

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Dalija Capan

**Mikrobiološka analiza vode Toplica Sveti Martin**

Diplomski rad

Zagreb, 2011. godina

Ovaj rad, izrađen je u Bioinstitut d.o.o. Čakovec pod neposrednim vodstvom prof.dr.sc. Jasne Hrenović, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

Najljepše se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Jasni Hrenović na pruženoj pomoći, strpljenju, idejama i korisnim savjetima prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Srdačno zahvaljujem i svim tehničarima Bioinstituta d.o.o. na pomoći te na opskrbljivanju potrebnim sredstvima prilikom provođenja eksperimentalnog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje, te veliko im hvala na strpljenju i potpori tijekom studija.

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

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno- matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Mikrobiološka analiza vode Toplica Sveti Martin**

Dalija Capan

Biološki odsjek, Prirodoslovno- matematički fakultet

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ispitana je kvaliteta vode u Toplicama Sveti Martin praćenjem fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara bazenske vode. Analiza vode je izvršena na 46 uzorka sakupljenih iz 11 bazena u periodu od godinu dana. Na osnovu izmjerenih vrijednosti i definiranih maksimalno dopuštenih vrijednosti pojedinih parametara određena je zdravstvena ispravnost vode. Po vrsti onečišćenja najveći broj zdravstveno neispravnih uzoraka otpada na fizikalno – kemijsko onečišćenje, i to pojedinačno na povećanu koncentraciju nitrata dok je po mjestu onečišćenja najveći broj zdravstveno neispravnih uzoraka u terapijskim bazenima a najmanji broj zdravstveno neispravnih uzoraka u jakuzijima. Mikrobiološka analiza je pokazala da je najviše zdravstveno neispravnih uzoraka zbog ukupnih koliformnih bakterija također u terapijskim bazenima.

(43 stranica, 27 slika, 14 tablica, 24 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: bazeni, termalna voda, bakterije, maksimalno dopuštene vrijednosti.

Voditelj: Dr. sc. Jasna Hrenović, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. J.Hrenović, izv. prof.

Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, doc.

Dr. sc. Zdravko Dolenc, doc.

Dr. sc. Mirna Ćurković Perica, izv. prof.

Rad prihvaćen: 09. veljače 2011.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

# **MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF WATER IN THE SVETI MARTIN SPA & GOLF RESORT**

Dalija Capan

Division of Biology, Faculty of Science  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The water quality was examined by monitoring of physical-chemical and microbiological parameters pool water in Sveti Martin. Water analysis was performed on 46 samples collected from 11 pools in the period of one year. Based on the measured value and the defined maximum allowed values of certain parameters, was determined the safety of water. According to the pollution type, the majority of the medically faulty samples belong to physical – chemical pollution, particularly to the increased nitrate concentration, when based on the pollution location the majority of the medically faulty samples were found in therapeutic pools, while the smallest numbers of the medically faulty samples were found in jacuzzis. Microbiological analysis showed that the most defective medical samples for total coliform bacteria are also in the therapeutic pools.

(43 pages, 27 figures, 14 tables, 24 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in central Biological Library

Key words: swimming pools, thermal water, bacteria, the maximum allowed value.

Supervisor: Dr. Jasna Hrenović, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. J.Hrenović, Assoc. Prof.

Dr. Iva Juranović Cindrić, Asst. Prof.

Dr. sc. Zdravko Dolenc, doc.

Dr. sc. Mirna Ćurković Perica, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 9<sup>th</sup> February 2011

# SADRŽAJ:

1. UVOD	1.
1.1. PRAVILNIK O KVALITETI I NADZORU NAD KVALITETOM VODE U BAZENIMA ZA KUPANJE	2.
1.2. OPASNOSTI U BAZENIMA ZA KUPANJE	5.
1.2.1. FIZIČKE OPASNOSTI ZA KUPAČE	5.
1.2.2. KEMIJSKE OPASNOSTI ZA KUPAČE	6.
1.2.3. MIKROBIOLOŠKE OPASNOSTI ZA KUPAČE	7.
1.3. OPĆE ZNAČAJKE BAKTERIJA ANALIZIRANIH U RADU	8.
1.3.1. MIKROORGANIZMI FEKALNOG PORIJEKLA	8.
1.3.2. MIKROORGANIZMI NE FEKALNOG PORIJEKLA	8.
1.4. CILJ ISTRAŽIVANJA	10.
2. MATERIJALI I METODE	11.
2.1. OPIS ISTRAŽIVANOM MJESTA	11.
2.2. PRIKUPLJANJE UZORKA	12.
2.3. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA UZORKA	13.
2.3.1. OPIS POSTUPKA ZA MEMBRANSKU FLTRACIJU	13.
2.3.2. DIREKTNO NACIJEPLJIVANJE UZORKA	14.
2.3.3. ODREĐIVANJE BROJA UKUPNIH KOLIFORMNIH BAKTERIJA	15.
2.3.4. ODREĐIVANJA BROJA FEKALNIH KOLIFORMNIH BAKTERIJA	18.
2.3.5. ODREĐIVANJE BROJA KOLONIJA PSEUDOMANAS AERUGINOSA	21.
2.3.6. ODREĐIVANJE BROJA KOLONIJA AEROBNIH MEZOFILNIH BAKTERIJA	23.
2.4. FIZIKALNO - KEMIJSKA ANALIZA UZORAKA VODE	25.
3. REZULTATI	28.
4. RASPRAVA	38.
5. ZAKLJUČAK	42.
6. LITERATURA	43.

