVANJA

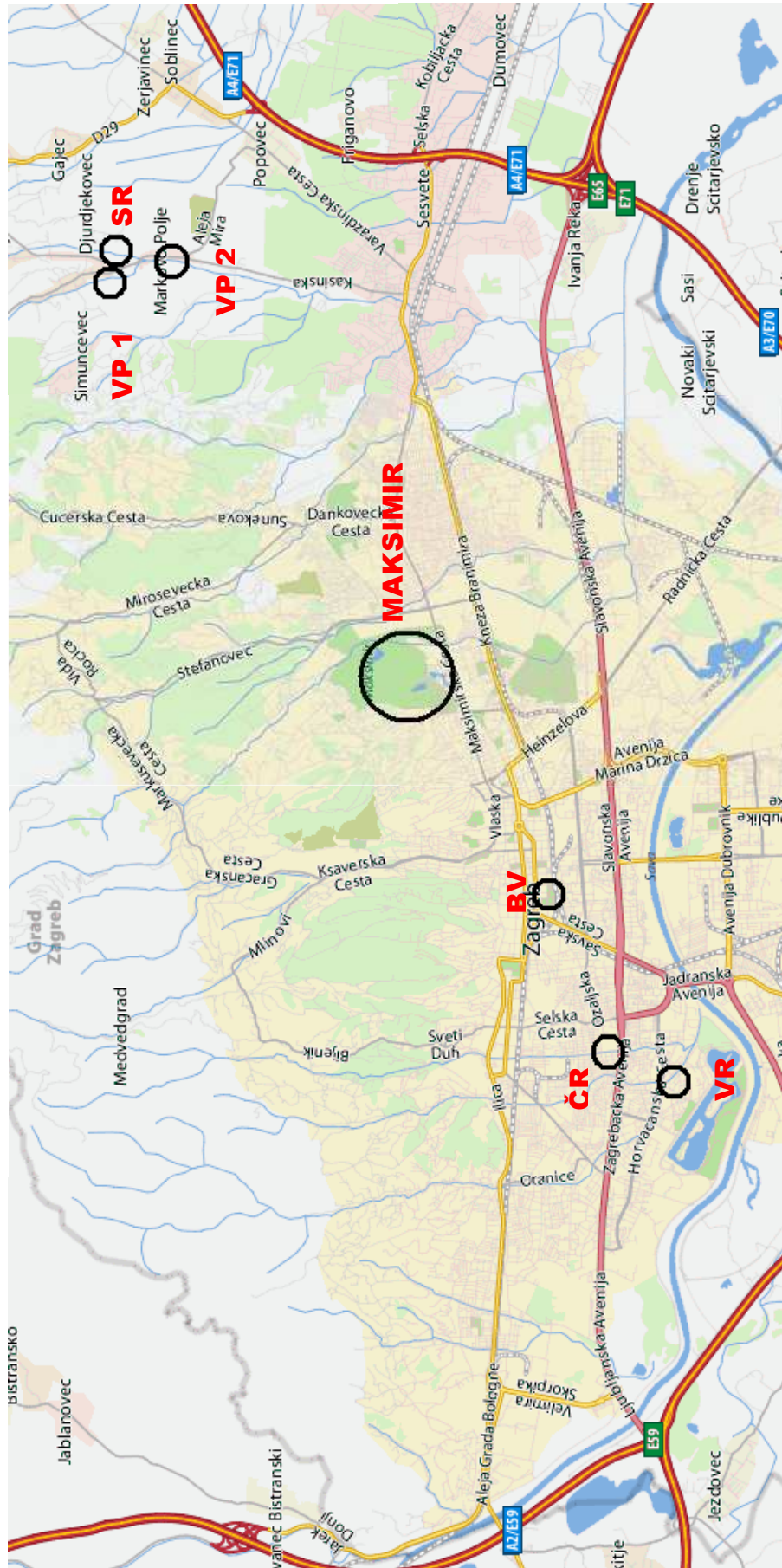
Analizirani uzorci vode prikupljeni su na različitim lokacijama grada Zagreba. Svi uzorci su sakupljeni i obrađeni tijekom ožujka 2009.

Istraživanje je provedeno na slijedećim lokacijama :

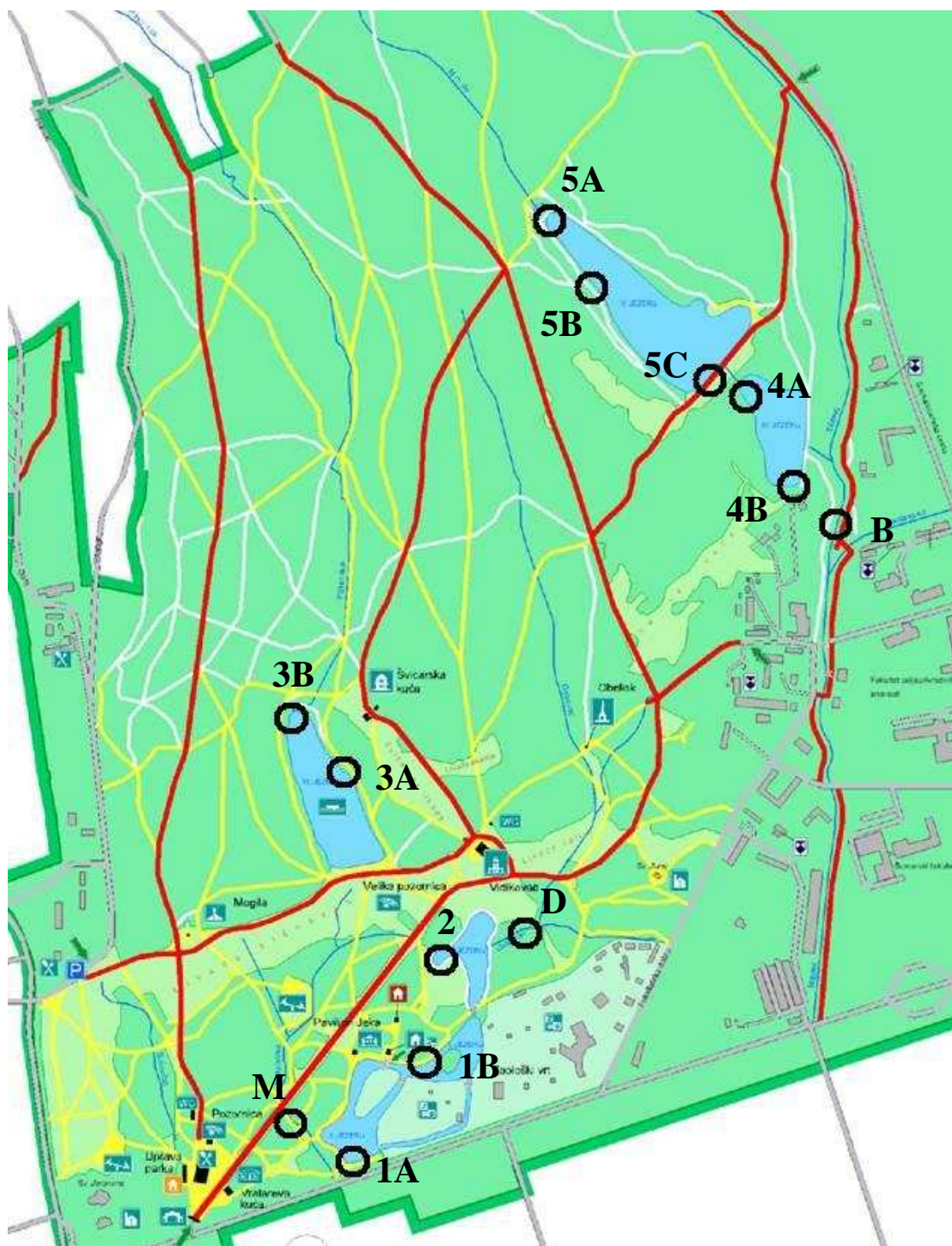
- jezero Botaničkog vrta
- potok Srednjak - Sesvete
- potok Vugrovec - Sesvete
- potok Črnomerec - Srednjaci
- potok Vrapčak - Jarun
- potok Bliznec - Maksimir
- potok Maksimirec - Maksimir
- potok Dalijevec - Maksimir
- maksimirska jezera

Uzorci su prikupljeni na ukupno 19 postaja (Tablica 5).

Na karti Zagreba (Slika 6) i Parka Maksimir (Slika 7) označene su lokacije svih istraživanih postaja.



Slika 6. Karta Zagreba sa označenim istraživanim postajama (Foto: travel.yahoo.com)



**Slika 7.** Plan Parka Maksimir sa označenim istraživanim postajama

(Foto: [www.park-maksimir.hr](http://www.park-maksimir.hr))

**Tablica 5.** Oznaka i kvaliteta vode istraživanih postaja

POSTAJA	OZNAKA POSTAJE	KVALITETA VODE
Botanički vrt	BV	4
Srednjak	SR	5
Vugrov potok 1	VP1	5
Vugrov potok 2	VP2	5
Vrapčak	VR	5
Črnomerec	ČR	5
Bliznec	B	4
Maksimirec	M	4
Dalijevec	D	5
1. maksimirsko jezero A	1A	4
1. maksimirsko jezero B	1B	4
2. maksimirsko jezero	2	5
3. maksimirsko jezero A	3A	4
3. maksimirsko jezero B	3B	4
4. maksimirsko jezero A	4A	4
4. maksimirsko jezero B	4B	4
5. maksimirsko jezero A	5A	4
5. maksimirsko jezero B	5B	4
5. maksimirsko jezero C	5C	4

## **2.1. OPIS ISTRAŽIVANIH POSTAJA**

Sve istraživane lokacije geografski pripadaju Središnjoj Hrvatskoj i nalaze se pod utjecajem kontinentalne klime karakteristične za ove geografske širine. Kao dio Panonske nizine Središnja Hrvatska je u toku gotovo čitave zime ispunjena hladnim zrakom, a kontinentalnost se očituje u relativno malom horizontalnom gradijentu temperature, tj. vrlo su male razlike u srednjoj siječanjskoj temperaturi raznih dijelova Središnje Hrvatske. Malo je drugačija situacija s rasporedom srednje srpanjske temperature, gdje također postoji malen horizontalan gradijent temperature, ali samo u nizinskom dijelu jer velike promjene unosi reljef. Što se tiče godišnjeg režima padalina u Središnjoj Hrvatskoj, kaže se da je on kontinentski: više padalina ima u toploj (travanj-rujan) nego u hladnoj polovici godine (listopad-ožujak). Upravo se u ovoj makroregiji nalazi najveća koncentracija površinskih voda i najrazgranatija mreža tekućica. To je zbog sastava zemljišta i njegovih hidrogeoloških osobina (Crkvenčić i sur., 1974).

### **2.1.1. Potoci Medvednice**

Medvednica obiluje potocima i izvorima. Oborinske se vode brzo slijevaju, ovisno o nagibu i sastavu terena. Na škriljavcima koji su nepropusni, vode je više i javljaju se izvori, primjer je potok Bliznec koji je duboka potočna dolina. Izvori Medvednice su općenito skromnog kapaciteta, ali su mnogobrojni, što omogućuje opskrbu vodom manjih naselja, te su manjim dijelom uključeni u gradski vodoopskrbni sustav. Glavnina ih izvire iznad 750 m.n.v. i u pošumljenim područjima, pa na tim prostorima nema opasnosti od erozije o kojoj inače treba posebno voditi računa. Izdašnost izvora, a samim time i protoka u potocima uvjetovana je padalinama. Potoci Medvednice su izrazito brdskog tipa; gornji tok je strm, a donji položit ([www.pp-medvednica.hr](http://www.pp-medvednica.hr)). Glavni medvednički potoci, od njih šezdesetak na južnim obroncima su: Dolje, Dubravica, Medpotoki, Vrapčak, Kustošak, Črnomerec, Kuniščak, Jelenovec, Zelengaj, Kraljevec, Kraljevečki potok, Gračanski potok, Remetski potok, Bliznec, Štefanovec, Trnava, Čučerska Reka, Goranec i Vugrov potok ([www.mzopu.hr](http://www.mzopu.hr)).

U ovo istraživanje uključeni su potoci: Črnomerec, Vrapčak, Bliznec, Vugrov potok i Srednjak.



Glavni tok potoka Črnomerec (Slika 8) potječe iz nekoliko izvora smještenih malo ispod glavnog grebena Medvednice. Na svom putu niz padine Medvednice taj potok nosi ime Veliki potok. Nedaleko Lukšića u njega se ulijeva Mali potok, potočić koji izvire ispod zapadne padine Medvedgrada. Od Lukšića taj potok nosi ime Črnomerec. Na svom putu prema Savi Črnomerec prima važnu pritoku, potok koji nosi pomiješane vode Kustošaka i Vrapčaka, a nekoliko stotina metara dalje se ulijeva u Savu.

Na zapadnom dijelu južne padine Medvednice protječe Vrapčak (Slika 9). Vrapčak ima posebno značenje zbog najljepšeg slapa na Medvednici Sopot . To je 9 m visoki slap u pećinastom klancu srednjeg toka potoka Vrapčaka. Skoro cijelog ljeta ovdje se može naći ugodno osvježanje, no koncem ljeta obično presuši ([www.pp-medvednica.hr](http://www.pp-medvednica.hr)). Vrapčak i Kustošak pobiru sve pritoke zapadno od Črnomerca i ulijevaju se u Črnomerec.



