

Perzistencija koliformnih bakterija u izvorskoj vodi Papuka

Iličić, Doris

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:223488>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doris Ilić

Perzistencija koliformnih bakterija u izvorskoj vodi Papuka

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za kvantitativnu ekologiju Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, pod vodstvom doc. dr. sc. Gorana Palijana, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja mag. oecol. et prot. nat.

Prije svega, zahvaljujem mentoru, docentu Goranu Palijanu, na pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada. Prenoseći znanje, prenio mi je i ljubav prema mikrobiologiji. Hvala na uloženom trudu, zalaganju, strpljenju, konstruktivnim savjetima i riječima podrške.

Također, zahvaljujem profesorici Jasni Hrenović na iskazanom interesu za poziciju komentora, na susretljivosti, ažurnosti, optimizmu i dodatnoj pomoći prilikom pisanja diplomskog rada.

Hvala roditeljima što su mi pružili mogućnost akademskog obrazovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

PERZISTENCIJA KOLIFORMNIH BAKTERIJA U IZVORSKOJ VODI PAPUKA

Doris Iličić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Koliformne bakterije uobičajeni su mikrobiološki pokazatelji kvalitete vode za piće. S obzirom na njihovo fekalno podrijetlo, jednom unesene u okoliš, mogu predstavljati rizik za ljudsko zdravlje. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti kakvoću vode, odnosno, odrediti prisutnost ukupnih heterotrofnih te ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija u uzorku izvorske vode s četiri odabrana izvora na području Papuka: Jankovac, Kokočak (Vučenović), Žervanjska i Muška voda. Kako bi se simuliralo zagađenje izvorske vode i sedimenta fekalnim materijalom, a s ciljem utvrđivanja sposobnosti perzistencije koliforma, upotrijebljeni su mikrokozmosi koji su u tu svrhu prethodno inokulirani laboratorijski čistom kulturom koliformne bakterije. Rezultati istraživanja pokazali su kako, s obzirom na povećan broj ukupnih heterotrofnih te ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija, voda s uzorkovanih izvora nije prikladna za piće. Inokulirani koliformi uspješno su preživjeli sedmodnevnu inkubaciju u svim uzorcima izvorske vode osim u vodi s izvora Jankovac. Stoga se može zaključiti da Jankovac ima, uz utvrđenu nisku sposobnost formiranja biofilma bakterija s ovoga izvora, najmanju mogućnost perzistencije koliforma u slučaju zagađenja izvora. Također, s obzirom da ovi rezultati pružaju samo dio uvida u kakvoću izvorske vode potrebno je provesti dodatne analize, uz kontinuirano praćenje mikrobioloških parametara, kako bismo sa sigurnošću mogli utvrditi zdravstvenu ispravnost iste.

(41 stranica, 19 slika, 2 tablice, 51 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: voda, koliformi, perzistencija, biofilm, Papuk

Voditelj: Dr. sc. Goran Palijan, doc.

Suvoditelj: Dr. sc. Jasna Hrenović, red. prof.

Ocjenitelji:

1. Dr. sc. Jasna Hrenović, red. prof.
2. Dr. sc. Ivana Buj, doc.
3. Dr. sc. Ana Galov, izv. prof.

Rad prihvaćen: 03.09.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

PERSISTENCE OF COLIFORM BACTERIA IN PAPUK SPRING WATERS

Doris Iličić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Coliform bacteria are most commonly used as microbiological indicators of drinking water quality. Given their faecal origin, once introduced into the environment, they can pose a risk to human health. The aim of this study was to determine water quality by determining the presence of total heterotrophic and total and fecal coliform bacteria in four selected springs in the Papuk area: Jankovac, Kokočak (Vučenović), Žervanjska and Muška voda. In order to simulate the contamination of spring water and sediment with fecal material, microcosms were used. They were previously inoculated with a laboratory-pure culture of coliform bacteria. In the same manner, microcosms were used in order to determine the persistence of inoculated coliforms. The results of the research showed that, given the increased number of total heterotrophic and total and fecal coliform bacteria, water from sampled springs is not suitable for drinking. On the other hand, inoculated coliforms successfully persisted in all spring water samples except in the water from the spring Jankovac. Therefore, it can be concluded that Jankovac has, with the established low ability of bacteria from this spring to form a biofilm, the lowest possibility of coliform persistence in case of pollution of the spring. Also, given that these results provide only a part of the insight into the quality of spring water, it is necessary to carry out additional analyses, with continuous monitoring of microbiological parameters.

(41 pages, 19 figures, 2 tables, 51 references, original in: croatian)

Thesis deposited in Central Biological library

Keywords: water, coliforms, persistence, biofilm, Papuk

Supervisor: Dr. Goran Palijan, Assistant professor.

Co-supervisor: Dr. Jasna Hrenović, Full professor

Reviewers:

1. Dr. Jasna Hrenović, Full professor.
2. Dr. Ivana Buj, Assistant professor
3. Dr. Ana Galov, Associate professor

Thesis accepted: 03.09.2020.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. OPĆA SVOJSTVA IZVORSKE VODE	2
1.1.1. PODRIJETLO IZVORSKE VODE	2
1.1.2. FIZIKALNO - KEMIJSKA SVOJSTVA	2
1.1.3. MIKROBIOLOGIJA IZVORSKE VODE.....	3
1.2. KOLIFORMNE BAKTERIJE	4
1.3. <i>Escherichia coli</i>	5
1.3.1. SPOSOBNOST PREŽIVLJAVANJA <i>E. COLI</i> U OKOLIŠU	7
1.3.2. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA PREŽIVLJAVANJE <i>E. COLI</i>	8
1.4. KOLIFORMNE BAKTERIJE KAO INDIKATORI ZAGAĐENJA.....	9
1.5. PERZISTENCIJA KOLIFORMNIH BAKTERIJA	9
1.5.1. PERZISTENCIJA U VODENOM OKRUŽENJU	9
1.5.2. PERZISTENCIJA UNUTAR BIOFILMA	10
1.6. INTERAKCIJE KOLIFORMNIH BAKTERIJA	11
1.7. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
2. MATERIJALI I METODE.....	13
2.1. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA.....	13
2.2. SAKUPLJANJE UZORAKA	15
2.3. BAKTERIOLOŠKI PARAMETRI IZVORSKE VODE	15
2.4. PERZISTENCIJA KOLIFORMA U MIKROKOZMOSIMA	16
2.5. SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMA KOLIFORMNIH BAKTERIJA	17
2.5.1. PRIPREMA HRANJIVOG MEDIJA	17
2.5.2. KRISTAL VIOLET TEST	17
2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	20
3. REZULTATI	21
3.1. BAKTERIOLOŠKI PARAMETRI IZVORSKE VODE	21
3.2. ANALIZE MIKROKOZMOSA	22
3.3. SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMA	27
4. RASPRAVA.....	29
5. ZAKLJUČAK.....	35
6. LITERATURA	36

1. UVOD

Podzemne vode predstavljaju jedan od glavnih izvora pitke vode. Tisućama godina izvori su privlačili znanstvenike i filozofe pa su tako prve ideje o hidrološkom ciklusu nastajale dok su ljudi pokušavali razumjeti podrijetlo izvorske vode. Za mnoge su izvori najočitiiji i najzanimljiviji dokaz podzemne vode ali oni također imaju i praktičnu upotrebu. Kroz povijest, predstavljali su mjesta na kojima su se gradila prva ljudska naselja dok su danas ona povezana s izvanrednom kvalitetom te se vjeruje u terapijsku i ljekovitu vrijednost izvorske vode, iako za to ne postoje znanstveni dokazi. Prema Pravilniku o prirodnim mineralnim, prirodnim izvorskim i stolnim vodama (NN 85/2019) prirodna izvorska voda definira se kao voda namijenjena konzumaciji u svom prirodnom stanju, potječe iz vodonosnika zaštićenog od svakog onečišćenja, a zahvaća se i puni iz izvora.

Za protok energije i tvari u okolišu ključni su mikroorganizmi. Bakterije predstavljaju najuspješniji oblik života. Glavni razlog ovog uspjeha je fenotipska plastičnost. Upravo je sposobnost bakterijskog genotipa da fenotipski odgovori na podražaje iz okoline dovela do snažnog razvoja bakterijskih organizama (World Health Organization 2003). Njihova sveprisutna pojava ograničena je samo s nekoliko okolišnih čimbenika, poput izuzetno alkalnih / kiselih uvjeta ili ekstremne temperature. Zbog toga se očekuje da nastanjuju svako dostupno stanište na Zemlji. Iako se podzemne vode smatraju najmanje onečišćenim izvorom vode i one predstavljaju jedno od mnogih staništa mikroorganizama. Kvantificiranje promjena i izvora tih mikroorganizama u izvorskoj vodi važno je u svrhu zaštite javnog zdravlja.

1.1. OPĆA SVOJSTVA IZVORSKE VODE

1.1.1. PODRIJETLO IZVORSKE VODE

Izvorište je mjesto gdje podzemna voda prirodno izlazi iz zemljinog podzemlja te istječe ili na površinu tla ili izravno utječe u neko vodeno tijelo. Sustav podzemnih voda povezan s izvorima jednostavan je, a sastoji se od područja gdje voda ulazi u podzemlje, vodonosnog sloja ili skupa vodonosnika kroz koji teče voda te točke pražnjenja gdje voda izvire kao izvor. Samo postojanje izvora zahtijeva da ispod površine infiltracijska voda naiđe na područje male propusnosti i nije u stanju nastaviti se kretati prema dolje onoliko brzo koliko se opskrbljuje na površini. Kao rezultat, voda se širi bočno sve dok ne presijeca površinu kopna (Riđanović 1993). Takvi izvori najčešće su zatrpani sedimentom ili stijenama pa sadrže i sekundarni izvor. Preljevni izvori, s druge strane, su izvori kod kojih se podzemna voda prelijeva preko nepropusne ili slabo propusne barijere, a takvi izvori najčešći su u krškom dijelu Hrvatske. Izvori također mogu biti silazni, pa se kod njih podzemna voda izlijeva na površinu pod utjecajem gravitacije. U nizinskoj Hrvatskoj prirodni izvori su malog kapaciteta i uglavnom su vezani uz brdska područja. To je područje međuzrnske poroznosti stijena, gdje se voda procjeđuje odnosno ispunjava pore među zrnima šljunka ili pijeska. Izvori su ovdje manje izdašni jer nema velikih kanala kojima bi došle veće količine vode, pa im maksimalni protoci obično ne prelaze nekoliko litara po sekundi. Zato ih ima relativno mnogo (Šafarek 2016).

1.1.2. FIZIKALNO - KEMIJSKA SVOJSTVA

Od vode za ljudsku potrošnju prirodna izvorska voda razlikuje se po svojoj izvornoj čistoći i prirodnim svojstvima te količini određenih mineralnih tvari i elemenata u tragovima. Navedena svojstva prirodne izvorske vode sačuvana su zbog podzemnog podrijetla koje je zaštićeno od većine rizika onečišćenja. Kako se podzemna voda slijeva prema izvoru, njezin se sastav i temperatura mogu mijenjati ovisno o materijalima kroz koje voda protječe, dužini vremena njezinog zadržavanja ispod površine i geološkim uvjetima (Freeze i Cherry 1979). Kemija izvorskih voda odražava interakciju podzemne vode sa stijenom vodonosnika, kao i svih kemijskih tvari koje se mogu unijeti iz površinskih izvora. Stoga se ona intrinzično ne razlikuje od kemije podzemnih voda te se primjenjuju ista načela. Iako se različiti izvori nalaze u različitim geološkim okruženjima, njihova kemija je iznenađujuće slična. Isti setovi kationa (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) i aniona (HCO_3^- ,

SO₄²⁻, Cl⁻) nalaze se u većini izvorskih voda te zajedno čine osnovu za njihovu klasifikaciju. Tako razlikujemo bikarbonatne vode, u kojima dominiraju kationi Ca²⁺ i Mg²⁺; sulfatne vode, gdje je koncentracija Mg veća od Ca; te kloridne vode u kojima pretežno prevladavaju alkalijski ioni. Ipak, ono što razlikuje jednu izvorsku vodu od druge jesu relativne koncentracije dominantnih iona kao i temperatura vode te prisutnost otopljenih plinova, posebice H₂S i CO₂ (White 2010).

1.1.3. MIKROBIOLOGIJA IZVORSKE VODE

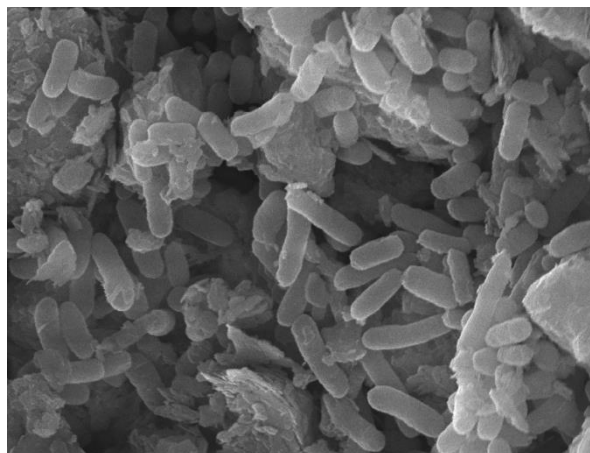
Podzemna staništa općenito karakteriziraju nedostatak svjetlosti, ograničena dostupnost hranjivih tvari te ograničen prostor, diktiran veličinom pora i pukotina u vodonosniku. Odsustvo svjetla znači da se proces fotosinteze ne odvija te stoga svu primarnu proizvodnju provode kemoautotrofi. Fotosintetski mikroorganizmi mogu biti uneseni s površine i, kao takvi, predstavljaju prolazne članove mikrobne zajednice. Stoga, osnova prehrambene mreže podzemnih voda sastoji se uglavnom od otopljenog organskog ugljika iz gornjih slojeva, a čija je koncentracija često manja od 3 mg/L (Gregory i sur. 2014). Okoliš s ovako niskim udjelom ugljika rezultira niskom biomasom mikroorganizama koji imaju nejasnu i neravnomjernu distribuciju, što je određeno lokalnom dostupnošću hranjivih tvari. Kemija podzemnih voda je uglavnom konstantna, a sastav mikrobnih zajednica ovisi o sezonskim promjenama. Tako su u vlažnijim razdobljima zabilježene značajne sezonske promjene broja i raznolikosti planktonskih oblika (Gregory i sur. 2014). Mikrobna zajednica podzemnih, a samim time i izvorskih voda, osim bakterija, uključuje i arheje, gljivice, protozoe i viruse. Kada govorimo o bakterijama, najčešće govorimo o nepatogenim heterotrofnim mikroorganizmima poput *Flavobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Chromobacterium* spp., *Achromobacter* spp. i *Alcaligenes* spp. (Aydin 2007). Osim navedenih, u izvorskim vodama nalaze se i koliformne bakterije koje su najčešće unesene infiltracijom fekalnog zagađenja u vodonosnik. Za konzumaciju u svom prirodnom stanju, prirodna izvorska voda mora zadovoljavati kriterije propisane Pravilnikom o prirodnim mineralnim, prirodnim izvorskim i stolnim vodama (NN 85/2019) (Tablica 1).