## 1. UVOD

Toplice Sveti Martin poznate su po tome što su njihovi bazeni punjeni izuzetno bogatom termalnom vodom visoke mineralizacije. Voda je poznata još od 1911. godine kada je englesko - mađarska tvrtka London - Budapest vršila istraživanja (bušenja) u potrazi za naftom, no umjesto nafte, potekla je termalna voda! Okolno pučanstvo je ubrzo otkrilo ljekovitu svrhu vode te je 1936. godine izgrađen jedan drveni bazen, dimenzija 3m širine i 4m dužine, jedan natkriveni bazen te instalirano sedam kada za namakanje u termalnoj vodi (Slika 1). Zbog izuzetnog mineralizacijskog sastava termo-mineralne vode i prisutnosti ugljičnog dioksida, voda je bila privlačna za piće pa je buteljirana u razdoblju do izbijanja II. Svjetskog rata, pod nazivom „*Međimursko jedno vrelo Selnica - Sv. Martin na Muri*“ ( [www.toplicesvetimartin.hr](http://www.toplicesvetimartin.hr) )



Slika 1. Toplice Sv. Martin 1963.( [www.toplicesvetimartin.hr](http://www.toplicesvetimartin.hr) )



Slika 2. Toplice Sv. Martin danas ( [www.toplicesvetimartin.hr](http://www.toplicesvetimartin.hr) )

## 1.1. PRAVILNIK O KVALITETI I NADZORU NAD KVALITETOM VODE U BAZENIMA ZA KUPANJE

Voda je životna potreba. Čini dvije trećine našeg tijela i planete Zemlje. Voda nam nije samo nužno potrebna za život, već nam može pružiti radost življenja u bazenima za kupanje. Bazeni predstavljaju dragocjenu oazu, koja nam u prebrzom tempu života pruža trenutke opuštanja i rasonode, te pomaže u stjecanju fizičke kondicije i očuvanju zdravlja. Svim bazenima, neovisno kakvog tipa oni bili i od kakvog materijala bili sagrađeni, zajednička je voda, koja mora biti čista, bezbojna i higijenski ispravna za kupanje. Kada bazen, koji je prethodno odgovarajuće očišćen i pripremljen, napunimo sa vodom iz vodovodne mreže, kupaći su, uz utjecaj okoline, zagađivači vode. Kupaći u vodu unose nečistoće, gljivice i bakterije, koje se u vodi brzo razmnožavaju, a posebno pri temperaturi vode iznad 25 ° C (NN 1992).

Za primjer, kupać koji se prije ulaska u bazen istuširao "unos" u vodu mikroorganizme (50 milijuna), urin (0,05 lit), znoj (0,3 litre) i cca. 1 gram dušika. Sve nečistoće zajedno sa ostalim otopljenim organskim tvarima su odlična hrana za bakterije čiji razvoj dodatno pospješuje temperatura vode viša od 25 ° C. U takvim uvjetima samo jedna bakterija za pola dana dobije i do milijardu potomaka. Zbog svega gore navedenog od izuzetne je važnosti kemijsko tretiranje vode, odnosno njezina dezinfekcija i na kraju kontrola njezine kvalitete. Kontrola kvalitete vode je jednako važna kao i samo tretiranje vode. Na osnovu izmjerenih vrijednosti iz vode, zatim definiranih optimalnih vrijednosti (MDK vrijednosti) određuje se da li je voda ispravna. Granične vrijednosti pojedinih parametara određuje u Hrvatskoj Hrvatski zavod za javno zdravstvo i sadržane su u „PRAVILNIK O KVALITETI I NADZORU NAD KVALITETOM VODE U BAZENIMA ZA KUPANJE“. Isti u člancima br. 2, 3, 4, 5, 6 i 7 propisuju slijedeće dopuštene vrijednosti u vodi (Tablica 1), (NN 2007).



Tablica 1. Dopuštene vrijednosti pojedinih parametara u vodi

<b>PARAMETRI</b>	Otvoreni i zatvoreni bazeni sa slatkom vodom	Otvoreni i zatvoreni bazeni sa morskom vodom	Otvoreni i zatvoreni bazeni za rehabilitaciju	Hidroma-sažne kade i bazeni sa dodatnim strujanjem vode
<b>FIZIKALNO – KEMIJSKI POKAZATELJI</b>				
Temperatura vode (° C)	> 19	26 – 28	32 - 35	> 23
Mutnoća (NTU)	≤ 5	-	≤ 5	≤ 5
pH	7,0 – 8,5	7,0 – 8,5	7,0 – 8,5	7,0 – 8,5
Prozirnost	jasna	-	jasna	jasna
Slobodni klor (Cl <sub>2</sub> / L)	0,3 – 0,6	-	0,3 – 0,6	0,5 – 1,0
Kloridi (Cl/L)	5 x	-	5 x	5 x
Amonijak (mg N / L)	≤ 0,2	< 0,1	≤ 0,2	≤ 0,2
Nitrati (mg N / L)	≤ 10	-	≤ 10	≤ 10
<b>BAKTERIOLOŠKI POKAZATELJI</b>				
Ukupni koliformi (100 mL, 37 ° C)	≤ 10	< 50 – zatvoren < 100 – otvoren	< 50	< 50
Fekalni koliformi (100 mL, 44,5 ° C)	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (100 mL, 37 ° C)	0	0	0	0
Broj aerobnih mezofilnih bakterija (100 mL, 37 ° C)	< 500 – zatvoren < 1000 – otvoren	< 500 – zatvoren < 1000 – otvoren	< 500	< 500
<i>Staphylococcus aureus</i> (100 mL, 37 ° C)	-	-	0	-
<i>Legionella pneumophila</i> (100 mL, 35 ° C)	-	-	-	u slučaju epidem. Indikacije

Osim navedenih parametara u (Tablici 1) članak 9. pravilnika propisuje da dnevni dodatak svježe vode mora biti 5 – 10 % od protoka reciklirane vode. Navedene parametre, odnosno ispitivanje higijenske ispravnosti vode za kupanje obavlja se jednom tjedno putem ovlaštene zdravstvene ustanove (za Toplice Sveti Martin to radi Bioinstitut d.o.o.), dok nadzor nad ispitivanjem higijenske ispravnosti obavlja nadležna sanitarna inspekcija.

