

Sanitarna kvaliteta izvorišta vodoopskrbnog sustava grada Zadra

Peroš, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:825241>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivana Peroš

**SANITARNA KVALITETA IZVORIŠTA VODOOPSKRBNOG
SUSTAVA GRADA ZADRA**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen u Vodovodu d.o.o. Zadar, pod vodstvom mr. sc. Nicolette Berović i Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, pod vodstvom prof. dr.sc. Božidara Stilinovića i doc. dr. sc. Marina Ježića, predan je Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

Zahvaljujem svojim mentorima prof. dr. sc. Božidaru Stilinoviću i doc. dr. sc. Marinu Ježiću na velikom strpljenju, razumijevanju, idejama te pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem mr. sc. Nicoletti Berović, Slavenu Meštroviću, Nikici Klarin, Aleksandri Meštrović i svim djelatnicima Sektora za nadzor i kontrolu kakvoće vode Vodovoda d.o.o. Zadar na savjetima i potpori prilikom izrade diplomskog rada,

Veliko hvala mojim roditeljima Jadranki i Ivici koji su mi svojim odricanjem omogućili studiranje i pružali podršku sve ove godine.

Hvala mom suprugu Teu i mojoj djeci Mauru i Pii Mili na podršci, razumijevanju, motivaciji i ljubavi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno - matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

SANITARNA KVALITETA IZVORIŠTA VODOOPSKRBNOG SUSTAVA GRADA ZADRA

Ivana Peroš

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati kvalitetu vode za ljudsku potrošnju, s obzirom na mikrobiološke pokazatelje, na području grada Zadra i dijela Zadarske županije, koju zahvaća, kondicionira i distribuira Vodovod d.o.o. Zadar. Uzorci su uzeti u svim dijelovima vodoopskrbnog sustava, od neobrađene vode na vodozahvatima do krajnjih korisnika. Analizirani su metodom membranske filtracije i kultivacijom na hranjivim podlogama radi utvrđivanja prisustva aerobnih mezofilnih bakterija, ukupnih i fekalnih koliforma, enterokoka, bakterija *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* i *Pseudomonas aeruginosa*. Na osnovu izmjerenih vrijednosti i definiranih maksimalno dopuštenih koncentracija pojedinih pokazatelja, određena je zdravstvena ispravnost vode. Mikrobiološka analiza je pokazala da su svi uzorci neobrađenih voda bili zdravstveno neispravni, dok je postotak neispravnih uzoraka obrađenih voda vrlo nizak.

(59 stranica, 24 slika, 6 tablica, 20 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: mikrobiološko ispitivanje voda, bakterije, maksimalno dopuštene vrijednosti.

Voditelj: Dr. sc. Marin Ježić, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Marin Ježić, doc.

Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, red. prof.

Dr. sc. Mirela Sertić Perić, doc.

Dr. sc. Morana Dulić, doc.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

SANITARY QUALITY OF WATER SUPPLY SOURCE SYSTEM OF THE TOWN OF ZADAR

Ivana Peroš

Roosveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The purpose of this research was to analyse the quality of water for human consumption, regarding microbiological indicators, covering the area of the town of Zadar and the part of the Zadar county, which is captured, treated and distributed by Vodovod Ltd. Zadar. The samples have been taken in every part of water supply system, from untreated water on water springs to the end users. They have been analysed using the membrane filtration method and cultivation on various nutrient media in order to define the presence of aerobic mesophilic bacteria, total and faecal coliforms, enterococci, bacteria *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* and *Pseudomonas aeruginosa*. Based on these measured values as defined by a maximum allowed concentrations of certain indicators, the water consumption safety has been determined. The microbiological analysis has shown that none of the samples of untreated water were sanitary acceptable, while the percentage of unsuitable samples of treated waters was very low.

(59 pages, 24 figures, 6 tables, 20 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: microbiological analysis of water, bacteria, maximum allowed concentrations

Supervisor: Dr. Marin Ježić, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Marin Ježić, Asst. Prof.

Dr. Iva Juranović Cindrić, Assoc. Prof.

Dr. Mirela Sertić Perić, Asst. Prof.

Dr. Morana Dulić, Asst. Prof.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Voda namijenjena ljudskoj upotrebi.....	1
1.2. Hidrološki ciklus	2
1.3. Vodoopskrba.....	2
1.4. Voda u Republici Hrvatskoj	3
1.5. Povijest vodoopskrbe Zadra.....	3
1.6. Suvremeni vodovod u Zadru.....	7
1.8. Praćenje kakvoće vode	10
1.8.1. Kakvoća voda na crpilištima zadarskog Vodovoda.....	12
1.8.2. Mikrobiološki pokazatelji	13
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1. Područje istraživanja	17
3.2. Materijali	17
3.2.1. Podloge i reagensi za izolaciju mikroorganizama	17
• Bile esculine azide agar (žučni eskulinski agar).....	19
3.2.2. Aparatura i pribor	19
3.3. Metode.....	20
3.3.2. Membranski filtracijski sustav	21
3.3.3. Određivanje broja živih organizama brojenjem kolonija izraslih na hranjivom agaru nakon inkubacije na 22°C i 37°C (HRN EN ISO 6222/99).....	23
3.3.4. Detekcija i određivanje broja ukupnih koliforma i bakterije <i>Escherichia coli</i> (Metoda: MF PREMA ISO/DIS 9308-1:1990).....	26
3.3.5. Detekcija i određivanje broja bakterija <i>Clostridium perfringens</i> metodom membranske filtracije (HRN EN ISO 14189:2013; EN ISO 14189:2016).....	32
3.3.6. Detekcija i određivanje broja <i>Pseudomonas aeruginosa</i> u vodi metodom membranske filtracije (METODA prema EN 12780: 2002).....	35
3.3.7. Detekcija i brojenje crijevnih enterokoka metodom membranske filtracije (ISO 7899-2:2000;EN ISO 7899-2:2000).....	40
5. RASPRAVA.....	51
6. ZAKLJUČAK.....	55
7. LITERATURA	56
8. ŽIVOTOPIS	58

1. UVOD

Voda je bitan element za održavanje života. Stoga je nužno da ona potrošačima bude dostupna u zadovoljavajućoj količini i što je moguće bolje kvalitete. Osnovni zadatak vodoopskrbnog sustava je dostaviti zdravstveno ispravnu vodu te stoga vodoopskrbni sustavi moraju omogućiti najviši mogući stupanj kontrole kakvoće pitke vode. Da bi se osigurala kvaliteta vode, bitna je zaštita i kontrola izvora, tretman vode, transport i zaštita distributivne mreže. U svakoj od ovih faza moguća je kontaminacija. Zaštita izvora najbolji je način u osiguravanju vode od zagađenja. Propusti u zaštiti i neadekvatnom tretmanu izlažu zajednicu riziku od bolesti čiji uzročnici se prenose vodom. Voda je otapalo za mnoge tvari, a kemijski čista voda u prirodi ne postoji. I najčišća kišnica sadrži otopljene plinove kao što su: ugljikov dioksid (CO_2), kisik (O_2), dušik (N_2), amonijak (NH_3) i drugo. Osim toga kišnica može sadržavati i nečistoće prisutne u atmosferi: sumporov dioksid (SO_2), sumporovodičnu kiselinu (H_2S), sumpornu kiselinu (H_2SO_4), klorovodičnu kiselinu (HCl), čađu i prašinu. Na prostorima uz more kišnica može sadržavati i morsku sol (NaCl), čiji sadržaj može iznositi i do 15 mg/L. Za vrijeme nevremena i oluja može doći do stvaranja ozona (O_3) i dušične kiseline (HNO_3), koji se također otapaju u kišnici. Voda koja prolazi kroz različite slojeve tla se djelomično filtrira čime se uklanjaju različite organske tvari i mikroorganizmi. Međutim, istovremeno dolazi do otapanja brojnih mineralnih tvari prisutnih u prirodi, npr. magnezija, kalcija, kloridnih, nitratnih, sulfatnih iona i dr. Podzemne vode su najmanje onečišćen izvor vode, ali im sastav može znatno varirati ovisno o sastavu i stanju tla kroz koje protječu, količini otpadnih voda, te mnogim drugim čimbenicima. Voda u prirodi sadrži brojne mikroorganizme. Ukoliko voda dođe u kontakt s fekalnim vodama može sadržavati i patogene bakterije poput *Escherichia coli* što može uzrokovati crijevna oboljenja (Mayer 2004.).

1.1. Voda namijenjena ljudskoj upotrebi

Većina Zemljine površine, nešto manje od 71%, prekrivena je vodom. Voda se nalazi u atmosferi, hidrosferi i litosferi: 96,652% vode nalazi se u morima i oceanima, 1,631% u podzemnim vodama, 1,702% u ledenjacima i vječnom ledu, mali postotak u drugim većim vodenim površinama, 0,001% u tlu i 0,001% u atmosferi kao vodena para, oblaci i atmosferske padaline. Samo 2,5% vode otpada na slatke vode, a 98,8% slatke vode nalazi se

zarobljeno u ledu ili u podzemnim vodama. Manje od 0,3% slatkih voda na Zemlji nalazi se u rijekama, slatkovodnim jezerima i atmosferi (Ravlić, Kovačec 2009.).

1.2. Hidrološki ciklus

Hidrološki ciklus je stalni proces kruženja, obnavljanja i prividnog gubljenja vode na Zemlji. Zemlja se smatra zatvorenim hidrološkim sustavom. Najjednostavnije tumačenje hidrološkog ciklusa je da djelovanjem sunčeve toplinske energije voda stalno isparava s površine oceana, mora i drugih površinskih voda, kondenzira se i stvara oblake, oborine, akumulacije vode na tlu ili u vodenim tokovima, jezerima i morima te ponovno isparava. Hidrološki ciklus je kruženje vode kroz atmosferu i na zemljinoj površini. Obuhvaća zemljinu atmosferu, hidrosferu i litosferu (Ravlić, Kovačec 2009.). Voda prodire u zemlju prosječno do 1 km dubine (u kršu i do 3 km), a u atmosferu do 15 km visine, pa se cijeli proces zbiva u amplitudi od 16-18 km. Pri takvoj cirkulaciji ukupna količina vode na Zemlji ostaje nepromijenjena (Ravlić, Kovačec 2009.).

1.3. Vodoopskrba

Pod pojmom vodoopskrbe podrazumijevamo pridobivanje, transport i distribuciju vode koja se rabi za piće, pripremu hrane, higijenske potrebe, industrijsku proizvodnju i komunalne potrebe. U Europi, pa tako i u našim krajevima moderni vodoopskrbni sustavi masovno se razvijaju od druge polovine 19. stoljeća. Tako je Zagreb dobio vodovod 1878., Sušak 1885., Rijeka 1894., a Zadar 1902. godine. Postojeći sustavi su se stalno proširivali i modernizirali. Izgradnja novih i obnova postojećih vodoopskrbnih sustava traje i danas (Mayer 2004.; Kaleb i sur. 2005.). Suvremeni vodoopskrbni sustavi sastoje se od vodocrpilišta, cjevovoda za dovod vode, rezervarskog prostora (vodosprema) i cjevovoda za raspodjelu vode. Vodocrpilište je temeljni dio svakog vodoopskrbnog sustava, ostali dijelovi manje ili više se razlikuju po tehničkim rješenjima. S obzirom na vrstu vode koja se koristi, vodocrpilišta se dijele na zahvate oborinskih voda, zahvate površinskih voda, zahvate (kaptaže) izvora i zahvate podzemnih voda (Mayer 2004.).

1.4. Voda u Republici Hrvatskoj

Republika Hrvatska prostire se na površini od preko 56594 km² i prema popisu stanovništva iz 2001. godine imala je 4437460 stanovnika, što je gustoća od 78,4 stanovnika po km² (podaci Državnog zavoda za statistiku). Sastoji se od 2 regije – u sjevernoj prevladavaju ravnice dunavskog područja, a južno od karlovačke depresije je klasičan krš Dinarida. U krškom području izmjena oborinskih i površinskih voda je visoka, površinskih tokova je malo, ali obiluje podzemnim vodama. Rijetko je naseljena i slabo industrijalizirana (Mayer 2004.). Ovaj prostor ima najkvalitetniju vodu ne samo u Hrvatskoj već i u Europi. Analizirajući raspoložive količine vode, zaključujemo da je Hrvatska u kategoriji m³/st./god. najbogatija zemlja u Europi (Eurostat). Buduće mjerilo „bogatstva“ neke zemlje neće biti nafta ili neke druge sirovine, već obnovljiva količina pitke vode.

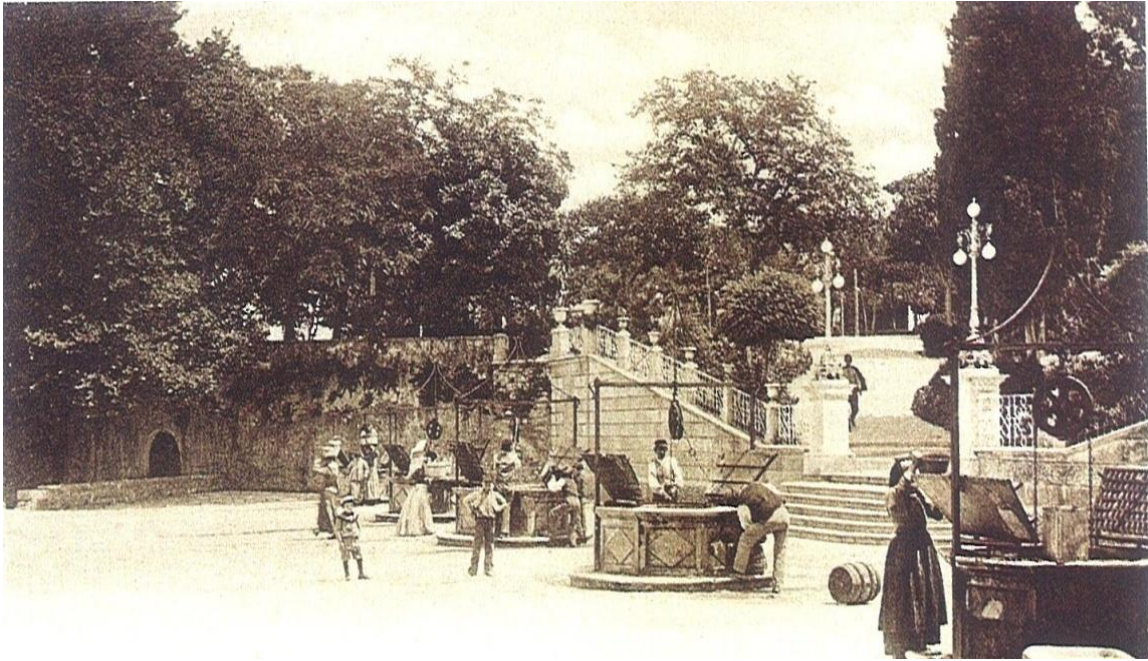
1.5. Povijest vodoopskrbe Zadra

Zadar je u doba Rima imao sve odlike uređenog grada: vodovod, odvodnju, grijanje kuća toplim zrakom, javno gradsko kupalište, amfiteatar i sl. Kvalitetni izvori vode nalazili su se u zaleđu. Prvi akvedukt Biba – Jader (Zadar) je izgrađen oko 105. godine, od Subibe (Kneževića vrilo) preko Vranske doline i Bibinja do Zadra, dužine 40350 m. Od tog kaptiranog vrela polazio je prvi gravitacijski kanal, plitko ukopan u zemlju, širok dvije rimske stope (59,6 cm). Drugi akvedukt Botina – Jader (Zadar) izgrađen je zbog povećanih potreba za vodom, od 100. do 115. godine, u vrijeme cara Trajana. Voda se dovodila od izvora Kučina praktički do područja današnjeg Smiljevca (dio Zadra), gdje je, kako su pokazala istraživanja, konstrukcija akvedukta Botina bila priključena na akvedukt Biba. Akvedukt Botina – Jader, pretpostavljenog maksimalnog kapaciteta 34 L/s, bio je dug oko 3400 m. Treći akvedukt Boljkovac – Aenona (Nin), izgrađen krajem 2. stoljeća, prvi je poznati nalaz kaptazne konstrukcije na čitavom području rimske provincije Dalmacije (Slika 1.). Ukupne dužine 3500 m, kapaciteta 91 L/s. Kompleksno rješenje vodoopskrbe područja Boljkovca i gradskog područja starog Nina obuhvaćalo je masivnu konstrukciju *castelluma fontis* koja je opasavala izvorište, glavni kanal, dvojne ustave (voda se upuštala u dva usporedna gravitacijska kanala, jednim prema Ninu i drugim prema mehaničkom uređaju - agregatu) i branu.



Slika 1. Akvedukt Boljkovac – Aenona (Nin).