**Slika 8.** Potok Črnomerec  
(Foto: Senka Šimunović)



**Slika 9.** Potok Vrapčak  
(Foto: Senka Šimunović)

Od posebnog značenja za grad Zagreb, zbog perivoja Maksimir, je potok Bliznec (Slika 10), koji izvire u najvišim predjelima Medvednice, između vrhova Sljeme 1033 m i Puntijarka 991 m, u blizini 12 m visoke stijene Šumarev grob. Potok nema jedan izvor, nego se voda sakuplja iz niza strmih jaraka ([www.pp-medvednica.hr](http://www.pp-medvednica.hr)). Prolazi kroz Park Maksimir, opskrbljuje vodom Drugo i Peto jezero, a prima vodu iz Četvrtoga jezera. Ulijeva se u kanalizacioni sustav grada Zagreba.

Vugrov potok i Srednjak također izvire u predjelima Medvednice. Vugrov potok prolazi kroz područje Sesveta, gdje prima vodu potoka Srednjak, a na kraju se ulijeva u kanalizacioni sustav.



**Slika 10.** Potok Bliznec

(Foto: Senka Šimunović)

### **2.1.2. Potoci i jezera Parka Maksimir**

Maksimirska jezera se nalaze u sklopu Parka Maksimir koji je zaštićen 1964. godine na temelju Zakona o zaštiti prirode kao objekt od izuzetne vrijednosti. Maksimirska jezera su jedan od osnovnih motiva od kojih je stvoren Park (šuma, livada, jezero) (Kerovec i sur., 2004). U parku Maksimiru je tijekom vremena formirano šest jezera od kojih danas postoje pet - Prvo, Drugo, Treće, Četvrto I Peto ([www.park-maksimir.hr](http://www.park-maksimir.hr)). Jezera su umjetnog podrijetla, a snabdijevaju se vodom iz potoka Bliznec koji utječe u Drugo i Peto jezero.

Na najjužnijem dijelu Parka, kod samog zoološkog vrta, smjestilo se Prvo jezero (Slika 11). Ono leži na +120 m.n.v., a obuhvaća površinu od 15120 m<sup>2</sup>. Snabdijeva se vodom iz Drugog jezera (Kerovec i sur., 2004).

Drugo jezero (Slika 12) je također smješteno kod zoološkog vrta, samo nešto sjevernije. Leži na +122 m.n.v., a njegova površina iznosi 6520 m<sup>2</sup> pa predstavlja najmanje jezero ovog jezerskog sistema. Jezero se snabdijeva vodom iz potoka Bliznec (Kerovec i sur., 2004). Voda potoka Bliznec donosi u jezero znatnu količinu suspendiranih anorganskih i organskih tvari, a u vrijeme intenzivnih kiša u jezero se ispiranjem unose i tvari sa slivnih površina. Iz Drugog jezera voda preko slapišta utječe u Prvo jezero ([www.park-maksimir.hr](http://www.park-maksimir.hr)).





**Slika 11.** Prvo maksimirsko jezero  
(Foto: M. Kerovec)



**Slika 12.** Drugo maksimirsko jezero  
(Foto: M. Kerovec)

Treće jezero (Slika 13) je smješteno na +127 m.n.v. zapadno od Prvog i Drugog jezera i snabdijeva se vodom iz Petog jezera. Površina ovog jezera iznosi 20160 m<sup>2</sup> (Kerovec i sur., 2004).

Četvrto jezero (Slika 14) smješteno je neposredno uz prirodni tok potoka Bliznec u sjeveroistočnom dijelu parka. Nalazi se na +135 m.n.v., zauzima površinu od oko 11000 m<sup>2</sup>. Opskrbljuje se vodom iz Petog jezera, a voda istječe u potok Bliznec ([www.park-maksimir.hr](http://www.park-maksimir.hr)).

Peto jezero (Slika 15) je smješteno najsjevernije, na +143 m.n.v., te predstavlja najveće jezero sadašnjeg jezerskog sistema. Njegova površina iznosi 30280 m<sup>2</sup>. Jezero se snabdijeva vodom iz potoka Bliznec (Kerovec i sur., 2004).



**Slika 13.** Treće maksimirsko jezero  
(Foto: Senka Šimunović)



**Slika 14.** Četvrto maksimirsko jezero  
(Foto: Senka Šimunović)



**Slika 15.** Peto maksimirsko jezero

(Foto: Senka Šimunović)

Klimatske prilike u Parku Maksimir odgovaraju parametrima karakterističnim za umjereno klimatsko podneblje. Srednja godišnja temperatura istraživanog područja varira od 9 °C – 11 °C. Temperatura zraka kreće se od maksimalno 38 °C tijekom ljetnih mjeseci do minimalno –20 °C tijekom zimskih mjeseci. Relativno visoka vlaga zraka zadržava se u hladnijoj polovici godine. Relativno niska vlaga zraka zadržava se tijekom ljetnih mjeseci, u tzv. vegetacijskom periodu (Kerovec i sur., 2004).

Maksimirska jezera spadaju u skupinu plitkih jezera umjerenog klimatskog područja. Polimiktičkog su tipa jer do miješanja stupca vode dolazi nekoliko puta godišnje.

Osim potoka Bliznec mogu se izdvojiti još četiri potoka, koji sudjeluju u opskrbi jezera vodom, ali su to potoci periodična karaktera pa je njihovo značenje u odnosu na Bliznec zanemarivo malo. To su: Maksimirec, Dalijevec, Piškornica te Mirni Dol. Potoci Piškornica i Mirni Dol u vrijeme istraživanja su bili presušili.

Potok Dalijevec izvire u parku Maksimir, a ulijeva se u Drugo jezero. Slivno područje potoka Dalijevec iznosi oko 43 ha. Sa stanovišta opskrbe jezera, ne pruža mogućnost značajnijih protoka posebno u sušnom razdoblju.

Potok Maksimirec nalazi se uz krajnji zapadni dio parka Maksimir, a obuhvaća oborinski sliv od svega 22 ha. Periodičnog je karaktera i u ljetnom razdoblju redovito presušuje. S obzirom da protječe kroz naseljeno područje, vode tog vodotoka su zagađene i ne mogu se koristiti za opskrbu (prihranjivanje) jezera ([www.park-maksimir.hr](http://www.park-maksimir.hr)).

### 2.1.3. Botanički vrt

Utemeljen je 1889. godine. Vrt je dio Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i u njemu se uzgajaju brojne i rijetke vrste biljaka. Zbog svoje velike obrazovne, kulturno-povijesne i turističke vrijednosti, te sveukupnog značenja za grad Zagreb i Republiku Hrvatsku, Botanički vrt PMF-a je od 1971. godine zakonom zaštićen kao spomenik prirode i kulture (spomenik vrtne arhitekture). Sastoji se od arboretuma, cvjetnog partera, staklenika, kamenjara i jezera. Postoje dva umjetna jezera, jedno je kraj drugoga, a jedno je veće od drugog. U njima je bogat biljni, ali i životinjski život. Osim lopoča i lokvanja, u njima su i ribe, žabe i kornjače, pa se svake dvije godine sa dna mora čistiti mulj i nečistoće.



**Slika 16.** Jezero Botaničkog vrta

(Foto: [www.destinacije.com](http://www.destinacije.com))

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Prikupljanje uzoraka

Uzorci vode sakupljeni su u sterilne bočice zapremine 250 ml nakon čega su pohranjeni u hladioniku na 4 °C do same analize. Prikupljeno je 19 uzoraka. U potocima je sa uzorcima vode prikupljen i sediment. Bakteriološka analiza izvršena je u roku od 12 sati nakon uzrokovanja.

#### 3.2. Obrada uzoraka

Uzorci vode nacijepljeni su, metodom širenja razmaza (Plate Streak Method), na četiri različite hranjive podloge: EC-X Gluc agar, Endo agar, m-Faecal Coliform agar i MacConkey agar. Metoda širenja razmaza provodi se tako da se na skrućenu hranjivu podlogu u Petrijevoj zdjelici odpipetira određeni volumen uzorka i raširi po podlozi prije flambiranim Drygalskim štapićem (stakleni štapić svinut pod 90°).

Za svaki uzorak vode napravljena je serija decimalnih razrjeđenja vode ( $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ), kako bi dobili rang poraslih kolonija između 10 i 300. Uzorci su nacijepljeni po 0,1 mL samo jedan puta, bez ponavljanja. Nacijepljen je i uzorak čiste kulture *E. coli* na svaku podlogu.

Nacijepljene podloge su inkubirane u termostatu 48 sati na 35 °C. Nakon inkubacije izbrojane su porasle kolonije koliformnih bakterija te kolonije *E. coli*.

#### 3.3. Statistička obrada podataka

Kako bi se izbjegle greške u izražavanju, budući da nikada nije sigurna pretpostavka da je iz svake pojedinačne žive (vijabilne) stanice porasla jedna kolonija mikroorganizama, broj poraslih kolonija izražava se kao broj jedinica koje stvaraju kolonije (engl. Colony Forming Units, CFU). Izračunavanje CFU bakterija vrši se na osnovu broja poraslih kolonija na Petrijevim pločama, uzimanjem u obzir volumen uzorka nacijepljen na ploču iz određenog razrjeđenja prema formuli:

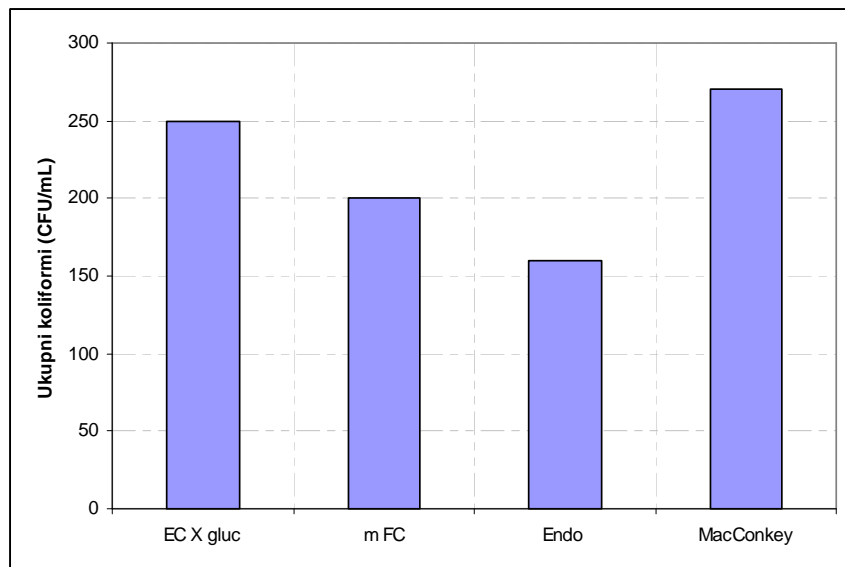
$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen inokuluma}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja uzorka}$$

Za račun se uzimaju samo one ploče na kojima je poraslo više od 10 i manje od 300 kolonija (brojive ploče). Kako je u jednoj seriji dobiveno više brojivih ploča, konačni broj CFU izračunava se kao srednja vrijednost brojivih ploča.

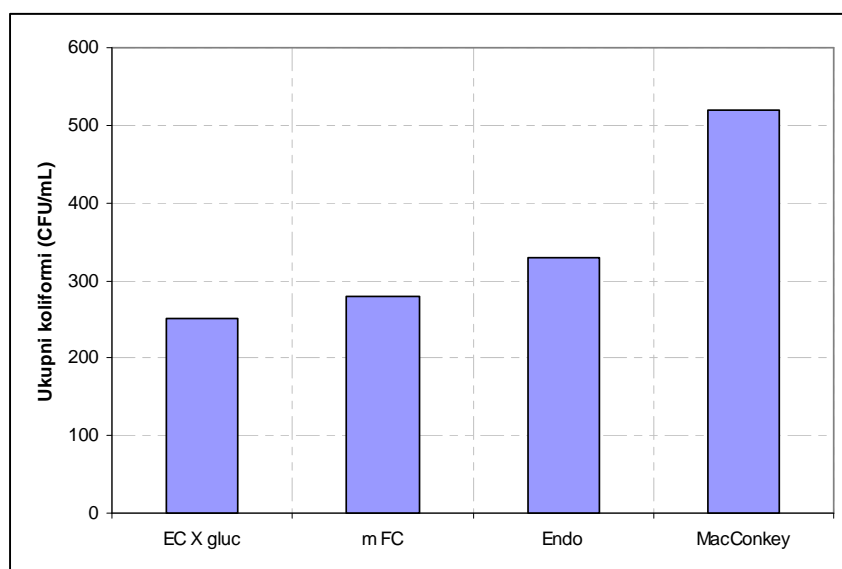
Broj poraslih kolonija *E. coli* izražava se kao postotak od ukupnih poraslih kolonija.

#### 4. REZULTATI

Istraživanje selektivnosti hranjivih podloga provedeno je sa na temelju 19 različitih uzoraka površinskih voda i uzorku čiste kulture *E. coli*. Kolonije izraslih koliformnih bakterija su izbrojane te je na temelju toga izračunat CFU. Prikazani su dobiveni rezultati (Slika 17- 36).