## 1.2. OPASNOSTI U BAZENIMA ZA KUPANJE

Voda u bazenu mora biti čista, bezbojna i higijenski besprijekorna. Korisnici bazena su svih dobnih skupina i to pojedinačno ili istovremeno. Međutim, postoje opasnosti i rizici koji se mogu pojaviti i negativno utjecati na zdravlje kupaca. Najčešće, rizici koji se pojavljuju prilikom korištenja bazena za kupanje, svrstani su u tri skupine:

- *fizičke opasnosti*

- *mikrobiološke opasnosti i kemijske opasnosti.*

### 1.2.1. FIZIČKE OPSNOSTI ZA KUPAČE

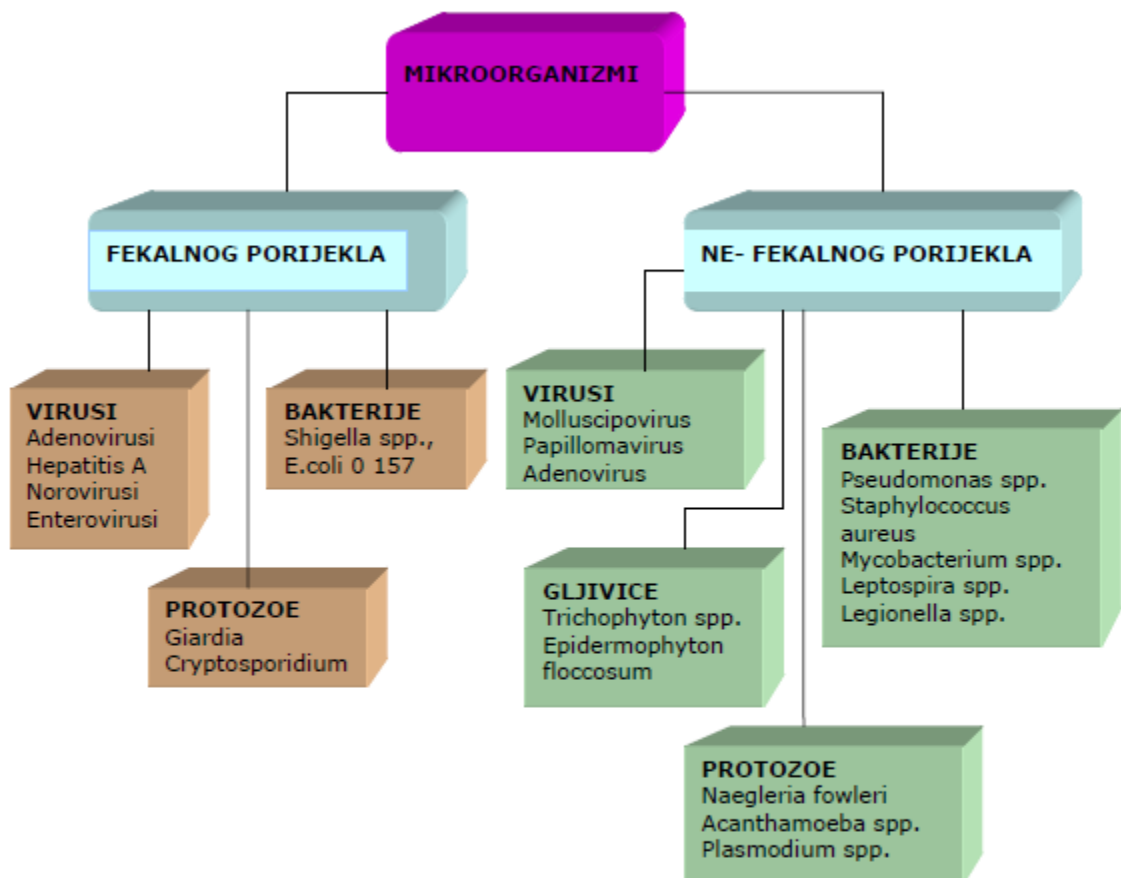
U fizičke opasnosti spadaju utapanja kao jedan od najčešćih uzroka smrti na bazenima u svijetu, kao i pokušaji utapanja koji su također ozbiljan problem jer mogu ostaviti dugoročne posljedice za organizam. Nadalje, ozljede nastaju i prilikom zarobljavanja kose ili dijelova tijela na odvodnim ispustima. Ozljede kralježnice najčešće su povezane s ronjenjem. Ozljede, kao porezotine i padovi, smanjuju osjećaj ugone prilikom relaksacije. Ostale ozljede, kao ozljede glave, potres mozga, ozljede ruku, ramena, nogu i stopala povezuju se uzrocima kao što su sklizav pod, nepokriveni odvodi, neprimjeren ponašanje kupaca na bazenu (nepromišljen ulazak u bazene, trčanje oko bazena, i sl.). Neodgovorno ljudsko ponašanje, pogotovo uz konzumiranje alkohola je prvenstveno razlog nastajanja ovakvih ozljeda. Opasnosti povezane sa temperaturnim razlikama jer temperatura vode u bazenima treba biti između 26 i 30 ° C da bi bila ugodna za kupanje, a do pregrijavanja tijela dolazi u jakuzijima gdje je temperatura oko 40 ° C. U *whirlpool*-ima s visokom temperaturom može doći do gubitka svijesti te utapanja, ili srčanog udara i smrti, te je preporuka da temperatura ne bude veća od 40 ° C. Niske temperature u bazenima za hlađenje (nakon korištenja saune) – temperatura je 8 do 10 ° C - mogu uzrokovati oslabljenu koordinaciju pokreta, gubitak zraka, te nakon nekog vremena kada temperatura tijela padne, usporavanje rada srca, hipotermiju, grč mišića ili gubitak svijesti (Bilajac i Lušić 2009).