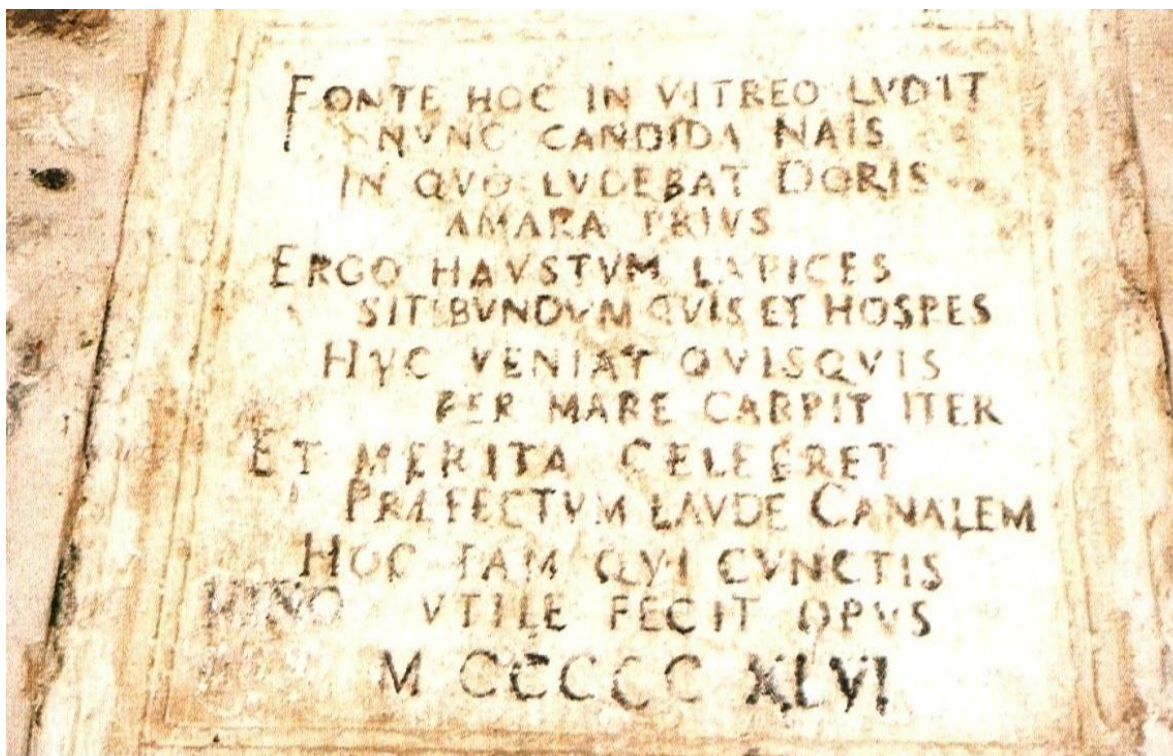
Unutar bedema Jadera (Zadra) nalazila se vodosprema od koje se širila vodovodna mreža do javnih zdenaca. Voda je tekla stalno i bila je besplatna, a višak je odlazio u terme. Na prijelazu iz antike u srednji vijek, iskopani su brojni bunari i koristila se podzemna voda. Neki su sačuvani do danas. Najpoznatiji su „Pet bunara“ (Slika 2.) (velika podzemna cisterna s 5 otvora za crpljenje vode, s poligonalnim renesansnim kamenim vijencima) i „Tri bunara“ (Slika 3.) (kameni vijenci u baroknom stilu). Zdenac Fontana u Arbanasima, sagrađen uz samo more, s prirodnim izvorom vode, spominje se u srednjovjekovnim povijesnim izvorima 1343. godine. Služila je za opskrbu brodova vodom. Agostino Canal, zadarski gradski kapetan, 1546. godine dao je sazidati novi zdenac i natkriti ga zidanim paviljonom (Slika 4.). U utvrdi Forte (danas park Vladimira Nazora) 1659. godine izgrađena je velika cisterna za potrebe vojske. Zbog sve veće potrebe za vodom, početkom 19. st. počinje se graditi vodovod, prema projektu Valentina Presanija (Kaleb i sur. 2005.).



Slika 2. Trg Pet bunara.



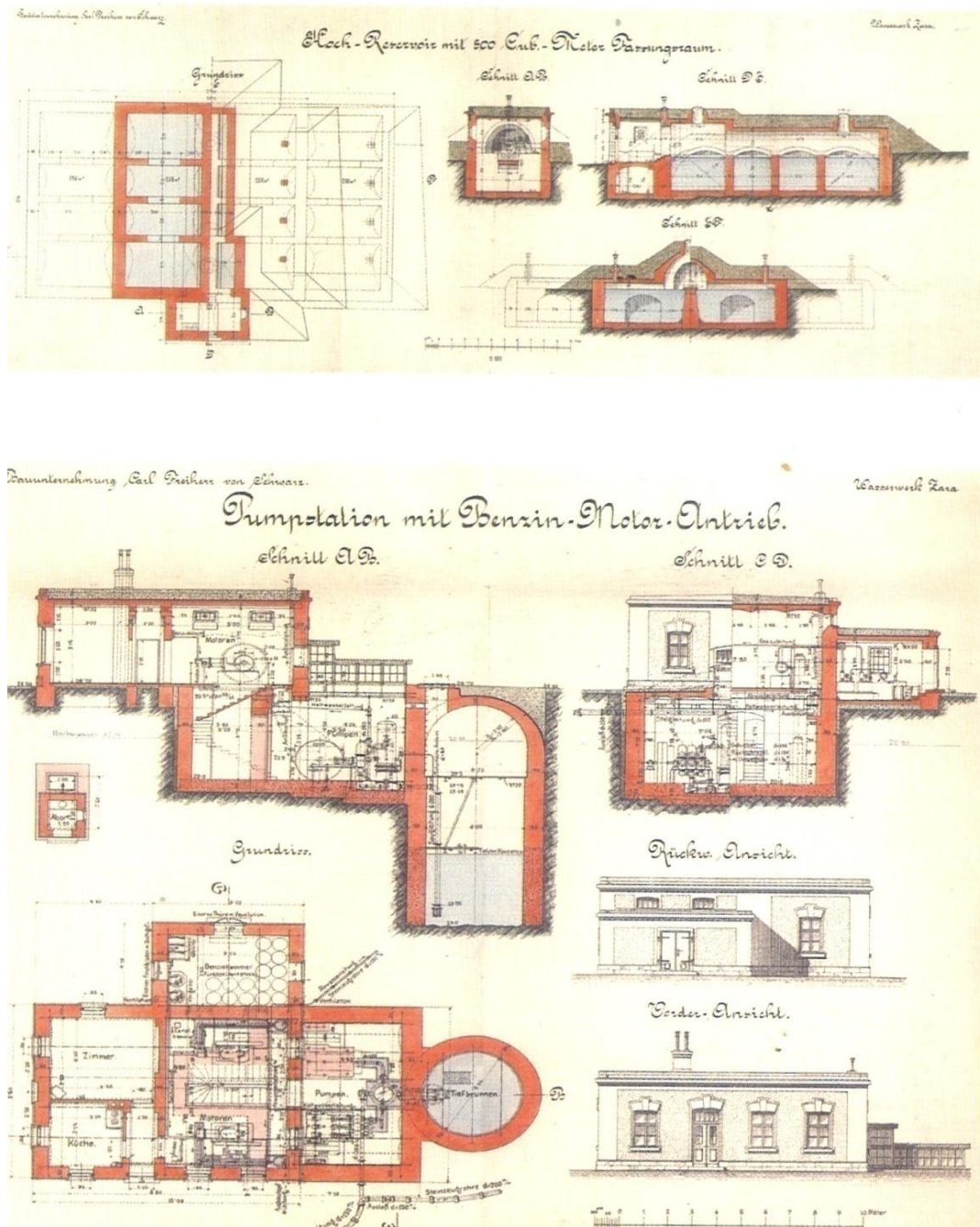
Slika 3. Trg Tri bunara.



Slika 4. Fontana u Arbanasima (Zadar) (gore) – Uzidana kamena ploča (dolje), iz vremena Agostina Canala, s natpisom u stihovima na latinskom, gdje nepoznati pjesnik bistu izvorsku vodu poistovjećuje s nimfom gorskih izvora Najadom, a gorku i slanu morsku vodu s morskom nimfom Doridom, te slavi namjesnika Canala „...koji korisno to učini djelo za sve“.

1.6. Suvremeni vodovod u Zadru

Prema projektu baruna Karla von Schwarza (Slika 5.), općinski savjet Zadra s gradonačelnikom Nicolom Trigarijem, nakon izvršene bakteriološke i kemijske analize vode podzemnih izvora na Bokanju, 22.11.1900. godine donio je odluku o izgradnji suvremenog vodovoda od Bokanjačkog blata do Zadra. Radovi su započeli u svibnju 1901. godine. Novi suvremeni vodovod započeo je s radom 26.1.1902. (Kaleb i sur. 2005.).



Slika 5. Nacrt novog vodovoda baruna Karla von Schwarza.

Danas Vodovod d.o.o. Zadar upravlja složenim i zahtjevnim sustavom koji opskrbljuje oko 110000 stanovnika (približno polovica Zadarske županije) i ima oko 1000 km vodovodne mreže (Slika 6.). Vodoopskrbni sustav je kombinacija regionalnog sustava s vodozahvatima na desnom zaobalju rijeke Zrmanje (udio u vodoopskrbi 58,4%), Bokanjačkom blatu, Ninu, Poličniku (udio u vodoopskrbi 39,93%) i lokalnih sustava s manjim lokalnim zahvatima Ražanac, Rtina, Novigrad, Starigrad i Žman (udio u vodoopskrbi 1,67%) (Kaleb i sur. 2005.).



Slika 6. Prikaz zadarskog vodoopskrbnog područja.

Zadarski Vodovod zahvaća vodu na dva slivna područja i nekoliko lokalnih vodozahvata:

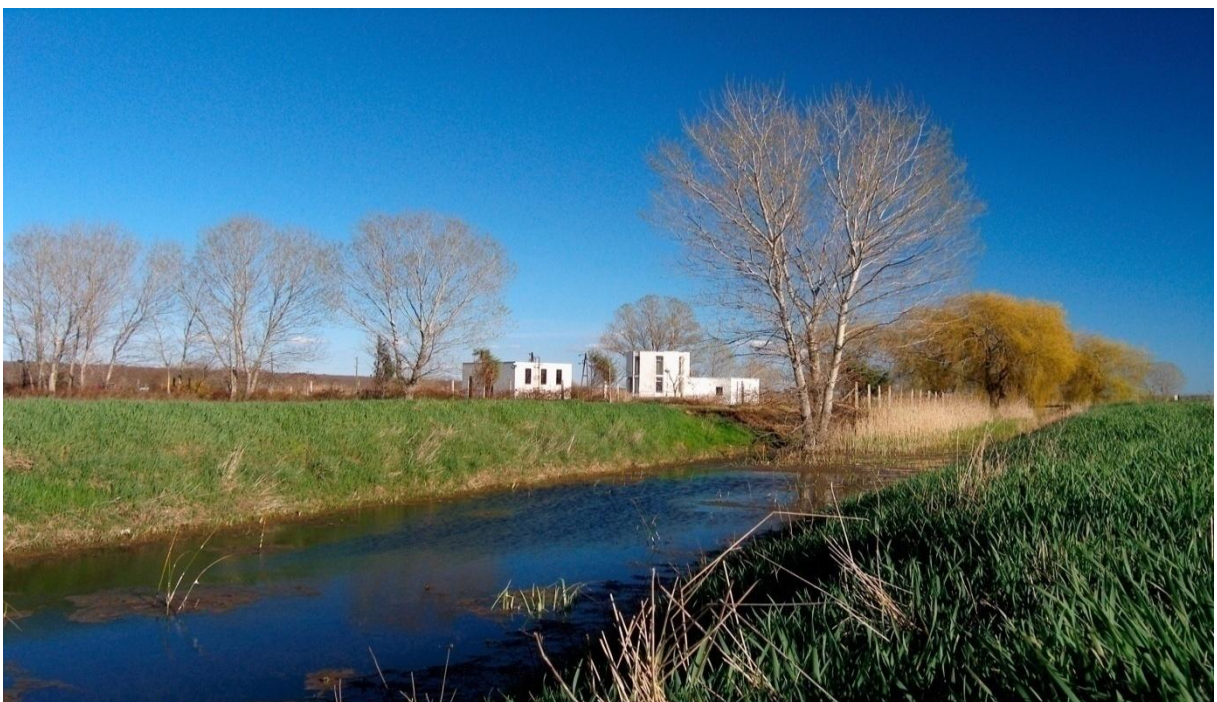
1. Slivno područje rijeke Zrmanje gdje se u desnom zaobalju rijeke zahvaćaju vode iz Velebitskih izvora Čavlinovac, Dorinovac i Sekulića vrelo i zatvorenim kolektorom dovode do crpne postaje Dolac (Slika 7.). U sušnijem dijelu godine koristi se i površinski vodozahvat Berberov buk na rijeci Zrmanji.

2. Slivno područje Bokanjac-Poličnik gdje se zahvaćaju vode iz 5 kopanih bunara Bunari 4 i 5, Jezerce (Slika 8.), Boljkovac, Oko i iz izvora Golubinka.
3. Lokalni vodozahvati u Starigradu i Žmanu na Dugom otoku. Starigrad se većim dijelom snabdijeva vodom koja dolazi sa slivnog područja rijeke Zrmanje, a dijelom iz Velebitskih izvora (Jukića vrilo, Kneževića vrilo, Vratrovac).

Mjesni vodovodi zahvaćaju vodu iz 10 izvora i 3 bunara. Sustav je povezan s vodoopskrbnim sustavom Šibenika, Biograda i Benkovca. Zahvaćene vode dezinficiraju se klorom (Kaleb i sur. 2005.).



Slika 7. Crpna postaja Dolac na Zrmanji.



Slika 8. Bunar Jezerce.

1.7. Karakteristike voda zadarskog slivnog područja

Tvrdoća vode je svojstvo koje ovisi o mineralizaciji vode, odnosno o količini otopljenih kalcijevih, magnezijevih i drugih soli u vodi. Vrsta i količina otopljenih mineralnih tvari ovisi o kemijskom sastavu tla s kojim voda dolazi u kontakt i njegovim geofizičkim osobinama. Tvrdoća se najčešće izražava u njemačkim stupnjevima (nj ili dH).

- Vrlo meka voda: < 4 nj
- Meka voda: 4 – 8 nj
- Srednje tvrda voda: 9 – 18 nj
- Tvrda voda: 18 – 25 nj
- Vrlo tvrda voda: > 25 nj

Vode na slivnom području rijeke Zrmanje su meke do srednje tvrde, dok su vode na slivnom području Bokanjac – Poličnik tvrde i vrlo tvrde.

Tvrdoća i alkalitet vode su veći nego kod tipičnih krških voda i sadrže znatno više otopljenog ugljikovog dioksida. Vode Golubinke i Boljkovca su pod utjecajem mora te sadrže povećane količine klorida. Vode ostalih bunara su kišničkog tipa, manje ili više korozivne. Slabije su zasićene kisikom zbog veće količine otopljenog ugljikovog dioksida. To su podzemne vode, isparnog ostatka oko 500 mg/L i pripadaju redu tvrdih voda (18-25 nj). Rijetko se zamućuju, u prosjeku do 5% dana godišnje (Kaleb i sur. 2005.).

1.8. Praćenje kakvoće vode

Zadatak Sektora za nadzor i kontrolu kakvoće vode Vodovoda d.o.o. Zadar jest pratiti kakvoću vode u svim fazama proizvodnje: od stanja kakvoće na vodozahvatima, preko svih faza priprema vode: dezinfekcija, ulaza i protoka kroz razdjelni sustav i vodospreme do potrošačkih mjesta – hidranti ili slavine. Kakvoća vode uključuje njenu zaštićenost, čistoću i upotrebljivost (organoleptičke osobine, odsutnost tvari koje mogu negativno utjecati na zdravlje). Mjerilo za procjenu kakvoće vode su razni pravilnici (nacionalni i međunarodni), preporuke WHO –a (Svjetske zdravstvene organizacije), te smjenice EU za vodu za piće, u kojima su dane maksimalne koncentracije tvari u vodi koje mogu biti štetne za zdravlje.

Monitoring je nužan i sastavni dio postupaka zaštite voda, a ima za cilj pravodobno uočavanje eventualnog zagađenja, identifikaciju vrste zagađenja te pravodobnu primjenu adekvatnih mjera i postupaka za njihovo otklanjanje (Kaleb i sur. 2005.).

Temelji se na:

1. Zakonu o vodama (N.N. 107/95)
2. Zakonu o zdravstvenoj ispravnosti i zdravstvenom nadzoru nad namirnicama i predmetima opće uporabe (N.N. 1/98)
3. Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće (N.N. 46/94)
4. Uredbi o klasifikaciji voda (N.N. 77/98)
5. Uredbi o opasnim tvarima u vodama (N.N. 78/98)

Monitoring obuhvaća svakodnevnu rutinsku kontrolu kakvoće vode prema dnevnim, mjesečnim i godišnjim planovima na osnovi kojih se utvrđuje jesu li tretman i distribucija u skladu s postavljenim ciljevima i važećim zakonskim propisima. Cilj je osigurati odgovarajući tretman, kvalitetu i spriječiti kontaminaciju vode u distributivnoj mreži. Monitoring se vrši na tri razine:

1. U vlastitom laboratoriju Vodovoda d.o.o. Zadar
2. U Zavodu za javno zdravstvo u Zadru prema programu nadzora
3. U Institutu Ruđer Bošković i drugim ovlaštenim laboratorijima prema programu nacionalnog monitoringa propisanog od strane Hrvatskih voda na temelju Uredbe o klasifikaciji voda

Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće propisuje se zdravstvena ispravnost vode koja služi za javnu vodoopskrbu. Sastavni dio Pravilnika su tablice s vrijednostima pokazatelja MDK (maksimalne dopuštene koncentracije), a odnose se na fizikalno – kemijska svojstva, kemijske tvari, toksične tvari i mikrobiološka svojstva, koja se ne smiju prekoračiti. Kratkotrajna odstupanja ne znače nužno da je voda neupotrebljiva za piće, a u kojoj mjeri i koliko dugo odstupanje može biti bez utjecaja na zdravlje, ovisi o prirodi tvari o kojoj je riječ.