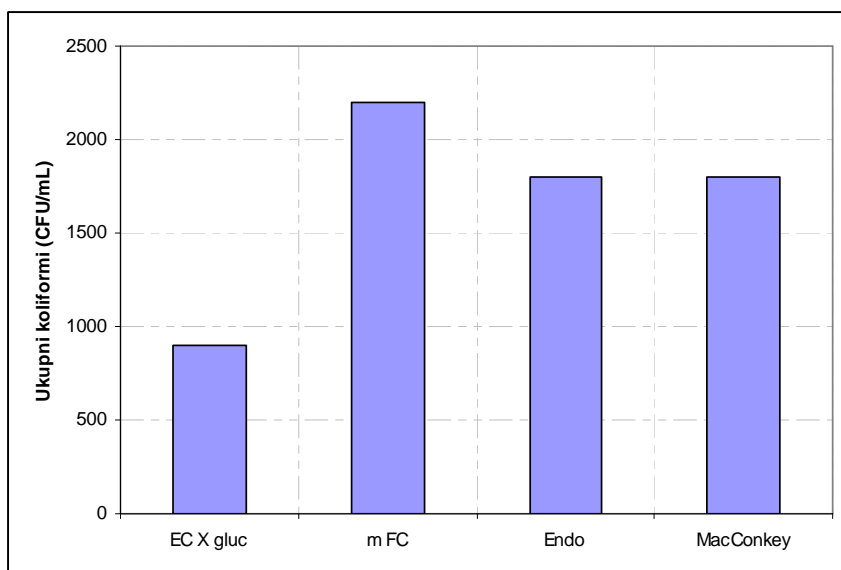


**Slika 17.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacjepljivanjem uzorka čiste kulture *E. coli* na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

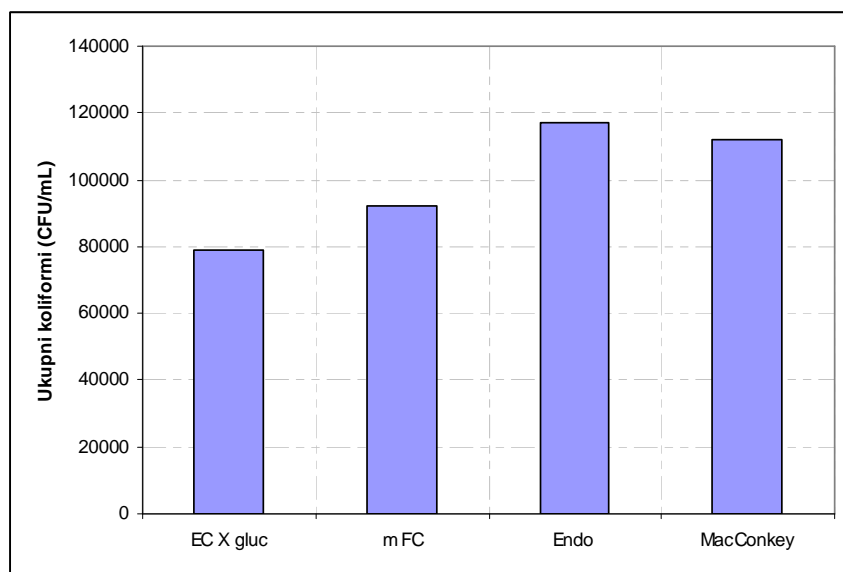


**Slika 18.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (jezero botaničkog vrta) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

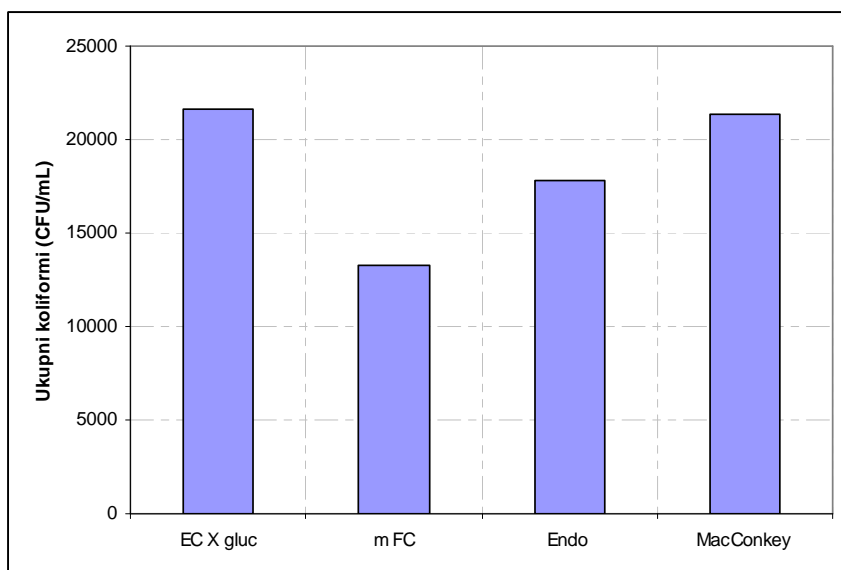




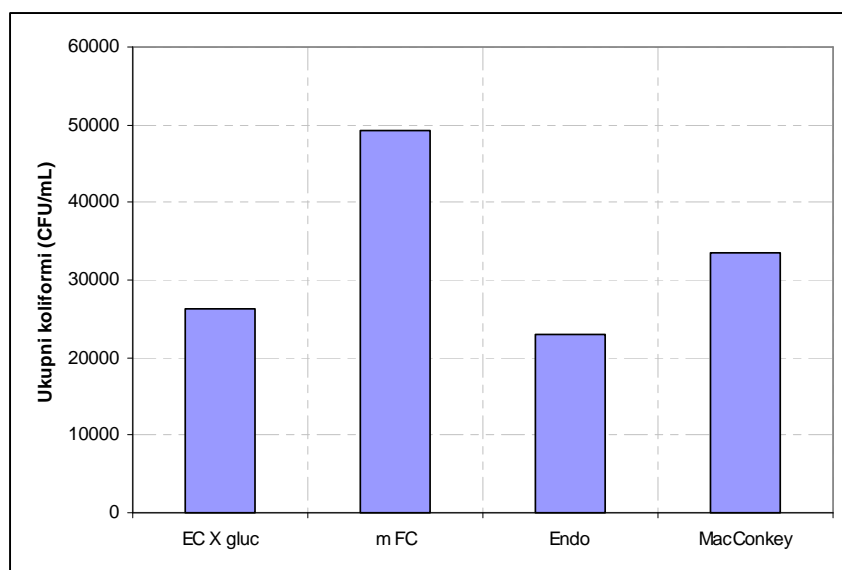
**Slika 19.** Broj ukupnih koliforma dobiven naciepljivanjem uzorka vode (Srednjak) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



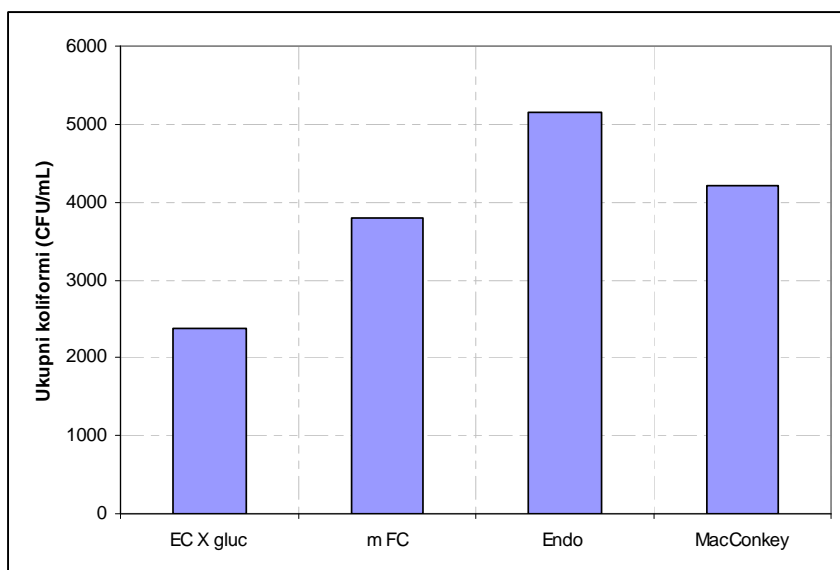
**Slika 20.** Broj ukupnih koliforma dobiven naciepljivanjem uzorka vode (Vugrov potok, postaja 1) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



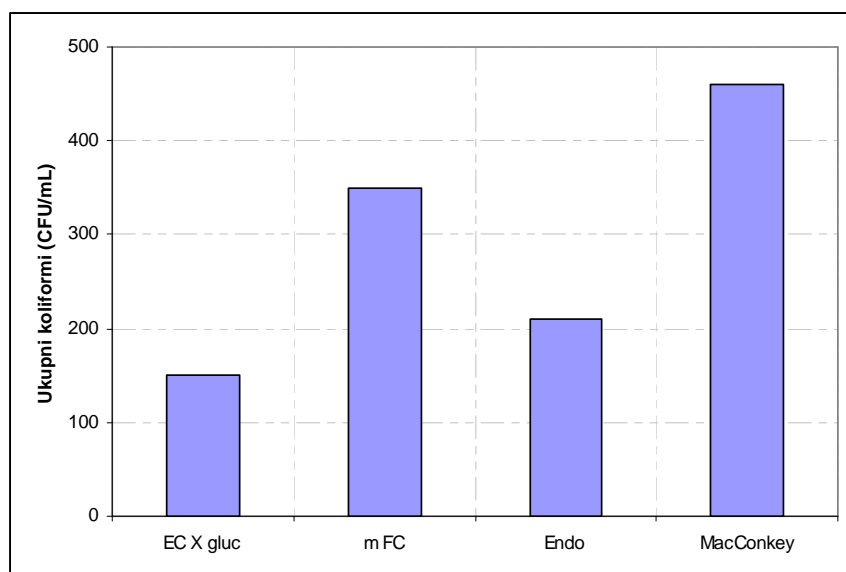
**Slika 21.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Vugrov potok, postaja 2) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



**Slika 22.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Vrapčak) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

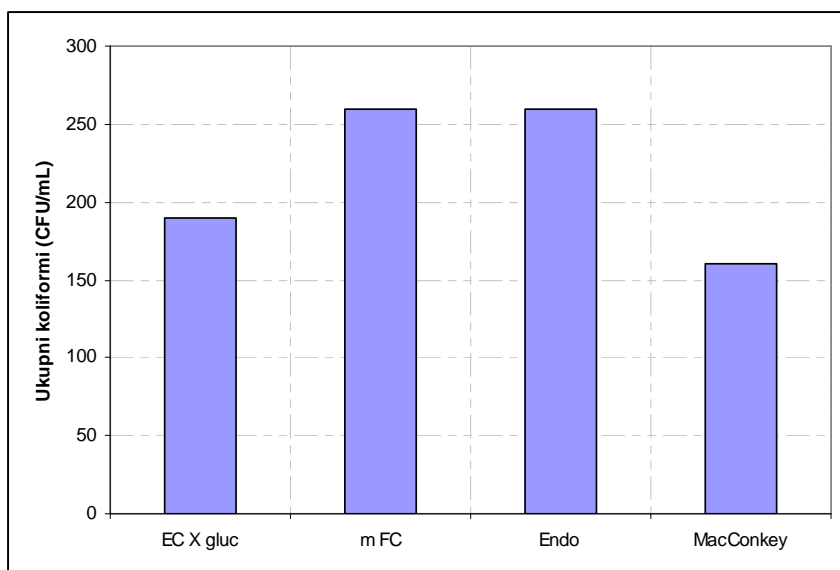


**Slika 23.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Črnomerec) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

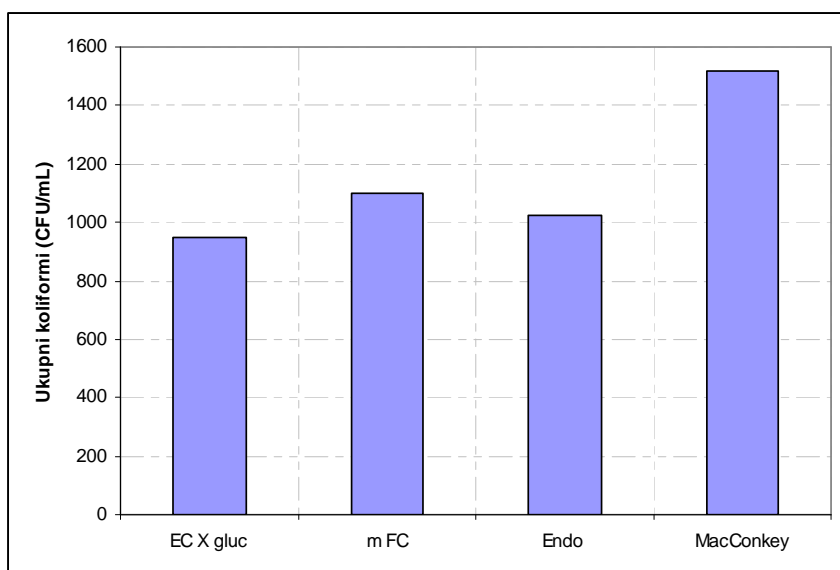


**Slika 24.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Bliznec) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