### 1.2.2. KEMIJSKE OPASNOSTI ZA KUPAČE

Kemikalije u bazensku vodu mogu doći iz raznih izvora - sirove vode, raznih dodataka u vodu radi njezinog pročišćavanja i pomoću kupača (znoj, urin, ostaci sapuna, kozmetičkih sredstava ili ulja za sunčanje). Postoje tri vrste unosa kemikalija u organizam: putem disanja, putem kože i gutanjem. Količina progutane vode ovisi o više faktora: iskustvu, dobi, vještinama i tipu aktivnosti. Kiseline i lužine dodaju se vodi kako bi regulirali pH i omogućili optimalni tretman vode kako bi bila ugodna za kupače. Za dezinfekciju se najčešće koriste klorni preparati koji mogu dovesti do stvaranja mnogobrojnih nusprodukata. Najčešće spominjani nusprodukti dezinfekcije vode su trihalometani (THM), a nastaju kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), dibromklor metan ( $\text{CHClBr}_2$ ) i bromoform ( $\text{CHBr}_3$ ). Kako se stvaraju u bazenskoj vodi, nalaze se i u zračnom prostoru iznad vode, a u organizam se mogu unijeti udisanjem, gutanjem i putem kože. THM su karcinogeni, te mogu biti detektirani u krvi i dah kupača i ne kupača zatvorenih bazena. Negativna djelovanja THM očituju se na centralnom živčanom sustavu, funkcijama jetre i bubrega. Količina nastanka trihalometana u zatvorenim bazenima ovisi o broju kupača, ukupnom organskom ugljiku (TOC), pH i temperaturi vode. Treba naglasiti kako usprkos stvaranja nusprodukata prilikom dezinfekcije vode, korištenje kemikalija kao dezinficijensa, manje je štetno za kupače nego mikrobiološka kontaminacija koja može nastati ukoliko se ne koriste dezinficijensi, a da se i ne spominje koliko tjelesna aktivnost u vodi doprinosi zdravlju (Bilajac i Lušić 2009).

### 1.2.3. MIKROBIOLOŠKE OPASNOSTI ZA KUPAČE

Od svih navedenih opasnosti možemo posebno izdvojiti mikrobiološke opasnosti. Bazenska voda mora odgovarati određenim propisanim vrijednostima jer ukoliko ne odgovara, postoji mogućnost prijenosa zaraznih bolesti i nastanka infekcija, a štetni utjecaji usmjereni su na gastrointestinalne infekcije, kožne, očne, spolne, urinarne infekcije (npr. upale gornjih dišnih putova, očnih spojnica -konjunktivitis, upale vanjskog sluhovoda i srednjeg uha, crijevnih zaraza, kožnih bolesti i to naročito gljivične epidermofizije stopala, nekih spolnih bolesti). Čitav niz mikroorganizama može uzrokovati infekcije. Neki su fekalnog porijekla a neki nisu (Slika 3), (Bilajac i Lušić 2009).



Slika 3. Mikroorganizmi u bazenima su potencijalna opasnost za zdravlje ljudi (Bilajac i Lušić 2009).

### 1.3. OPĆE ZNAČAJKE BAKTERIJA ANALIZIRANIH U RADU

#### 1.3.1. MIKROORGANIZMI FEKANOG PORIJEKLA

##### Koliformne bakterije

Koliformne bakterije su grupa Gram-negativnih bakterija, fakultativno anaerobnih štapićastih bakterija koje fermentirajući šećer laktozu proizvode kiselinu i plin. Primarno su nepatogene i normalno obitavaju u donjem intestinalnom traktu (debelom crijevu) čovjeka i toplokrvnih životinja, gdje su odgovorne za pravilnu probavu hrane. Izlučuju se fekalijama, te dospijevaju u otpadne vode, a preko njih u prirodne vode recipijente otpadnih voda. Koliformne bakterije uključuju 15 vrsta bakterija iz porodice Enterobacteriaceae (obuhvaća 30 rodova) koja spada u 5. grupu Bergey-evog priručnika za determinativnu bakteriologiju (fakultativno anaerobni Gram-negativni štapići). Uključuju *Escherichia coli* i srodne vrste koje normalno obitavaju u debelom crijevu kao što su vrste rodova *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (Kučišec-Tepeš 1994).

Laktozu fermentiraju mješovito-kiselim putem fermentacije, gdje su završni produkti fermentacije etanol, mliječna, jantarna, octena kiselina, ugljični dioksid (CO<sub>2</sub>) i vodik (H<sub>2</sub>). Samo vrste roda *Enterobacter* provode butandiolnu fermentaciju, pri kojoj su završni produkt fermentacije etanol, mliječna, mravlja kiselina, butandiol, CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>. Ukupne koliformne bakterije razgrađuju laktozu na 35±0,5 ° C / 24 h, a fekalne koliformne bakterije razgrađuju laktozu na 44,5 ± 0,2 ° C / 24 h, što znači da imaju sposobnost termotolerancije (Stilinović i Hrenović 2009).