Primjena spomenutih provedbenih propisa znači:

1. Voda, bez obzira na njeno podrijetlo u prirodnom stanju, ako se namjerava koristiti za piće, treba zadovoljavati kriterije određene Uredbom za I vrstu voda.

2. U trenutku kada ta ista voda postane voda za piće (izvorište, spremnik, mreža), ona mora zadovoljavati kriterije zdravstvene ispravnosti propisane Pravilnikom.

1.8.1. Kakvoća voda na crpilištima zadarskog Vodovoda

Uredbom o klasifikaciji voda (NN broj 77/98), određene su vrste voda (I – V) koje odgovaraju uvjetima kakvoće u smislu njihove opće ekološke funkcije kao i uvjetima korištenja voda za određene namjene, a odnose se na sve površinske i podzemne vode, te mora u pogledu zaštite od onečišćenja.

Pokazatelji za klasifikaciju svrstani su u dvije skupine:

- I. skupinu pokazatelja čine obavezni pokazatelji za ocjenu opće ekološke funkcije voda. To su: fizikalno – kemijski pokazatelji, režim kisika, hranjive tvari i mikrobiološki pokazatelji.
- II. skupinu pokazatelja čine pokazatelji koji služe za širu ocjenu opće ekološke funkcije voda. To su: metali, organski spojevi i radioaktivnost.

Vrsta I. Podzemne i površinske vode koje se u svom prirodnom stanju ili nakon dezinfekcije mogu koristiti za piće ili u prehrambenoj industriji, te površinske vode koje se mogu koristiti i za uzgoj plemenitih vrsta riba (pastrve).

Vrsta II. Vode koje se u prirodnom stanju mogu koristiti za kupanje i rekreaciju, za sportove na vodi, za uzgoj drugih vrsta riba (ciprinida) ili koje se nakon odgovarajućeg pročišćavanja mogu koristiti za piće i druge namjene u industriji i sl.

Vrsta III. Vode koje se mogu koristiti u industrijama koje nemaju posebne zahtjeve za kakvoćom vode, te u poljoprivredi. To su vode koje se pročišćavaju da bi se koristile za određene namjene.

Vrsta IV. Vode koje se mogu koristiti isključivo uz pročišćavanje na područjima gdje je veliko pomanjkanje vode.

Vrsta V. Vode koje se gotovo ne mogu koristiti ni za kakve namjene, jer ne zadovoljavaju kriterije za namjene po ovoj Uredbi.

1.8.2. Mikrobiološki pokazatelji

Kontrola zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju definirana je Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju (NN 56/13, 64/15, 104/17, 115/18) i Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnosti javne vodoopskrbe (NN 125/17). Mikrobiološki dio analize obuhvaća kontrolu prisutnosti i broj mikroorganizama u vodi.

Ukupan broj kolonija

Vode sadrže mnoštvo mikroorganizama koji potječu iz različitih izvora, pa određivanje njihovog ukupnog broja može dati korisne informacije za procjenu i nadzor nad kvalitetom vode. To su aerobne mezofilne bakterije koje formiraju kolonije unutar ili na površini hranjive podloge pod točno definiranim uvjetima ispitivanja. Mikroorganizmi koji žive u vodi u laboratorijskim uvjetima rastu bolje na 22°C nego na višim temperaturama, a rezultati uglavnom odražavaju stanje u okolišu u ovisnosti o sezonskim promjenama. Mikroorganizmi koji dobro rastu na 37°C u laboratoriju, uglavnom teško preživljavaju u vodi i za njih se pretpostavlja da su došli iz drugih izvora te imaju sanitarni značaj. Zato se vrši odvojeno određivanje mikroorganizama koji rastu i razvijaju se na hranjivim podlogama na 37°C i 22°C.

Koliformne bakterije

Koliformne bakterije su Gram-negativne bakterije, aerobne ili fakultativno anaerobne, nesporogene bakterije štapićastog oblika. Fermentiraju laktozu stvarajući kiseline i ugljikov dioksid. Razlikujemo skupinu ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija.

Ukupni koliformni organizmi (UK): Organizmi sposobni formirati kolonije aerobno na $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ili na $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ na selektivnoj ili diferencijalnoj podlozi s laktozom uz proizvodnju kiseline (i aldehida) unutar 48 h.

Termotolerantni koliformni organizmi (FK): Koliformni organizmi koji imaju iste fermentativne osobine unutar 24 h, na $44\pm 0,25^{\circ}\text{C}$.

Vjerojatna (Pretpostavljena) *E. coli*: Termotolerantni koliformni organizmi koji također proizvode plin iz laktoze i manitola kao i indol iz triptofana unutar 24 h, na $44\pm 0,25^{\circ}\text{C}$. To su

primarno nepatogene bakterije, koje čine znatan dio fiziološke mikroflore debelog crijeva čovjeka i toplokrvnih životinja. Koliformne bakterije se izlučuju fekalijama, dospijevaju u otpadne vode, a preko njih u prirodne vode recipijente otpadnih voda te na taj način predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi koji dolaze u kontakt s vodom (Stilinović i Hrenović 2009.).

Escherichia coli

Rod *Escherichia* pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Od svih enterobakterija, *E. coli* je najčešći uzročnik crijevne infekcije kod čovjeka. Po fiziologiji i strukturi je tipična enterobakterija. To su kratki Gram-negativni štapići, veličine 2 do 6 μm . *Escherichia coli* može neko vrijeme preživjeti izvan ljudskog organizma, poput u vodi, na tlu ili na hrani. U hrani se ove bakterije lako i brzo razmnožavaju. Osjetljiva je na uobičajene dezinficijense koji sadrže spojeve klora (Weisglass 1988.). *Escherichia coli* ima važnu ulogu u intestinalnom traktu: sudjeluje u cijepanju nekih tvari koje organizam nije u stanju fermentirati; 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 antibiotičkih tvari koje sprečavaju patogene i nepoželjne mikrobe da se nastane u lumenu gastrointestinalnog trakta. *Escherichia coli* nije uvijek ograničena na crijeva, i njezina sposobnost preživljavanja na kratak period izvan tijela je čini idealnim indikatorskim organizmom za testiranje okolišnih uzoraka za fekalnu kontaminaciju (Kalenić 2013.).

Clostridium perfringens

Ova bakterija indikator je fekalnog zagađenja. Unutar intestinalnog trakta životinja i ljudi, ove Gram-pozitivne, anaerobne bakterije formiraju spore koje često imaju oblik vretena (lat. *closter* – vreteno) a koje su otporne na povišene temperature, za razliku od vegetativnih stanica. *Clostridium perfringens* ima kapsulu, nema bičeva, uzrokuje teška oboljenja (plinska gangrena, sekundarne infekcije rana, enteritis, sepsu) (Stilinović i Hrenović 2009.). U anaerobnim uvjetima reduciraju sulfat SO_4^{2-} do sumporovodika, H_2S . Nastali sumporovodik precipitira sa željezom iz podloge i tvori crni talog željezovog (II) sulfida, FeS . U intestinalnom traktu *C. perfringens* perzistira u oba oblika, kao spore i vegetativne stanice. Spore su također nađene u okolišnim uzorcima. Spore *C. perfringens* preživljavaju u vodi mjesecima, mnogo duže od vegetativnih fekalnih indikatorskih bakterija i zbog toga njihova prisutnost može indicirati starije ili povremeno fekalno zagađenje. Monitoring *C. perfringens*

se pokazao korisnim za procjenu kvalitete vodnih resursa i provjere faza obrade vode. Spore nisu uvijek inaktivirane rutinskim postupcima dezinfekcije (npr. kloriranjem) (Hajsig i Delaš 2016.).

Pseudomonas aeruginosa

Bakterija *P. aeruginosa* je Gram-negativni, nesporogeni bacil, pozitivan na katalazni i oksidazni test, posjeduje oksidativni metabolizam, reducira nitrata preko nitrita te razgradnjom acetamida proizvode amonijak (NH₃). Rastu na selektivnoj podlozi koja sadrži cetrimid. Većina sojeva (98%) proizvode fluoresciraajući pigment piocijanin topiv u vodi. Uglavnom rastu na 42°C, ali ne i na 40°C po čemu se diferenciraju vrste *P. aeruginosa* od *P. fluorescens* koji, obrnuto, raste na 40°C, a ne raste na 42°C. *Pseudomonas aeruginosa* je oportunistički patogen za čovjeka i može rasti u vodi s vrlo niskim sadržajem hranjivih tvari. U vodama namijenjenim za ljudsku potrošnju *P. aeruginosa* ne smije biti detektirana (prema Europskoj direktivi 80/777/EEC i 96/70/EC).

Crijevni enterokoki

Crijevnne enterokoke čine razni Gram-pozitivni okrugli ili ovalni koki koji obično tvore kratke lance i parove. Ove bakterije su negativne na katalazne i oksidazne testove, posjeduju D-antigen i sposobne su reducirati 2,3,5-trifeniltetrazolium klorid u formazon i hidrolizirati eskulin u podlozi na 44°C. Spadaju u fakultativne anaerobe s fermentativnim metabolizmom. Smatraju se bakterijama slabije patogenosti i čine dio fiziološke mikroflore završnog dijela probavnog sustava ljudi i toplokrvnih životinja. Zbog toga se smatraju indikatorima fekalnog onečišćenja. Ovu skupinu čine bakterije iz rodova *Enterococcus* i *Streptococcus*. Najvažnije vrste su *En. faecalis*, *En. faecium*, *En. durans*, *En. hirae*, *S. faecalis* i *S. faecium*. Ostale vrste, kao *En. avium*, *En. cecorum*, *En. columbae* i *En. gallinarium* ne preživljavaju dugo u okolišu pa nemaju takvu indikacijsku važnost (Hajsig i Delaš 2016.). Iz svih ovih razloga, ove bakterije predstavljaju najpogodniju bakterijsku grupu za utvrđivanje sanitarne kvalitete vode. Na umjetnim podlogama za rast potrebne su im izrazito bogate podloge obogaćene krvlju ili serumom.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Odrediti mikrobiološku ispravnost vode vodoopskrbnog sustava grada Zadra.
- Odrediti postotak ispravnih i neispravnih uzoraka sirove i obrađene vode.
- Na osnovu analize dobivenih rezultata uočiti manjkavosti i propuste u distributivnoj mreži.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Područje istraživanja

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je područje grada Zadra i dijela Zadarske županije, od vodocrpilišta, preko vodosprema do krajnjih potrošača. Voda se zahvaća iz pet bunara (Bunar 4, Bunar 5, Jezerce, Boljkovac i Oko), dva izvora (pritoke rijeke Zrmanje i Golubinka) i jednog površinskog vodotoka (Zrmanja – Berberov buk).

Uzela sam 6 uzoraka sirove vode na vodocrpilištima (voda koja nije klorirana) i 311 uzoraka vode iz distributivne mreže, u periodu 2.-31. svibnja 2001. godine.

3.2. Materijali

3.2.1. Podloge i reagensi za izolaciju mikroorganizama

Hranjive podloge su otopine kemijskih spojeva koji omogućuju rast i razmnožavanje određenih vrsta ili grupa bakterija. Podloge moraju sadržavati izvore potrebnih kemijskih elemenata, za sintezu dijelova bakterijske stanice, te izvore energije, kako bi se životni ciklus odvijao.

Podloga za izolaciju aerobnih bakterija:

- YE čvrsta podloga (Yeast extract agar, kvašćev ekstrakt)

Određivanje broja koliformnih bakterija i bakterije *Escherichia coli*

Podloge za izolaciju *E. coli*:

- Endo agar (Biokar diagnostics)
- m-FC čvrsta podloga
- Laktozni TTC agar s tergitolom
- Laktozni agar s tergitolom
- Obogaćeni Teepol bujon za membransku filtraciju

- Lauril sulfatni bujon za MF

Podloge za potvrdivanje *E. coli*:

- Laktoza peptonska voda (podloga za proizvodnju plina)
- Triptonska voda (podloga za proizvodnju indola)
- Lauril triptoza manitol bujon s triptofanom

Reagensi za potvrdivanje *E. coli*:

- Kovacev reagens za indol
- Reagens za oksidazni test (Biosdisc O)

Podloge za izolaciju *C. perfringens*

- Tryptose sulfite cycloserine agar (TSC agar)
- Krvni ili Columbia agar (TSA agar)

Reagensi za potvrdivanje *C. perfringens*

- Kisela fosfataza

Podloge za izoliranje *P. aeruginosa*

- King B podloga ili Pseudomonas agar F (Biolife)
- Acetamid bujon

Reagensi za potvrdivanje *P. aeruginosa*

- Reagens za oksidazni test (Biosdisc O)
- Nesslerov reagens

Podloge za izolaciju enterokoka:

- M-enterokokus agar (Slanetz i Bartley)
- TTC otopina (Biolife)
- Bile esculine azide agar (žučni eskulinski agar)

3.2.2. Aparatura i pribor

Uobičajena laboratorijska oprema koja uključuje:

- Suhi sterilizator i autoklav
- Inkubator
- Vodena kupelj
- Uređaj za membransku filtraciju
- Brojač kolonija (metodom osvjetljavanja na tamnoj podlozi)
- pH metar
- Membranski filteri, 47 ili 50 mm, veličine pora 0.45 μm
- Pinceta za rukovanje membranskim filterima
- Eze
- Staklene ili plastične sterilne Petrijeve zdjelice promjera 90 ili 100 mm
- Posuda za postizanje anaerobnih uvjeta
- Analitička vaga

3.3. Metode

Analizu uzoraka provela sam standardnim laboratorijskim metodama u skladu s **Zakonom o zdravstvenoj ispravnosti i zdravstvenom nadzoru nad namirnicama i predmetima opće uporabe** (N.N. 1/98), te **Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće** (NN 46/94).

3.3.1. Uzorkovanje vode za ljudsku potrošnju (HRN ISO 5667-5:2000)

Uzorci za mikrobiološku analizu vode moraju biti reprezentativni. Uzimala sam ih u staklenim ili polietilenskim bocama. Boce za mikrobiološku analizu moraju biti odgovarajućeg volumena (500mL za MF metodu), prethodno sterilizirane, u koje sam dodala sredstvo za neutralizaciju dezinficijensa zaostalog u vodi (0,5 mL 1,8%-tne otopine natrijevog tiosulfata $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ u 500 mL uzorka), moraju se dobro zatvarati da uzorci budu zaštićeni od naknadne kontaminacije nakon uzorkovanja. Preko čepa mora biti zaštitna folija ili papir koji štiti uzorke od naknadne kontaminacije nakon uzorkovanja. Uzorke mora pratiti izvještaj, koji identificira uzorke s oznakama na njima.

Izvještaj mora sadržavati :

- Broj uzorka
- Mjesto uzorkovanja
- Datum uzorkovanja
- Temperaturu uzorka kod uzimanja
- Količinu zaostalog klora kod uzorkovanja

Uzorkovanje prirodnih voda

Uzorke je potrebno uzimati ako je moguće na mjestu zahvaćanja, direktno spremnikom (kontejnerom) za uzorkovanu vodu ili odgovarajućim alatom za uzimanje uzoraka.

Uzorkovanje u vodospremniku

Uzorke sam trebala uzeti iz ulaznih i izlaznih cijevi što je moguće bliže vodospremniku. Prije uzimanja uzorka slavinu sam dezinficirala plamenom i pustila vodu da teče 2-3 minute da se izmjeni voda zaostala u cijevi i tek tada uzela uzorak. Ako nema slavine, uzorak sam uzela direktno iz vodospremnika alatom za uzimanje uzoraka i pritom pazila da ne dođe do

onečišćavanja spremnika. Za mikrobiološko ispitivanje, boce za uzorke ne smiju se puniti do ruba već tako da nakon stavljanja čepa voda ne dodiruje rub čepa ili poklopca. Čep mora biti zaštićen papirom ili folijom. U slučaju uzorkovanja na slavini u vodospremniku, slavinu sam sterilizirala plamenom ili namakanjem u 5 do 10%-tnoj otopini klora nekoliko minuta.

Uzorkovanje u distribucijskom sustavu

Uzorke treba uzimati na različitim mjestima u distribucijskom sustavu, posebno na krajevima distribucijskih sustava. Kod uzorkovanja iz hidranata trebaju se poštivati posebne dezinfekcijske mjere. Sve površine hidranta koje dolaze u dodir s vodom trebaju biti čiste i bez raspadnih ostataka i dezinficirane s npr. 5 do 10%-tnom otopinom klora. Na hidrantu treba skinuti zaštitnu kapu, a zatim pustiti vodu da teče 3-5 minuta, odnosno dok mutnoća ne padne ispod 4 NTU i tek tada uzeti uzorak. Za mikrobiološke svrhe slavine za uzimanje uzoraka treba sterilizirati plamenom ili namakanjem u 5 do 10%-tnoj otopini klora nekoliko minuta. Zamućenje se izražava u NTU jedinicama (engl. Nephelometric Turbidity Units). Nefelometrijom se mjeri jačina (intenzitet) elastično raspršenog zračenja na koloidnim česticama pod kutom od 90°, na smjer početne zrake svjetlosti. Intenzitet raspršenog zračenja proporcionalan je zamućenju otopine. Instrumenti za nefelometrijska mjerenja sastoje se od stabilnog izvora zračenja, kivete kroz čije dno prolaze zrake svjetlosti, a mjeri se raspršeno zračenje kroz stijenku kivete, te fotomultiplikatorske cijevi koja služi kao detektor. Nefelometrijska mjerenja pogodna su za analizu otopina slabog zamućenja. U Hrvatskoj je maksimalno dozvoljeno zamućenje pitke vode 4 NTU.