Tablica 1. Mikrobiološki parametri zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju

POKAZATELJ	MJERNA JEDINICA	M.D.K.
<i>Escherichia coli</i>	broj / 250 ml	0
Koliformne bakterije (37 °C, 44,5 °C)	broj / 250 ml	0
Enterokoki	broj / 250 ml	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	broj / 250 ml	0
Broj kolonija 20 - 22 °C	broj / 1ml	20
Broj kolonija 37 °C	broj / 1ml	5

1.2. KOLIFORMNE BAKTERIJE

Koliformne bakterije važna su skupina iz porodice Enterobacteriaceae. To su fakultativno anaerobne, Gram-negativne, štapićaste (Slika 1), nesporogene bakterije koje fermentiraju laktozu stvarajući kiselinu i plin (Stilinović i Hrenović 2009). Gotovo stoljeće smatralo se da su koliformi, posebice *Escherichia coli*, isključivo crijevnog podrijetla. Točno je da izmet toplokrvnih životinja i ljudi obiluje koliformnim bakterijama, međutim, postoje koliformi koji se nalaze i u vodenom okruženju, tlu i vegetaciji, a da nisu povezani s fekalnim zagađenjem (Patel i sur. 2014). Stoga među koliformnim bakterijama razlikujemo ukupne koliformne bakterije koje se uzgajaju i laktozu razgrađuju pri $35,0 \pm 0,5$ °C / 48 h i fekalne koliformne bakterije koje toleriraju višu temperaturu uzgoja od $44,5 \pm 0,2$ °C / 24 h te kao takve čine termotolerantni soj koliforma (Dekić i Hrenović 2017). Rodovi *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella* i *Escherichia* samo su neki od rodova koje obuhvaća koliformna skupina bakterija (Garrity i sur. 2005, Henze i sur. 2015).



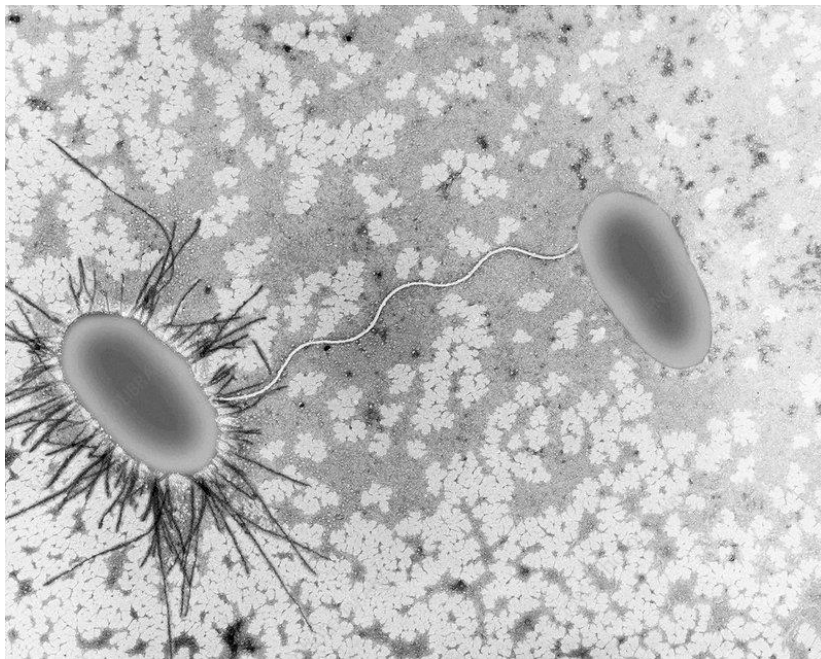
Slika 1. Stanice *E. coli* imobilizirane na mineralnu podlogu (Hrenović i sur. 2012)

Vrste roda *Citrobacter* koriste citrat kao izvor ugljika, a pokreću se pomoću peritrihijalnih flagela. Uobičajeni su stanovnici crijeva ljudi i životinja te su posljedično prisutne i u okolišu. Predstavnik roda, *Citrobacter freundii*, iako najpoznatija kao oportunistički patogen, ima veliki ekološki značaj. *C. freundii* pretvara nitrata i amonijeve ione u nitrite. Nakon što se nitrat pretvori u nitrit, nitrit se pretvara u dušik što predstavlja završni korak ciklusa kruženja dušika u okolišu. Također, bakterije ove vrste mogu akumulirati uran stvarajući fosfatne komplekse. Taksonomski, rod *Citrobacter* najuže je povezan s rodovima *Salmonella* i *Escherichia* (Borenshtein i Schauer 2006). *Enterobacter* su 1960. godine Hormaeche i Edwards predložili kao rod na temelju podjele nekadašnjeg roda *Aerobacter* na pokretne, ornitin dekarboksilaza - pozitivne sojeve (*Enterobacter*) i nepokretne ODC - negativne sojeve (*Klebsiella*) (Iversen 2014). Najpoznatije vrste ovog roda, ujedno i oportunistički patogeni, su: *Enterobacter cloacae* i *Enterobacter aerogenes*. Rod *Klebsiella* svoj naziv dobio je po njemačkom liječniku i bakteriologu Edwinu Klebsu. Predstavnik ovog roda, *Klebsiella pneumoniae*, koja se naziva i Friedländerov bacil, prvi je put opisana 1882. godine i najpoznatija je kao patogen ljudskog respiratornog sustava koji uzrokuje upalu pluća. No, postoje i određeni sojevi izolirani iz korijena biljaka kao što su pšenica, riža i kukuruz, koji vrše fiksaciju dušika (Brisse i sur. 2006). Nadalje, rod *Hafnia* uključuje samo dvije poznate vrste: *Hafnia alvei* i *H. paralvei*. Od otkrića prije više od 50 godina, vrlo je malo utvrđeno o varijacijama među tim vrstama. No, razvoj metode sekvenciranja cijelog genoma omogućio je reklasifikaciju ovog roda (Yin i sur. 2019).

1.3. *Escherichia coli*

Rod *Escherichia* uključuje pet vrsta: *E. albetii*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* i *E. vulneris* (Liu 2015). Iako su i druge vrste ovog roda patogene, kao što je *E. albertii* koja je povezana s dijarejskom bolešću kod djece Bangladeša, *E. coli* je najpoznatiji i najproučavaniji patogen po kojem je cijeli rod dobio ime (Patel i sur. 2014). *E. coli* (Slika 2) je po prvi puta izolirao njemački bakteriolog Theodar Escherich 1885. godine iz dječjeg izmeta. U prirodi se pojavljuje u različitim oblicima, u rasponu od komenzalnih sojeva do onih patogenih. To je univerzalni stanovnik intestinalnog trakta ljudi i toplokrvnih životinja te se koristi kao pokazatelj fekalne kontaminacije vode i prisutnosti enteričkih patogena. Iako je većina sojeva *E. coli* bezopasna, postoji nekoliko kategorija sojeva koji nose faktore virulencije i uzrokuju bolesti. Na temelju njihove prisutnosti i seroloških svojstava razlikujemo: enteropatogeni (EPEC), enteroinvazivni (EIEC), enterotoksigeni

(ETEC), enterohemoragični (EHEC) ili pak enteroagregativni (EAggEC) serotip (Bitton 2005). *E. coli* svrstavamo u mezofilne bakterije kojima je optimalna temperatura rasta 37 °C. Iako mogu preživjeti pri pH 4.4, spadaju u neutrofilne bakterije s optimumom pH oko 7. Od ostalih članova porodice Enterobacteriaceae, *E. coli* se fenotipski razlikuje na temelju sposobnosti fermentacije laktoze pri 44,5 °C te korištenja različitih supstrata (Patel i sur. 2014). Iako su fiziologija, genetika i biokemija *E. coli* opsežno proučavane, nije poznato detaljno kako se bakterija ponaša u svojim prirodnim staništima. Takva staništa podijeljena su na primarna, odnosno probavni sustav ljudi i životinja, i sekundarna staništa tj. okoliš (Gordon 2004). Pretpostavlja se da su, tijekom evolucijskog vremena, različiti sojevi *E. coli* imali bifazni životni stil koji se sastoji od faza neovisnih o domaćinima i onih povezanih s domaćinom. Dakle, bile su prisutne fluktuirajuće, ali općenito niske koncentracije dostupnih izvora ugljika / energije, temperature, pH te aerobni i anoksični uvjeti (van Elsas i sur. 2011).



Slika 2. Transmisijski elektronski mikrograf (TEM) stanica *E. coli* koje prolaze konjugaciju putem pila (Web 1)

1.3.1. SPOSOBNOST PREŽIVLJAVANJA *E. COLI* U OKOLIŠU

Pod uvjetom da su raspoloživi povoljni abiotički uvjeti, populacija *E. coli* može preživjeti, pa čak se i umnažati u okolišu (Jang i sur. 2017). Međutim, pod fluktuirajućim okolišnim uvjetima, poput onih koji su prisutni u mnogim tlima i vodenom okruženju, njihovo umnažanje može biti različito i može doći do brzog odumiranja bakterija ako prevlada stopa smrtnosti. I umnažanje i smrtnost određeni su okolišnim uvjetima na lokalnoj razini ali i načinom na koji se mikroorganizam može nositi s tim uvjetima reguliranjem svojih obrazaca ekspresije gena. Istraživanja su pokazala da stanice koje se brzo dijele u mediju bogatom nutrijentima, imaju povećanu ekspresiju gena koji su uključeni u translaciju i ne zahtijevaju ekspresiju gena biosinteze aminokiselina u usporedbi sa stanicama u mediju siromašnom nutrijentima. Takva analiza genske ekspresije može se dalje koristiti za proučavanje fiziologije stanica u različitim uvjetima, oponašajući one koji se smatraju relevantnim za okoliš. Na primjer, mogu se procijeniti uzorci ekspresije gena komenzalnih i patogenih oblika *E. coli* da bi se utvrdilo da li se određeni geni eksprimiraju u određenom okruženju i u kojoj mjeri to utječe na preživljavanje bakterija. U tom kontekstu, otkriveno je da je preko 300 gena specifičnih za soj O157:H7 (verotoksična (VTEC) *E. coli*), u siromašnom mediju, odgovorilo na prijelaz rasta iz eksponencijalnog u stacionarni, uz značajne promjene u ekspresiji gena, uključujući više gena koji su odgovorni za patogenost bakterije. Također, u uvjetima gladovanja *E. coli* pokazuje visoki stupanj kataboličke fleksibilnosti, što je očigledno pogodovalo njezinoj vijabilnosti u sekundarnim staništima kao što su tlo i voda. To potvrđuje činjenica da *E. coli* može preživjeti, pa čak se i umnažati u sterilnoj slatkoj vodi s malim koncentracijama ugljika (van Elsas i sur. 2011). Štoviše, zbog proizvodnje RpoS (podjedinice RNA polimeraze koja predstavlja glavni faktor koji sudjeluje u preživljavanju uslijed nedostatka hranjivih tvari), *E. coli* se brzo prilagođava i može podnijeti različite stresne uvjete. Tako se pokazalo da visoka osmolarnost, ekstremne temperature kao i fluktuacije temperature, niski pH i niska stopa umnažanja induciraju RpoS u stanicama *E. coli* (Sheldon i sur. 2012). Konačno, *E. coli* može ući u stanje mirovanja, stanje u kojem su stanice metabolički ili fiziološki aktivne ali gube sposobnost formiranja kolonija na hranjivom mediju (tzv. vijabilne ali nekultivabilne stanice). Ono može biti potaknuto stresnim uvjetima koje nameću, na primjer, niska temperatura (4 °C) ili toksični metali (bakar, olovo, živa i kadmij). Iako stanje mirovanja osigurava perzistenciju, nije jasno predstavlja li ono oštećenje stanice uslijed povećanih stresnih uvjeta okoliša ili je uistinu pravi način preživljanja *E. coli* (van Elsas i sur. 2011).

1.3.2. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA PREŽIVLJAVANJE *E. COLI*

Iako se smatra da su uvjeti za preživljavanje *E. coli* u tlu ili vodi manje povoljni nego u probavnom sustavu, opaženo je da organizam preživljava do skoro godinu dana na fiziološkoj temperaturi (30 - 37 °C) u aerobnim uvjetima i u uvjetima nedostatka hranjivih tvari). Raspoloživost nutrijenata, poput ugljika, vjerojatno je glavni kritični faktor koji utječe na preživljavanje *E. coli*, a ovisi o lokalnim uvjetima koji su karakteristični za stanište. Pokazalo se kako su, u nedostatku glukoze, stanice *E. coli* sposobne iskoristavati druge različite nutrijente koji se javljaju u niskim koncentracijama. Tijekom razdoblja gladovanja preživljavanje se kontrolira na molekularnoj razini stvarajući ne samo fiziološke, već i morfološke promjene, pa su tako na primjer, stanice manje od normalnih stanica dok neke pak stvaraju kovrčava vlakna zbog čega se bakterije skupljaju (Patel i sur. 2014). Temperatura i temperaturni režim drugi je važan čimbenik koji utječe na preživljavanje i rast *E. coli*. Temperatura u tijelu domaćina često je stabilna, dok ona u sekundarnom okruženju, kao što su tlo ili voda, može snažno fluktuirati. Istraživanja su pokazala kako je preživljavanje pod fluktuirajućim temperaturama općenito niže od preživljavanja pri stalnoj temperaturi. Štoviše, smanjenje preživljavanja organizma bilo je izraženije kada je amplituda temperaturnih oscilacija bila veća (7 °C) nego pri manjim amplitudama (4 °C). Općenito, porast temperature predstavlja veći stres i potrošnju energije za organizam nego njezino smanjenje. Također, izložena visokim temperaturama, *E. coli* sintetizira proteine toplinskog stresa (heat-shock proteins - HsPs) kako bi ublažila oštećenje bjelančevina (van Elsas i sur. 2011). Također, većina istraživanja navodi bolje preživljavanje *E. coli* pri nižim temperaturama (Aung i sur. 2016, Sampson i sur. 2006). Bogosian i sur. (1996) navode da je u nesterilnoj riječnoj vodi *E. coli* mogla preživjeti do 6 dana pri 37 °C, 8 dana pri 20 °C i 12 dana pri 4 °C. Važno je istaknuti kako osjetljivost *E. coli* na pojedine stresne uvjete uvelike ovisi o položaju stanice u ciklusu rasta. Tako su na primjer one najosjetljivije u log-fazi rasta, a nakon prolaska kroz stacionarnu fazu, otpornost se povećava (van Elsas i sur. 2011).