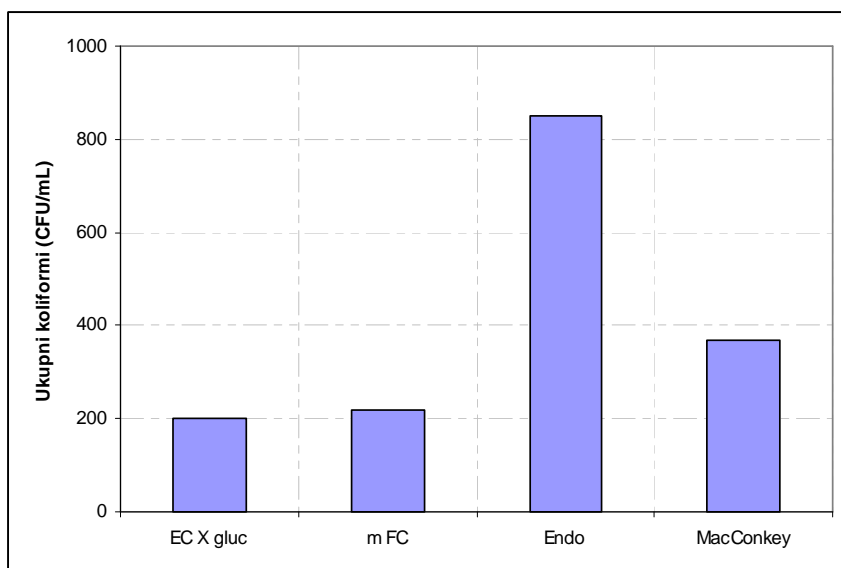




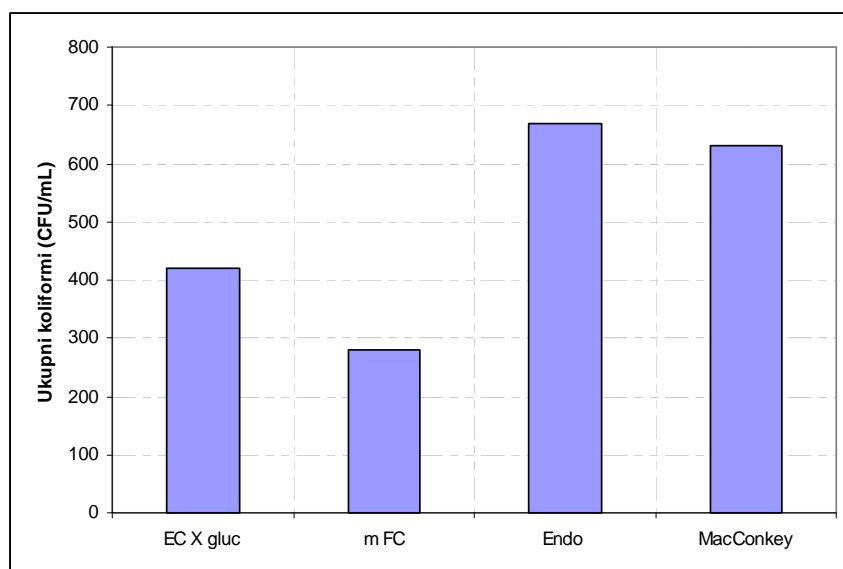
**Slika 25.** Broj ukupnih koliforma dobiven naciepljivanjem uzorka vode (Maksimirec) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



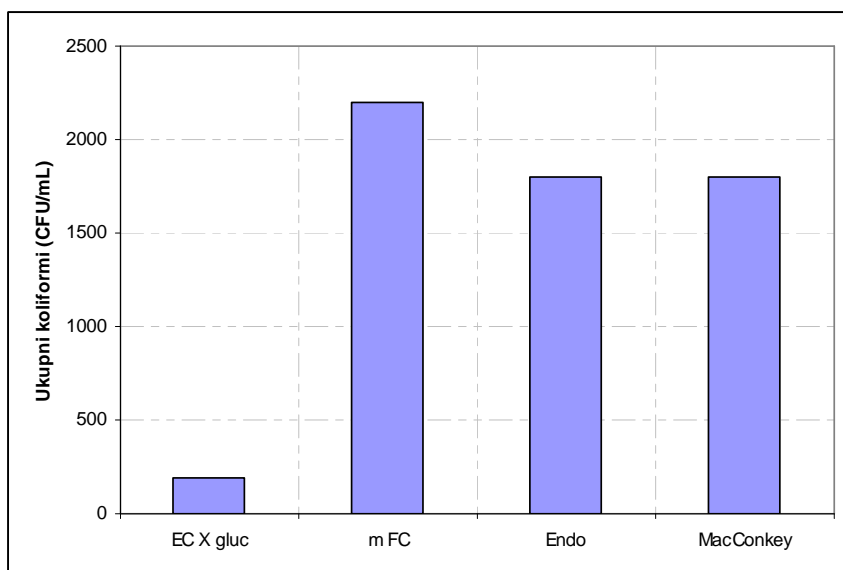
**Slika 26.** Broj ukupnih koliforma dobiven naciepljivanjem uzorka vode (Dalijevec) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



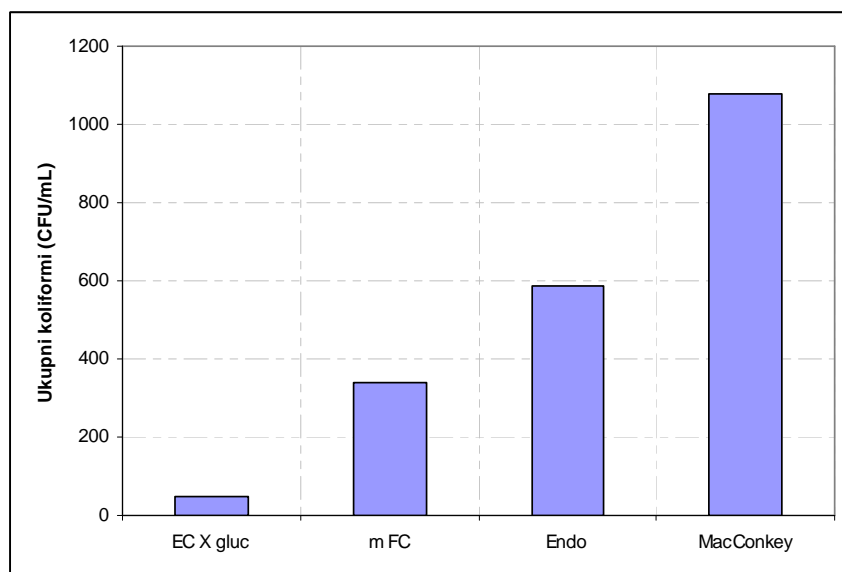
**Slika 27.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Prvo jezero, postaja A) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



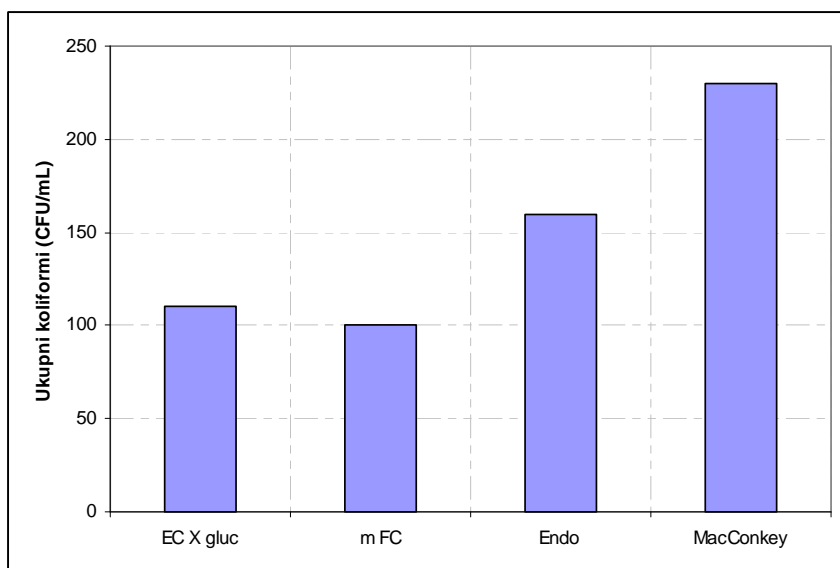
**Slika 28.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Prvo jezero, postaja B) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



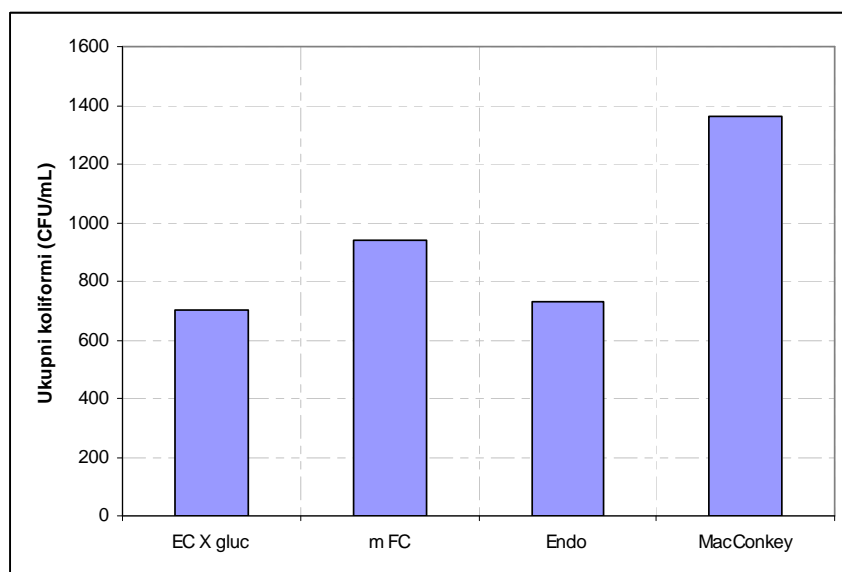
**Slika 29.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Drugo jezero) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



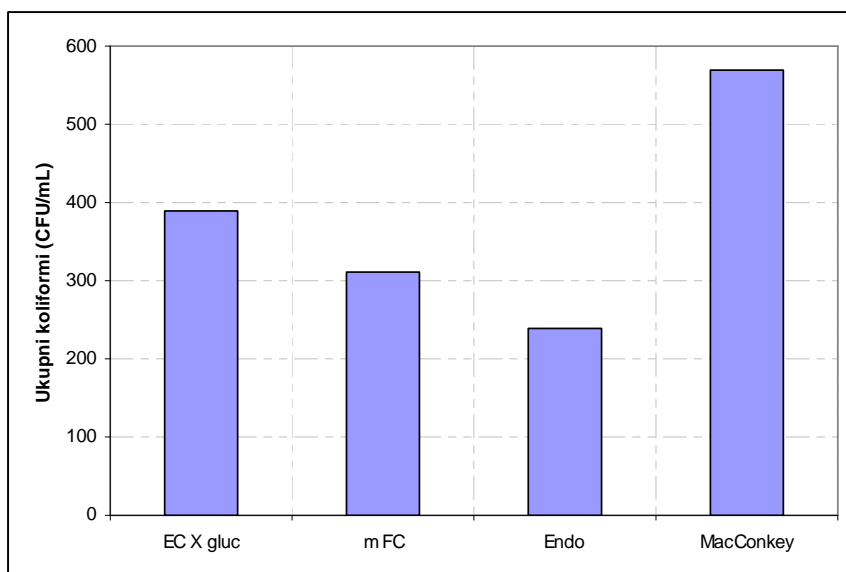
**Slika 30.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Treće jezero, postaja A) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



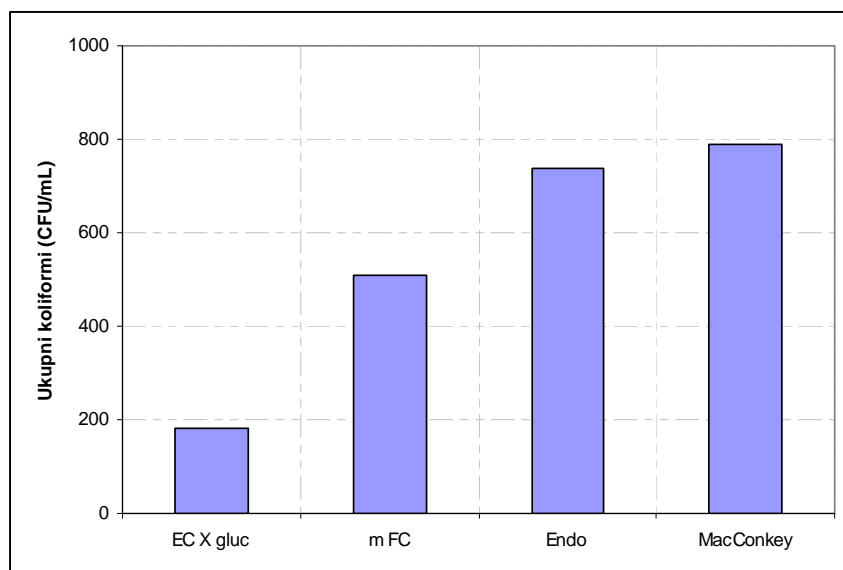
**Slika 31.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Treće jezero, postaja B) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