Uzorkovanje na slavini korisnika

Prije ispiranja i uzorkovanja iz slavina korisnika skinula sam zaštitnu mrežicu ako postoji, pustila vodu da teče 2-3 minute i uzela uzorak. Za mikrobiološka uzorkovanja metalne slavine sam sterilizirala plamenom, a plastične slavine dezinficirala 5 do 10%-tnom otopinom klora.

3.3.2. Membranski filtracijski sustav

Opis filtracijskog sustava

Uređaj se sastoji od tri držača filtera koji se nalaze na bazi uređaja i zasebnih ventila za kontrolu usisa svakog lijevka (Slika 9.). Svi lijevci imaju jednostavnu kopču za brzo i sigurno pričvršćivanje lijevka na bazu uređaja te poklopac s unutarnjim silikonskim prstenom koji

osigurava brtvljenje. S unutarnje strane lijevka nalazi se skala od 5 oznaka, od kojih svaka odgovara volumenu od 100 mL, što omogućava ulijevanje određenog volumena uzorka bez prethodnog mjerenja. Izljev iz uređaja jest „muški spoj“ vanjskog promjera 11 mm, na kojeg se spaja crijevo za vakuum-filtraciju. Usis se osigurava pomoću električne vakuum-pumpe koja je spojena na vakuum-posudu te služi za prikupljanje filtrata.



Slika 9. Uređaj za membransku filtraciju.

Predfiltracija

Koristi se u slučaju kad je uzorak zagađen većom količinom netopljivih krutina. Prefilterski dodatak SM 16807 omogućava predfiltraciju i filtraciju u jednom koraku. Spoj s bakteriološkim prefilterom SM 12301-050 (veličina pora je $8\mu\text{m}$) postiže se montažom između lijevka i baze uređaja. Netopive čestice bivaju zadržane na prefilteru omogućujući izdvajanje bakterija na membranskom filteru bez ometanja netopljivih nečistoća koje mogu sakriti kolonije ili ometi njihov rast.

Čišćenje i održavanje

Sterilizacija se može obavljati u autoklavu 30 minuta na 134°C ili suhom sterilizacijom 120 minuta na 180°C . Uređaj sam čistila i sušila prije i nakon svakog korištenja, isprala prvo s

vrúćom vodom i nakon toga s destiliranom vodom. Za uklanjanje tvrdokornih mrlja i drugih nečistoća koristila sam meku četku i komercijalna sredstva za pranje laboratorijskog posuđa.

Mikrobiološko testiranje

Laboratorijske površine moraju biti čiste i dezinficirane 70%-tnim etanolom ili nekim drugim sredstvom. Posložila sam hranjive podloge i filtere blizu uređaja, napunila čašicu s malo alkohola i u nju uronila pincetu te odložila blizu plamenika. Uključila sam vakuum-pumpu pri čemu treba posebno paziti da sustav nije već pod vakuumom (gornji ventil vakuumposude zatvoriti tek nakon paljenja pumpe). Plamenikom sam sterilizirala metalno sito uređaja dok je ventil otvoren kako bi vakuum povukao plamen kroz sito. Odmah zatvoriti ventil. Postupak sam ponovila s dnom lijevka, te ga pričvrstila na uređaj. Otklopila sam lijevak i sterilizirala ga plamenom odozdo prema gore u raznim smjerovima. Postupak sam ponovila s poklopcem te zatvorila lijevak. Time je uređaj postao sterilan te sam mogla pristupiti filtraciji. Koristeći plosnatu pincetu koju sam kratkotrajno sterilizirala u plamenu, položila sam filter na podlogu i učvrstila lijevak natrag na uređaj, ulila uzorak u lijevak, zaklopila ga poklopcem i potom otvorila ventil za filtraciju. Postupak sam ponovila s ostalim lijevcima. Po završetku filtracije zatvorila sam ventil, otklopila lijevak te sterilnom pincetom premjestila filter na hranjivu podlogu.

3.3.3. Određivanje broja živih organizama brojenjem kolonija izraslih na hranjivom agaru nakon inkubacije na 22°C i 37°C (HRN EN ISO 6222/99)

Svrha i djelovanje

Opisana je metoda za određivanje živih mikroorganizama u vodi brojenjem kolonija formiranih unutar ili na površini hranjive podloge nakon aerobne inkubacije na temperaturi od 22°C i 37°C. Metoda se odnosi na mikrobiološko ispitivanje svih vrsta vode.

Princip

Kako bih odredila broj živih organizama u uzorcima, točno određeni volumen uzorka ili odgovarajuće razrjeđenje, prelila sam s pripremljenom hranjivom podlogom u sterilnim Petrijevim zdjelicama. Petrijeve zdjelice inkubirala sam na temperaturi od 37°C tijekom 24 ili 48 h i na temperaturi od 22°C tijekom 72 h. Nakon toga odredila sam broj bakterija u 1 mL

uzorka (CFU ili „colony forming unit“) od kolonija formiranih unutar ili na površini hranjive podloge.

$$CFU = \frac{\text{broj kolonija na podlozi} \times \text{recipročna vrijednost razrijeđenja uzorka}}{\text{volumen Petrijeve zdjelice}}$$

Uzorkovanje

Uzorci se uzimaju i dopremaju u laboratorij prema uputama za uzorkovanje. Voda za analizu dostavlja se u zatvorenim kontejnerima, održavane temperature oko $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, u roku od 12 h od punjenja.

Hranjive podloge i otopine

Za pripremu podloga koristila sam sastojke iste kvalitete kao i standardne kemikalije određene analitičke točnosti i destiliranu vodu.

Podloga za izolaciju

YE čvrsta podloga (Yeast extract agar, kvašćev ekstrakt)

Tripton (pepton iz kazeina)	6,0 g
Dehidrirani kvašćev ekstrakt	3,0 g
Agar	10 g
Voda	1000 mL

Sve sastojke ili kompletnu dehidriranu podlogu, dodala sam u vodu i otopila zagrijavanjem. Ako je bilo potrebno, pH sam podesila dodavanjem natrijevog hidroksida (NaOH) ili klorovodične kiseline (HCl) tako da pH pripremljene podloge bude $7,2\pm 0,2$ na 25°C . Podlogu sam razdijelila u odgovarajuće epruvete, posude ili boce od kojih je svaka sadržavala 15-20 mL podloge. Za pohranu većeg volumena koristila sam posude kapaciteta do 500 mL. Sterilizaciju sam provodila u autoklavu na $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ u vremenu od 15 ± 1 min. Kada sam koristila prethodno pripremljenu podlogu, koja se čuva u hladnjaku te je u krutom stanju, prije upotrebe podlogu sam otopila u mikrovalnoj pećnici i ostavila hladiti do $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ u vodenoj kupelji. Podloga ne smije stajati dulje od 4 h na $45\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Priprema uzorka i nacjepljivanje podloge

Određeni volumen uzorka ili razrjeđenja, ne preko 2 mL, stavila sam u Petrijevu zdjelicu te dodala 15 do 20 mL otopljene podloge i pažljivo promiješala laganim rotiranjem. Vrijeme od nalijevanja uzorka (odnosno razrjeđenja) do dodavanja otopljene podloge nije bilo dulje od 15 min. Inokulirala sam po jednu zdjelicu za inkubaciju na svakoj temperaturi.

Inkubacija i ispitivanje

Petrieve zdjelice sam preokrenula i inkubirala na $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ tijekom 48 ± 4 h, a drugi dio zdjelica na $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ tijekom 72 ± 4 h. Nakon inkubacije odmah sam brojala izrasle kolonije. Ako to nije moguće odmah zdjelice se pohrane na $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ i ispituju u roku od 48h. Zdjelice na kojoj su kolonije previše narasle se odbacuju.

Prebrojavanje kolonija

Prebrojavaju se sve kolonije koje rastu u ili na površini podloge za svaku temperaturu inkubacije kako bi se mogao procijeniti broj formiranih jediničnih kolonija u 1 mL (CFU/mL) uzorka.

Izražavanje rezultata

Rezultati se izražavaju kao broj formiranih jediničnih kolonija u 1 mL (CFU /mL) uzorka za svaku temperaturu inkubacije. Ako nema poraslih kolonija u ispitivanom volumenu nerazrijeđenog uzorka, rezultat se izražava kao da nisu pronađene kolonije u 1 mL. Ako je na pločama s najvećim razrjeđenjem prisutno više od 300 kolonija, rezultat se izražava kao 300 ili samo kao približna vrijednost.

Izvještaj

U izvještaju treba navesti sve potrebne informacije uključujući:

- sve detalje potrebne za kompletnu identifikaciju uzorka
- metodu rada (nalijevanjem podloge) i uporablenu podlogu
- vrijeme i temperaturu inkubacije
- rezultate brojanja

-svaki pojedini slučaj zapažen tijekom ispitivanja ili bilo koje druge okolnosti koje utječu na postupak.

3.3.4. Detekcija i određivanje broja ukupnih koliforma i bakterije *Escherichia coli* (Metoda: MF PREMA ISO/DIS 9308-1:1990)

Svrha i područje primjene

Ovom se metodom detektiraju i određuju koliformne bakterije prisutne u vodi i potencijalno prisutna *E. coli* nakon filtracije preko membrane, uzgoja na diferencijalnoj podlozi s laktozom i izračunavanja njihovog broja u uzorku. Metoda se može primijeniti na sve vrste voda osim onih s visokim sadržajem suspendiranih čestica koje smetaju pri filtraciji ili voda s visokim brojem drugih organizama koji smetaju rastu koliforma. U praksi detekcija vjerojatne prisutnosti *E. coli* obično omogućava identifikaciju nedavnog fekalnog zagađenja.

Princip metode

Filtrirala sam 100 mL uzorka kroz membranu koja zadržava mikroorganizme. Membranu sam postavila na odgovarajuću podlogu za izolaciju. Inkubacija membrane traje 24 h na 35°C ili 37°C za detekciju koliforma (UK) i na 44°C za detekciju prisutnosti termotolerantnih koliforma (FK). Nakon toga sam brojala karakteristične kolonije na membrani i precjepila odabrane kolonije za potvrdni test na produkciju plina i indola. Na kraju sam izračunala broj koliformnih organizama (UK), termotolerantnih koliformnih organizama (FK) i vjerojatne *E. coli* u 100 mL uzorka.

Postupak

Priprema uzorka, filtracija i naciepljivanje podloge

Za koliformne organizme (UK) i termotolerantne koliformne organizme (FK) filtrirala sam po 100 mL uzorka i postavila membranu paralelno na LES endo agar i m-FC agar tako da nema uklopljenih mjehurića zraka. Petrijeve zdjelice s podlogama izvadila sam iz hladnjaka da se temperiraju na sobnu temperaturu prije upotrebe.

Inkubacija membrana

a) Za koliformne organizme (UK) inkubirala sam membranu na LES endo agaru tijekom 18 – 24 h na $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ili $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

b) Za termotolerantne koliformne organizme (FK) inkubirala sam membranu na m-FC agaru tijekom 18 – 24 h na $44\pm 0,25^{\circ}\text{C}$ ili $44.5\pm 0,25^{\circ}\text{C}$.

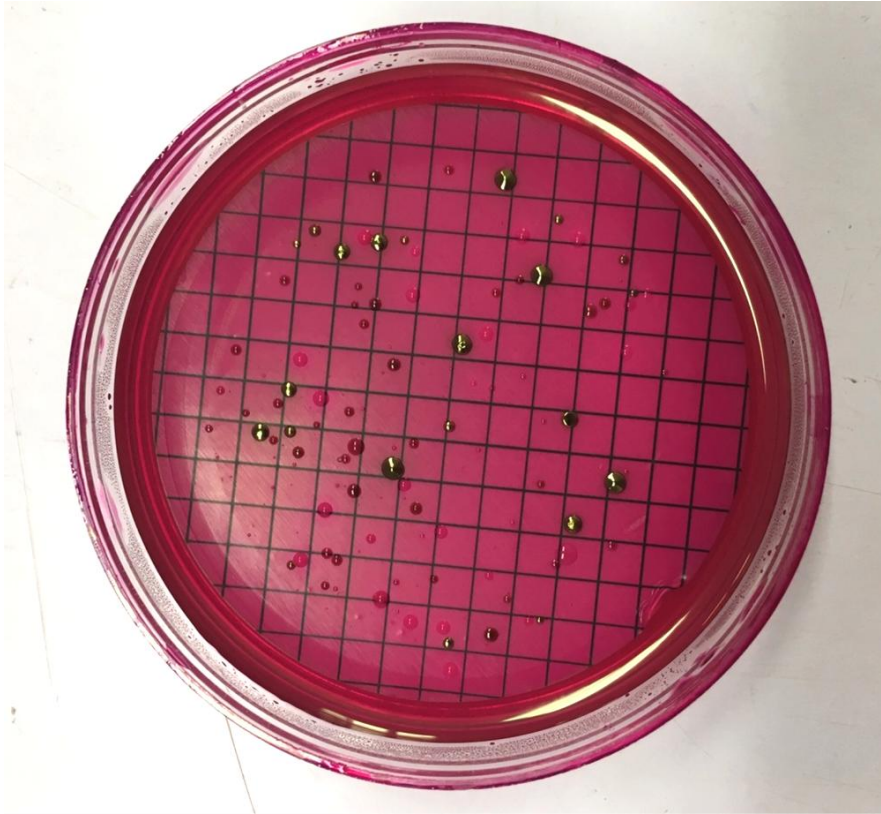
Ista podloga se može koristiti za koliformne i termotolerantne koliformne organizme, no m-FC podloga bi se trebala koristiti samo na 44°C , a Endo i LES Endo samo na 35 ili 37°C . Podloge se stavljaju na inkubaciju u obrnutom položaju (poklopac okrenut prema dolje).

Prva četiri sata podloge sam inkubirala na nižoj temperaturi, od 30°C , što se preporuča da bi se oporavili oštećeni organizmi, osobito u pretragama voda za ljudsku potrošnju.

Očitavanje rezultata prethodnog testa

Koliformni organizmi – Ukupni koliformi

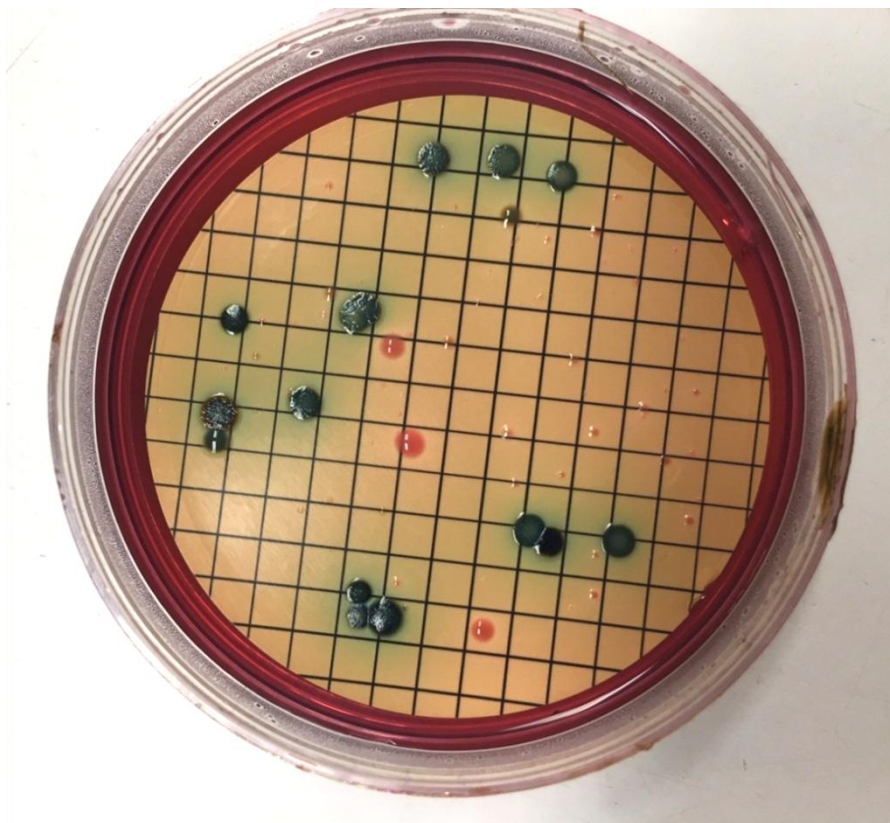
Pregledala sam membrane i izbrojila kao rezultat prethodnog testa sve kolonije, bez obzira na veličinu, koje nakon inkubacije na 35°C ili 37°C na LES Endo agaru izrastu kao tamnocrvene kolonije sa zlatnozelenim metalnim sjajem (Slika 10.).



Slika 10. Očitavanje broja kolonija ukupnih koliforma.

Termotolerantni koliformni organizmi – Fekalni koliformi

Sve kolonije koje su nakon inkubacije na 44°C na m-FC podlozi plave boje predstavljaju termotolerante kolifome (Slika 11.).



Slika 11. Očitavanje broja kolonija *Escherichia coli* – kolonije plave boje.