Još jedan važan čimbenik koji utječe na preživljavanje *E. coli* u okolišu je njegova biotička komponenta. U svim prirodnim staništima, populacije ove bakterije ulaziti će u interakcije s prirodno prisutnim organizmima, uključujući mikrobne zajednice. Jedan od glavnih biotičkih čimbenika koji može negativno utjecati na preživljavanje *E. coli* je prisutnost protozoa. Suprotno opadajućoj populaciji koja se često viđa u prirodnim staništima, populacije *E. coli* mogu nesmetano rasti u supstratima u sterilnim uvjetima, to jest, bez grabežljivih, antagonističkih ili kompeticijskih organizama. Također, ekosustavi s većom

razinom biološke raznolikosti otporniji su na poremećaje od onih s manjom bioraznolikošću. Stoga bi takva staništa bila manje podložna invaziji *E. coli* od ostalih, a s obzirom na složenost i heterogenost većine prirodnih staništa, teško je predvidjeti sudbinu *E. coli* u okolišu (van Elsas i sur. 2011).

1.4. KOLIFORMNE BAKTERIJE KAO INDIKATORI ZAGAĐENJA

Voda sadrži veliki broj mikroorganizama od kojih su neki štetni za zdravlje ljudi, dok drugi ukazuju na razinu kontaminacije. Analizirati vodu na svaku pojedinu vrstu mikroorganizma nije samo nepraktično, već je i ekonomski neprihvatljivo. Stoga se prate neki odabrani reprezentativni mikroorganizmi koje nazivamo indikatorima zagađenja. Teorijski, postoje određena svojstva koje indikatorska skupina mikroorganizama treba zadovoljiti kako bi se pokazala kao idealan pokazatelj zagađenja. Osim što su nepatogeni i pogodni za sve kategorije voda, takvi indikatori prisutni su u otpadnim i zagađenim vodama kad god su prisutni i patogeni te u većem broju. Također, ne umnažaju se u vodama te se mogu lako i brzo detektirati, iako su prisutni u malom broju. Naravno, takav idealan organizam ne postoji. Ipak, neke skupine, kao što su fekalne koliformne bakterije ili crijevni enterokoki, najviše se približavaju prethodno navedenim karakteristikama (Horan 2003). Ukupne koliformne bakterije i *E. coli* koriste se kao pokazatelji potencijalne fekalne kontaminacije gotovo 100 godina (Koirala i sur. 2008). Prisutnost *E. coli* u vodi ukazuje da je voda bila kontaminirana fekalnim materijalom ljudi ili drugih toplokrvnih životinja. U mnogim slučajevima *E. coli* postoji zajedno s patogenim organizmima. Dakle, njezina prisutnost može odražavati prisutnost enteričkih patogena. Ukupni koliformi, s druge strane, ne potječu uvijek iz fekalnih izvora i prirodno su prisutni u okolišu (An i Breindenbach 2005, Brandt i sur. 2017).

1.5. PERZISTENCIJA KOLIFORMNIH BAKTERIJA

1.5.1. PERZISTENCIJA U VODENOM OKRUŽENJU

Jednom ispuštene u vodeni okoliš, koliformne bakterije suočavaju se s brojnim fizičkim, kemijskim i biološkim čimbenicima koji mogu uzrokovati stres, uključujući promjene temperature, salinitet, nedostatak hranjivih sastojaka i grabežljivost. Istraživanja su pokazala kako fekalne koliformne bakterije preživljavaju >260 dana u autoklaviranoj

filtriranoj vodi. Suprotno tome, njihov broj u nefiltriranoj vodi nešto je manji, što ukazuje kako prisutnost predacije može imati veliki utjecaj na preživljavanje koliformnih bakterija u stupcu vode. Također, utvrđeno je kako se porastom temperature povećava stopa odumiranja koliforma, odnosno, niže temperature pogoduju njihovom preživljavanju (Craig i sur. 2004). Nadalje, sedimenti predstavljaju važan rezervoar koliformnih bakterija te se pokazalo da one perzistiraju i da se, u određenoj mjeri, čak i umnažaju u sedimentima. Njihova akumulacija u sedimentima pripisana je adsorpciji na čestice suspendirane u vodi, a koje se potom talože. Tako sediment mogu sadržavati 100 do 1000 puta više bakterija u odnosu na stupac vode. Bakterije adsorbirane na čestice sedimenta mogu se zaštititi od vanjskih utjecaja poput UV zračenja, visoke slanosti, toksičnosti teških metala ili predacije. Pored toga, u stanju su dobiti hranjive tvari povezane s česticama sedimenta (Davies i sur. 1995). U skladu s time, utvrđeno je kako vrsta i svojstva sedimenta također utječu na preživljavanje koliformnih bakterija. Craig i sur. (2004) uočili su bolje preživljavanje *E. coli* u sedimentima koji sadrže visoke udjele gline i hranjivih tvari u usporedbi s pješčanim sedimentima.

1.5.2. PERZISTENCIJA UNUTAR BIOFILMA

Kada govorimo o izvorskoj vodi, nedavna istraživanja (Sampson i sur. 2006) sugeriraju da pijesak ili sediment predstavlja važan rezervoar fekalnih bakterija. Točnije, biofilm formiran u sedimentima podzemnih voda, koji kao takav predstavlja važnu ekološku komponentu bakterijske zajednice. Većina mikroorganizama prisutna je u okolišu u imobiliziranom obliku kao biofilm na česticama supstrata, dok je manji broj bakterija suspendiran u stupcu vode u obliku slobodno plutajućih stanica. Organski i anorganski spojevi biofilma pružaju veće mogućnosti bakterijama da se umnože, a zatim otpuste u stupac vode. Tri su najvažnije komponente koje određuju relativnu ulogu vodenog stupca i biofilma u bakterijskoj populaciji: kolonizacija supstrata, neto proizvodnja bakterija u biofilmu i u vodenom stupcu i oslobađanje bakterija iz biofilma. No, razmjena bakterija između biofilma i vodenog stupca nije stalna. Brzina protoka podzemne vode u vodonosniku može utjecati na kretanje bakterija između staništa na dva načina: 1) fizička sila vode uzrokuje kontinuirani, spori gubitak bakterija iz biofilma; 2) kada je brzina protoka povećana, sedimenti se kreću, što dovodi do oslobađanja bakterija abrazijom (Leff i sur. 1998). Susreti sa supstratima mogu se povećati pri bržem i turbulentnijem toku, ali smanjena duljina kontakta između stanice i supstrata može uzrokovati smanjenje brzine adsorpcije. Sedimenti su prostorno složeni, a sve bakterije koje žive u sedimentima nemaju

jednak pristup vodenom stupcu. Također, unutar sklopa sedimenata mogu postojati različite razine adhezije na podlogu, s tim da je samo mali dio sklopa lako dostupan za odvajanje. Studije razvoja biofilma podržavaju tu mogućnost, tako da se snaga vezanja s vremenom mijenja. U početku se bakterije vežu reverzibilno. S vremenom, međutim, ta vezanost postaje nepovratna. Dok je s jedne strane planktonski način života pogodan za širenje, imobilizirano stanje unutar biofilma s druge je strane pogodno za umnažanje i preživljavanje. Nadalje, postalo je široko poznato da bakterije kao kolonijalni organizmi u biofilmu razrađuju sustave međustanične komunikacije kako bi se olakšala njihova prilagodba promjenjivim uvjetima u okolišu. Otkriveni su brojni reakcijski putevi i signaliziranje posredovano autoinducerskim molekulama što predstavlja oblik komunikacije poznat pod nazivom *quorum sensing*. Proces je povezan sa sintezom signalnih molekula male molekularne mase, čija koncentracija proizlazi iz gustoće naseljenosti organizama koji ih proizvode. Također je pokazano da signalizacija ovisna o gustoći stanica igra važnu ulogu u stvaranju i održavanju strukture biofilma. Nadalje, iskorištavanje organske tvari u vodenim staništima ovisi o interaktivnoj zajednici biofilma, jer postoji mnogo različitih organskih spojeva, od kojih svaki zahtijeva različite enzime za razgradnju. Zapravo, biofilm pruža idealno okruženje za uspostavljanje sintrofičkih odnosa u kojima dvije metabolički različite fiziološke grupe bakterija međusobno ovise jedna o drugoj za korištenje specifičnih supstrata. Tako se sklonost rastu u zaštićenom biofilmu pokazala većom prednosti nego rast u planktonu. U okolišu bakterije unutar biofilma značajno su otpornije na bakteriofage, ameboidne grabežljivce i slobodno živuće praživotinje. Dakle, bakterije u svojim najjednostavnijim planktonskim oblicima mogu dosegnuti vrlo širok raspon ekosustava no, kada uvjeti hranjivih tvari postanu povoljni, njihova fenotipska plastičnost omogućuje bakterijama stvaranje biofilma sa specifičnim metaboličkim sposobnostima koje im omogućuju formiranje kooperativnih konzorcija. Danas je široko priznato da način rasta biofilma prevladava u vodenim ekosustavima, jer se pokazalo da planktonske populacije čine < 0,1% ukupne mikrobne zajednice (Costerton i sur. 1995; World Health Organization 2003).

1.6. INTERAKCIJE KOLIFORMNIH BAKTERIJA

Heterotrofne bakterije predstavljaju raznoliku skupinu mikroorganizama sa širokim spektrom metaboličkih zahtjeva. Kako se prirodno nalaze u izvorskim vodama, dolaze u

interakciju s unesenim koliformnim bakterijama. Iako oskudna, dosadašnja istraživanja pokazala su određenu korelaciju između povećanog broja heterotrofnih bakterija i povećane stope odumiranja koliforma. Naime, za razliku od koliformnih bakterija, heterotrofne bakterije mogu rasti i pri nižim koncentracijama hranjivih tvari što im daje prednost u kompeticiji kada se radi o oligotrofnim vodama kao što su prirodne izvorske vode (Lechevallier i McFeters 1985). Ove tvrdnje potvrdili su Amanidaz i sur. (2015) koji također navode teškoće u detektiranju koliforma u uzorcima vode s povećanim brojem heterotrofnih bakterija. Točnije, kada broj kolonija heterotrofa prelazi 500 - 1000 CFU/ml, smanjuje se mogućnost detekcije koliforma u uzorku. *E. coli* također se nalazi u kompeticiji s drugim bakterijama za izvore hranjivih tvari što potvrđuje istraživanje da su vrste *E. coli* bolje rasle u sterilnom nego u tlu u kojemu su prirodno bili prisutni ostali mikroorganizmi (Jang i sur. 2017). Nadalje, važno je istaknuti kako na genetske osobine *E. coli* utječu okolišni uvjeti u kojima bakterija obitava. U istraživanju Janga i sur. (2017), filogenetskom analizom genoma određenih sojeva *E. coli*, ustanovljeno je da oni sojevi adaptirani na okolišne uvjete bolje preživljavaju u vanjskom okruženju nego u crijevu čovjeka.

1.7. CILJ ISTRAŽIVANJA

Planina Papuk obiluje mnoštvom prirodnih izvorskih voda te zbog njihove pristupačne lokacije uz same planinarske staze, izvori su često mjesto okrijepe planinara, a kako kontaminiranost vode nije isključena može doći do narušavanja zdravlja ljudi. Shodno s time, cilj ovog rada bio je utvrditi, na temelju bakterioloških parametara, da li je uzorkovana izvorska voda prikladna za piće. Kako prirodne izvorske vode mogu biti izložene fekalnom onečišćenju, određivala se sposobnost perzistencije koliformnih bakterija koje su dodane u laboratorijskom eksperimentu u mikrokozmosu s izvorskom vodom. Ispitana je sposobnost stvaranja biofilma bakterija prirodno prisutnih u izvorskoj vodi te bakterija mikrokozmosa inokuliranih samo s izvorskom vodom ili izvorskom vodom dodatno obogaćenom koliformnim bakterijama. Obogaćenim mikrokozmosima se željelo ispitati utječu li dodani koliformi na sposobnost stvaranja biofilma te kakva je njihova perzistencija u mikrokozmosima s različitim izvorskim vodama.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

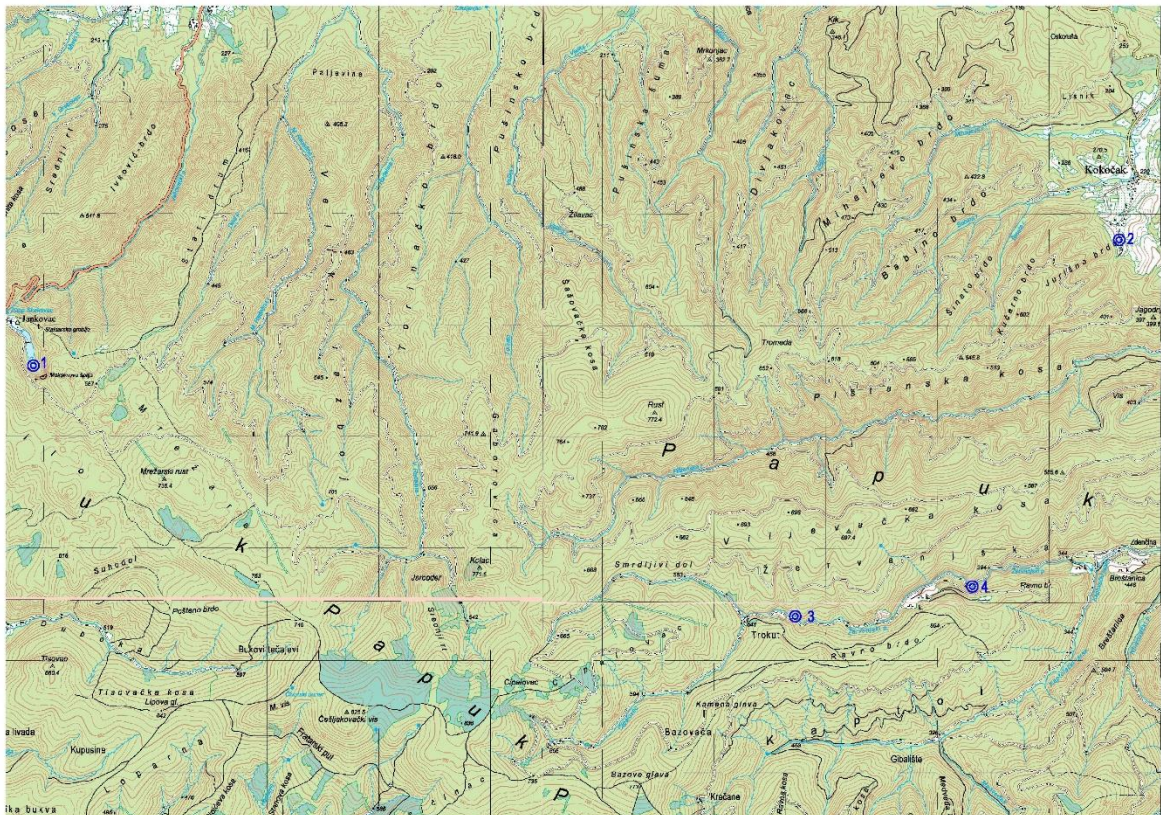
Planina Papuk dio je zapadno-slavonskog gorja istočne Hrvatske. Iako još uvijek relativno neistraženo područje, znamo da obiluje brojnim izvorskim vodama koje su se, kako kroz povijest, tako i danas, pokazale kao vrijedno bogatstvo Papuka. Kao predmet ovog istraživanja odabrana su četiri izvora: Jankovac, 432 m. n. v. (Slika 3a) koji se nalazi uz Grofovu poučnu stazu na području istoimene park-šume Jankovac unutar Parka prirode Papuk; Kokočak (Vučenović), 215 m. n. v. (Slika 3b) koji se nalazi unutar naselja Kokočak te izvori Žervanjska, 428 m. n. v. (Slika 4a) i Muška voda, 549 m. n. v. (Slika 4b) koji izvire unutar šume, a uz makadamsku cestu u blizini eksploatacijskog polja tehničko-građevnog kamena „Žervanjska“ (Slika 5).