#### 1.3.2. MIKROORGANIZMI NE FEKALNOG PORIJEKLA

*Pseudomonas aeruginosa* je bakterija koja sveprisutna u našem okolišu. Iako se najčešće izolira iz oboljelog čovjeka, kao izvor zaraze na bazenima je najčešće okoliš bazena. Toplina, vlažne klupice, ispusti i pod oko bazena su idealni za rast i razvoj bakterije. Kupači je mogu prenijeti s poda i unijeti u bazen. Infekcije koje ukazuju na prisutnost bakterije su upala vanjskog uha, infekcija urinarnog trakta, respiratorne infekcije, infekcije rana i rožnice. Mogu nastati infekcije korijena kose ili kože, ispod kupaćeg kostima, kao i svrab (HZJZ 2002).

*Staphylococcus aureus* je najčešći uzročnik upala nosne sluznice i kože. Prisutnost ove bakterije u bazenima objašnjava se kao rezultat ljuštenja ljudske kože, iz inficiranih rana, iz infekcija urinarnog trakta, očnih infekcija. Simptomi infekcije *S. aureusom* iz bazena javljaju se nakon 48 sati (HZJZ 2002).

#### 1.4. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati kakva je kvaliteta vode Toplica Sveti Martin praćenjem fizikalno - kemijskih i mikrobioloških parametra bazenske vode, u vremenskom razdoblju od 01.06.2009. do 01.06.2010. Na osnovu izmjerenih vrijednosti i definiranih maksimalno dopuštenih vrijednosti određivala sam da li je voda ispravna prema Pravilniku o kvaliteti i nadzoru nad kvalitetom vode u bazenima za kupanje koji u Republici Hrvatskoj određuje Hrvatski zavod za javno zdravstvo.



## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. OPIS ISTRAŽIVANOG MJESTA

Toplice Sv. Martin (Slika 4) smjestile su se u Republici Hrvatskoj u Međimurskoj županiji u naselju Vučkovec. Međimurje je smješteno u sjeverozapadnom području Hrvatske, a graniči sa Mađarskom i Slovenijom. Međimurje je omeđeno sa dvjema rijekama; Murom i Dravom. Uz Toplice Sv. Martin u Međimurskoj županiji postoje još samo gradski bazeni u gradu Čakovcu, koji služe isključivo u rekreacijske svrhe te nemaju nikakvih ljekovitih svojstava. Toplice Sv. Martin su u spomenutoj županiji jedini objekt takve vrste.



Slika 4. Karta Gornjeg Međimurja s označenim mjestom istraživanja

( [www.maps.google.com](http://www.maps.google.com) )

## 2.2. PRIKUPLJANJE UZORKA

Analizirani su uzorci vode iz bazena Toplica Sveti Martin. Svi uzorci su sakupljeni i obrađeni od lipnja 2009. do lipnja 2010. U Toplicama se nalaze 6 bazena (terapijski unutarnji, rekreacijski unutarnji, dječji unutarnji bazen, vani se nalaze terapijski, rekreacijski i dječji vanjski) osim bazena u toplicama se nalaze i 5 jakuzija (od toga 3 jakuzija se nalaze unutra i dva vani). Tijekom zime od kraja 10 mjeseca dva vanjska jakuzija i vanjski dječji bazen nisu punjeni vodom. Osim toga u prostoru gdje su bazeni nalazi se i sam izvor (bušotina) termalne vode (Slika 6) čiji sam uzorak također uzimala. Uzorci vode sakupljeni su u sterilne staklene boce zapremnine od 500 mL (Slika 5) nakon čega su pohranjeni u hladioniku na 4 ° C do same analize (APHA 1998). Bakteriološka analiza izvršena je u roku 3 sata od uzorkovanja, a kemijska analiza je izvršena odmah nakon bakteriološke.



Slika 5. Uzimanje uzorka sterilnom bocom zapremnine 500 mL (Vlastita fotografija)



Slika 6. Izvor (bušotina) termalne vode (Vlastita fotografija)

## 2.3. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

### 2.3.1. OPIS POSTUPKA ZA MEMBRANSKU FILTRACIJU

Metoda membranske filtracije je povoljna metoda za mikrobiološku analizu vode jer je praktična, jednostavna, ponovljiva i omogućuje kvantitativnu detekciju mikroorganizama. Princip ove metode jest koncentracija mikroorganizama iz većeg uzorka na površini membranskog filtra, te nasađivanje ovih mikroba na hranjivu podlogu. Ovom metodom rađene su bakterije: *Pseudomonas* sp., ukupni koliformi i fekalni koliformi.

Oprema i pribor:

Uređaj za membransku filtraciju (Slika 7), membranski filtri 0,45  $\mu\text{m}$ , pinceta, plinski plamenik, boca sa 96 % alkoholom, sterilna Petrijeva ploča, sterilna fiziološka otopina.