Potvrdni testovi

Broj kolonija izraslih na membrani na 35°C ili 37°C i na 44°C je samo prethodni rezultat detekcije ukupnih koliformnih bakterija i vjerojatne *E. coli*. Budući da se na membrani proizvodnja plina ne može utvrditi, može se samo pretpostaviti da izrasle kolonije mogu proizvesti plin iz laktoze. Da bi se potvrdili rezultati prethodnog testa, treba nacijepiti svaku koloniju ili reprezentativan broj kolonija s LES endo agarom (UK) i m-FC agarom (*E. coli*) u epruvete s podlogom za proizvodnju plina i indola (Lauril triptozna manitol bujonom sa triptofanom ili cmo967: Modified lauril sulphate tryptose broth with MUG). Pojava plina u epruvetama s lauril triptozna manitol bujonom s triptofanom ili modificiranim lauril sulfat triptozna bujon s MUG-om nakon inkubacije na 35°C ili 37°C tijekom 24 h dokaz je prisutnosti koliformnih organizama (UK). Pojava plina u epruvetama s lauril triptozna manitol bujonom s triptofanom ili modificiranim lauril sulfat triptozna bujon s MUG-om nakon inkubacije na 44°C tijekom 24 h dokaz je prisutnosti termotolerantnih koliformnih organizama (FK).

Indolski test

Indolski test se provodi na epruvetama s lauril triptoza manitol bujonom s triptofanom ili modificiranim lauril sulfat triptoza bujon s MUG-om koje su nakon inkubacije na 44°C pozitivne i vidljiva je proizvodnja plina. U te epruvete sam dodala 0,2 – 0,3 mL Kovacevog reagensa. Pojava crvenoljubičastog prstena na površini je dokaz proizvodnje indola, odnosno potvrđuje prisutnost *E. coli*.

Oksidazni test

Koliformne bakterije, termotolerantne koliformne bakterije i *E. coli* ne pokazuju pozitivnu oksidaznu reakciju. Neke bakterije prisutne u vodi (npr. *Aeromonas*) pokazuju potvrdne rezultate na većinu osobina (proizvodnja plina i kiseline na 37°C), ali se razlikuju od koliforma po pozitivnoj oksidaznoj reakciji. Da bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati na koliforme, kolonije s hranjivog agara inkubiranog na 35°C ili 37°C treba precijepiti i podvrgnuti oksidaznom testu. Kada se nacjepljuju kolonije s membrane na podloge za potvrdne testove, poželjno ih je paralelno nacjepljivati i na ploče s hranjivim agarom za oksidazni test (npr. TSA – Tryptic soy agar). Čistu kulturu kolonija izraslih na agaru za prethodni test ili s TSA agara pikirala sam staklenim ili drvenim štapićem, ili platinskom ezom (ne od Cr-Ni čelika) i razmazala na Bios disk O, navlažen s jednom kapi destilirane vode. Pojava tamnoljubičaste boje unutar 10 sekundi smatra se pozitivnom reakcijom na oksidazu. U svakom slučaju kad sam radila oksidazni test, paralelno sam provodila i kontrolni test s kulturom organizma koji daju pozitivnu oksidaznu reakciju (*P. aeruginosa*) i negativnu oksidaznu reakciju (*E. coli*) (Tablica 1.).

Tablica 1. Potvrdni testovi za koliformne bakterije.

Mikroorganizam	Potvrdni test	Rezultat identifikacije mikroorganizama
<i>Escherichia coli</i>	Proizvodnja plina +	Prisutna <i>E. coli</i> i termotolerantne koliformne bakterije FK
	Indol test: + (ljubičasti prsten)	
	Oksidaza test: -	
Ukupne koliformne bakterije	Proizvodnja plina +	Prisutne samo ukupne koliformne bakterije
	Indol test: - (ljubičasti prsten)	
	Oksidaza test: -	
Druge vrste	Proizvodnja plina +	Nije prisutna niti <i>E. coli</i> niti ukupne koliformne bakterije
	Indol test: -	
	Oksidaza test: + (ljubičasta boja)	

Očitavanje rezultata:

Iz broja karakterističnih kolonija izraslih na membrani u prethodnom testu i rezultata potvrdnog testa izračunala sam broj koliformnih bakterija (UK), termotolerantnih koliformnih bakterija (FK) i broj pretpostavljene *E. coli* prisutnih u 100 mL uzorka:

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

Gdje je:

C – broj potvrđenih kolonija u 100 mL

A – broj kolonija koje su uzete za potvrdni test

B – broj kolonija koje su precijepjene za potvrdni test
N – broj karakterističnih kolonija izbrojenih na membrani
Vs – volumen uzorka koji je filtriran
Vt – volumen uzorka za izražavanje rezultata
F – faktor razrjeđenja

3.3.5. Detekcija i određivanje broja bakterija *Clostridium perfringens* metodom membranske filtracije (HRN EN ISO 14189:2013; EN ISO 14189:2016)

Područje primjene

Metoda je prikladna za brojenje *C. perfringens* u vodi namijenjenoj za ljudsku potrošnju, a može se primijeniti i na sve tipove uzoraka vode koji ne sadrže čestice ili koloidne tvari koje ometaju membransku filtraciju. Bakterijske kolonije porasle na TSC agaru na $44\pm 1^\circ\text{C}$ kroz 21 ± 3 h, svih nijansa crnih, sivih do žutosmeđih boja, čak i kada je obojenje slabo, smatraju se potencijalno *C. perfringens*. Bakterije koje na TSC agaru produciraju karakteristične kolonije i enzim kiselu fosfatazu smatramo da predstavljaju potvrđenu *C. perfringens*.

Princip metode

Određeni volumen uzorka ili njegovog razrjeđenja filtrirala sam kroz membranu veličine pora $0,45\ \mu\text{m}$ koje zadržavaju spore klostridija. Membranu sam inkubirala na selektivnom/diferencijalnom agaru (triptozna-sulfit-cikloserin agar) anaerobno pri $44\pm 1^\circ\text{C}$ kroz 21 ± 3 h. *Clostridium perfringens* uobičajeno formira crne ili sive do žutosmeđe kolonije kao rezultat redukcije sulfita u sulfid koji reagira sa soli željeza u podlozi. Brojala sam karakteristične kolonije nakon čega sam provela potvrdne testove.

Postupak određivanja

Analizu sam uvijek počela što je prije moguće jer je najduže vrijeme čuvanja za vegetativne bakterije 12 h, a za spore 18 h. Volumen i razrjeđenje uzorka sam odredila tako da broj poraslih kolonija na membrani bude između 20 i 80, zbog čega sam paralelno filtrirala različite volumene uzorka tako da bar na jednoj membrani broj poraslih kolonija bude unutar referentnih vrijednosti. Kad sam brojila samo spore *C. perfringens*, uzorak sam prije filtracije

zagrijala u vodenoj kupelji na $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ tijekom 15 ± 1 minuta. Filtrirala sam odgovarajući volumen uzorka, filter položila na dobro osušenu ploču TSC agara pazeći da između filtra i podloge ne ostanu mjehurići zraka. Budući da su spore *C. Perfringens* vrlo otporne, lijevke sam nakon upotrebe sterilizirala u autoklavu, osim kada sam filtrirala seriju volumena istog uzorka. U tom slučaju filtrirala sam najprije volumen najvećeg razrjeđenja prema najmanjem. Petrijeve zdjelice inkubirala sam na $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ tijekom 24 h u anaerobnim uvjetima, koji se postižu u anaerobnoj posudi (volumena 2,5 L za 15 Petrijevih zdjelica) ili u Anaerocult A mini vrećicama Merck (za najviše 4 Petrijeve zdjelice), ovisno o broju uzoraka. Nakon 24 sata inkubacije na TSC podlozi kojoj sam dodala D-cikloserin, narastu tipične kolonije *C. perfringens* koje su crne, sive i bezbojne (Slika 12.). Sve kolonije koje narastu na TSC agaru (bez obzira da li rastu iznad ili ispod filtera) na 44°C brojila sam kao prethodan *C. perfringens* te ih podvrgnula potvrdnom testu. Ploče sam očitala unutar 30 min, budući da crna boja kolonija brzo blijedi i na koncu nestaje.



Slika 12. Kolonije *Clostridium perfringens* na TSC agaru.

Potvrđni test

Kolonije sam precijepila ili sam prebacila cijeli filter papir (ako je na njemu bilo poraslo manje od 10 kolonija) na Columbia, krvni ili TSA agar i inkubirala anaerobno na $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ tijekom 24 h. Izrasle kolonije sam razmazala na filter papir i dodala im 2-3 kapi reagensa za dokazivanje kisele fosfataze, koji je visoko specifičan indikator za *C. perfringens*. Purpurna boja koja nastaje unutar 3 minute smatra se pozitivnom reakcijom.

Osiguranje kvalitete

Korištenje pozitivnih, negativnih i slijepih proba su dio testa. Za proces kvantitativne kontrole kvalitete koristila sam suspenziju *C. perfringens*. Uzela sam volumen suspenzije koja sadrži 10-80 CFU/mL spomenute bakterije i tretirala je kao i sve druge uzorke. Usporedila sam broj izraslih kolonija („recovery“) s rastom na neselektivnom agaru (TSA ili krvni agar). Za svaku seriju uzoraka napravila sam i slijepu probu tako što sam filtrirala 100 mL sterilne vode i tretirala kao i uzorak, ali bez prethodnog zagrijavanja (pasterizacije). Nakon inkubacije slijepa probe, na Petrijevim zdjelicama ne bi trebale biti vidljive nikakve kolonije. Prilikom potvrđnog testa dokazivanja kisele fosfataze treba koristiti poznate pozitivne i negativne kontrolne sojeve (Tablica 2.). Najmanje jedan od sojeva *C. perfringens*: WDCM 00007, WDCM 00080 ili WDCM 00174 sam koristila kao pozitivnu kontrolu podloga i potvrđnog testa. *Bacillus subtilis* koristi kao negativna kontrola TSC podloge i anaerobnih uvjeta.

Tablica 2. Test za kontrolu kvalitete TSC agara usporedbom s neselektivnom referentnom podlogom.

Test	Inkubacija	Referentne podloge	Metode kontrole	Kriterij	Karakteristična reakcija
Produktivnost	$23\pm 3\text{h}/44\pm 1^{\circ}\text{C}$ anaerobno	TSA ili krvni agar	kvantitativna	$PR\geq 0,5$	Crne kolonije
Selektivnost	$23\pm 3\text{h}/44\pm 1^{\circ}\text{C}$ anaerobno	–	kvalitativna	Totalna inhibicija (0)	–

Priprava podloga i reagensa

Koristila sam gotove dehidrirane podloge: TSC agar, krvni ili Columbia agar.

Priprema 20 mL acetatnog pufera (pH 4,6±2): 0,3 mL ledene octene kiseline i 0,4 g Na-acetata otopila sam u deioniziranoj vodi i dopunila do 1000 mL. Podesila sam pH na 4,6±2.

Priprema reagensa za dokazivanje kisele fosfataze: 1-naftilfosfatdinatrijevu sol i Fastblue sol otopila sam u 20 mL acetatnog pufera i ostavila da odstoji 60±5 min na 5±3°C kako bi se neotopljeni dio istaložio. Profiltrirala sam otopinu preko filter papira (plava vrpca). Pripremljenu crvenu otopinu sam čuvala na temperaturi od 5±3°C ne duže od 2 tjedna. Ukoliko se nakon prvog filtriranja pojavilo još taloga, reagens sam ponovno filtrirala.

3.3.6. Detekcija i određivanje broja *Pseudomonas aeruginosa* u vodi metodom membranske filtracije (METODA prema EN 12780: 2002)

Princip metode:

Smjesa peptona u osnovnoj podlozi omogućava rast širokog spektra *Pseudomonas* vrsta. Formiranju pigmenta pomažu kalijev sulfat (K₂SO₄) i magnezijev klorid (MgCl₂). Uz pomoć odgovarajućeg selektivnog dodatka i temperature inkubacije podloga postaje selektivna za *Pseudomonas* vrste.

***Pseudomonas* CN Selective Agar podloga**

Pseudomonas Selective Agar (PSA) base (Merck ili Biolife) + CN Selective Supplement (Merck ili Biolife). Kada se PSA bazi doda CN Selective Supplement, takva podloga je sukladna preporukama DIN/EN 12780 za detekciju i brojenje *P. aeruginosa* u vodi tehnikom membranske filtracije.

Pseudomonas agar baza:

Pepton iz želatine	16,0 g/L
Kazeinski hidrolizat	10,0 g/L
Kalijev sulfat	10,0 g/L
Magnezijev klorid	1,4 g/L
Agar	11-18 g/L ovisno o proizvođaču

CN Ps. Supplement (jedna ampula/500 mL podloge):

Cetrimid (heksadeciltrimetilamonijum bromid) 100 mg

Nalidiksična kiselina 7,5 mg

U jednu ampulu dodala sam 2 mL smjese redestilirane vode i etanola u omjeru 1:1 i lagano promiješala. Aseptično sam dodala sadržaj ampule u 500 mL podloge ohlađene na 45-50°C. Selektivni dodatak je smjesa dvaju inhibitora u liofiliziranom obliku. Cetrimid i nalidiksična kiselina inhibiraju rast pratećih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

Priprema podloge:

Prema uputi na originalnoj ambalaži otopila sam potrebnu količinu dehidrirane hranjive podloge u odgovarajućoj količini redestilirane vode uz dodatak 5 mL glicerola, zagrijala do vrenja dok se potpuno ne otopi. Autoklavirala sam 15 min na 121°C. Ohladila sam podlogu do 45-50°C i u aseptičnim uvjetima dodala sadržaj jedne ampule Pseudomonas CN selektiv supplement (4240046 Biolife). Dobro sam promiješala i izlila u Petrijeve zdjelice tako da visina agara bude najmanje 5 mm. pH mora biti $7,1 \pm 0,2$ na 25°C. Ploče trebaju biti bistre i bezbojne, mogu se čuvati u hladnjaku na 2-8°C do 4 tjedna zaštićene od svjetla i isušivanja.

Podloge i reagensi za potvrdne testove:

Acetamid bujon

Sastav:

Otopina A

Kalijev dihidrogen fosfat	1,0 g
Magnezijev sulfat anhidrid	0,2 g
Acetamid	2,0 g
Natrijev klorid	0,2 g
Destilirana voda	900 mL

pH $7,0 \pm 0,5$ na 25°C

Otopina B

Natrijev molibdat	0,5 g
Željezov(II)-sulfat	0,05 g
Destilirana voda	100 mL

Priprema podloge:

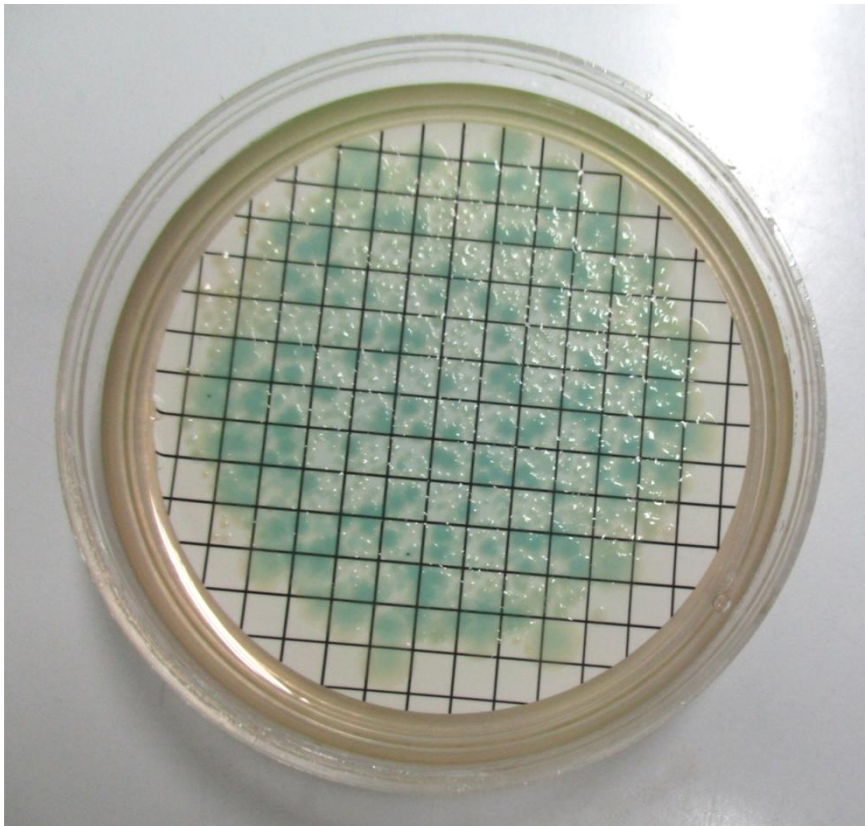
U 900 mL svježe pripremljene otopine A dodala sam 1 mL otopine B, te dopunila deioniziranom vodom uz stalno miješanje do 1 L. Razlila sam po 5 mL bujona u epruvete s čepom i autoklavirala na $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$ tijekom 15 min. Podloge sam čuvala u hladnjaku do tri mjeseca.

Postupak detekcije i brojenja kolonija:

Filtrirala sam 100 mL uzorka vode postupkom membranske filtracije i inokulirala podlogu. Vrsta filtera može utjecati na rezultate pa sam uvijek koristila iste Cellulose Mixed Ester membrane (Pall GN-6). Inkubirala sam ih tijekom 44 ± 4 h na $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ uz provjeru rasta na membranskim filterima nakon 22 ± 2 h i 44 ± 4 h.