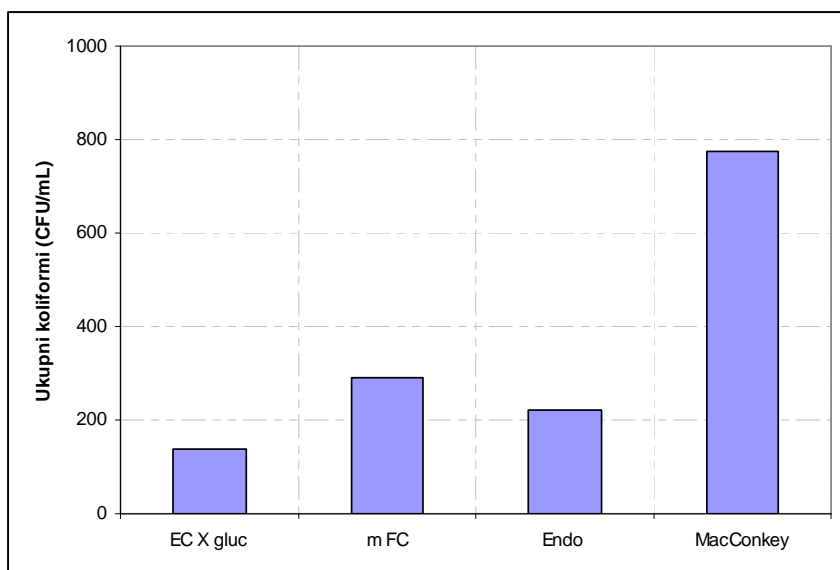
**Slika 32.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Četvrto jezero, postaja A) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



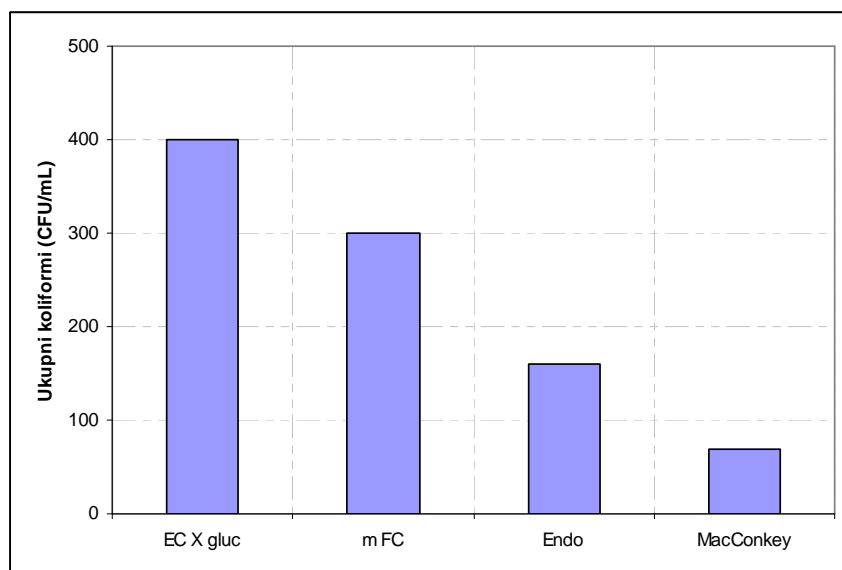
**Slika 33.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Čtvrto jezero, postaja B) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



**Slika 34.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Peto jezero, postaja A) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

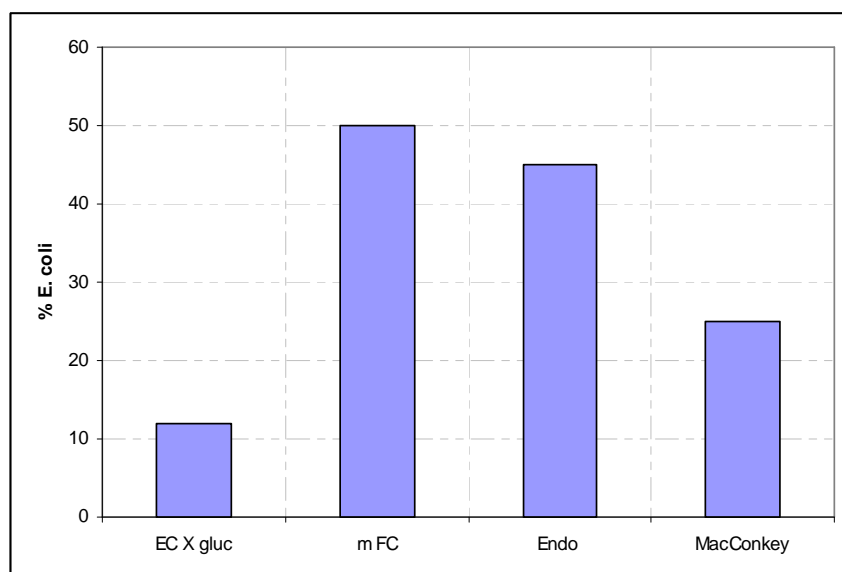


**Slika 35.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Peto jezero, postaja B) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

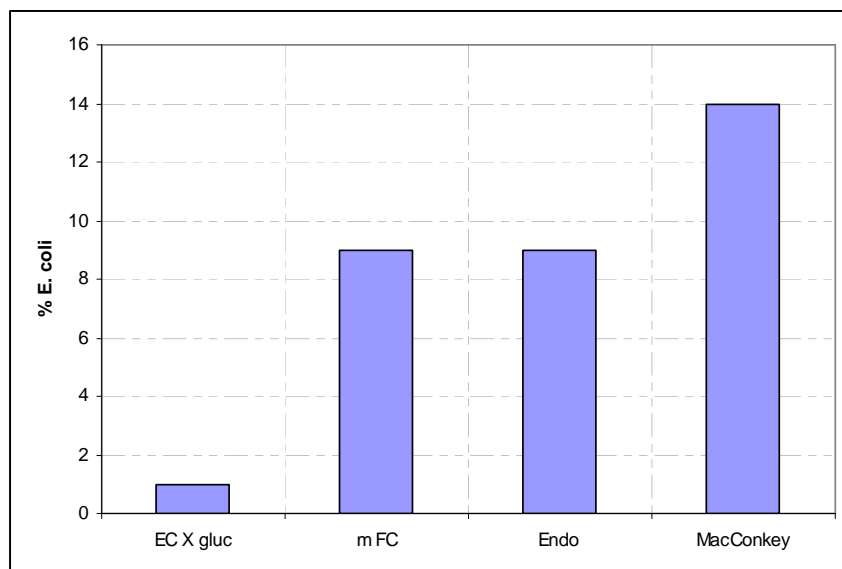


**Slika 36.** Broj ukupnih koliforma dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Peto jezero, postaja C) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

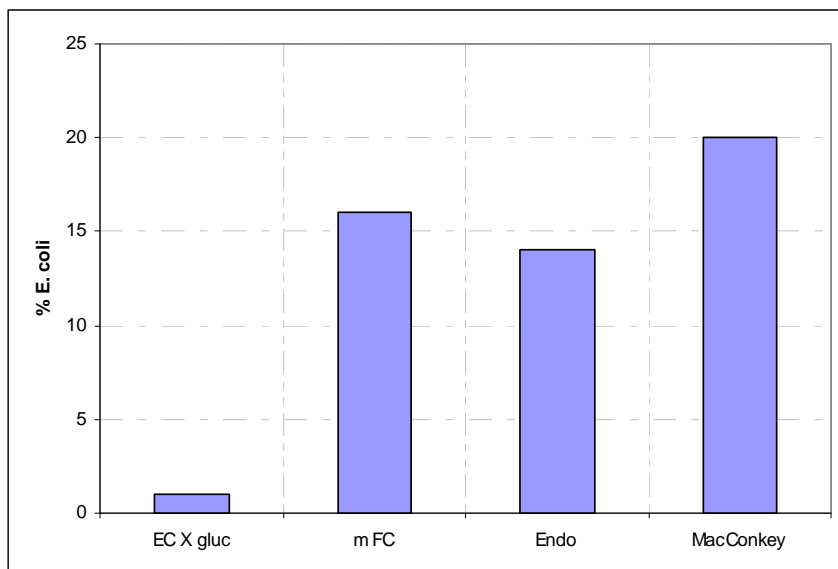
Dio ukupnih koliforma izraslih na podlogama čine kolonije vrste *E. coli*. Njihov broj se izražava kao postotak od ukupnih koliforma. Prikazani su dobiveni rezultati (Slika 37 - 55).



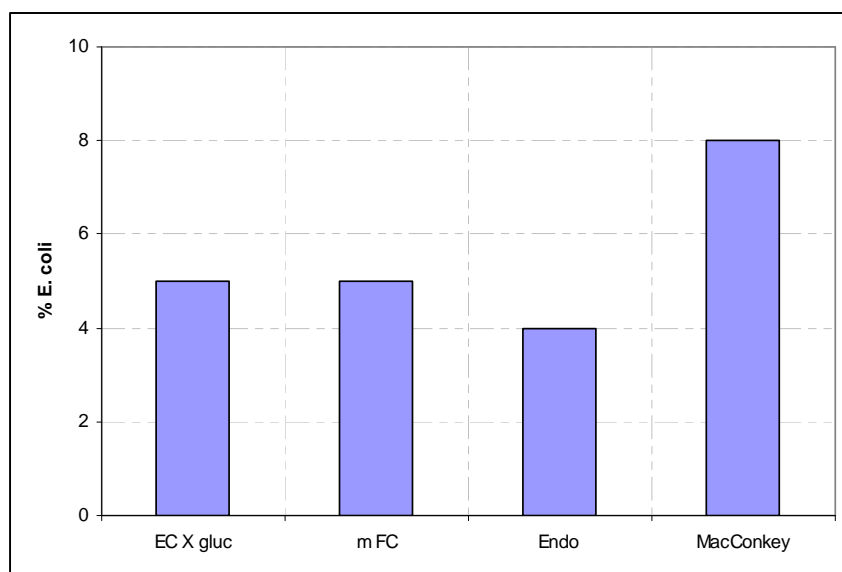
**Slika 37.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Botanički vrt) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



**Slika 38.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Srednjak) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

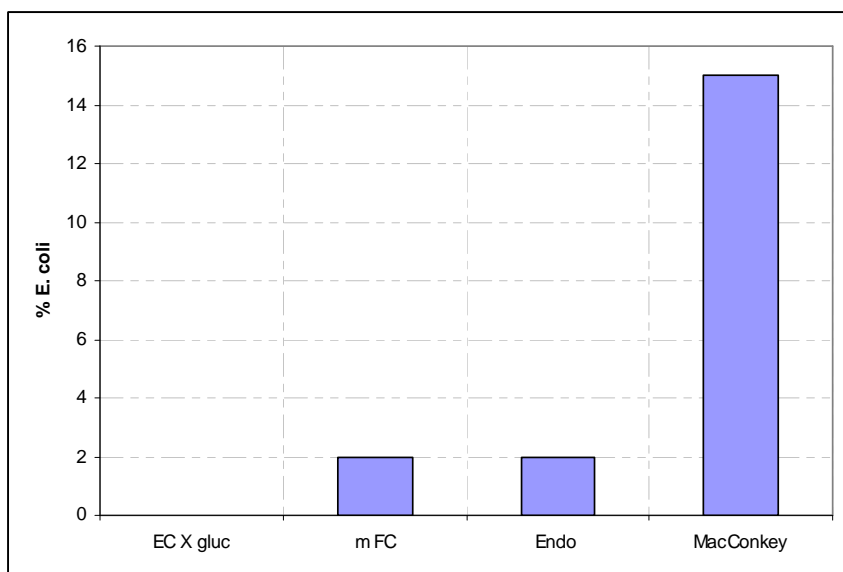


**Slika 39.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Vugrov potok, postaja 1) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

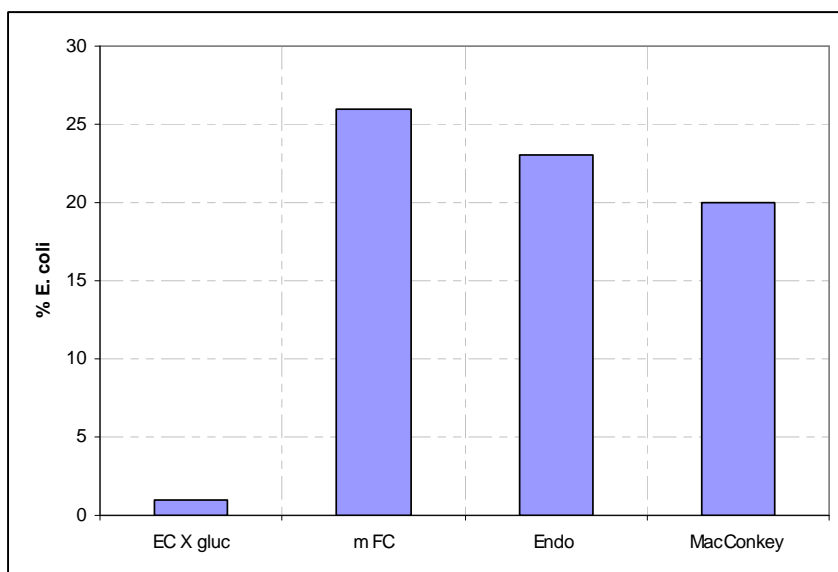


**Slika 40.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Vugrov potok, postaja 2) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