Slika 7. Uređaj za membransku filtraciju (Vlastita fotografija)

Prije filtriranja trebalo je dobro sterilizirati aparaturu za membransku filtraciju. To smo učinili tako da smo unutrašnje stjenke i rubove lijevka te podložak filtra dobro natopili 96 %-tnim etanolom, zatim smo plinskim plamenikom dobro opalili sve natopljene površine lijevka i podloška filtra. Sačekali smo ok 20-30 sekundi da se ohladi podložak filtra. Zatim smo uzeli filter sa sterilnom pincetom iz omota i stavili smo na podložak za filtra (Slika 8). Pincetu smo također prethodno natopili 96 %-tnim etanolom i sterilizirali opaljivanjem plinskim plamenom. Zatim smo postavili lijevak u ležište. Na kućištu za lijevke nalaze se sigurnosne ručice koje se prije nalijevanja vode nalaze u horizontalnom položaju. Zatim smo natočili odgovarajući volumen uzorka vode, i sigurnosne ručice smo postavili u vertikalni položaj, zatim smo na vakuum pumpi uključili prekidač, kada se voda profiltrirala, vratili smo lijevak na sterilnu Petrijevu ploču, a filter smo prenijeli na odgovarajuću hranjivu podlogu. Prije početka rada

važno je napraviti slijepu probu da vidimo da li su filtri sterilni. To smo napravili tako da smo u jednom lijevku profiltrirali 100 mL sterilne fiziološke otopine i filter smo prenijeli na podlogu za određivanje aerobnih mezofilnih bakterija (TGYA).



Slika 8. Stavljanje filtra na podložak za filter na uređaju za membransku filtraciju (Vlastita fotografija)

### 2.3.2. DIREKTNO NACJEPLJIVANJE UZORKA

Za aerobne mezofilne bakterije, čiji je broj bio visok nacijepili smo direktno 1 mL promiješanog uzorka na TGYA agar. Kada je broj poraslih kolonija na filtru bio prevelik kod ukupnih koliformnih bakterija nacijepili smo 0,1 mL uzorka na ENDO agar.

### 2.3.3. ODREĐIVANJE BROJA UKUPNIH KOLIFORMNIH BAKTERIJA

#### a) Priprema uzorka

Uzorak je čuvan pri temperaturi do 8 ° C u frižideru. Treba ga ispitivati najkasnije 6 sati nakon uzorkovanja. Prije filtracije promiješali smo bocu 25 puta laganim okretanjem, zatim smo filtrirali 100 mL uzorka ili smo direktno na podlogu nacijepili 0,1 mL uzorka.

Za uzgoj ukupnih koliformnih bakterija koristili smo Endo agar, čiji je sastav i priprema dana u (Tablici 2).

Tablica 2. Sastav i priprema agara za izolaciju koliformnih bakterija

Naziv podloge i proizvođač	Endo agar- kruta podloga za izolaciju koliformnih bakterija Bioinstitut d.o.o. Čakovec
Oznaka	E
Sastav g / L	Tripton 10,00 g Laktoza 10,00 g Dikalijev fosfat 3,50 g Natrijev sulfit 2,50 g Pararosanilin (Osnovni Fuksin) 0,40 g Agar 15,00 g
Priprema	- u suhu bočicu odmjeri 100 mL destilirane vode - odvagaj 41,4 g i stavi u bočicu - kružno miješaj dok se ne rastopi prašak - dopuni do 1000 mL - začepi čepom od staničevine i na čep stavi alu foliju - autoklaviraj na 121 ° C 15 min - ohladiti na 50 ° C i rastočiti u sterilne Petrijeve zdjelice
Opis podloge	- podloga je prozirno ljubičaste boje
Skladištenje gotove podloge i rok uporabe	Sobna temperatura/ 7 dana Hladnjak 2-8 ° C / 14 dana

#### b) Nacjepljivanje filtra i inkubacija

Filtar smo nakon filtriranja nacijepili na ENDO agar i stavili ga inkubirati pri 36±2 ° C/ 21±3 sata. Ako na podlogama nije bilo rasta nakon navedenog vremena inkubaciju smo produžili još 24 sata.

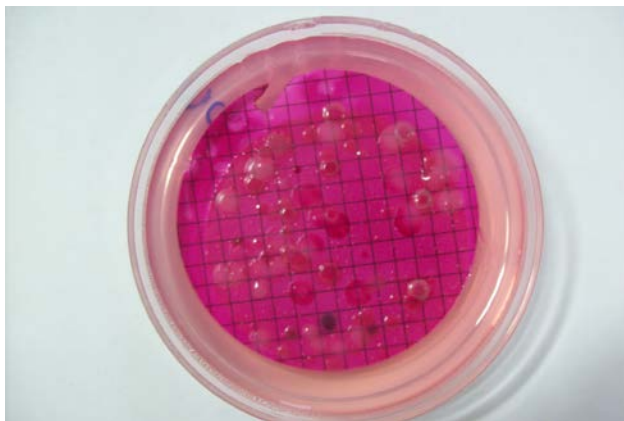
#### c) Očitavanje rezultata i potvrdni test

Na ENDO agaru smo brojili kolonije koje su svjetlo crvene do ljubičaste boje (koliformne bakterije) i svijetlocrvene do ljubičaste kolonije s ili bez metalnog sjaja (*E. coli*) bez obzira na veličinu (Slika 9). Brojali smo podloge koje imaju

najviše 50-100 kolonija na filtru. Kolonije smo brojali tako da smo bakteriološkom ušicom obavljali ubod pored svake izbrojane kolonije.

Nakon toga radili smo potvrđne testove za ukupne koliformne bakterije. Potvrđni test Brilliant green (Slika 10) se radi tako da u roku 48 h koliformne bakterije fermentiraju a dokaz za to je plin  $\text{CO}_2$  koji se nakuplja u mikroepruveti. Drugi potvrđni test je Oksidaza test (Slika 11) koji mora biti negativan ako se radi o koliformnim bakterijama. Oksidaza test se bazira na produkciji enzima indofenol oksidaze. Enzim u prisutnosti atmosferskog kisika oksidira fenilendiamin prisutan u oksidaza reagensu do tamno-ljubičaste komponente indofenola. Test je pozitivan kada na oksidaza disku se pojavi tamno – ljubičasto obojenje u roku 10 – 30 s (Duraković 1996).