Očitavanje rezultata:

1. Sve izrasle kolonije plavozelene pigmentacije broje se kao kolonije *P. aeruginosa*. Membranske filtere pregledala sam pod UV svjetlom.
2. Sve kolonije koje nemaju plavozelenu pigmentaciju ali fluoresciraju, sumnjive su i treba ih potvrditi otopinom acetamida.
3. Sve druge crvenosmeđe kolonije koje ne fluoresciraju, također se smatraju sumnjivima na *P. aeruginosa*, te ih treba potvrditi oksidaznim testom, otopinom acetamida i precjepljivanjem na King B podlogu (Tablica 3.).



Slika 13. Očitavanje broja kolonija *Pseudomonas aeruginosa*.

Tablica 3. Potvrdni testovi za *Pseudomonas aeruginosa*.

Izgled kolonija na CN agaru	Amonijak iz acetamida	Produkcija oksidaze	Fluorescencija na King B podlozi	Potvrđene kao <i>P. aeruginosa</i>
plavozelene	ne treba testirati	ne treba testirati	ne treba testirati	DA
fluoresciraju (nisu plavozelene)	pozitivno	ne treba testirati	ne treba testirati	DA
crvenosmeđe	pozitivno	pozitivno	pozitivno	DA
ostale vrste	ne treba testirati	ne treba testirati	ne treba testirati	NE

Potvrdni testovi (Tablica 3.):

Oksidazni test

Na gotovi disk za oksidazni test kapnula sam kap redestilirane vode i razmazala malo materijala sa sumnjive kolonije platinskom ili plastičnom ezom (nikako Ni–Cr ezom) ili staklenim štapićem. Ako se unutar 10 sekundi na disku pojavilo tamnoljubičasto obojenje, oksidazni test sam smatrala pozitivnim.

King B podloga

Crvenosmeđe kolonije pozitivne na oksidaznom testu nasadila sam na King B podlogu i inkubirala do 5 dana na $36\pm 2^{\circ}\text{C}$. Svaki dan pregledala sam rast pod UV svjetlom. Ako sam unutar 5 dana primijetila fluorescenciju, rezultat testa sam smatrala pozitivnim.

Acetamid bujon

Inokulirala sam sumnjive kolonije i inkubirala na $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ tijekom 22 ± 2 h. Dodala sam 1-2 kapi Nesslerovog reagensa. Ako se u epruveti razvije žuta do crvenosmeđa boja (ovisno o koncentraciji amonijaka), test sam smatrala pozitivnim.

Sve kolonije koje proizvode piocijanin ili su pozitivne na oksidazni test, fluoresciraju pod UV svjetlom i proizvode amonijak iz acetamida, bilježe se kao CFU *P. aeruginosa* u 100 mL uzorka.

3.3.7. Detekcija i brojenje crijevnih enterokoka metodom membranske filtracije (ISO 7899-2:2000;EN ISO 7899-2:2000)

Uvod

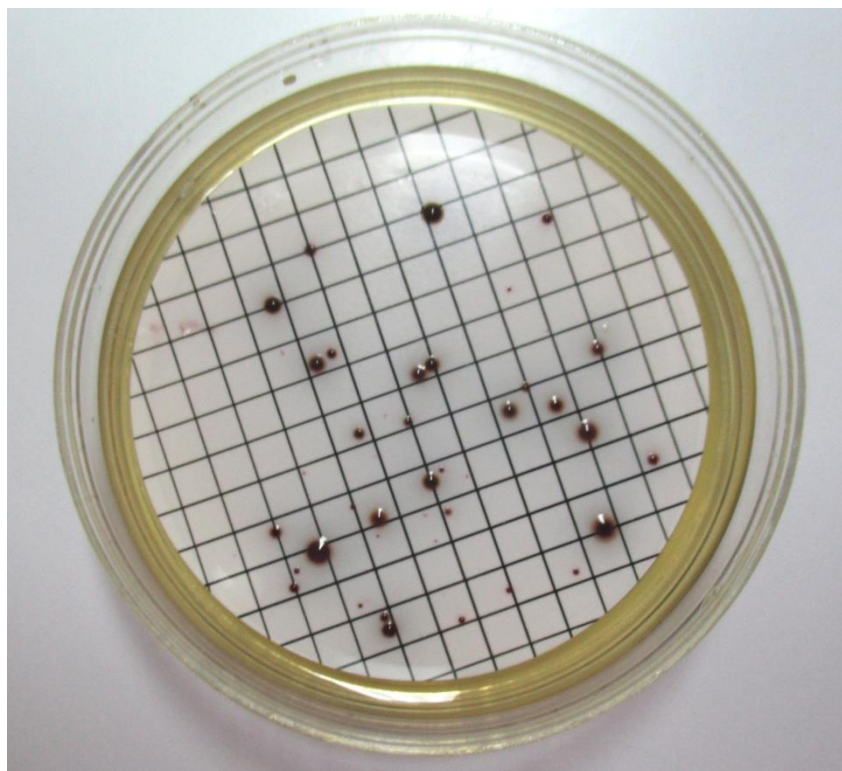
Metoda opisuje izolaciju i brojenje intestinalnih enterokoka; *En. faecalis*, *En. faecium*, *En. durans* i *En. hirae*. Druge vrste bakterija *Enterococcus* i *Streptococcus* (osobito *S. bovis* i *S. equinus*) se mogu povremeno detektirati budući da ne mogu dugo preživjeti u vodi tako da se ne određuju kvantitativno. Enterokoki se pri analizi voda smatraju indikatorima fekalnog zagađenja iako treba imati na umu da mogu biti i drugog porijekla.

Postupak

Preko membrane veličine pora 0.45 µm sam filtrirala 100 mL uzorka te filtere stavila na ploču M-enterokoknog agara. Membrane sam inkubirala na 36±0,5°C tijekom 44±4 h.

Potvrda i brojenje

Nakon inkubacije izbrojala sam sve narasle kolonije koje su crvene, kestenjaste ili ljubičaste boje. One se smatraju rezultatom prethodnog testa na fekalne streptokoke. Preselila sam filter s reprezentativnim tipičnim kolonijama na ploče sa žučnim eskulin azid agarom koji je prethodno temperiran na 44°C. Inkubirala sam na 44±0.5°C tijekom 2 h. Nakon toga odmah sam očitala rezultat. Sve kolonije koje su tamne do crne boje i/ili je podloga oko njih poprimila tamnu boju, smatrala sam i brojala kao intestinalne enterokoke (Slika 14.).



Slika 14. Očitavanje broja kolonija fekalnih enterokoka.

Izražavanje rezultata

Broj kolonija koje su potvrđene kao fekalni enterokoki (Slika 14.), izrazila sam kao broj enterokoka u jedinici volumena uzorka (CFU/100mL).

4. REZULTATI

Rezultati istraživanja koncentracije bakterija dobiveni su na temelju analize 311 uzoraka obrađene vode i 6 uzoraka neobrađene vode s različitih područja grada Zadra i Zadarske županije. Kolonije izraslih koliformnih bakterija izbrojane su, te je na temelju toga izračunat CFU (Tablica 4.).

Tablica 4. Mikrobiološki parametri zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju.

Pokazatelj	Mjerna jedinica	MDK
Ukupan broj kolonija na 22°C	CFU/mL	100
Ukupan broj kolonija na 37°C	CFU/mL	100
Ukupni koliformi	CFU/100 mL	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CFU/100 mL	0
<i>Escherichia coli</i>	CFU/100 mL	0
Enterokoki	CFU/100 mL	0
<i>Clostridium perfringens</i>	CFU/100 mL	0

MDK – maksimalno dozvoljena koncentracija prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće

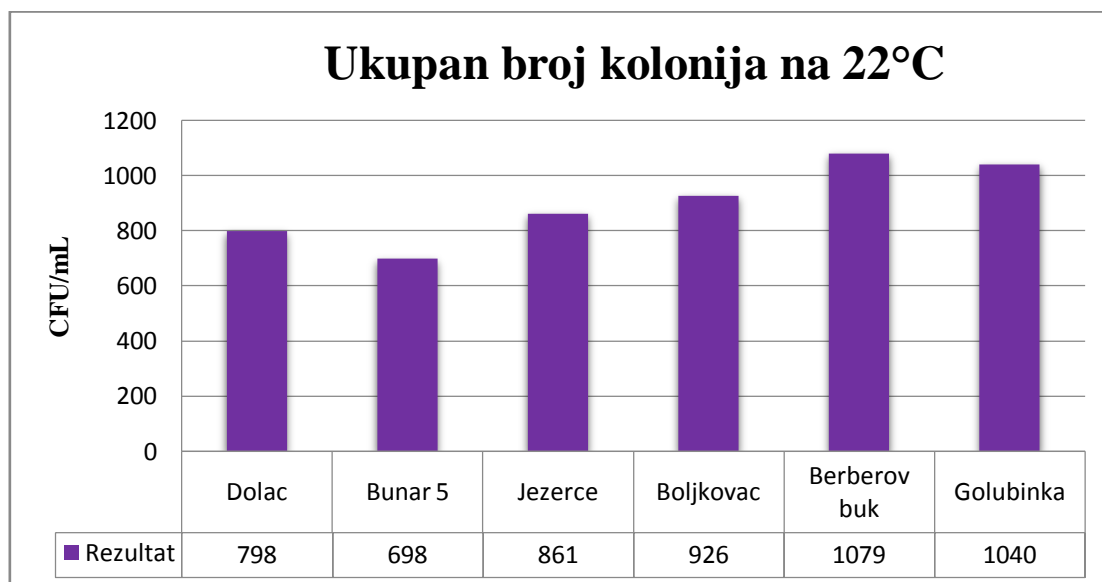
CFU – *colony forming unit*

Od 6 uzorka sirove vode, uzetih na vodocrpilištima Dolac, Bunar 5, Jezerce, Boljkovac, Berberov buk i Golubinka (voda koja nije klorirana), niti jedan nije bio zdravstveno ispravan prema mikrobiološkim pokazateljima (Tablica 5.).

Tablica 5. Ispitivanje zdravstvene ispravnosti neobrađene vode na vodocrpilištima za period 2.- 31. svibnja 2001. godine.

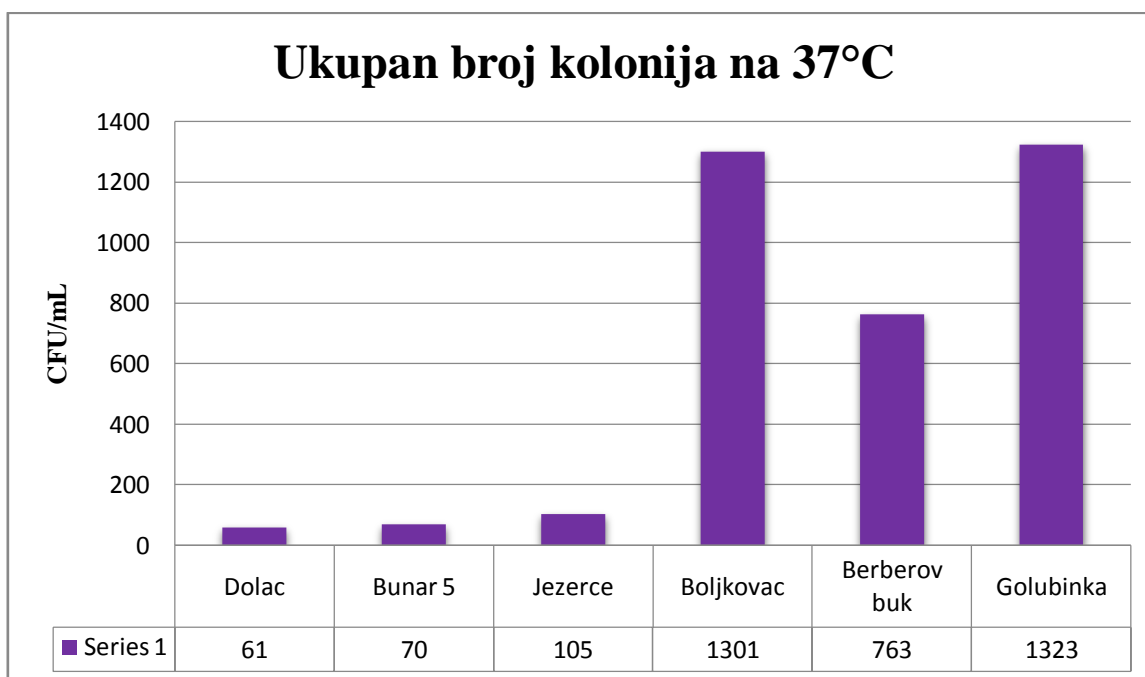
Ukupni broj analiziranih uzoraka	Ukupan broj neispravnih uzoraka	Mikrobiološki pokazatelji	Broj neispravnih uzoraka
6	6 (100%)	Ukupan broj kolonija na 22°C	6 (100%)
		Ukupan broj kolonija na 37°C	4 (66,66%)
		Ukupni koliformi	6 (100%)
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 (83,33%)
		<i>Escherichia coli</i>	6 (100%)
		Enterokoki	4 (66,66%)
		<i>Clostridium perfringens</i>	0 (0%)

Grafovi na slikama 15, 16, 17, 18, 19 i 20 prikazuju rezultate mikrobioloških ispitivanja neispravnih uzoraka neobrađene vode.



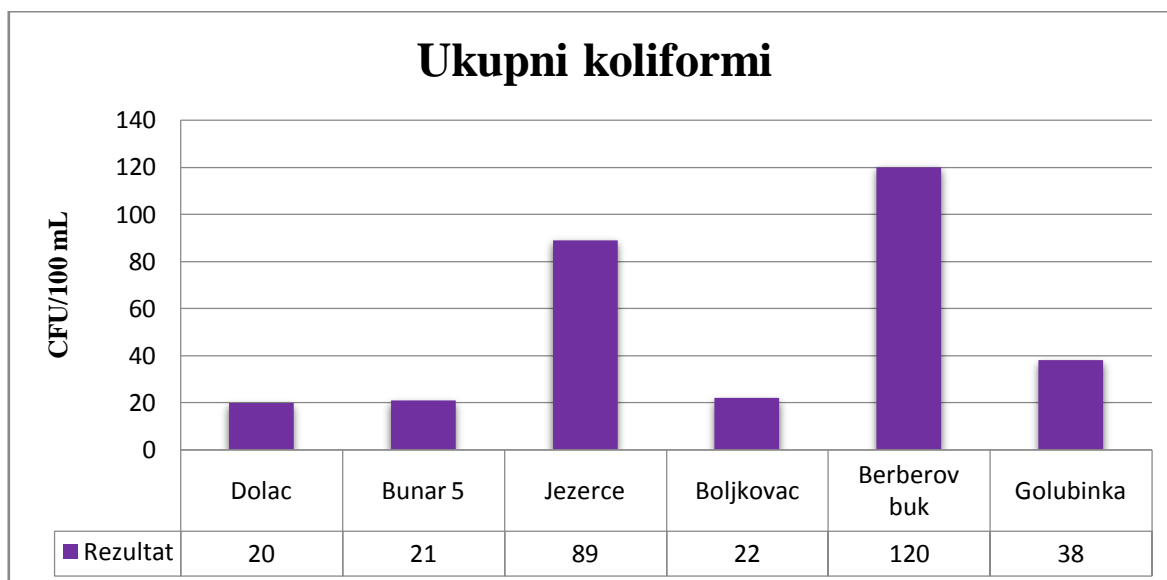
Slika 15. Ukupan broj kolonija poraslih na 22°C u uzorcima neobrađene vode.

Referentna vrijednost MDK – maksimalna dozvoljena koncentracija prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće je 100 CFU/mL.



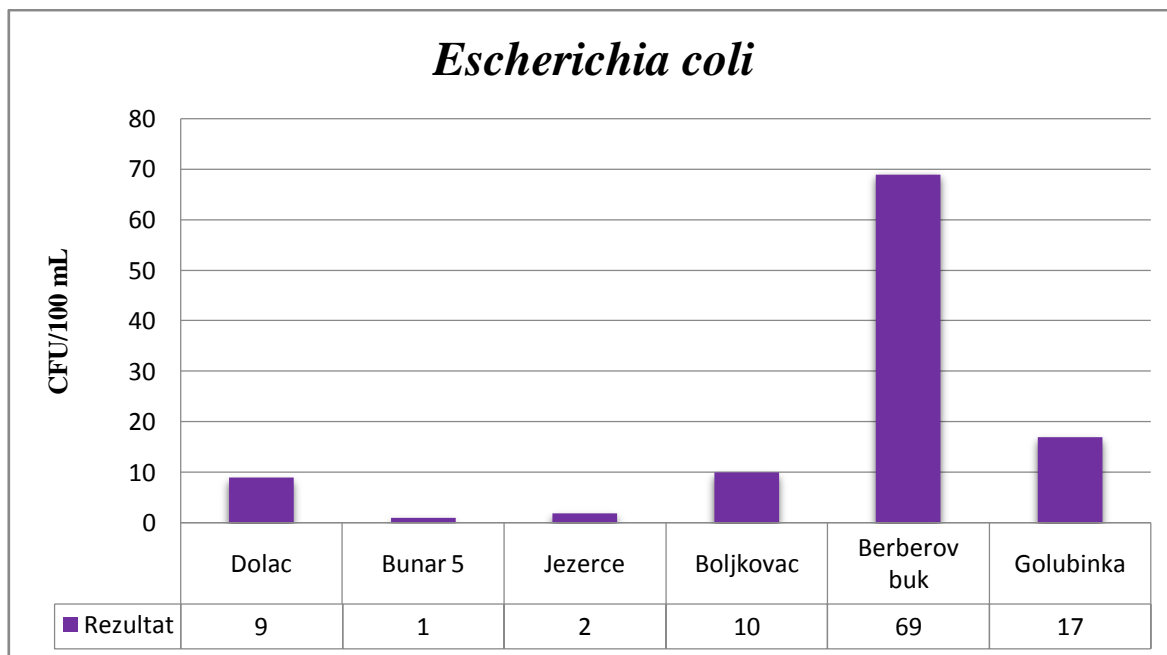
Slika 16. Ukupan broj kolonija poraslih na 37°C u uzorcima neobrađene vode.