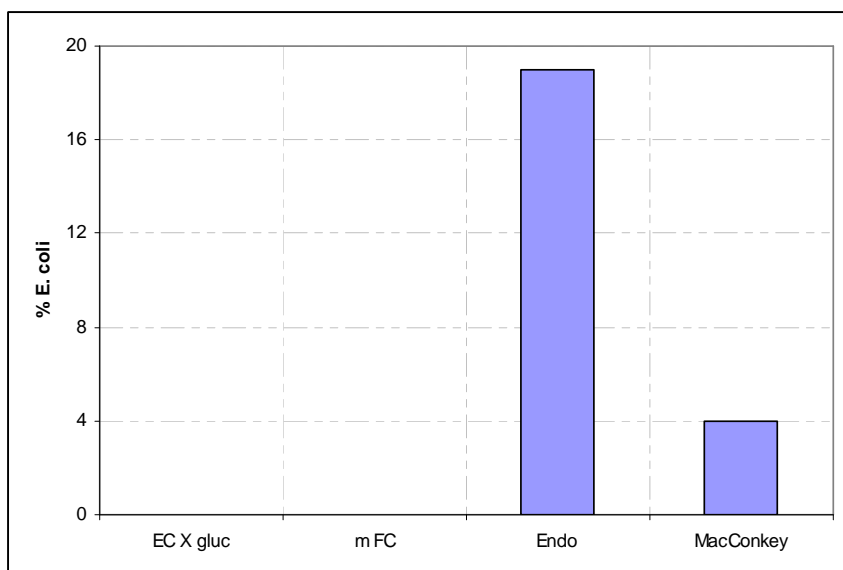




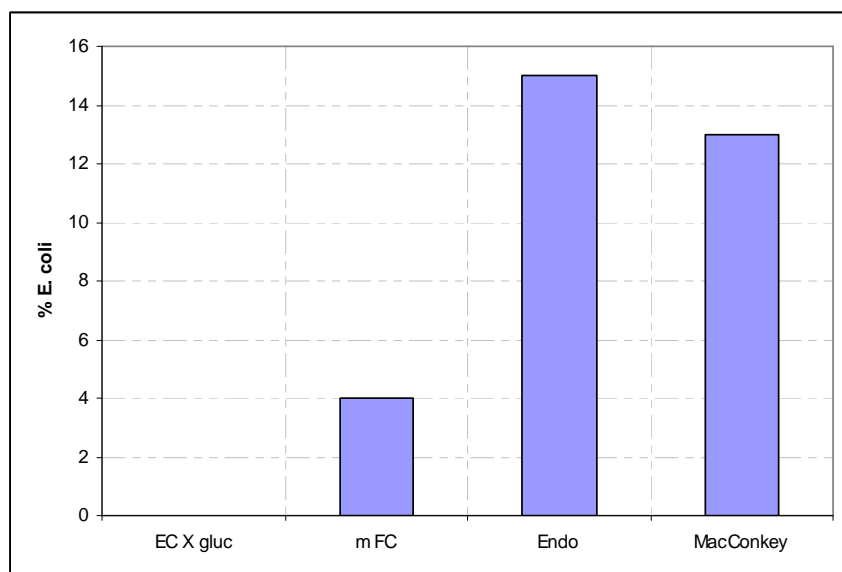
**Slika 41.** Postotak vrste *E. coli* dobiven naciepljivanjem uzorka vode (Vrapčak) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



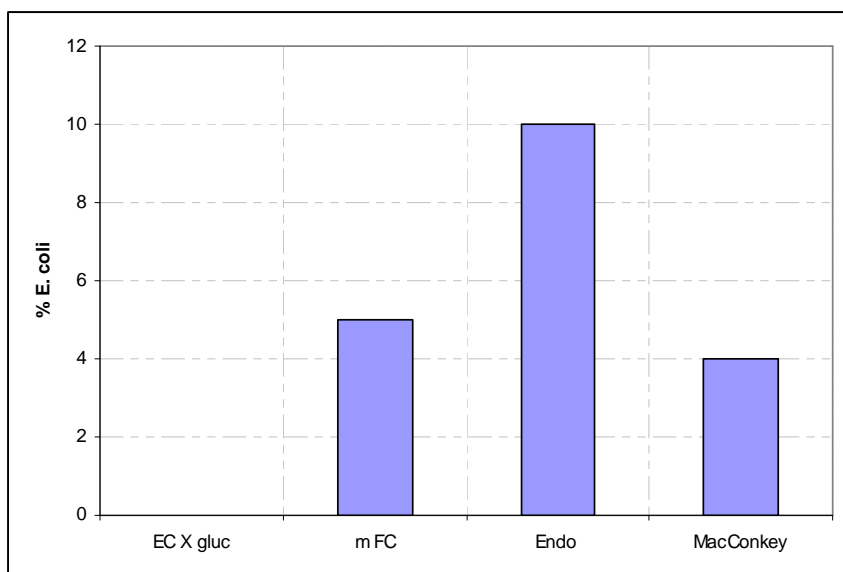
**Slika 42.** Postotak vrste *E. coli* dobiven naciepljivanjem uzorka vode (Črnomerec) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



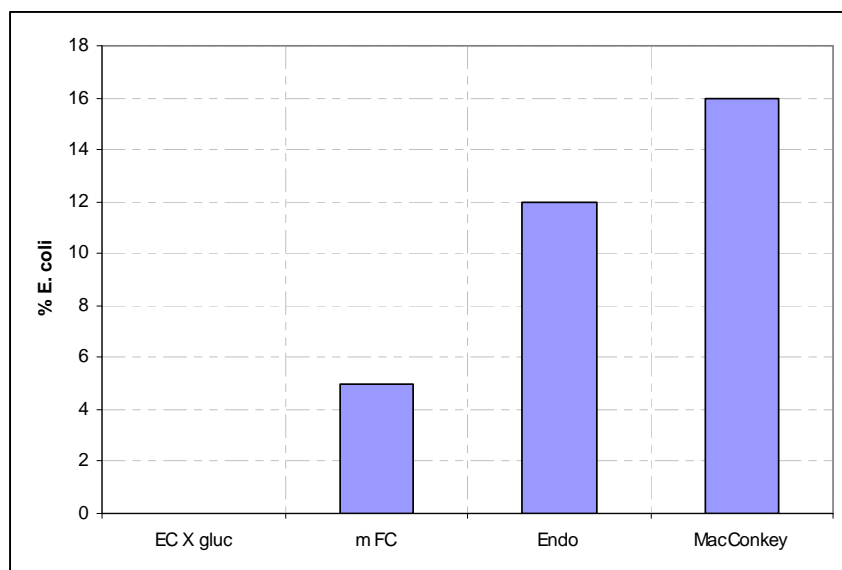
**Slika 43.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Bliznec) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



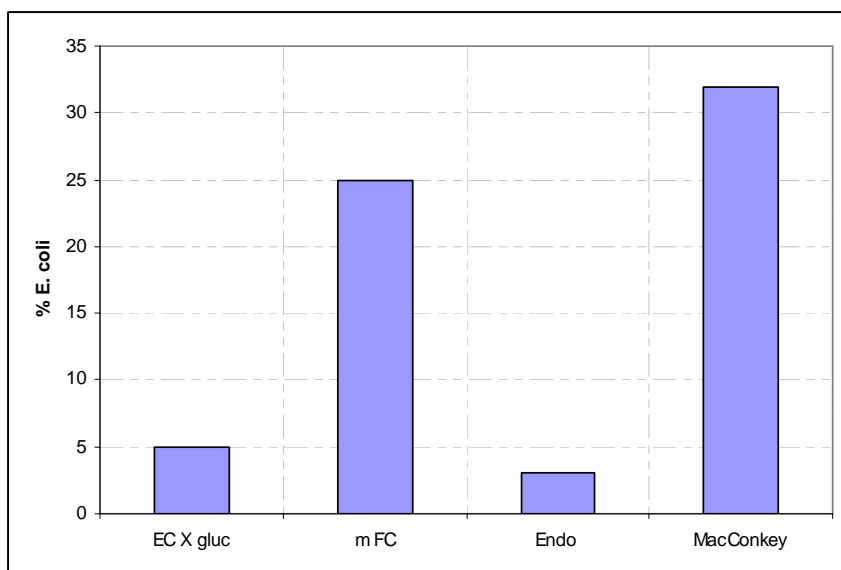
**Slika 44.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Maksimirec) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



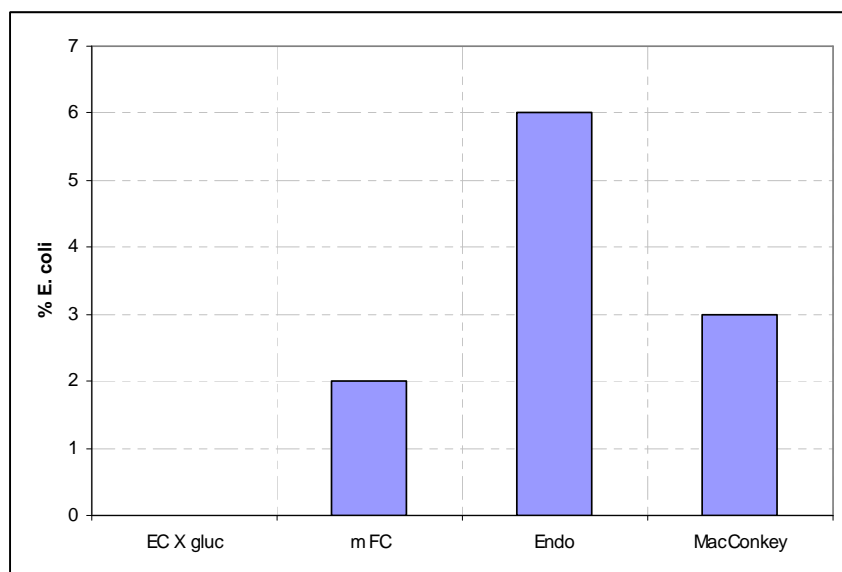
**Slika 45.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Dalijevec) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



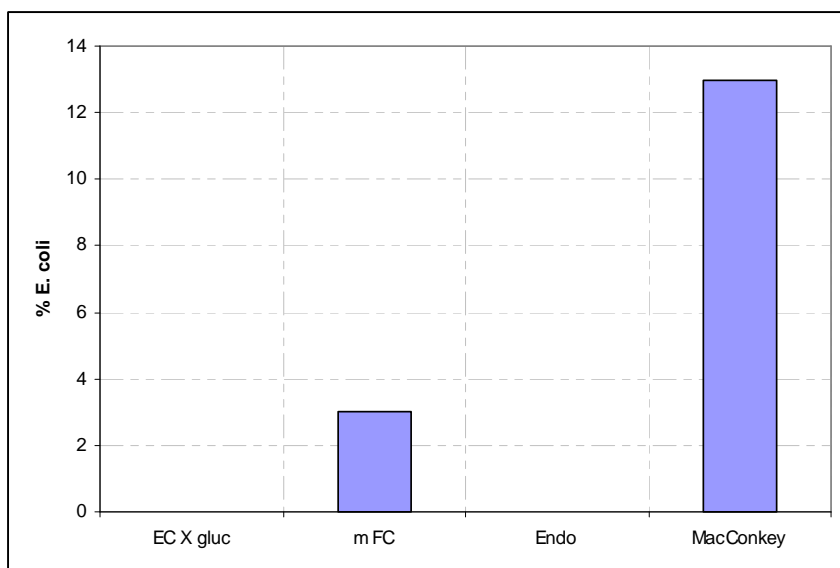
**Slika 46.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Prvo jezero, postaja A) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



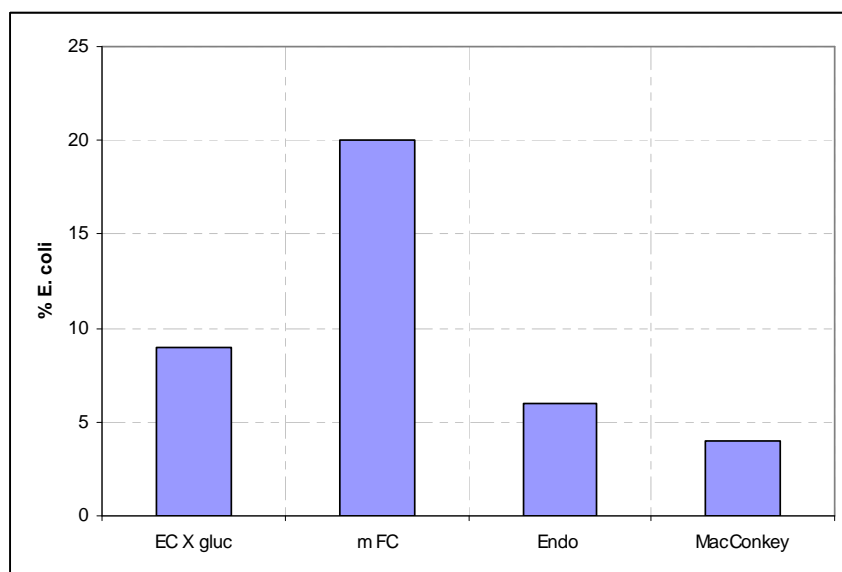
**Slika 47.** Postotak vrste *E. coli* dobiven naciepljivanjem uzorka vode (Prvo jezero, postaja B) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