Rezultat se iskazuje tako da se potvrđeni broj kolonija preračuna na određeni volumen (npr. 100 mL).



Slika 9. ENDO agar sa kolonijama ukupnih koliformnih bakterija (Vlastita fotografija)



Slika 10. Brilliant green potvrđni test za koliformne bakterije (Vlastita fotografija)



Slika 11. Oksidaza disk potvrdni test za koliformne bakterije (Vlastita fotografija)

### 2.3.4. ODREĐIVANJE BROJA FEKALNIH KOLIFORMNIH BAKTERIJA

#### a) Priprema uzorka

Uzorak je čuvan pri temperaturi do 8 ° C u frižideru. Treba ga ispitivati najkasnije 6 sati nakon uzorkovanja. Prije filtracije promiješali smo bocu 25 puta laganim okretanjem, zatim smo filtrirali 100 mL uzorka. Za uzgoj fekalnih koliforma koristili smo FCA, čiji je sastav i priprema dana u Tablici 3.

Tablica 3. Sastav i priprema agara za izolaciju fekalnih koliforma

Naziv podloge i proizvođač	m- Faecal Coliform Agar (m-FC AGAR) - selektivna kruta podloga za izolaciju i brojanje fekalnih koliforma Bioinstitut d.o.o. Čakovec
Oznaka	FCA
Sastav g / L	Triptoza 10,00 g Peptokompleks 5,00 g Kvaščev ekstrakt 3,00 g Natrijev klorid 5,00 g Laktoza 12,50 g Žučne soli N.3 1,50 g Anilin Plava 0,10 g Agar 13,00 g
Priprema	<ul style="list-style-type: none"><li>- otopi 50 g u 1000 mL destilirane vode</li><li>- dobro promiješaj dok se prašak ne otopi u Kohovom loncu</li><li>- dodaj 10 mL Rosalična kiselina 10 % otopinu u NaOH 0,2 N</li><li>- kontinuirano miješaj kod vrenja oko 1 minutu</li><li>- ne autoklavirati</li><li>- ohladiti i rastočiti u male Petrijeve zdjelice 55 mm</li></ul>
Opis podloge	- smeđa
Skladištenje gotove podloge i rok uporabe	2-8 ° C / 21 dan

#### b) Nacjepeljivanje filtra i inkubacija

Filtar smo nacijepili na m-FCA agar (Slika 12) i inkubirali pri 44,5 ±0,5 ° C/ 21 ±3 sata, ako na podlogama nije bilo rasta kolonija nakon navedenog vremena inkubaciju smo produžili još 24 sata.





Slika 12. Stavljanje filtra na m-FCA agar (Vlastita fotografija)

c) Očitavanje rezultata i potvrđni test

Na m-FCA agaru brojili smo plave kolonije (Slika 13) bez obzira na veličinu. Brojali smo podloge koji imaju najviše 50 - 100 kolonija na filtru. Tri do pet karakterističnih kolonija smo ispitali potvrđnim testom. Kao izvor ugljikohidrata u podlozi nalazi se laktoza. Ukoliko bakterije u epruveti fermentiraju laktozu do miješanih kiselina i CO<sub>2</sub>, pH u epruveti će pasti na 5,2 pri čemu će boja pH-indikatora prijeći iz ljubičaste u žutu, a u maloj Durham-ovoj cjevčici vidjeti će se mjehurić plina ugljičnog dioksida. Da bi rezultat bio pozitivan, barem 1/3 Durham-ove cjevčice mora biti ispunjeno plinom (Naglić i sur. 1992).

Izračun za potvrđni test:

$$a = (B / A) \times C$$

B= broj potvrđenih kolonija kao fekalni koliformi

A= broj kolonija stavljenih na potvrđni test

C= ukupan broj suspektnih kolonija na ploči

a = konačni rezultat; broj fekalnih koliforma u uzorku

Rezultat se iskazuje tako da se potvrđeni broj kolonija preračuna na određeni volumen (npr. 100 mL), (Topolnik i sur. 1980).



Slika 13. Kolonija fekalne koliformne bakterije (Vlastita fotografija)