Referentna vrijednost MDK – maksimalna dozvoljena koncentracija prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće je 100 CFU/mL.



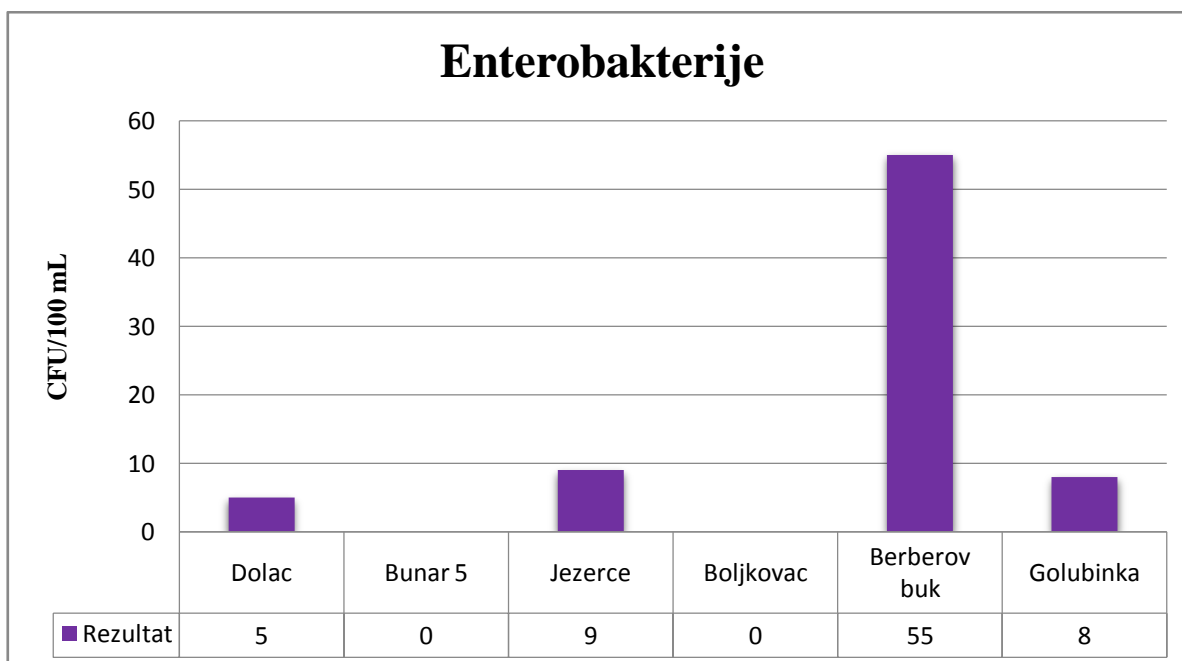
Slika 17. Brojnost ukupnih koliforma u uzorcima neobrađene vode.

Referentna vrijednost MDK – maksimalna dozvoljena koncentracija prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće je 0 CFU/100 mL.



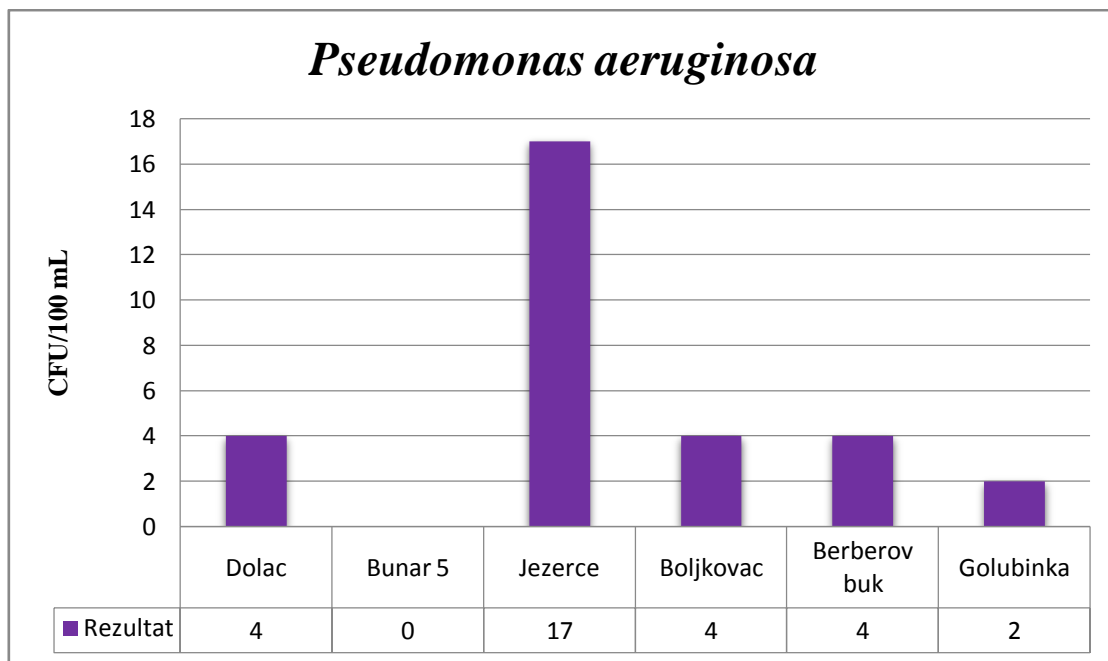
Slika 18. Brojnost bakterije *Escherichia coli* u uzorcima neobrađene vode.

Referentna vrijednost MDK – maksimalna dozvoljena koncentracija prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće je 0 CFU/100 mL.



Slika 19. Brojnost enterobakterija u uzorcima neobrađene vode.

Referentna vrijednost MDK – maksimalna dozvoljena koncentracija prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće je 0 CFU/100 mL.



Slika 20. Brojnost bakterije *Pseudomonas aeruginosa* u uzorcima neobrađene vode. Referentna vrijednost MDK – maksimalna dozvoljena koncentracija prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće je 0 CFU/100 mL.

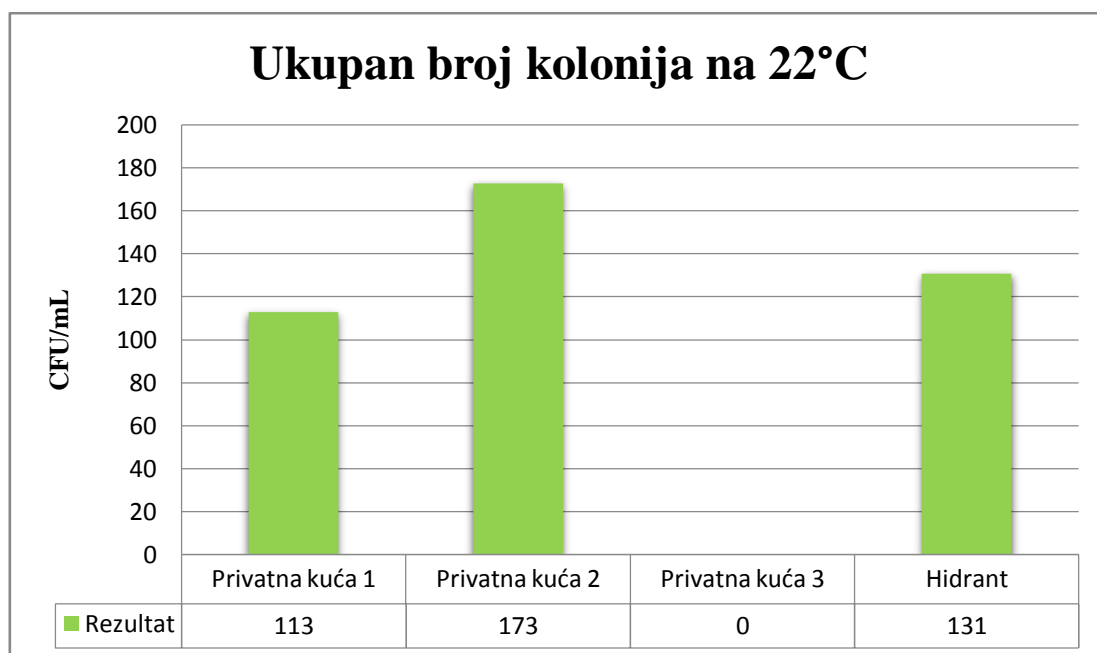
Zanimljivo je istaknuti da bakterija *C. perfingens* nije pronađena u niti jednom uzorku sirove vode.

Od 311 uzoraka obrađene (klorirane) vode, uzetih s raznih mjesta u distributivnoj mreži, zdravstveno neispravnih je bilo svega 4 uzorka, odnosno 1,28% (Tablica 6.). U privatnim kućama uzeto je 110 uzoraka, u ugostiteljskim objektima 77, u vodospremama 55, u ormarićima za uzorkovanje 24, na hidrantima 25 i na predcrpnim stanicama 20.

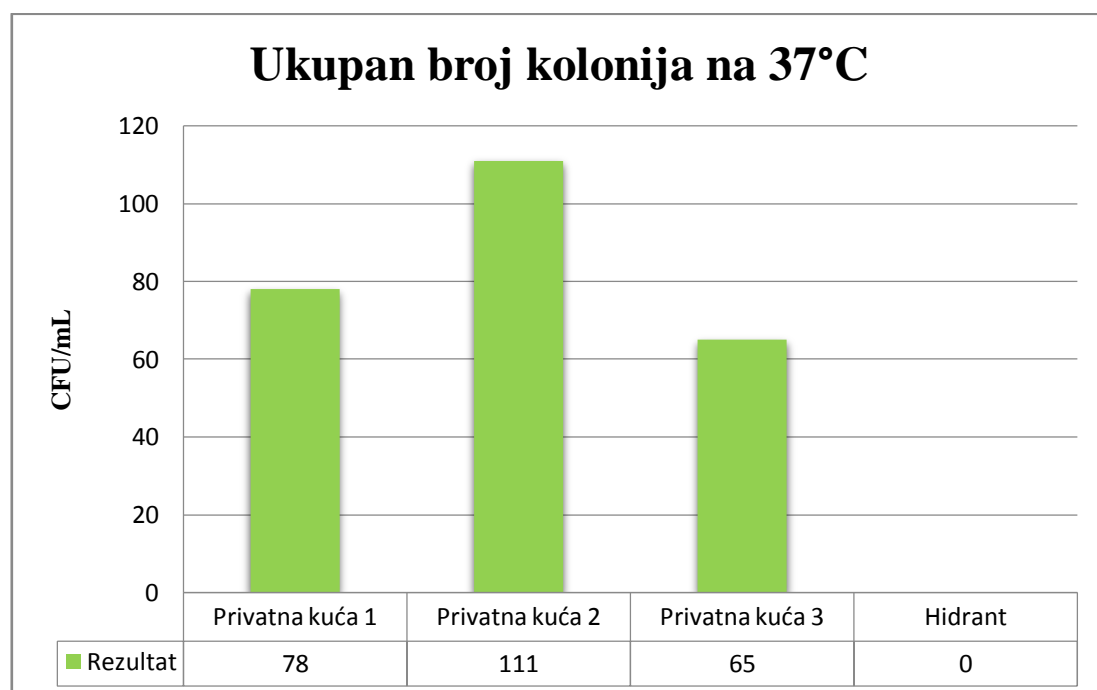
Tablica 6. Ispitivanje zdravstvene ispravnosti obrađene vode za ljudsku potrošnju u vodovodnoj mreži za period 2.- 31. svibnja 2001. godine.

Ukupni broj analiziranih uzoraka	Ukupan broj neispravnih uzoraka	Mikrobiološki pokazatelji	Broj neispravnih uzoraka
311	4 (1,28%)	Ukupan broj kolonija na 22°C	3 (75,00%)
		Ukupan broj kolonija na 37°C	1 (25,00%)
		Ukupni koliformi	1 (25,00%)
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (25,00%)
		<i>Escherichia coli</i>	0
		Enterokoki	0
		<i>Clostridium perfringens</i>	0

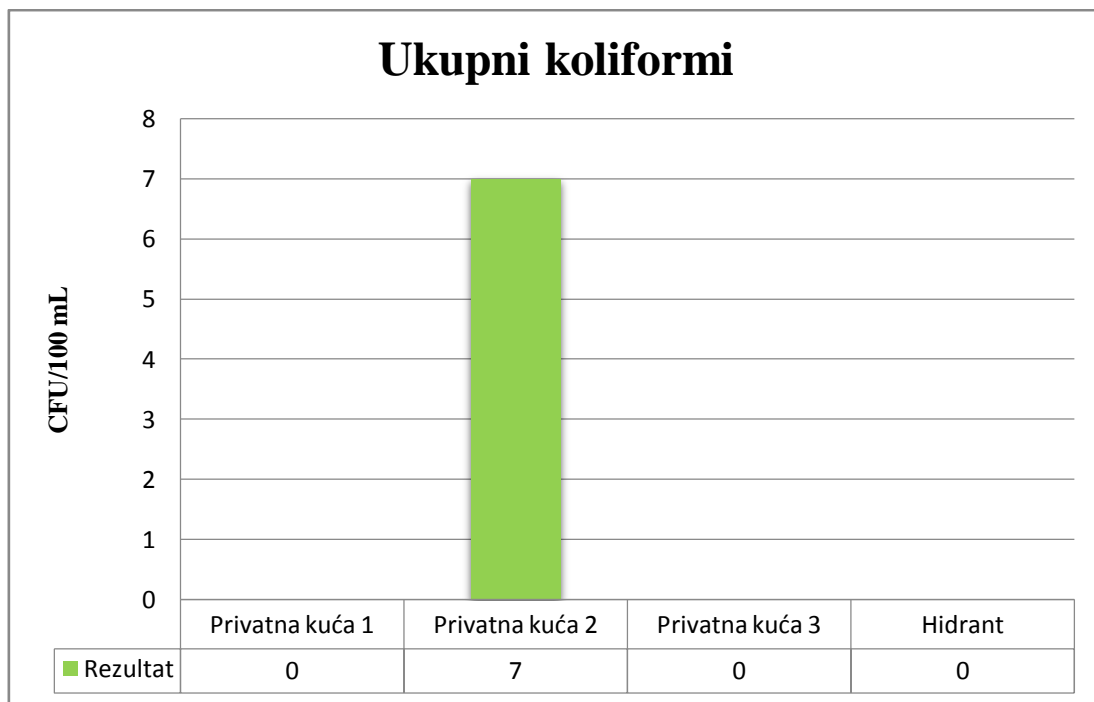
Grafovi na slikama 21, 22, 23 i 24 prikazuju rezultate mikrobioloških ispitivanja neispravnih uzoraka obrađene vode.



Slika 21. Ukupan broj kolonija poraslih na 22°C u neispravnim uzorcima obrađene vode. Referentna vrijednost MDK – maksimalna dozvoljena koncentracija prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće je 100 CFU/mL.

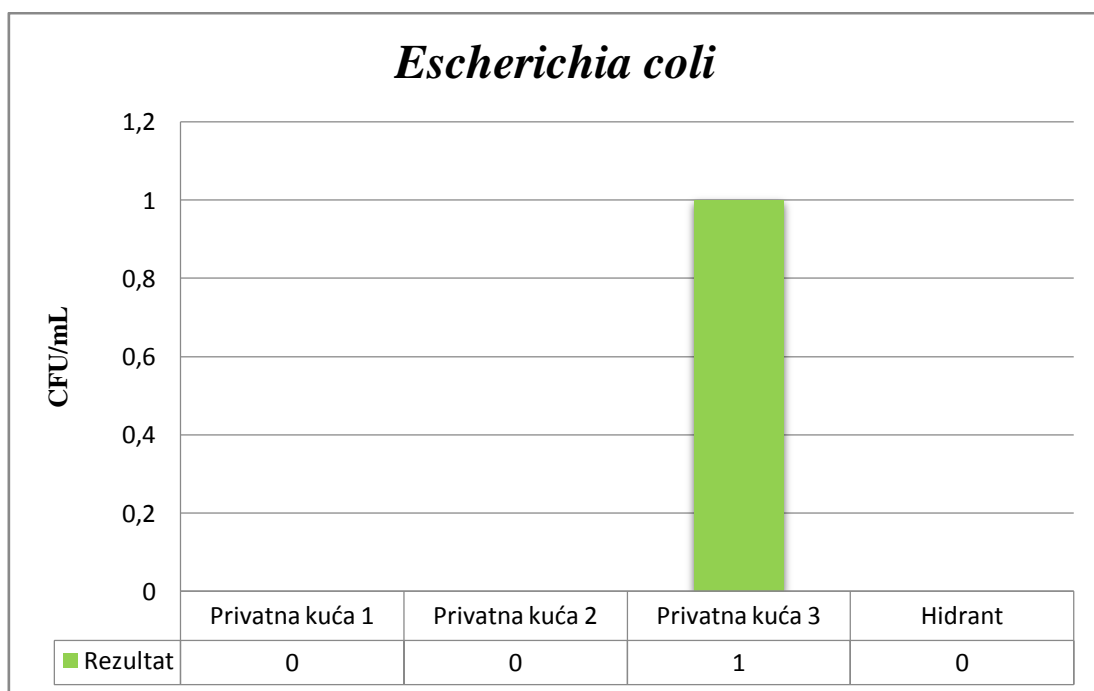


Slika 22. Ukupan broj kolonija poraslih na 37°C u neispravnim uzorcima obrađene vode. Referentna vrijednost MDK – maksimalna dozvoljena koncentracija prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće je 100 CFU/mL.