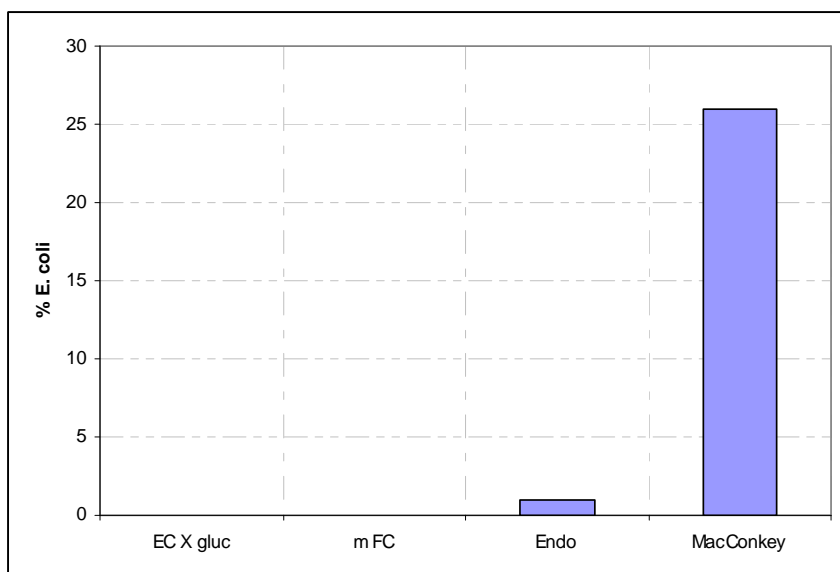
**Slika 48.** Postotak vrste *E. coli* dobiven naciepljivanjem uzorka vode (Drugo jezero) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



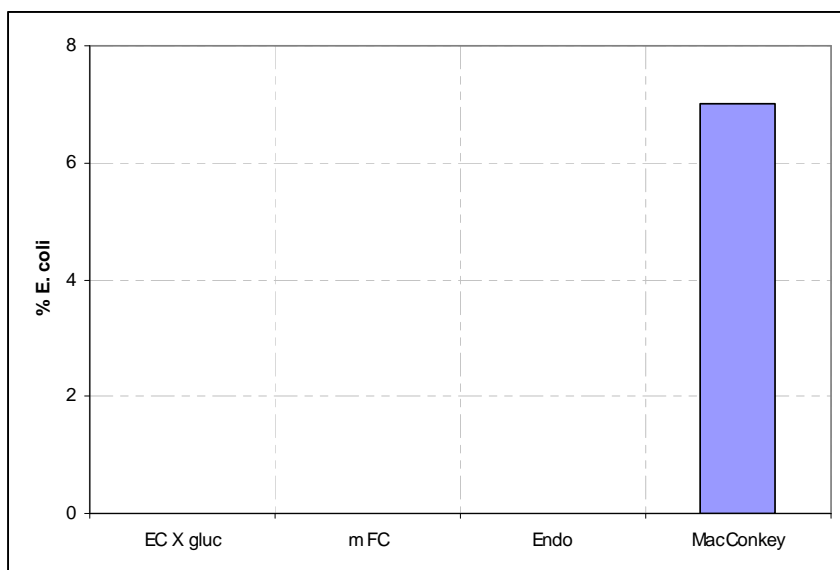
**Slika 49.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Treće jezero, postaja A) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



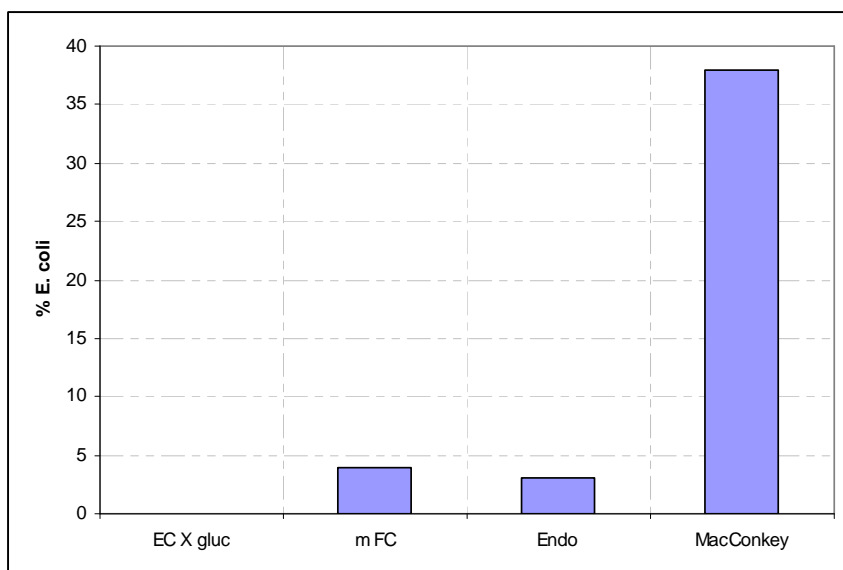
**Slika 50.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacjepljivanjem uzorka vode (Treće jezero, postaja B) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



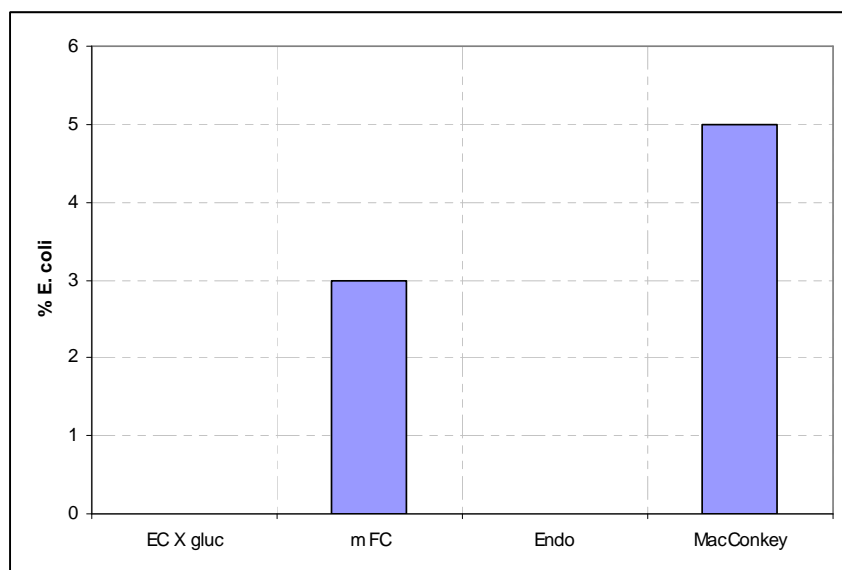
**Slika 51.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Četvrto jezero, postaja A) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



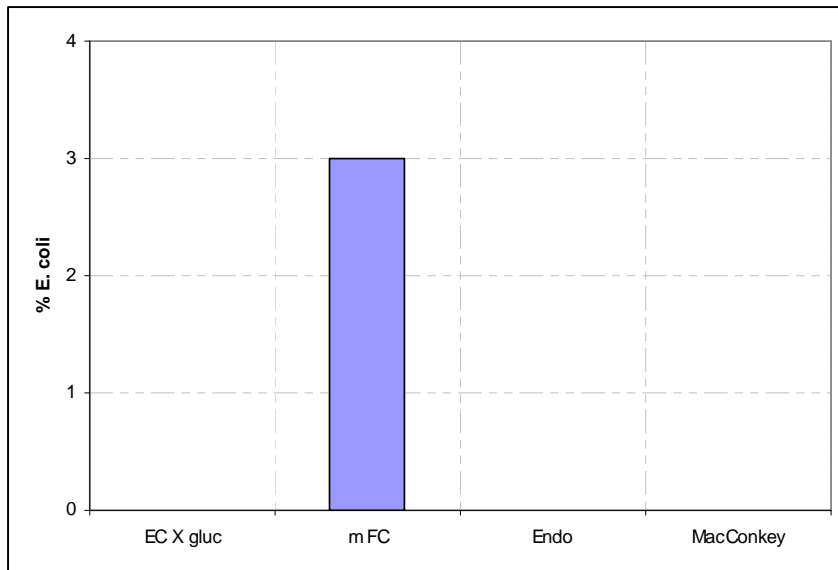
**Slika 52.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Četvrto jezero, postaja B) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



**Slika 53.** Postotak vrste *E. coli* dobiven naciepljivanjem uzorka vode (Peto jezero, postaja A) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

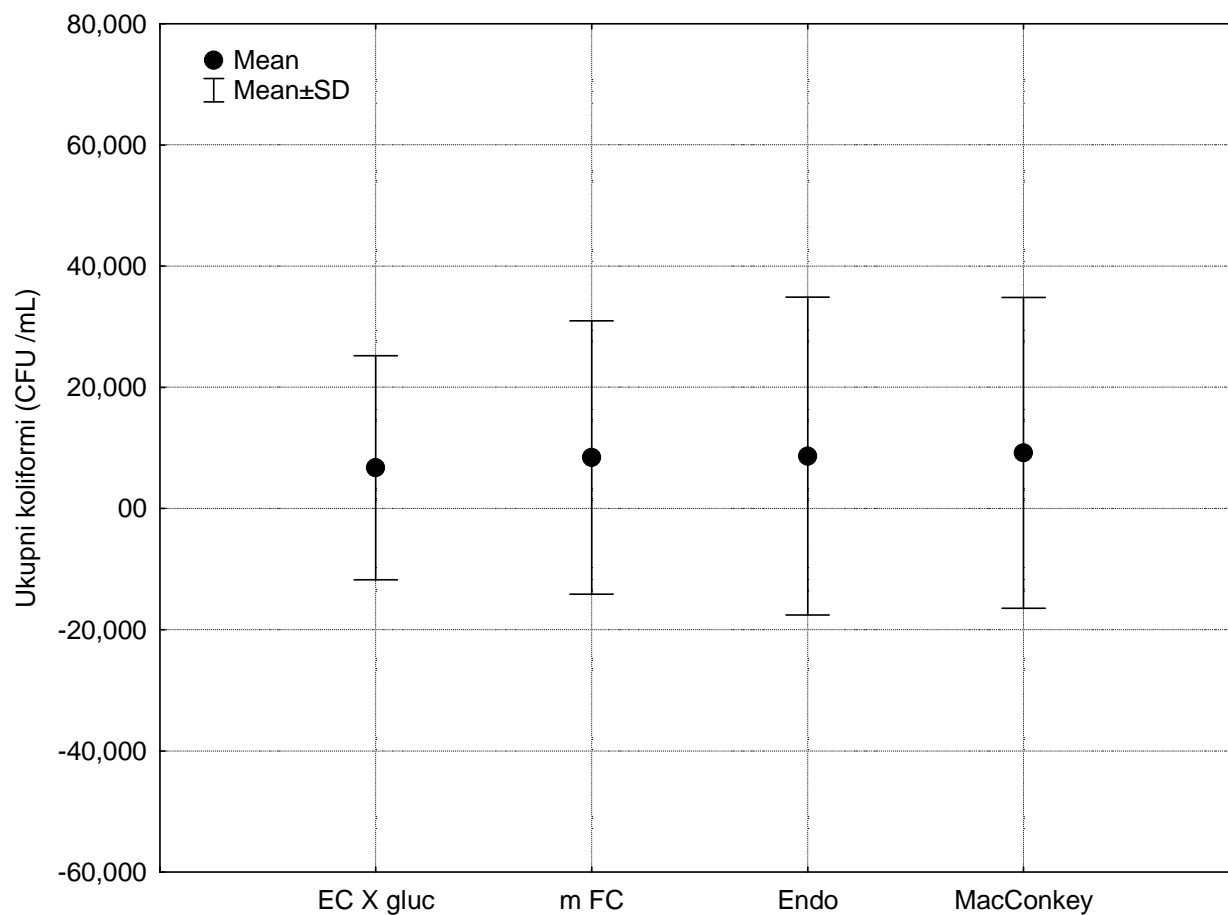


**Slika 54.** Postotak vrste *E. coli* dobiven naciepljivanjem uzorka vode (Peto jezero, postaja B) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar



**Slika 55.** Postotak vrste *E. coli* dobiven nacepljivanjem uzorka vode (Peto jezero, postaja C) na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