Slika 3. a) izvor Jankovac, b) izvor Kokočak (Vučenović)



Slika 4. a) izvor Žervanjska, b) izvor Muška voda



Slika 5. Topografska karta s označenim izvorima Jankovac (1), Kokočak (Vučenović) (2), Žervanjska (3) i Muška voda (4)

2.2. SAKUPLJANJE UZORAKA

Uzorci su prikupljeni u jutarnjim satima 24. rujna 2019. u staklene boce volumena 1 litre koje su prethodno sterilizirane 2,5 h na 160 °C. Nakon toga, transportirani su u prijenosnom hladnjaku te spremljeni u hladnjak laboratorija gdje su stajali do analize koja je uslijedila idućeg dana.

2.3. BAKTERIOLOŠKI PARAMETRI IZVORSKE VODE

U svrhu određivanja broja kolonija ukupnih heterotrofnih bakterija pripremljena su decimalna razrjeđenja uzoraka izvorske vode u sterilnoj fiziološkoj otopini. Metodom izlivanja (*'pour plate'*) 1 ml originalnih uzoraka, kao i razrjeđenja, nasadeni su na hranjivu podlogu (Nutrient agar, Biolife) i stavljeni na inkubaciju od 72 h na 22 °C. Broj kolonija zatim je prikazan kao CFU (engl. *Colony Forming Units*) po 1 ml uzorka izvorske vode.

Za određivanje prisutnosti ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija korištena je metoda membranske filtracije te selektivna i diferencijalna čvrsta hranjiva podloga, Endo agar. Na-sulfit i bazični fuksin u podlozi 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. Stoga, porasle kolonije *E. coli* na Endoagaru imaju zlatno-metalni sjaj, a kolonije drugih koliformnih bakterija različite nijanse ružičaste boje (Hrenović i Šimunović 2010). 100 ml uzorka profiltrirano je kroz sterilni filter od miješanih celuloznih estera, promjera pora 0,2 µm (Merck Millipore). Radi boljeg protoka uzorka vode, neki uzorci su filtrirani kroz dva filtera. Nakon filtracije, filter je otisnut na Endo agar (Merck) tako da je njegova gornja strana okrenuta prema podlozi, a zatim odložen pored otiska donjom stranom okrenutom prema podlozi. Nacijepljeni Endo agari inkubirani su 48 h na 37 °C za određivanje ukupnih koliforma i 24 h na 44,5 °C za određivanje fekalnih koliforma. Svaki uzorak analiziran je u tehničkom duplikatu. U radu su prikazane srednje vrijednosti.

2.4. PERZISTENCIJA KOLIFORMA U MIKROKOZMOSIMA

U svrhu istraživanja perzistencije koliformnih bakterija u izvorskoj vodi, korišteni su mikrokozmosi. Staklene bočice s plastičnim čepom napunjene su s 15 ml kvarcnog pijeska. Kako bi se očistio od potencijalnih nečistoća, pijesak je natopljen sa 6 ml 0,1 M HCl, ostavljen 3 h, a zatim ispran s destiliranom vodom postupkom koji je ponavljan pet puta. Nakon toga, mikrokozmosi su stavljeni u sušionik na 24 h na 105 °C, a zatim sterilizirani u autoklavu na temperaturi od 121 °C i tlaku od 1 bar. U svrhu simulacije fekalnog onečišćenja izvorske vode, u laboratoriju je uzgojena čista kultura jedne kolonije fekalne koliformne bakterije, vjerojatno *E. coli*, koja je na Endo agaru razvila metalni sjaj. Kako bi se mikrokozmosi inokulirali uzgojenom bakterijom, u staklenim, sterilnim epruvetama priređene su suspenzije optičke gustoće 0,98. Mikrokozmosima, koji su inokulirani s 0,6 ml pripremljene suspenzije, dodano je 5,4 ml uzorka izvorske vode. Mikrokozmosi nasađeni sa 6 ml uzorka izvorske vode predstavljali su pozitivnu kontrolu dok oni nasađeni sa 6 ml sterilne destilirane vode predstavljali su negativnu kontrolu. Svaki uzorak rađen je u triplikatu. Nakon nasađivanja, zatvorene bočice mikrokozmosa stavljene su na sedmodnevnu inkubaciju, u mraku, na 22 °C.

Suspenzije stanica iz mikrokozmosa priređene su tako da je u staklenoj epruveti vorteksirano 0,5 g pijeska i 4,5 ml sterilne destilirane vode. Priređena su decimalna razrjeđenja koja su zatim nasađena na hranjive podloge. Metodom izlivanja nasađivalo se na hranjivi agar, nakon čega su uzorci stavljeni na inkubaciju od 72 h na 22 °C. S druge strane, metodom razmazivanja (*'spread plate'*) nasađivalo se na Endo agar, a inkubacija je trajala 24 h na 44,5 °C te 48 h na 37 °C. Na Slici 8. sažeto je prikazan tijek nasađivanja uzoraka izvorske vode.

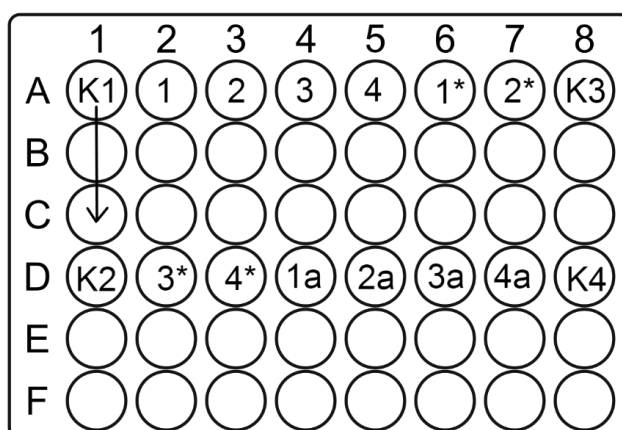
2.5. SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMA KOLIFORMNIH BAKTERIJA

2.5.1. PRIPREMA HRANJIVOG MEDIJA

Kako bi se bakterijama osigurala dovoljna količina nutrijenata i na taj način pospješilo njihovo umnažanje, uzorcima se dodavao prethodno pripremljeni tekući hranjivi medij. Za pripremu 8 ml medija u epruvetu je dodano: 80 μ l glukoze (koncentracije (c) 400 mg/ml), koja predstavlja glavni izvor ugljika, 3,92 ml M63 (4x koncentriran), 4 ml bujona (B:250) i 16 μ l 1 M $MgSO_4 \times 7H_2O$ (O'Toole 2011).

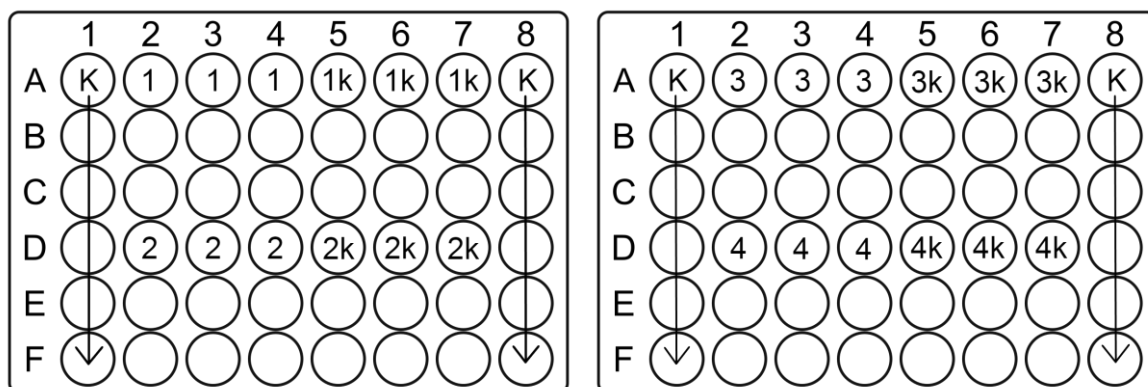
2.5.2. KRISTAL VIOLET TEST

Kristal violet test provodio se na mikrotitarskim pločicama s 48 bunarčića. Kako bi odredili sposobnost formiranja biofilma bakterija prirodno prisutnih u izvorskoj vodi, u jažice je pipetirano: 1. 200 μ l uzorka izvorske vode, 2. 100 μ l uzorka + 100 μ l prethodno pripremljenog hranjivog medija te 3. 180 μ l uzorka + 20 μ l medija. Kontrolu je predstavljalo 200 μ l autoklaviranog uzorka izvorske vode. Shema pipetiranja prikazana je na Slici 6. Nakon inkubacije od 30 h na 37 °C, pločice su isprane vodovodnom vodom, a u jažice je zatim dodana otopina kristal violeta. Nakon 15 min, boja ja isprana vodovodnom vodom te su pločice ostavljene na sušenju na sobnoj temperaturi. Kako bi se otopila i na taj način kvantificirala boja vezana za formirani biofilm, u jažice je dodano 200 μ l 96% etanola. Apsorbancija je mjerena spektrofotometrom (Perkin Elmer, Coleman 572) na 588 nm.

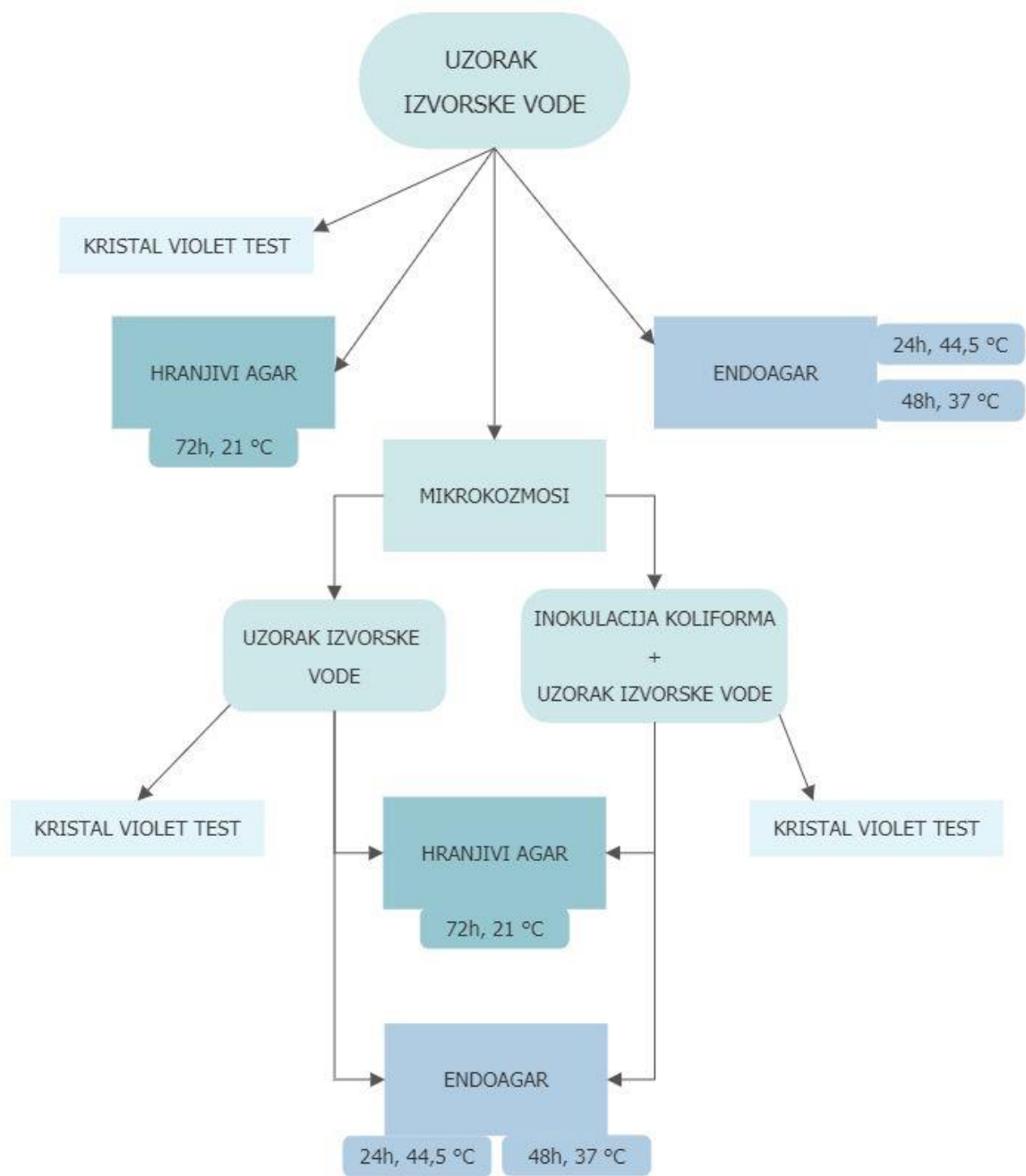


Slika 6. Shema provođenja kristal violet testa na mikrotitarskim pločicama, s uzorcima prirodne izvorske vode. Brojevi 1 - 4 označavaju uzorak izvorske vode (1 – Jankovac, 2 – Kokočak (Vučenović), 3 – Žervanjska, 4 – Muška voda). K1, K2, K3, K4 – 200 μ l autoklavirane izvorske vode; 1, 2, 3, 4 – 200 μ l izvorske vode; 1*, 2*, 3*, 4* - 100 μ l medija + 100 μ l izvorske vode; 1a, 2a, 3a, 4a – 20 μ l medija + 180 μ l izvorske vode

Isti postupak ponovljen je u svrhu određivanja sposobnosti formiranja biofilma uzoraka iz mikrokozmosa. Suspenzije mikrokozmosa pripremljene su tako da je 300 mg pijeska suspendirano u 500 μ l sterilne destilirane vode, koje su zatim pipetirane širokim nastavkom u jažice prema shemi na Slici 7. U ovoj analizi u sve jažice pipetirano je 100 μ l suspenzije iz mikrokozmosa i 100 μ l medija. Kontrolu je predstavljala sterilna destilirana voda.