Slika 23. Brojnost ukupnih koliforma u neispravnim uzorcima obrađene vode.

Referentna vrijednost MDK – maksimalna dozvoljena koncentracija prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće je 0 CFU/100mL.



Slika 24. Brojnost bakterije *Escherichia coli* u neispravnim uzorcima obrađene vode.

Referentna vrijednost MDK – maksimalna dozvoljena koncentracija prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće je 0 CFU/100 mL.

Najviše neispravnih uzoraka je na ukupan broj kolonija na 22°C (Slika 21.). Po jedan uzorak bio je neispravan na ukupan broj kolonija na 37°C (Slika 22.), ukupne koliforme (Slika 23.) i *E. coli* (Slika 24.). *Pseudomonas aeruginosa*, *C. perfringens* i drugi enterokoki nisu pronađeni u niti jednom uzorku obrađene vode.

5. RASPRAVA

Istraživanje prisustva bakterija u vodama na području grada Zadra uključilo je ispitivanje 6 uzoraka sirove, neobrađene vode i 311 uzoraka obrađene vode. Mikrobiološke analize uzoraka neobrađene vode pokazale su prisutnost bakterija na svih 6 uzorkovanih crpilišta, te stoga takve vode nisu sukladne Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju s obzirom na mikrobiološke pokazatelje, radi čega se voda prije puštanja u sustav vodoopskrbe obavezno dezinficira klorom (Pravilnik o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju NN 125/213). S obzirom na rezultate, vidljivo je da je najveća koncentracija ukupnog broja bakterija na 22°C, odnosno ukupnih koliforma, *E. coli* i enterobakterija u uzorku vode s površinskog zahvata Berberov buk na rijeci Zrmanji, najveći ukupni broj bakterija koje su porasle na 37°C nađen je u uzorku vode s izvora Golubinka, dok je *P. aeruginosa* najzastupljenija u uzorku vode iz bunara Jezerce. Bakterija *C. perfringens* nije pronađena niti u jednom uzorku.

Riječ je vrlo različitim tipovima zahvata voda, pa je tako Berberov buk površinski zahvat na rijeci Zrmanji, odakle voda dolazi do crpne stanice Dolac, udaljene 2 km. Bunar 5 i Jezerce su kopani bunari na Bokanjačkom blatu, udaljeni međusobno 1,5 km. Izvor Golubinka je kaptirana krška jama, nalazi se u neposrednoj blizini mora, u Ljubačkom zaljevu. Boljkovac je kopani bunar pokraj naselja Grbe grada Nina (Kaleb i sur. 2005.).

Bakterije čija se prisutnost provjerava u mikrobiološkim analizama vode pripadnice su više različitih metaboličkih i ekoloških skupina. Tako je bakterija *E. coli* najčešće neopasni komenzal toplokrvnih organizama. Ako se nađe u vodi za piće ili na hrani, može uzrokovati infekcije mokraćnog i probavnog sustava, ali i upalu žuči, upalu pluća, meningitis kod novorođenčadi, kao i teške oblike sepse (Kaper i sur. 2004.). Ovaj mikroorganizam prvi je opisao znanstvenik Theodor Escherich 1885. godine kad ga je izolirao iz stolice novorođenčadi (Escherich 1885.), a kompletni genom je sekvencioniran 1997. godine (Blattner i sur. 1997.).

Clostridium perfringens široko je rasprostranjen u fecesu, tlu, zraku i vodi. Kontaminirano meso uzrokom je mnogih manjih epidemija. Nakon što uđe u probavni trakt, proizvodi enterotoksin koji djeluje na tanko crijevo i uzrokuje blagi gastroenteritis (Kiu i Hall 2018.). Često je glavni uzročnik emfizematoznog kolecistitisa, plinske gangrene uterusa (koja je ranije bila česta kod septičkog pobačaja), infekcija ženskog genitalnog trakta (apsces jajovoda

i jajnika, zdjelice i maternice), infekcija nakon rupture debelog crijeva prouzročene karcinomom te infekcija mekih tkiva npr. celulitis, miozitis i klostridijska mionekroza (Labbe i Juneja 2017.).

Pseudomonas aeruginosa je gram-negativni, pokretni, oportunistički patogen. Važan je bolnički patogen, koji uzrokuje ozbiljne bolničke infekcije, te znatno doprinosi porastu morbiditeta i mortaliteta. Uzrokuje infekcije kože, potkožnog tkiva, kostiju, oka, uha, mokraćnih organa i srčanih zalistaka. Lokalizacija ovisi o ulaznom mjestu i osjetljivosti bolesnika (Ramos 2004.).

Od 311 uzoraka obrađene vode, samo 4 uzorka nisu bila sukladna Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju s obzirom na mikrobiološke pokazatelje. Dvije privatne kuće u kojima uzorci nisu bili ispravni, nalazile su se u neposrednoj blizini oštećene vodovodne cijevi, te je pretpostavka da je došlo do zagađenja fekalnim otpadnim vodama iz okolnih septičkih jama. Nakon sanacije, ispiranja i dezinfekcije cijevi, ponovljena je analiza i uzorci vode su bili ispravni.

Mikrobiološka neispravnost u uzorcima obrađene vode u distributivnoj mreži povezuje se s radovima na mreži, novim cjevovodima, planskim ispiranjem mreža i neispravnim unutarnjim mrežama potrošača. Nakon utvrđivanja mikrobiološke neispravnosti na uzorcima, primjerice, poslije različitih radova na mreži, vodovodna mreža se obvezno ispiri i/ili dezinficira i tek po dobivanju zdravstveno ispravnog nalaza voda se ponovno distribuira potrošačima. U slučajevima kada se utvrdi da je mikrobiološka neispravnost posljedica unutarnje mreže, o istom se obavještava vlasnik. Kakvoća vode na zadarskom području je zadovoljavajuća, s obzirom na mali postotak uzoraka obrađene vode koji nisu sukladni Pravilniku o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe (NN 125/2017).

Iako je ovo istraživanje napravljeno 2001. godine, u vrijeme kada Republika Hrvatska nije bila članica Europske unije, do danas nema promjena u zakonskoj regulativi kao ni u mikrobiološkim parametrima, odnosno referentnim vrijednostima broja bakterija nađenih u uzorcima vode i metodama koje se koriste za analizu vode namijenjene ljudskoj potrošnji (Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnosti javne vodoopskrbe - NN 125/17).

Koliformne bakterije pouzdani su sanitarni indikatori fekalnih zagađenja, a također i indikatori dotoka hranjivih tvari koje potiču procese eutrofikacije (Hunter, 2003). Provedene analize dokazale su prisutnost ukupnih koliforma u svim uzorcima neobrađene vode, što potvrđuje da se radi o recentnim fekalnim zagađenjima, pošto bakterija *E. coli* ne može dugo preživjeti izvan ljudskog organizma. Smatraju se najtočnijim i najspecifičnijim mikrobiološkim indikatorima kakvoće pitke vode. Stoga je jedna od najznačajnija vrsta koliformnih bakterija za ovo istraživanje bila upravo *E. coli*. Na temelju rezultata evidentno je da je ona nađena u svim neobrađenim uzorcima. Zanimljivo je da je najveća koncentracija *E. coli* nađena u uzorku vode s površinskog zahvata Berberov buk na rijeci Zrmanji. Na samom buku nalazi se ugostiteljski objekt koji je u vrijeme uzorkovanja bio otvoren, vegetacija je bujna, u blizini ima naseljenih kuća koje imaju septičke jame, te polja koja služe za ispašu stoke. Sve navedeno može biti uzrok velikog broja pronađenih bakterija.

Temperatura inkubacije od 37°C je biološki optimalna za izolaciju bakterije *P. aeruginosa*, ali nema selektivni učinak kao inkubacija pri 42°C. Kod voda koje sadrže vrlo različitu floru iz porodice *Pseudomonaceae* postoji mogućnost gubitka dijela *Pseudomonas* vrsta pri inkubiranju na 37°C zbog kompeticije ostalih bakterija. Stoga se uzgojem bakterija na 42°C može usporiti rast antagonističkih bakterija, ali i izgubiti dio *Pseudomonas* vrsta kojima je ta temperatura na selektivnoj podlozi previsoka. Najbolje bi bilo redovito napraviti pretragu istog uzorka inkubacijom pri 37°C i pri 42°C kako bi se dobio detaljniji pregled mikrobiološkog stanja vode, pogotovo kada je fokus upravo na vrstama roda *Pseudomonas* (Ratkowsky i sur. 1982.; Kropinski i sur. 1987.).

Istraživanje je pokazalo da je na čitavom području grada Zadra prisutno veće ili manje onečišćenje izvora, bunara i površinskih voda, koji se nalaze na različitim i relativno udaljenim lokacijama. To je zagađenje posljedica ispuštanja otpadnih voda izravno ili neizravno u okoliš. Recentnija sanitarna analiza zahvata dala je podjednake rezultate, što ukazuje na povećanu potrebu zaštite izvorišta (www.vodovod-zadar.hr).

Zakonom o vodama propisano je, naime, da se zaštita izvorišta i površinskih vodozahvata po zonama sanitarne zaštite provodi sukladno odluci o zaštiti izvorišta, a naručitelj vodoistražnih radova i elaborata zona sanitarne zaštite za postojeća izvorišta za javnu vodoopskrbu treba biti jedinica lokalne ili područne samouprave na koje se odluka o zaštiti izvorišta odnosi. Kako za vodocrpilišta Dolac (Muškovci) i Berberov buk ranije nije bila donesena odluka o zaštiti izvorišta, Zadarska županija 2017. godine započela je postupak njenog donošenja. Hrvatski

geološki institut je izradio elaborat Slijev vodocrpilišta Dolac (Muškovci) i Berberov buk - Hidrološka interpretacija postojećih istraživanja i detaljno kartiranje ponornih zona Gračačkog polja; elaborat Trasiranje podzemnih tokova u neposrednom zaleđu vodozahvata i detaljno hidrogeološko kartiranje zaleđa vodocrpilišta Dolac i Hidrogeološki elaborat zona sanitarne zaštite vodocrpilišta Dolac (Muškovci) i Berberov buk. U njemu su detaljno opisane sve značajke područja, moguće slabosti i preporuke za daljnju zaštitu (www.zadarska-zupanija.hr).

U svrhu poboljšanja kvalitete voda, trebalo bi prvenstveno djelovati na ekološku svijest stanovništva. Česti su slučajevi namjernog pražnjenja septičkih jama na tlo ili u more, odlaganja komunalnog i krupnog otpada te uginulih životinja na divljim deponijima. Također, planska urbanizacija, s izvedbom kanalizacijske mreže koja bi osigurala priključak svakom kućanstvu, bolje gospodarenje i zbrinjavanje otpada, omogućava bolju zaštitu okoliša pa tako i voda. Stalnim motrenjem stanja okoliša, kao i izvora onečišćenja, moguće je donositi bolje odluke o učinkovitosti dosadašnjih mjera zaštite te potrebu uvođenja dodatnih postupaka za poboljšanje i očuvanje kakvoće voda. Gospodarske i financijske mjere u neposrednoj su vezi sa stanjem okoliša. Očuvanje čistog okoliša iziskuje puno financijskih sredstava potrebnih za izgradnju i održavanje objekata za preradu otpadnih voda. No, kada sagledamo moguće posljedice onečišćenja voda na zdravlje ljudi (pojava bolesti, epidemija, nedostatak pitke vode) i na samu prirodu (promjena krajolika, smanjenje biološke raznolikosti, smanjena mogućnost korištenja okoliša za razonodu i sportove), ulaganja u zaštitu i poboljšanje kakvoće voda, moraju biti prioritet (Tedeschi 1997.).

6. ZAKLJUČAK

Vodovodna voda na zadarskom području zadovoljavajuće je kvalitete i sukladna Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju, pošto su svega 4 od 311 uzorka bila mikrobiološki neispravna.

Neobrađena voda na vodocrpilištima je mikrobiološki neispravna pošto niti jedan od analiziranih uzoraka nije udovoljavao Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju.

7. LITERATURA

Blattner F. R.; Plunkett G.; Bloch C. A.; Perna N.T.; Burland V.; Riley M. (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 *Science*, 277: 1453–1462.

Duraković S.; Duraković L. (1997): Priručnik za rad u mikrobiološkom laboratoriju. I. dio knjiga prva. Zagreb: Biblioteka udžbenici i priručnici Sveučilišta u Zagrebu.

Duraković S.; Redžepović S. (2002): Uvod u opću mikrobiologiju: knjiga prva. Zagreb: Kugler.

Escherich T. (1885): Die Darm bakterien des Neugeborenen und Säuglinge. *Fortschritteder Medizin*, 3: 515–522.

Hajsig D.; Delaš F. (2016): Priručnik za vježbe iz mikrobiologije. Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo.

Hunter P. R. (2003): Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli*. *Journal of Water and Health*, 1: 65-72.

Kaleb J.; Berović N.; Kale A. (2005): *Vodovod Zadar*. Zadar: Vodovod Zadar.

Kalenić S. (2013): *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada.

Kaper J. B.; Nataro J. P.; Mobley H. L. (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2:123-140.

Kiu R.; Hall L. J. (2018): An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging Microbes and Infections*, 7: 141.

Kropinski A. M.; Lewis V., Berry D. (1987): Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Journal of bacteriology*, 169: 1960-1966.

Labbe R. G.; Juneja V. K. (eds.) (2017): *Clostridium perfringens* foodborne diseases, Elsevier, pp. 235–242.

Mayer D. (2004): *Voda od nastanka do upotrebe*. Zagreb: Prosvjeta.

Nester E.W.; Anderson D. G.; Roberts C. E.; Pearsall N. N.; Nester M. T. (2004):
Microbiology: A human perspective. New York: McGraw – Hill.

Ramos J. L. (ed.) (2004): Pseudomonas Volume 1: Genomics, life style and molecular
architecture. Kluwer Academics/Plenum Publishers.

Stilinović B.; Hrenović J. (2009.): Praktikum iz bakteriologije. Zagreb: Kugler.

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

www.enciklopedija.hr

www.vodovod-zadar.hr

www.zadarska-zupanija.hr

8. ŽIVOTOPIS

OBRAZOVANJE

- COUO “Juraj Baraković” Zadar - Biološka škola - biološki tehničar

RADNO ISKUSTVO

- 1997. Medicina i tehnika, Zagrebački velesajam Zagreb - prevoditelj
Parfumerija Diva Zagreb - prodavačica
- 2002. Gimnazija Vladimira Nazora Zadar - profesor biologije
- 2003. Osnovna škola Stanovi Zadar - nastavnik prirode, biologije i kemije
- 2004. Osnovna škola Bartula Kašića Zadar - nastavnik prirode, biologije i kemije
Osnovna škola Petra Preradovića Zadar - nastavnik biologije i kemije
Turistička zajednica mjesta Zaton - informator
Osnovna škola Krune Krstića Zadar - nastavnik prirode, biologije i kemije
- 2005. Gimnazija Franje Petrića Zadar - profesor kemije
- 2006. Gimnazija Vladimira Nazora Zadar - profesor kemije
- 2007. Gimnazija Vladimira Nazora Zadar - profesor kemije i biologije
Osnovna škola Šimuna Kožičića Benje Zadar- nastavnik biologije i kemije
- 2008. Gimnazija Vladimira Nazora Zadar - profesor kemije
Osnovna škola Šimuna Kožičića Benje Zadar - nastavnik biologije i kemije
Osnovna škola Šime Budinića Zadar - nastavnik biologije i kemije
Osnovna škola Bartula Kašića Zadar - nastavnik prirode, biologije i kemije
- 2009. Osnovna škola Bartula Kašića Zadar - nastavnik prirode, biologije i kemije
- 2009. - 2010. Izrada projekta sanacije odlagališta Siđe, BIH - prevoditelj

- 2012. - 2013. Labosano d.o.o. Zadar - voditelj kemijskog i reološkog laboratorija
- 2013. - 2014. Osnovna škola Jurja Barakovića Ražanac - nastavnik prirode i biologije
- 2014. Osnovna škola Sukošan - nastavnik prirode, biologije i kemije
 Osnovna škola Nikole Tesle Gračac - nastavnik biologije i kemije
- 2017. Narodni muzej Zadar - Kneževa palača - marketing asistent
- 2018. - 2019. Ivančica d.d. Ivanec - voditelj trgovine
- 2019. Osnovna škola Šime Budinića Zadar - nastavnik prirode, biologije i kemije

OSTALA ZNANJA

Rad na računalu: korištenje alata MS Office

Jezici: Aktivno znanje - engleski i talijanski jezik

 Pasivno znanje - španjolski, slovački i ruski jezik

Vozačka dozvola B kategorije

Bračno stanje: udata