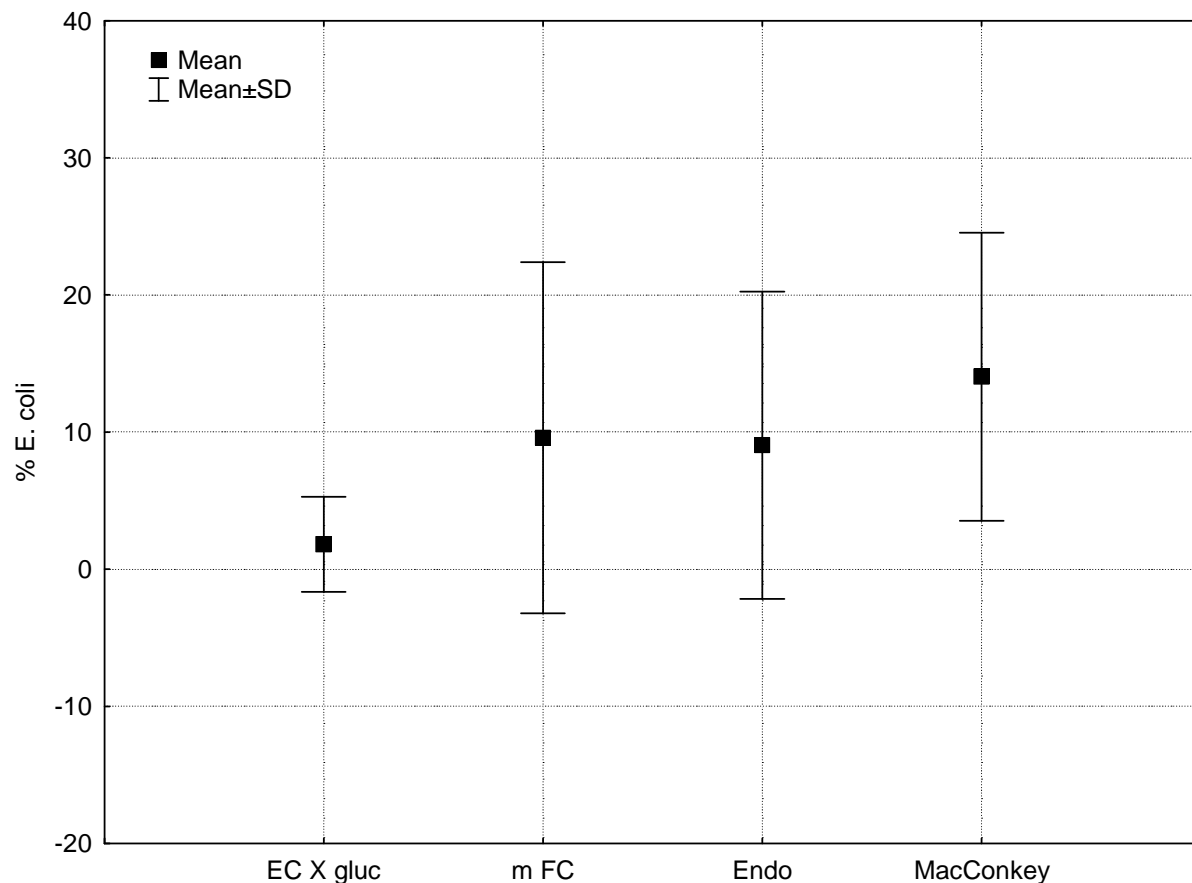




**Slika 56.** Srednja vrijednost (i standardna devijacija) broja ukupnih koliforma svih uzoraka naci jepljenih na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

**Tablica 6.** Srednja vrijednost broja ukupnih koliforma svih uzoraka (sa standardnom devijacijom) i redoslijed podobnosti hranjivih podloga za izolaciju ukupnih koliforma

PODLOGA	UKUPNI KOLIFORMI(CFU/mL) ± SD	REDOSLIJED PODOBNOSTI ZA IZOLACIJU UKUPNIH KOLIFORMA
EC X Gluc	6,74 ± 18,50	4
m FC	8,41 ± 22,58	3
Endo	8,64 ± 26,23	2
MacConkey	9,18 ± 25,63	1



**Slika 57.** Srednja vrijednost (i standardna devijacija) postotka *E. coli* svih uzoraka naci jepljenih na četiri različite podloge za izolaciju koliformnih bakterija: EC X Gluc agar, m-Faecal Coliform agar, Endo agar i MacConkey agar

**Tablica 7.** Srednja vrijednost postotka *E. coli* svih uzoraka (sa standardnom devijacijom) i redoslijed selektivnosti hranjivih podloga za postotak *E. coli*

PODLOGA	% <i>E. coli</i> ± SD	REDOSLIJED SELEKTIVNOSTI ZA % <i>E. coli</i>
EC X Gluc	1,79 ± 3,47	4
m FC	9,58 ± 12,80	2
Endo	9,05 ± 11,20	3
MacConkey	14,05 ± 10,51	1

## 5. RASPRAVA

Istraživanje je uključilo četiri komercijalna kruta medija za izolaciju ukupnih koliformnih bakterija na kojima je koliformne bakterije lako identificirati bez potrebe za daljnjim biokemijskim testovima za potvrdnu identifikaciju. Podloge su selektivne, omogućuju rast samo Gram –negativnih bakterija, a rast ostalih bakterija je inhibiran nekim sastojkom koji je dodan u podlogu. Podloge su također i diferencijalne, omogućuju istovremenu izolaciju koliformnih bakterija i detekciju *E. coli*. Rezultati istraživanja pokazuju da sve četiri hranjive podloge nisu jednako učinkovite za izolaciju ukupnih koliformnih bakterija iz površinskih voda kao ni za izolaciju vrste *E. coli*. Iako su na podloge naciyepljeni isti uzorci vode broj izraslih kolonija je vrlo različit. Razlog tome je između ostaloga različit sastav podloga te sama metoda naciyepljivanja uzoraka vode koja nije toliko pouzdana kao metoda membranske filtracije.

Iz srednje vrijednosti broja ukupnih koliforma svih uzoraka (Slika 56) se vidi da se vrijednosti ukupnih koliforma ne razlikuju za svaku podlogu, ali se razlike vide iz analize vrijednosti pojedinačnih uzoraka. Gledajući prvi uzorak vode (jezero Botaničkog vrta) može se reći da je najbolja podloga MacConkey agar, na njemu je izraslo najviše kolonija koliformnih bakterija. Na EC-X Gluc agaru je izraslo upola manje kolonija nego na MacConkey agaru što bi značilo da je ta podloga loša za izolaciju koliformnih bakterija. No jedan uzorak ne govori ništa.

Gledajući rezultate svih 19 uzoraka vode i uzorka *E. coli*, podloga na kojoj je u najviše slučajeva izraslo najviše kolonija je upravo MacConkey agar. Od 20 naciyepljenih uzoraka, 10 uzoraka je pokazalo najbolje rezultate na MacConkey agaru, tj. na njemu je izraslo najviše kolonija. Najgora podloga za uzgoj koliformnih bakterija je EC-X Gluc agar. Naime, na toj podlozi je u najviše slučajeva izraslo najmanje kolonija. Gledajući rezultate, od 20 naciyepljenih uzoraka, 12 ih je najslabije izraslo na EC-X Gluc agaru. Endo agar i m-FC agar su po podobnosti izolacije koliformnih bakterija između MacConkey i EC-X Gluc agara. Teško je razlučiti koji je od ta dva agara bolji budući da su im rezultati približno jednaki. Bolje i reprezentativnije rezultate bi dobili da je rađeno sa više uzoraka, ali i da je napravljeno više ponavljanja naciyepljivanja. No iako su razlike male, možemo reći da je drugi po podobnosti Endo agar. Na njemu je, odmah iza MacConkey agara, izraslo najviše kolonija. 5 od 20 uzoraka je najbolje uspjelo na Endo agaru, a 4 uzorka na m-FC agaru. Dakle, treći bi po podobnosti izolacije ukupnih koliformnih bakterija bio m-FC agar. Kako bi bolje usporedili Endo agar i m-FC agar potrebno je promotriti koja je podloga druga po broju izraslih kolonija.

7 uzoraka je najbolje uspjelo na MacConkey agaru što samo potvrđuje najbolju podobnost te podloge za uzgoj koliformnih bakterija. 6 uzoraka je najbolje uspjelo na Endo agaru, a 5 na m-FC agaru. Opet se vidi da je mala razlika između te dva agara. Ako bi pak pogledali koja je podloga treća po broju izraslih kolonija možemo sa sigurnošću reći da je to m-FC agar. U tom slučaju 8 je uzoraka pokazalo najbolje rezultate na tom agaru, a 6 na Endo agaru.

S obzirom na ove činjenice, evidentno je da je najbolja podloga za uzgoj koliformnih bakterija MacConkey agar. Slijede ga Endo agar i m-FC agar, a najlošija podloga za uzgoj koliformnih bakterija je svakako EC-X Gluc agar. Literaturnih podataka o usporedbi ove četiri podloge nema. Najčešća podloga koja je istraživana i uspoređivana sa drugim podlogama, ali i često korištena je MacConkey agar.

Ukupni koliformni podrazumijevaju više vrsta bakterija, a svakako najčešća i najznačajnija za ovo istraživanje je *E. coli*. Na temelju rezultata srednje vrijednosti postotka *E. coli* svih uzoraka (Slika 57) evidentno je da su sve četiri podloge različito selektivne za izolaciju ove bakterije. Podloga na kojoj je izraslo najviše kolonija *E. coli* je MacConkey agar. Kao i za izolaciju koliformnih bakterija, tako je MacConkey najbolja podloga za izolaciju *E. coli*. Prema dobivenim rezultatima najlošija podloga za izolaciju kolonija *E. coli* je EC-X Gluc agar. Na njemu je izraslo najmanje kolonija *E. coli*. Što se tiče m-FC i Endo agara, oni su po rezultatima vrlo slični. Razlike su male, ali za neki mali postotak m-FC agar je bolji za izolaciju *E. coli*. Na temelju ovih činjenica jasno je da je MacConkey agar najselektivnija podloga za detekciju i izolaciju *E. coli*. Slijede ga po selektivnosti m-FC agar i Endo agar, a najlošija podloga je EC-X Gluc agar.

Na temelju ovog istraživanja je uočeno da je MacConkey agar najbolja podloga za izolaciju koliformnih bakterija i za izolaciju *E. coli* te bi on bio preporučljiva podloga. U mnogim znanstvenim istraživanjima se koristi ova podloga, no ima jedan nedostatak. Zbog sličnosti kolonija *E. coli* koje su crveno-roza boje sa crvenom zonom precipitacije i kolonija ostalih koliforma koje su roza boje na ovom agaru, razlikovanje tih kolonija je subjektivno i nije dovoljno pouzdano (Finney et al., 2003). Podloga koja nije preporučljiva za izolaciju ukupnih koliformnih bakterija niti za izolaciju *E. coli* je EC-X Gluc agar.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- Četiri uspoređivana komercijalna kruta medija (EC-X Gluc agar, m-FC agar, Endo agar i MacConkey agar) nisu jednako podobna za izolaciju ukupnih koliformnih bakterija i vrste *Escherichia coli* iz površinskih voda
- Najbolja hranjiva podloga za uzgoj i izolaciju ukupnih koliformnih bakterija iz površinskih voda je MacConkey agar. U usporedbi s ostalim ispitivanim podlogama ta podloga je ostvarila najbolje rezultate. Po podobnosti ga slijede Endo agar te m-FC agar. Najlošija podloga za izolaciju ukupnih koliformnih bakterija je EC-X Gluc agar.
- Najselektivnija hranjiva podloga za izolaciju vrste *Escherichia coli* je MacConkey agar. Po selektivnosti ga slijede m-FC agar, Endo agar te EC-X Gluc agar.
- Preporučljiva hranjiva podloga za izolaciju ukupnih koliformnih bakterija i izolaciju vrste *Escherichia coli* je MacConkey agar. Endo agar i m-FC agar reagiraju prosječno i mogu se koristiti. Podloga koja nije preporučljiva za izolaciju ukupnih koliformnih bakterija i vrste *Escherichia coli* je EC-X Gluc agar.

## 7. LITERATURA

Bonadonna, L., Cataldo, C., Semproni, M. (2006): Comparison of methods and confirmation tests for the recovery *Escherichia coli* in water. *Desalination* **213**: 18-23.

Crkvenčić, I., Dugački, Z., Jelen, I., Malić, A., Riđanović, J., Roglić, J., Šegota T., Žuljić, S. (1974): *Geografija Središnje Hrvatske*. Školska knjiga, Zagreb.

Finney, M., Smullen, J., Foster, H.A., Brox, S., Storey, D.M. (2003): Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae from faecal samples from healthy subjects. *Journal of Microbiological Methods* **54**: 353-358.

Kerovec, M., Meštrov, M., Stilinović, B., Mrakovčić, M., Plenković-Moraj, A., Hršak, V., Ternjej, I., Mihaljević, Z., Gottstein Matočec, S., Popijač, A., Mustafić, P., Žganec, K., Previšić, A., Gligora, M., Kralj, K., Bartovsky, V., Horvat, R., Vajdić, S. (2004): *Detaljni istražni radovi u svezi ispitivanja kakvoće voda u maksimirskim jezerima*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kučišec-Tepeš, N. (1994): *Specijalna bakteriologija i odabrana poglavlja iz opće i specijalne mikologije*. Školska knjiga, Zagreb.

Manafi, M. (2000): New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology* **60**: 205–218.

Stilinović, B. i Hrenović, J. (2009) : *Bakteriološki praktikum*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Tedeschi, S. (1997): *Zaštita voda*. Hrvatsko društvo građevinskih inženjera, Zagreb.

Weisglass, H. (1988): *Medicinska bakteriologija*. Jumena – jugoslavenska medicinska naklada, Zagreb.

Korištene web stranice:

<http://www.molecularstation.com>

<http://www.lzmk.hr>

<http://en.wikipedia.org>

<http://www.eol.org>

<http://www.microtradeuk.com>

<http://www.biolifeit.com>

<http://www.biol.pmf.hr>

<http://travel.yahoo.com>

<http://www.park-maksimir.hr>

<http://www.pp-medvednica.hr>

<http://www.mzopu.hr>

<http://www.destinacije.com>

<http://www.izaberi.hr>

<http://www.medri.hr>