Slika 7. Shema provođenja kristal violet testa na mikrotitarskim pločicama, na suspenzijama mikrokozmosa. Brojevi 1 - 4 označavaju uzorak izvorske vode (1 – Jankovac, 2 – Kokočak (Vučenović), 3 – Žervanjska, 4 – Muška voda), a slovo K označava kontrolu. 1, 2, 3, 4 – 100 μ l medija + 100 μ l suspenzije iz mikrokozmosa; 1k, 2k, 3k, 4k – 100 μ l medija + 100 μ l suspenzije iz mikrokozmosa koji su prethodno inokulirani koliformnim bakterijama



Slika 8. Hodogram nasadivanja uzoraka izvorske vode

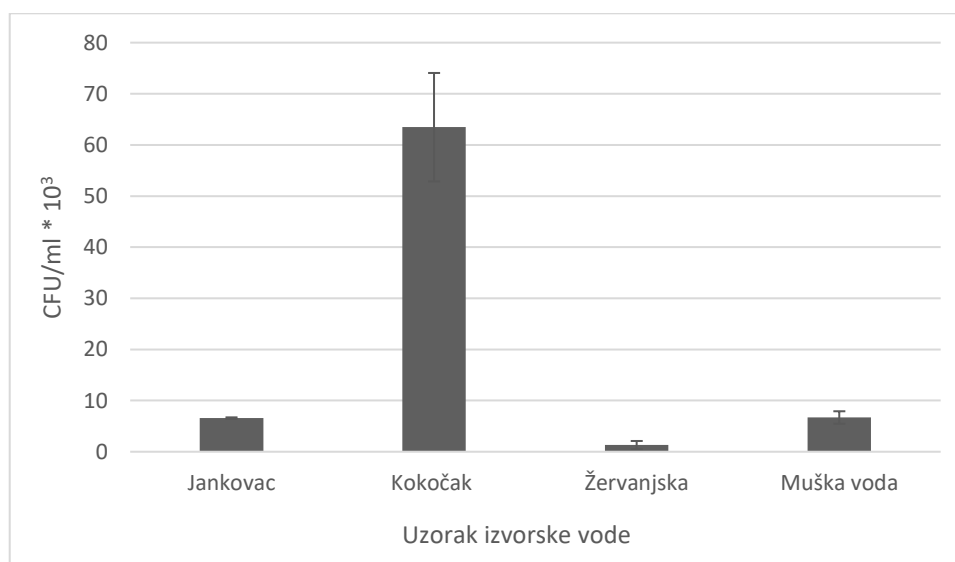
2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Kako bi se utvrdila njihova značajnost, dobiveni rezultati obrađeni su statističkim testovima. Za analizu podataka dobivenih uzgojem bakterija u mikrokozmosima, za pojedini izvor, korišten je t-test. S druge strane, ANOVA testom određivala se značajnost razlike u broju kolonija između izvora. T-test i ANOVA rađeni su u programu Excel (Microsoft Office). Kako bi se utvrdilo između kojih izvora postoji statistički značajna razlika u broju poraslih bakterija, korišten je post hoc Tukey HSD test u programu KyPlot 2.0.

3. REZULTATI

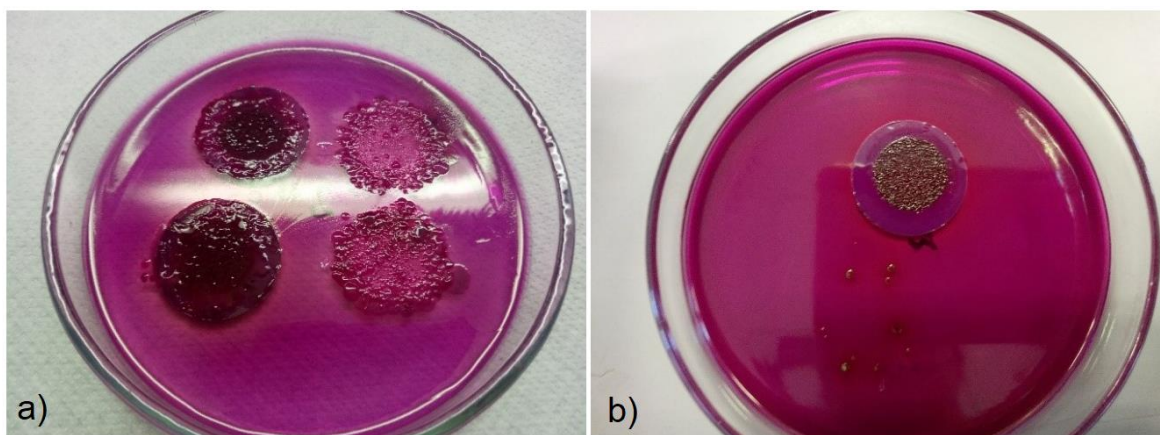
3.1. BAKTERIOLOŠKI PARAMETRI IZVORSKE VODE

Analize hranjivog agara nakon inkubacije od 72 h na 22 °C pokazale su porast kolonija heterotrofnih bakterija na svim uzorkovanim izvorima (Slika 9). ANOVA testom utvrđeno je kako je postojala statistički značajna razlika između mjerenih uzoraka, a Tukey HSD post hoc testom pokazano je kako se broj bakterija u uzorku vode s izvora Kokočak statistički značajno razlikovao od ostalih uzoraka. Točnije, na navedenom izvoru zabilježena je koncentracija bakterija od $6,35 \times 10^4 \pm 1,05 \times 10^4$ CFU/ml. Na ostalim izvorima koncentracija je bila puno manja, pa je tako u uzorku vode s izvora Žervanjska zabilježen najmanji broj heterotrofnih bakterija od $1,3 \times 10^3 \pm 0,8 \times 10^3$ CFU/ml.



Slika 9. Srednja vrijednost i standardna devijacija broja kolonija ukupnih heterotrofnih bakterija u uzorcima izvorske vode

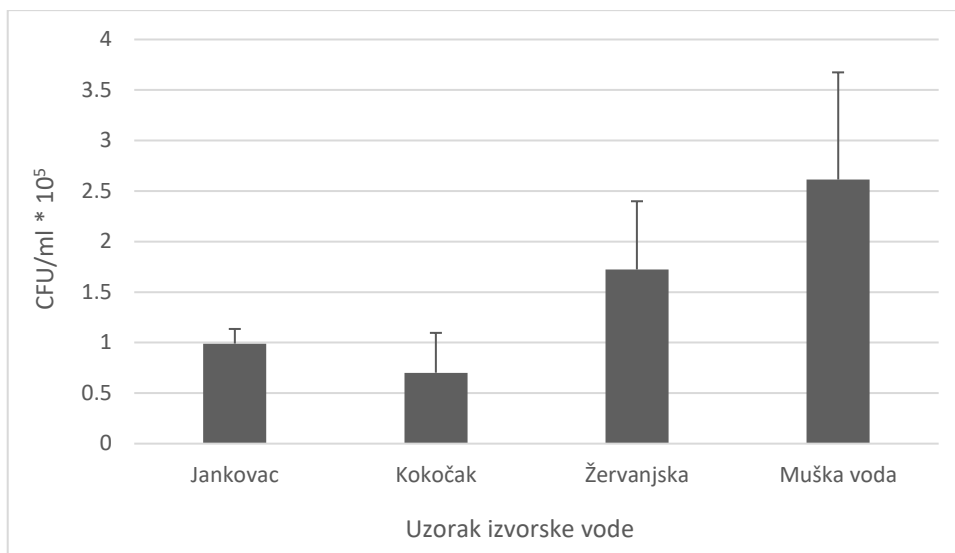
Membranskom filtracijom utvrđena je prisutnost kolonija ukupnih koliformnih bakterija na Endo agaru, nakon inkubacije od 48 h na 37 °C, na svim uzorkovanim izvorima, u broju od više od 500 kolonija u 100 ml uzorka (slika 10a). Nakon inkubacije od 24 h na 44,5 °C, porast kolonija fekalnih koliforma, od kojih su sve razvile metalni sjaj, zabilježen je također na svim uzorkovanim izvorima, no samo na izvoru Kokočak taj je porast bio prevelik da bi se brojao (slika 10b).



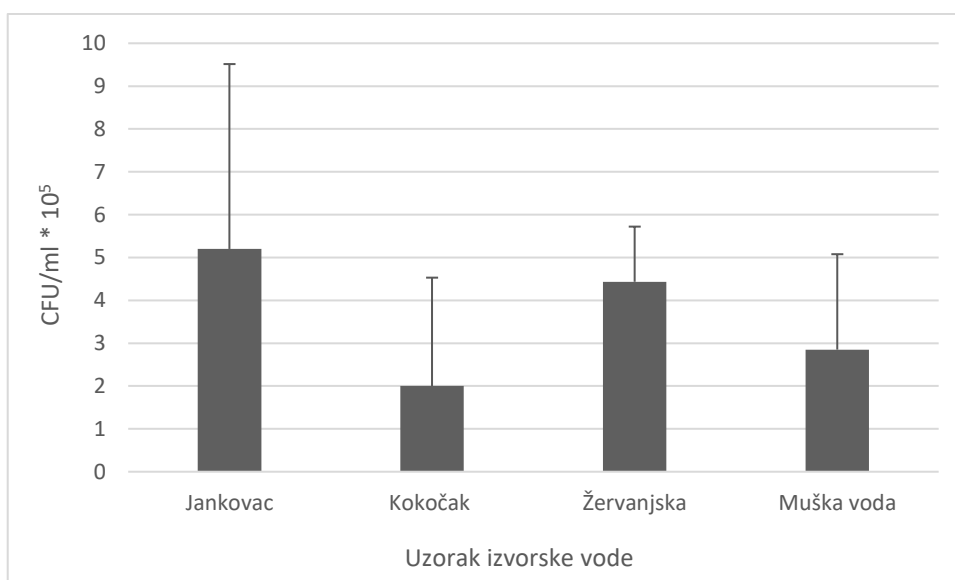
Slika 10. a) Porast kolonija ukupnih koliformnih bakterija na Endo agaru iz uzorka vode s izvora Kokočak, b) porast kolonija fekalnih koliformnih bakterija na Endo agaru iz uzorka vode s izvora Kokočak

3.2. ANALIZE MIKROKOZMOSA

Analizom suspenzija mikrokozmosa rezultati na hranjivom agaru, nakon inkubacije od 72 h na 22 °C, pokazali su porast kolonija heterotrofnih bakterija na svim uzorkovanim izvorima (Slika 11). ANOVA testom utvrđeno je da je postojala statistički značajna razlika između dobivenih rezultata. Najveći porast od $2,6 \times 10^5$ CFU/ml tako je zabilježen na izvoru Muška voda te je Tukey HSD post hoc test pokazao kako se porast broja bakterija na ovom izvoru statistički značajno razlikovao od porasta na ostalim izvorima. Nadalje, analizom rezultata suspenzija mikrokozmosa koji su prethodno inokulirani laboratorijski uzgojenom koliformnom bakterijom, na hranjivom agaru, a nakon inkubacije od 72 h na 22 °C, utvrđen je porast kolonija heterotrofnih bakterija u odnosu na suspenzije mikrokozmosa koji nisu bili inokulirani (Slika 12). U ovoj analizi, ANOVA testom utvrđeno je kako među uzorcima nije postojala statistički značajna razlika. Nadalje, t-testom utvrđeno je da je jedino na izvoru Žervanjska razlika u porastu broja kolonija u prethodno inokuliranim mikrokozmosima, a u odnosu na neinokulirane, bila statistički značajna ($p = 0,0018$).



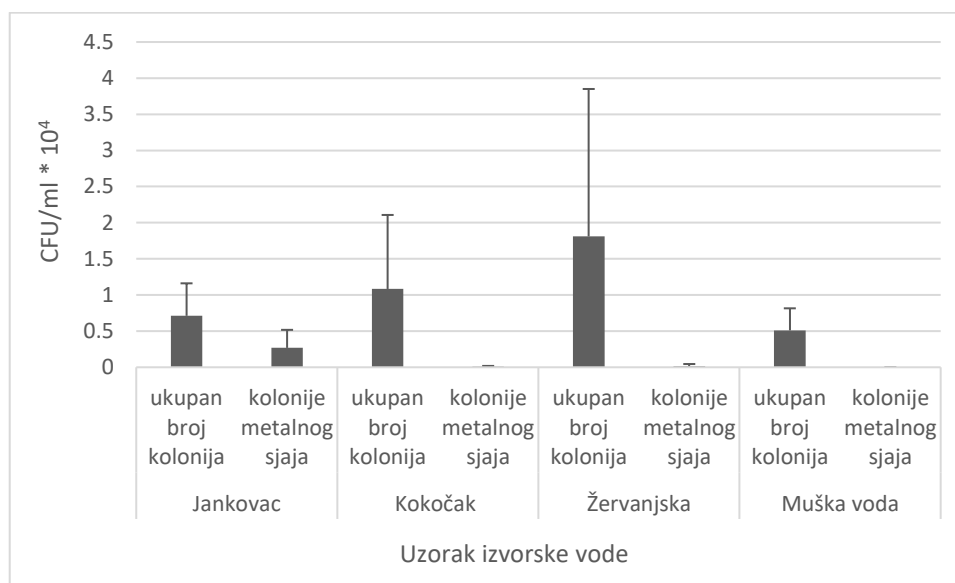
Slika 11. Srednja vrijednost i standardna devijacija broja kolonija na hranjivom agaru nakon nasađivanja uzoraka izvorske vode u mikrokozmoste



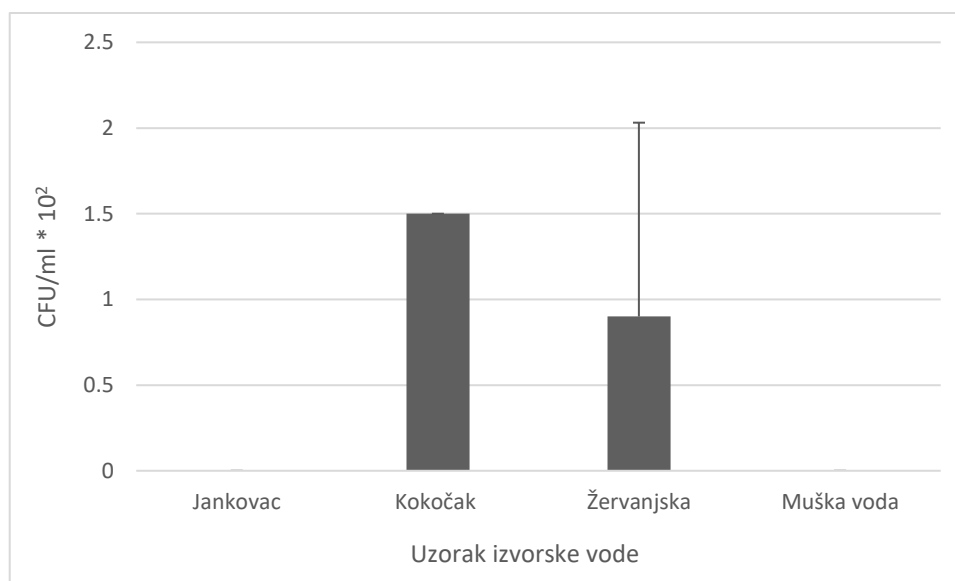
Slika 12. Srednja vrijednost i standardna devijacija broja kolonija na hranjivom agaru nakon nasađivanja uzoraka izvorske vode u mikrokozmoste prethodno inokulirane koliformima

Rezultati suspenzija mikrokozmosa na Endo agaru, nakon dvodnevne inkubacije na 37 °C, pokazali su porast kolonija ukupnih koliformnih bakterija na svim uzorkovanim izvorima, a ANOVA testom utvrđeno je da između uzoraka nije postojala statistički značajna razlika, dok porast kolonija metalnog sjaja nije zabilježen samo na izvoru Muška voda (Slika 13) te je u ovom slučaju razlika bila statistički značajna. Tako se porast kolonija metalnog sjaja u uzorku vode s izvora Jankovac statistički značajno razlikovao u odnosu na porast u

uzorcima vode s ostalih izvora (Tukey HSD post hoc). Nadalje, nakon jednodnevne inkubacije na 44,5 °C, porast kolonija termotolerantnog soja koliformnih bakterija zabilježen je na izvorima Kokočak i Žervanjska (Slika 14) te su sve kolonije razvile metalni sjaj, ANOVA testom utvrđeno je kako nije postojala statistički značajna razlika u porastu kolonija termotolerantnog soja koliforma na uzorkovanim izvorima.

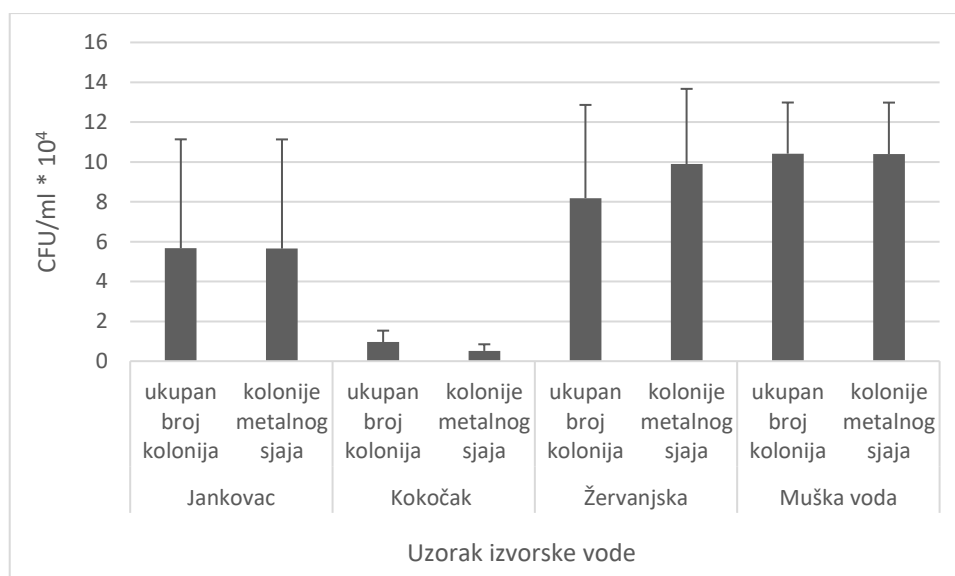


Slika 13. Srednja vrijednost i standardna devijacija broja kolonija ukupnih koliformnih bakterija i kolonija metalnog sjaja na Endo agaru, nakon nasađivanja uzoraka izvorske vode u mikrokozmoste

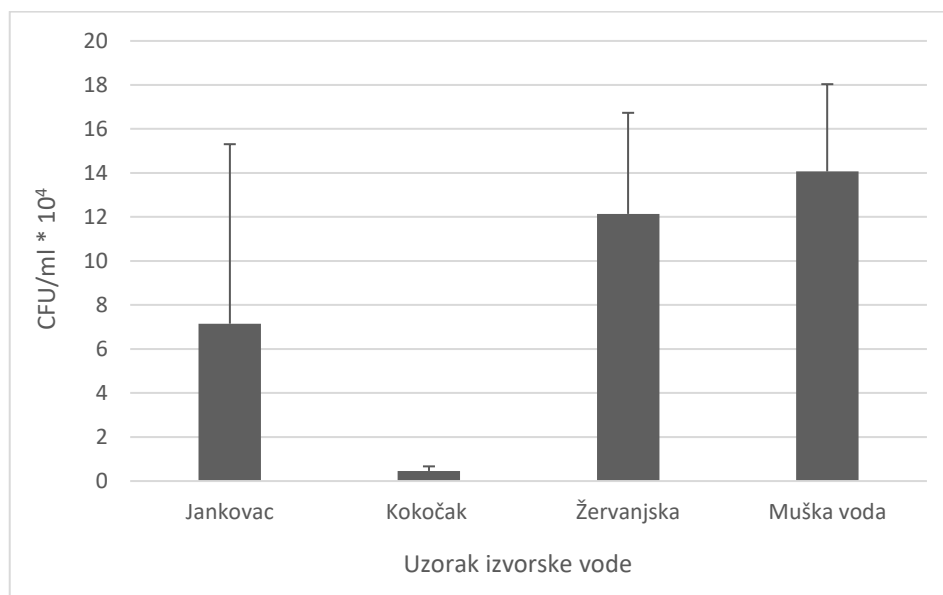


Slika 14. Srednja vrijednost i standardna devijacija broja kolonija fekalnih koliformnih bakterija na Endo agaru, nakon nasađivanja uzoraka izvorske vode u mikrokozmoste

Rezultati suspenzija mikrokozmosa koji su prethodno inokulirani koliformnim bakterijama, na Endo agaru, a nakon inkubacije na 37 °C, pokazali su očekivani porast kolonija ukupnih koliformnih bakterija na svim izvorima, kao i kolonija metalnog sjaja, a u odnosu na rezultate suspenzija mikrokozmosa koji prethodno nisu bili inokulirani koliformima (Slika 15). ANOVA test pokazao je da je postojala statistički značajna razlika između uzoraka u oba slučaja, a Tukey HSD post hoc testom pokazalo se kako se porast kolonija ukupnih koliforma, kao i kolonija metalnog sjaja, na izvoru Kokočak, statistički značajno razlikovao u odnosu na porast na izvorima Žervanjska i Muška voda. T-testom utvrđena je statistički značajna razlika u porastu broja kolonija ukupnih koliforma u prethodno inokuliranim mikrokozmosima, a u odnosu na neinokulirane, samo na izvorima Žervanjska ($p = 0,02$) i Muška voda ($p = 0,0002$). Porast broja kolonija metalnog sjaja nije bio statistički značajan samo na izvoru Jankovac ($p = 0,06$). Nakon inkubacije na 44,5 °C, porast kolonija fekalnih koliforma zabilježen je na svim uzorkovanim izvorima (Slika 16) te se razlika među uzorcima pokazala statistički značajnom (ANOVA), točnije, porast kolonija fekalnih koliforma na izvoru Kokočak statistički se značajno razlikovao u odnosu na porast na ostalim izvorima. Također, sve kolonije bile su metalnog sjaja. Taj porast, u odnosu na neinokulirane mikrokozmose, nije bio statistički značajan samo na izvoru Jankovac (t-test, $p = 0,08$). U Tablici 2 brojčano je prikazan porast kolonija ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija u mikrokozmosima nakon analiza na Endo agaru.



Slika 15. Srednja vrijednost i standardna devijacija broja kolonija ukupnih koliformnih bakterija i kolonija metalnog sjaja na Endo agaru, nakon nasađivanja uzoraka izvorske vode u mikrokozmose prethodno inokulirane koliformima



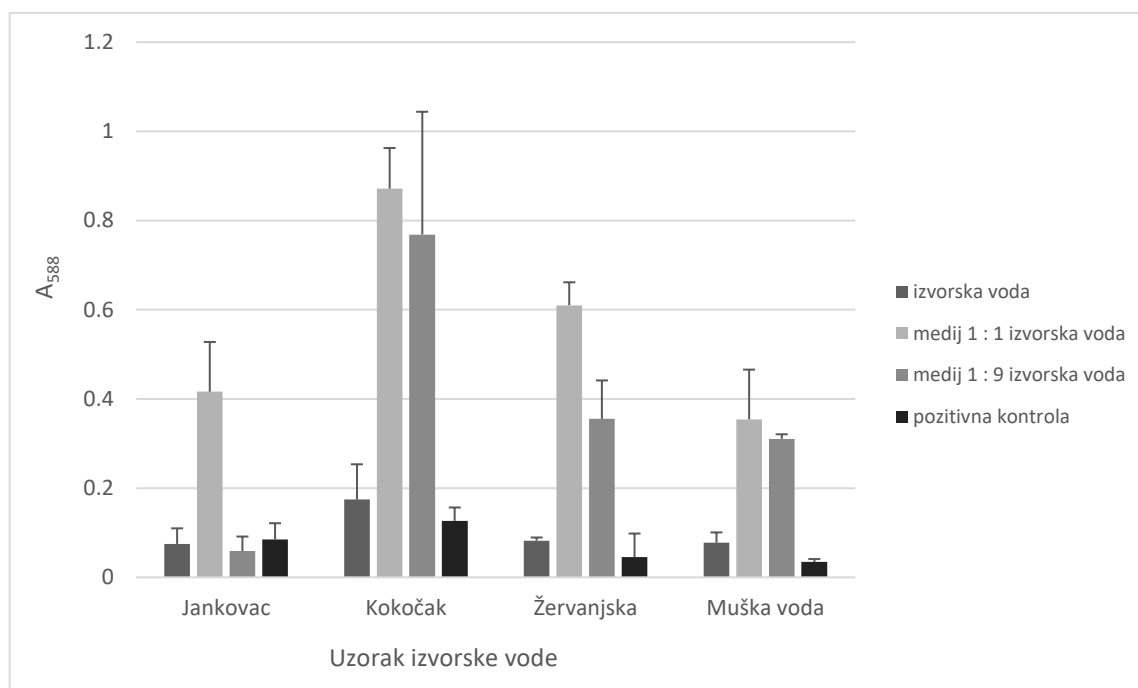
Slika 16. Srednja vrijednost i standardna devijacija broja kolonija fekalnih koliformnih bakterija na Endo agaru, nakon nasađivanja uzoraka izvorske vode u mikrokozmose prethodno inokulirane koliformima

Tablica 2. Koncentracija (CFU/ml) ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija u mikrokozmosima

UZORAK IZVORSKE VODE	MIKROKOZMOSI			MIKROKOZMOSI INOKULIRANI KOLIFORMIMA		
	UKUPNI KOLIFORMI		FEKALNI KOLIFORMI	UKUPNI KOLIFORMI		FEKALNI KOLIFORMI
	ukupne kolonije	kolonije metalnog sjaja	ukupne kolonije (metalni sjaj)	ukupne kolonije	kolonije metalnog sjaja	ukupne kolonije (metalni sjaj)
JANKOVAC	7x10 ³	3x10 ³	0	57x10 ³	57x10 ³	72x10 ³
KOKOČAK	11x10 ³	0.1x10 ³	150	10x10 ³	5x10 ³	5x10 ³
ŽERVANJSKA	18x10 ³	0.1x10 ³	90	82x10 ³	99x10 ³	121x10 ³
MUŠKA VODA	5x10 ³	0	0	104x10 ³	104x10 ³	141x10 ³

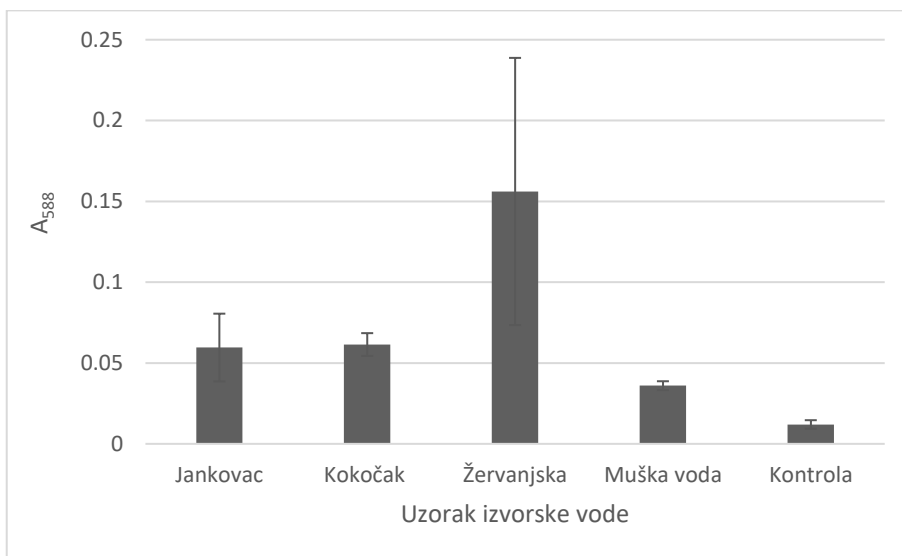
3.3. SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMA

Rezultati kvantifikacije biofilma pokazali su najveću sposobnost formiranja biofilma u uzorku s izvora Kokočak (Slika 17). Analizirajući omjer dodanog medija i uzorka izvorske vode, najveća sposobnost formiranja biofilma u svim uzorcima zabilježena je pri omjeru 1:1.

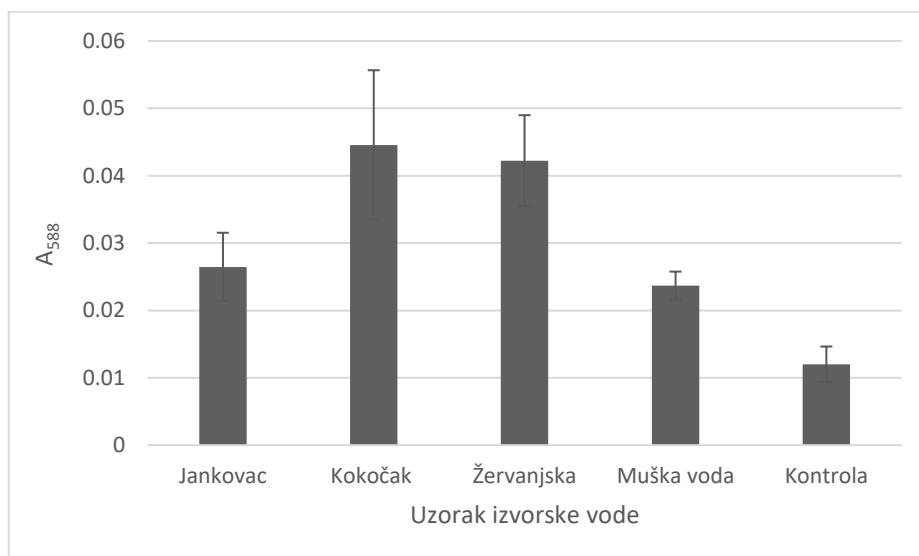


Slika 17. Sposobnost formiranja biofilma autohtonih bakterija prirodne izvorske vode

U suspenzijama mikrokozmosa zabilježena je manja sposobnost formiranja biofilma u usporedbi s uzorcima prirodne izvorske vode. U mikrokozmosima, koji prethodno nisu inokulirani koliformima, najveća sposobnost zabilježena je na izvoru Žervanjska (Slika 18). U mikrokozmosima, koji su prethodno inokulirani koliformima, ta sposobnost bila je manja u usporedbi s prethodnom analizom te je u ovom slučaju najveća sposobnost formiranja biofilma zabilježena na izvoru Kokočak (Slika 19).



Slika 18. Sposobnost formiranja biofilma u mikrokozmosima izvorske vode



Slika 19. Sposobnost formiranja biofilma u mikrokozmosima koji su prethodno inokulirani koliformima

4. RASPRAVA

Kontaminacija podzemne vode fekalnim materijalom predstavlja zdravstveni rizik zbog pojave patogenih mikroorganizama koji su često prisutni u njima. Takva kontaminacija obično se određuje ispitivanjem vode na prisutnost "indikatorskih" bakterija kao što su ukupni koliformi, fekalni koliformi ili bakterija *E. coli*. Koliformne bakterije uvijek su prisutne u netretiranom otpadu ljudi i toplokrvnih životinja, pa se te bakterije koriste za ukazivanje na potencijalnu prisutnost patogena, točnije, koriste se kao indikatori zagađenja vode. U ovom radu istraživala se, prije svega, prisutnost ukupnih heterotrofnih, kao i ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija na četiri odabrana izvora (Jankovac, Kokočak, Žervanjska i Muška voda) kako bi se odredila ispravnost izvorske vode za ljudsku potrošnju i upotrebu. Analize rezultata na hranjivom agaru, koji su nasadeni odmah po dolasku s terena, pokazale su porast kolonija ukupnih heterotrofnih bakterija kao i porast kolonija koliforma na svim uzorkovanim izvorima, pri čemu se taj porast na izvoru Kokočak značajno razlikuje u odnosu na druge izvore. Prema članku 13. Pravilnika o prirodnim mineralnim, prirodnim izvorskim i stolnim vodama (NN 85/2019) ukupni broj mikroorganizama sposobnih za umnažanje u prirodnoj izvorskoj vodi mora biti manji od 20 CFU/ml, poraslih pri temperaturi 20 – 22 °C u vremenu od 72 sata. Nadalje, prema članku 14. ovog Pravilnika, izvorska voda ne smije sadržavati bakteriju *E. coli* i druge koliformne bakterije te crijevne enterokoke, u bilo kojem ispitanom uzorku od 250 ml. Kako je na svim uzorkovanim izvorima broj ukupnih heterotrofnih bakterija prelazio dopuštene vrijednosti te s obzirom da je na svim izvorima zabilježen porast koliformnih bakterija, voda s ovih izvora smatra se neprikladnom za piće. Ovi podatci razlikuju se od prethodnog mjerenja iz 2018. godine (Iličić i Palijan 2019) kada je utvrđeno da, prema broju ukupnih heterotrofa i prisutnosti koliforma u uzorku, samo voda s izvora Kokočak nije prikladna za piće, dok su izvori Jankovac, Žervanjska i Muška voda zadovoljavali propise Pravilnika (NN 85/2019). Navedene razlike mogu se objasniti obilnom jesenskom kišom koja je prethodila uzorkovanju ovog istraživanja. Tako je na dan prije uzorkovanja, prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda, zabilježena količina padalina od 72,9 mm za izvore Kokočak, Žervanjska i Muška voda, dok je za izvor Jankovac zabilježena količina od 38,2 mm. U veljači 2018. godine, kada je provedeno prethodno istraživanje te su količine iznosile 5,7 mm za izvore Kokočak, Žervanjska i Muška voda te 9,2 mm za izvor Jankovac. Padaline su odgovorne za transport mikroorganizama iz površinskih ili prizemnih izvora u podzemne vode. Dolazi do ispiranja mikroorganizama s

površina izravno ili neizravno (npr. širenje aerosola, otjecanje oborinskih voda) u tlo, nakon čega slijedi infiltracija u podzemne vode. U istraživanju koje su proveli An i Breindenbach (2005) zabilježen je nagli porast broja koliformnih bakterija u prirodnoj izvorskoj vodi u mjesecu kolovozu, a kao posljedica obilne kiše koja je uzrokovala infiltraciju bakterija iz tla. Mnoga istraživanja potvrđuju navedene rezultate pa su tako Elisante i Muzuka (2016) zabilježili porast fekalnih koliforma u podzemnoj vodi tijekom kišnijeg perioda u godini, kao i Godfrey i sur. (2005) koji su najveću razinu kontaminacije zabilježili odmah nakon prve obilne kiše u mjesecu studenom. Također, Koirala i sur. (2008), koji su istraživali sezonske razlike u koncentraciji ukupnih koliforma u potocima kao i njihovu perzistenciju, utvrdili su da su ukupne koncentracije koliforma veće u ljetnim mjesecima, a niže u zimskim mjesecima. Točnije, tijekom povećanog protoka uslijed povećane količine oborina, dolazi do resuspendiranja koliforma, a to rezultira povećanom koncentracijom u stupcu vode. Zaključno, sugeriraju na dugotrajnu perzistenciju koliforma koji su podrijetlom iz podzemne vode dok kratkotrajnu perzistenciju pripisuju onim koliformima koji su uneseni putem povećane precipitacije.

Kako bi se simuliralo stanište u kojem su mikroorganizmi izvorske vode bili prije izviranja, pripremljeni su mikrokozmosi napunjeni pijeskom. Takvi mikrokozmosi osigurali su uvjete podzemne vode u kojoj su oni bili u neprestanom kontaktu sa čvrstom anorganskom tvari. Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajan porast ukupnih heterotrofnih bakterija u mikrokozmosima na svim uzorkovanim izvorima. Porast ukupnih koliformnih bakterija također je zabilježen ali u nešto manjem broju u odnosu na ukupne heterotrofne bakterije što je u skladu s očekivanjima s obzirom na selektivnost podloge. Nadalje, fekalni koliformi nisu zabilježeni na izvorima Jankovac i Muška voda iako je membranskom filtracijom utvrđena njihova prisutnost u izvorskoj vodi. U ovom slučaju nije došlo do perzistencije koliforma na navedenim izvorima, unatoč velikom porastu ukupnih heterotrofnih bakterija na hranjivom agaru, s obzirom da se radi o starijem zagađenju koje je kiša isprala iz gornjih slojeva u podzemnu vodu. Ovi rezultati u skladu su s literaturnim navodima o boljem preživljavanju bakterija u sedimentima u odnosu na stupac vode. Tako su Craig i sur. (2004) u svom istraživanju utvrdili povećanu koncentraciju fekalnih koliforma nakon događaja obilne kiše, a koja je dostigla slične vrijednosti i u stupcu vode i u sedimentu. Dva dana nakon kiše, koncentracija koliforma bila je oko sto puta veća u sedimentu u usporedbi s vodom i iako je nakon pet dana voda zadovoljavala propisane standarde za upotrebu, koncentracije u sedimentu i dalje su bile prevelike. Ovi rezultati sugeriraju da se mikroorganizmi koji se unose u okoliš mogu

akumulirati u sedimentu, a što dovodi do povećane sposobnosti preživljavanja u istom. Sampson i sur. (2006), koji su istraživali sposobnost preživljavanja *E. coli* pri različitim temperaturama, utvrdili su kako je upravo prisutnost pijeska usporila brzinu kojom se broj *E. coli* smanjivao, što ukazuje da pijesak može produžiti preživljavanje. Osim što predstavlja stanište u kojem su bakterije manje izložene stresnim uvjetima i na taj način osigurava bolje preživljavanje, sediment također podržava umnažanje bakterija. Marino i Gannon (1991) potvrdili su ovu hipotezu budući da su se populacije fekalnih indikatorskih bakterija održavale u visokim gustoćama u prisutnosti konstantne predacije i kompeticije / antagonizma i bez značajnih unosa hranjivih tvari. Također navode minimalni učinak abiotičkih faktora na njihovo preživljavanje.

Inokulacijom mikrokozmosa prethodno uzgojenom kulturom koliforma pokušao se simulirati događaj fekalnog onečišćenja izvorske vode, a u svrhu istraživanja perzistencije unesenih koliforma. Analizom rezultata na hranjivom agaru zabilježen je povećani porast ukupnih heterotrofnih bakterija, kao i ukupnih i fekalnih koliforma, a u odnosu na neinokulirane mikrokozmoze, što je u skladu s očekivanjima zbog prethodno dodanih koliforma. Analizom rezultata utvrđeno je kako porast broja ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija na izvoru Jankovac, a nakon inokulacije mikrokozmosa, nije statistički značajan što sugerira na nemogućnost perzistencije inokuliranih koliforma na ovom izvoru. Na izvoru Kokočak, broj poraslih kolonija nakon inokulacije koliforma nije se značajno promijenio što također sugerira na nemogućnost perzistencija unesenih koliforma. Nadalje, na izvoru Muška voda, iako je zabilježena nemogućnost perzistencije koliforma starijeg fekalnog zagađenja koje je u podzemnu vodu dospjelo ispiranjem tla za vrijeme obilne kiše, utvrđena je perzistencija koliforma recentnog, laboratorijski simuliranog zagađenja. U prethodnom istraživanju, na izvoru Muška voda, zabilježen je porast koliformnih bakterija na Endo agaru ali ne i porast kolonija metalnog sjaja te je zaključeno kako koliformne bakterije koje su unesene u mikrokozmoze ne mogu perzistirati na ovom izvoru, a kao posljedica interakcije s heterotrofnim bakterijama. U skladu s idejom prehrambenih interakcija navodi se kompeticija između heterotrofnih i koliformnih bakterija za ograničene esencijalne hranjive tvari. Heterotrofne bakterije mogu rasti i pri nižim vrijednostima dostupne hranjive tvari, za razliku od koliforma, što im daje prednost u kompeticiji (LeChevallier i sur. 1980). Ovom se hipotezom također može objasniti nemogućnost perzistencije koliforma starijeg fekalnog zagađenja koje su na izvor Muška voda, u ovom uzorkovanju, dospjeli uslijed događaja obline kiše. Također, hipotezom prehrambenih interakcija možemo objasniti i nemogućnost perzistencije

unesenih koliforma na izvoru Kokočak, s obzirom da su rezultati analize mikrokozmosa pokazale porast ukupnih heterotrofnih bakterija kada porast koliforma nije bio značajan. LeChevallier i sur. (1980) navode nisku stopu rasta koliformnih bakterija kada je u vodi utvrđena visoka koncentracija ukupnih heterotrofa. Suprotno tome, kada je koncentracija heterotrofa bila niska (manje od 20% ukupnog broja bakterija), zabilježena je veća učestalost koliforma (75%). Amanidaz i sur. (2015) podupiru ovu tvrdnju te navode kako organizmi poput bakterija roda *Pseudomonas* i *Flavobacterium* mogu spriječiti rast ukupnih koliformnih bakterija tj. spriječiti opaženu proizvodnju plina tijekom fermentacije laktoze u tekućim medijima, ali i ograničiti rast koliforma na Endo agaru, te na taj način onemogućiti detekciju koliformnih bakterija u uzorku vode.

Biofilm predstavlja ekološki rezervoar patogenih mikroorganizama i, kao takav, potencijalni izvor onečišćenja vode. Dosadašnja istraživanja pokazala su da, u usporedbi s planktonskim organizmima, fekalni oportunistički patogeni mogu duže preživjeti i imati veću otpornost na nepovoljne uvjete kada su zaštićeni unutar biofilma (Aberrrton i sur. 2016). Ti se mikroorganizmi mogu integrirati u postojeći biofilm, u kojem opstaju danima, tjednima ili čak i dulje, ovisno o biologiji i ekologiji organizma i uvjetima okoline, ali mogu formirati i novi biofilm. U ovom radu ispitala se sposobnost bakterija izvorske vode i bakterija suspenzija mikrokozmosa da formiraju biofilm u sedimentima podzemne vode. Na svim izvorima zabilježena je veća sposobnost formiranja biofilma ukupnih heterotrofnih bakterija, u odnosu na inokulirane koliformne bakterije. Također, ta sposobnost bila je značajno veća kada je rast bakterija potpomognut dodanim hranjivim medijem. Aberrrton i sur. (2016) pokazali su da se monokulture *E. coli*, pod uvjetima povećanog stresa, mogu pričvrstiti na površinu i umnožiti se, stvarajući biofilm, samo uz dodatak hranjivog medija, a što nije bio slučaj s bakterijama iz uzorka vode bez dodanog medija. Nadalje, rezultati kvantifikacije biofilma podupiru zaključak o nemogućnosti perzistencije inokuliranih koliforma na izvoru Jankovac, s obzirom na njihovu malu sposobnost formiranja biofilma. Veća sposobnost formiranja biofilma inokuliranih koliforma na izvoru Kokočak s druge strane, predstavlja rizik kada je u pitanju konzumacija izvorske vode uzimajući u obzir da se navedeni izvor nalazi u samom središtu istoimenog naselja. Uz povećani broj ukupnih heterotrofnih i koliformnih bakterija u samom uzorku vode s ovoga izvora, dodatan izvor koliformnih, a samim time i potencijalnih patogenih bakterija predstavlja formirani biofilm u sedimentu podzemne vode.

Koncept koliformnih bakterija kao pokazatelja fekalnog zagađenja čest je i redovit predmet rasprave jer niti jedna skupina mikroorganizama u potpunosti ne zadovoljava teorijske kriterije savršenog pokazatelja. Pouzdanost *E. coli* kao indikatora dovedena je u pitanje izvješćima (Ishii i Sadowsky 2008, Jang i sur. 2017) o dugoročnom preživljavanju ove bakterije u tlima, sedimentima i vodi. Dugo se smatralo da *E. coli* ne može opstati izvan domaćina, a kao posljedica nemogućnosti umnažanja u okolišu. Međutim, nedavna istraživanja (Brennan i sur. 2010, Pachepsky i Shelton 2011, Abberton i sur. 2016) pokazala su da ova bakterija može dugo preživjeti izvan crijevnog trakta i umnažati se u tlu, pijesku i sedimentu. Neki sojevi *E. coli* mogu se naturalizirati te je sada ova bakterija prepoznata kao dio autohtonih bakterijskih zajednica u pijesku, tlu, sedimentima, kao i sastavni dio mikroflore makrofitskih algi i perifitona (Jang i sur. 2017). Zbog toga, prisutnost okolišne *E. coli* u uzorku može dovesti u pitanje metodu za ispitivanje kakvoće vode u kojoj se ona koristi kao indikator fekalnog onečišćenja. Mnoga istraživanja provedena su u svrhu pronalaska pouzdanijih indikatora kvalitete vode za piće, pa se kao alternativni indikatori navode crijevni enterokoki, spore bakterijske vrste *Clostridium perfringens* te F+ specifični kolifagi (Edberg i sur. 2000, Leclerc i sur. 2000). Crijevni enterokoki poslužili bi samo kao dodatni indikatori uz *E. coli*, a ne kao zamjena iz razloga što se u fekalijama nalaze u puno manjem broju. No, postavlja se pitanje hoće li potrebni dodatni troškovi dovesti do zadovoljavajuće zdravstvene zaštite kako bi opravdali njihovo uključivanje kao obveznih mikrobioloških parametara prilikom ispitivanja kakvoće vode za piće. Nadalje, spore *C. perfringens* izuzetno su dugovječne. Zapravo, njihov dug životni vijek je glavna prepreka njihovoj upotrebi kao uobičajenog pokazatelja fekalne kontaminacije jer nadživljavaju sve poznate patogene. S obzirom da u stanju mirovanja mogu preživjeti godinama, pronalazimo ih u uzorcima tla i bez fekalne kontaminacije (Stelma 2018). No, upravo zbog njihove dugovječnosti, pokazalo se da su spore *C. perfringens* najatraktivnije kao pokazatelji zagađenja podzemne vode (Edberg i sur. 2000). Međutim, zbog velikih troškova izvođenja testova za njihovu detekciju, nisu usvojeni kao indikatori fekalnog onečišćenja. F+ kolifagi su bakteriofagi specifični za vrstu *E. coli*, iako postoje dokazi da se mogu umnažati i u drugim vrstama ne-fekalnog podrijetla, poput *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter cloacae* (Edberg i sur. 2000). Iako potencijalni pokazatelji zagađenja podzemnih voda, u kojima mogu preživjeti i do nekoliko tjedana (Leclerc i sur. 2000), zbog nedostatka stabilnog domaćina te nedostatka jeftine, brze i jednostavne metode, nisu prihvaćeni kao indikatori fekalnog onečišćenja. Iako trenutne metode utvrđivanja ispravnosti vode za piće, koje su propisane Pravilnikom, ne uključuju

genetsko razlikovanje *E. coli*, a što bi omogućilo utvrđivanje njezinog fekalnog ili okolišnog porijekla, ova bakterija najpraktičniji je indikator fekalnog onečišćenja. Prisutna je u velikom broju u fekalijama svih sisavaca, a metode detekcije su jeftine, jednostavne i specifične. Kako bi se postigla maksimalna moguća zaštita ljudskog zdravlja, potrebno je provoditi kontinuirani monitoring vode koja se koristi za piće, a daljnja istraživanja u smjeru razvoja novih indikatora fekalnog onečišćenja i metoda izravne detekcije patogena, potrebna su kako bi se poboljšala potvrda zdravstvenog rizika kao i identifikacija izvora zagađenja.

5. ZAKLJUČAK

Prema provedenim mikrobiološkim analizama i prema Pravilniku o prirodnim mineralnim, prirodnim izvorskim i stolnim vodama (NN 85/2019), utvrđeno je da niti jedan od četiri uzorkovana izvora nije prikladan za piće, s obzirom na prisutnost koliformnih bakterija u svim uzorcima, kao i prekomjeren broj ukupnih heterotrofnih bakterija. Uzgoj u mikrokozmosima rezultirao je povećanjem ukupnog broja bakterija od više redova veličine u svim uzorcima izvorske vode. Porast fekalnih koliformnih bakterija nije zabilježen samo na izvoru Muška voda što sugerira na nemogućnost perzistencije koliforma starijeg fekalnog zagađenja. Nadalje, koliformi inokulirani u mikrokozmose povećali su ukupan broj kolonija bakterija na hranjivom agaru kao i na Endo agaru. Inokulirani koliformi nisu perzistirali na izvoru Jankovac, a sukladno s time, imali su i najmanju sposobnost formiranja biofilma u mikrokozmosima s ovog izvora. Također, nisu perzistirali na izvoru Kokočak, unatoč većoj sposobnosti formiranja biofilma.

6. LITERATURA

Abberton, C. L., Bereschenko, L., van der Wielen, P. W. J. J., Smith, C. J. (2016): Survival, biofilm formation, and growth potential of environmental and enteric *Escherichia coli* strains in drinking water microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, **82**(17): 5320–5331.

Amanidaz, N., Zafarzadeh, A., Mahvi, A. H. (2015): The interaction between heterotrophic bacteria and coliform, fecal coliform, fecal streptococci bacteria in the water supply networks. *Iranian Journal of Public Health*, **44**(12): 1685–1692.

An, Y. J., Breindenbach, G. P. (2005): Monitoring *E. coli* and total coliforms in natural spring water as related to recreational mountain areas. *Environmental Monitoring and Assessment*, **102**(1–3): 131–137.

Aung, T. S., Rayaji, S. J. B., Oo, K. S., Lin, Z., Masandid, H. (2016): The Study on the Survival of *Escherichia Coli* in Water at Room Temperature. *Borneo Journal of Medical Sciences*, **10**: 14-18.

Aydin, A. (2007): The microbiological and physico-chemical quality of groundwater in West Thrace, Turkey. *Polish Journal of Environmental Studies*, **16**(3): 377–383.

Bitton, G. (2005): *Wastewater Microbiology: Third Edition*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.

Bogosian, G., Sammons, L. E., Morris, P. J. L., O'Neil, J. P., Heitkamp, M. A., Weber, D. B. (1996): Death of the *Escherichia coli* K-12 Strain W3110 in Soil and Water. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(11): 4114–4120.

Borenshtein, D., Schauer, D. B. (2006): *The Prokaryotes, Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Dworkin, M. (ur.) *The Genus Citrobacter*. New York, Springer, str. 90–98.

Brandt, M. J., Johnson, K. M., Elphinston, A. J., Ratnayaka, D. D. (2017): Twort's Water Supply. Chemistry, Microbiology and Biology of Water. IWA Publishing, London, str. 235-321.

Brennan, F. P., Abram, F., Chinalia, F. A., Richards, K. G., O'Flaherty, V. (2010): Characterization of Environmentally Persistent *Escherichia coli* Isolates Leached from an Irish Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7): 2175–2180.

Brisse, S., Grimont, F., Grimont, A. D. P. (2006): The Prokaryotes, Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. Dworkin, M. (ur.) *The Genus Klebsiella*. New York, Springer, str. 159–196.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. (1995): Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49: 711–745.

Craig, D. L., Fallowfield, H. J., Cromar, N. J. (2004): Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5): 922–930.

Davies, C. M., Long, J. A. H., Donald, M., Ashbolt, N. J. (1995): Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5): 1888–1896.

Dekić, S., Hrenović, J. (2017): Bakteriološka analiza izvorske vode uz najpoznatija izletišta Parka prirode Medvednica. *Hrvatske Vode*, 25(99): 13–16.

Edberg, S. C., Rice, E. W., Karlin, R. J., Allen, M. J. (2000): *Escherichia coli*: The best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 88(29): 106-116.

Elisante, E., Muzuka, A. N. N. (2016): Sources and seasonal variation of coliform bacteria abundance in groundwater around the slopes of Mount Meru, Arusha, Tanzania. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188: 395.

Freeze, A. R., Cherry, J. A. (1979): Groundwater. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (2005): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Second Edition. Volume Two: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Springer, New York.

Godfrey, S., Timo, F., Smith, M. (2005): Relationship between rainfall and microbiological contamination of shallow groundwater in Northern Mozambique. Water SA, **31**(4): 609–614.

Gordon, D. M. (2004): The Influence of Ecological Factors on the Distribution and the Genetic Structure of *Escherichia coli*. EcoSal Plus, **1**(1).

Gregory, S., West, J. M., Maurice, L., Goody, D. C. (2014): Microbial communities in UK aquifers: Current understanding and future research needs. Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology, **47**: 145-157.

Henze, M., van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A., Brdjanovic, D. (2015): Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design. IWA Publishing, London.

Horan, N. J. (2003): Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Mara, D. (ur.) Faecal indicator organisms, Academic Press, str. 105–112.

Hrenović, J., Milenković, J., Ivanković, T., Rajić, N. (2012): Antibacterial activity of heavy metal-loaded natural zeolite. Journal of Hazardous Materials, 201-202, 260-264.

Hrenović, J., Šimunović, S. (2010): Pogodnost komercijalnih krutih hranjivih podloga za kultivaciju ukupnih koliformnih bakterija iz površinskih voda. Hrvatske vode, **18**(71): 35-40.

Iličić, D., Palijan, G. (2019): Perzistencija koliformnih bakterija u mikrokozmosima izvorske vode. Hrvatske vode, **27**(109): 193-200.

Ishii, S, Sadowsky, M. J. (2008): *Escherichia coli* in the environment: Implications for water quality and human health. *Microbes and Environments*, **23**(2): 101–108.

Iversen, C. (2014): *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. Batt, C. A., Tortorello, M. L. (ur.) Electrical techniques - Enterobacter. Academic Press, str. 653-658.

Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yans, T., Ishii, S. (2017): Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, **123**: 570-581.

Koirala, S. R., Gentry, R. W., Perfect, E., Schwartz, J. S., Sayler, G. S. (2008): Temporal Variation and Persistence of Bacteria in Streams. *Journal of Environmental Quality*, **37**(4): 1559–1566.

Lechevallier, M. W., Mcfeters, G. A. (1985): Interactions between Heterotrophic Plate Count Bacteria and Coliform Organisms. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**(5): 1338-1341.

LeChevallier, M. W., Seidler, R. J., Evans, T. M. (1980): Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, **40**(5): 922–930.

Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V., Delattre, J. M. (2000): Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *Journal of Applied Microbiology*, **88**(1): 5–21.

Leff, L. G., McArthur, J. V., Shimkets, L. J. (1998): Persistence and dissemination of introduced bacteria in freshwater microcosms. *Microbial Ecology*, **36**(2): 202–211.

Liu, D. (2015): *Molecular Medical Microbiology*. Tang, Y.-W. (ur.) Superficial Gastrointestinal Infections: A Clinical Overview, Academic Press, str. 1127-1131.

Marino, R. P., Gannon, J. J. (1991): Survival of fecal coliforms and fecal streptococci in storm drain sediment. *Water Research*, **25**(9): 089–1098.

Narodne novine (2019): Pravilnik o prirodnim mineralnim, prirodnim izvorskim i stolnim vodama, NN 85/2019.

O'Toole, G. A. (2011): Microtiter dish Biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, **47**: 2437.

Pachepsky, Y. A., Shelton, D. R. (2011): *Escherichia Coli* and Fecal Coliforms in Freshwater and Estuarine Sediments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **41**(12): 1067-1110

Patel, A. K., Singhania, R. R., Pandey, A., Joshi, V. K., Nigam, P. S., Soccol, C. R. (2014): *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. Batt, C. A., Tortorello, M. L. (ur.) Enterobacteriaceae, coliforms and *E. coli* – Introduction. Academic Press, str. 659-666.

Riđanović, J. (1993): Hidrogeografija: Drugo izdanje. Školska knjiga, Zagreb.

Sampson, R. W., Swiatnicki, S. A., Osinga, V. L., Supita, J. L., McDermott, C. M., Kleinheinz, G. T. (2006): Effects of temperature and sand on *E. coli* survival in a northern lake water microcosm. *Journal of Water and Health*, **4**(3): 389–393.

Sheldon, J. R., Yim, M.-S., Saliba, J. H., Chung, W.-H., Wong, K.-Y., Leunga, K. T. (2012): Role of rpoS in *Escherichia coli* O157:H7 Strain H32 Biofilm Development and Survival. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(23): 8331–8339.

Stelma, Jr. N. G. (2018): Use of bacterial spores in monitoring water quality and treatment. *Journal of Water & Health*, **16**(4): 491–500.

Stilinović, B., Hrenović, J. (2009): Praktikum iz bakteriologije. Kugler, Zagreb, p. 199.

Šafarek, G. (2016): Priroda Hrvatske, Mozaik knjiga, Zagreb.

van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., Trevors, J. T. (2011): Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME Journal*, **5**: 173–183.

White, W. B. (2010): Groundwater Hydrology of Springs. Krešić, N., Stevanović, Z. (ur.)
Springwater geochemistry: First edition, Elsevier Inc.

World Health Organization (2003): Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety.
IWA Publishing, London.

Yin, Z., Yuan, C., Du, Y., Yang, P., Qian, C., Wei, Y., Zhang, S., Huang, D., Liu, B.
(2019): Comparative genomic analysis of the *Hafnia* genus reveals an explicit evolutionary
relationship between the species *alvei* and *paralvei* and provides insights into
pathogenicity. BMC Genomics, **20**(1): 1–16.

WEB IZVORI:

Web 1: <https://www.sciencephoto.com/media/864724/view/e-coli-conjugation-bacterium-tem> (17.07.2020.)