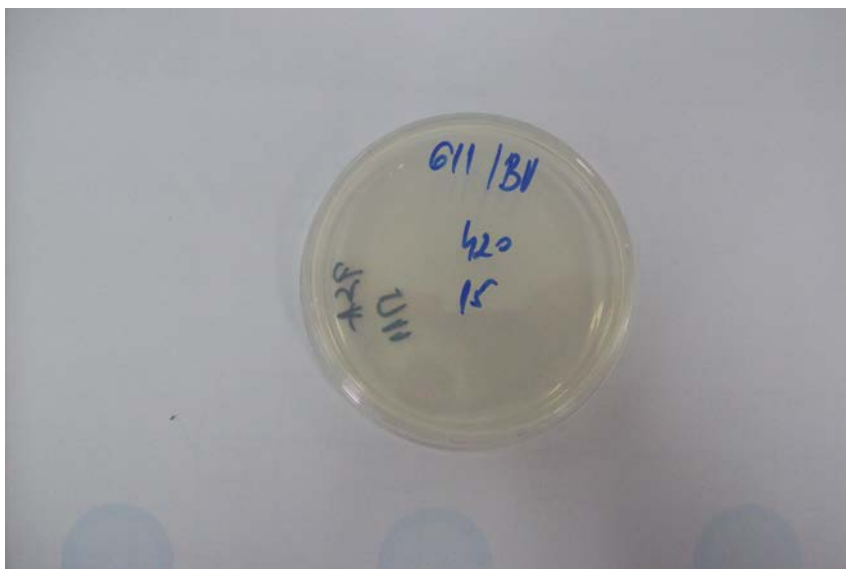
### 2.3.5. ODREĐIVANJE BROJA KOLONIJA PSEUDOMONAS AERUGINOSA

#### a) Priprema uzorka

Uzorak je čuvan pri temperaturi do 8 ° C u frižideru. Treba ga ispitivati najkasnije 6 sati nakon uzorkovanja. Prije filtracije promiješali smo bocu 25 puta laganim okretanjem, zatim smo filtrirali 100 mL uzorka. Za uzgoj *Pseudomonas* sp. koristili smo PSA, čiji je sastav i priprema dana u Tablici 4 izgled ove podloge prikazan je na Slici 14 (Carozzi 2003).

Tablica 4. Sastav i priprema agara za uzgoj *Pseudomonas* sp. (PSA)

Naziv podloge i proizvođač	Pseudomonas Selective Agar with Nalidixic Acid-kruta podloga za izolaciju <i>Pseudomonas</i> sp. Bioinstitut d.o.o. Čakovec	
Oznaka	PSA	
Sastav g / L	Peptokompleks	20,00 g
	Magnezij Klorid	1,40 g
	Kalijev sulfat	10,00 g
	Cetrimid	0,30 g
	Agar	14,00 g
Priprema	22,85 g otopi u 500 mL destilirane vode i dodaj 5 mL glicerola - zagrijavaj do vrenja - steriliziraj u autoklavu 121 ° C 15 minuta	
Opis podloge	Prozirna	
Skladištenje gotove podloge i rok uporabe	2-8 ° C / 15 dana	



Slika 14. Podloga za uzgoj *Pseudomonas* sp. (Vlastita fotografija)

b) Nacjeppljivanje filtra i inkubacija

Filtar smo nacijepili na PSA agar i inkubirali pri  $42\pm 2$  ° C i  $36\pm 2$  ° C /  $44\pm 4$  h.

c) Očitavanje rezultata i potvrdni test

Na PSA agaru smo izbrojili sve kolonije prozirno- smeđe – zelenkaste. Nakon toga rade se potvrdni testovi Tablica 5. API potvrdni test temelji se na 21 minijaturnom biokemijskom testu i specijalno prilagođenoj računalnoj bazi podataka. API 20 E strip sastoji se od 20 mikro-cjevčica ispunjenih dehidriranih supstratima. Ovi testovi inokuliraju se bakterijskom suspenzijom koja otapa ugrađenu podlogu. Tijekom inkubacije dolazi do spontane promjene boje supstrata ili se boja mijenja tek nakon dodatka reagensa. Test oksidaze je sastavni dio konačnog profila (21. identifikacijski test), kojeg je potrebno provesti odvojeno. Reakcije se očitavaju na osnovi tabele očitavanja, a identifikacija se vrši pomoću računalnog programa za identifikaciju (Pelczar i Reid 1965).

Tablica 5. Potvrdni testovi za *Pseudomonas aeruginosa*

<i>Pseudomonas</i> sp.	Katalaza test
	Oksidaza
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Krvni agar 42 ° C negativan
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	API za <i>Pseudomonas aeruginosa</i> = biokemijski potvrdni test prema sustavu API

Rezultat se iskazuje tako da se potvrđeni broj kolonija preračuna na određeni volumen (npr. 100 mL).

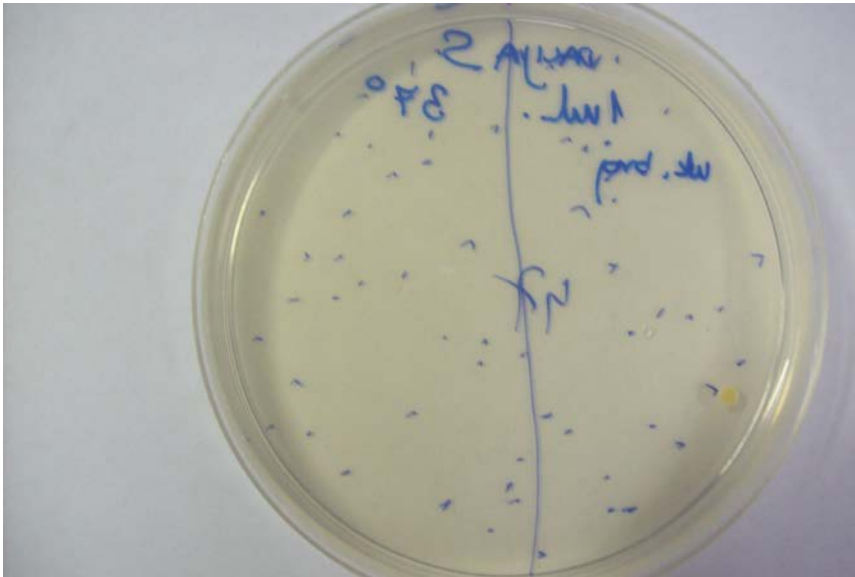
### 2.3.6. ODREĐIVANJE BROJA KOLONIJA AEROBNIH MEZOFILNIH BAKTERIJA

#### a) Priprema uzorka

Uzorak je čuvan pri temperaturi do 8 ° C u frižideru. Treba ga ispitivati najkasnije 6 sati nakon uzorkovanja. Prije filtracije promiješali smo bocu 25 puta laganim okretanjem, zatim propipetom odpipetirali 1mL uzorka i izlili ga na TGYA agar. Za uzgoj aerobnih mezofilnih bakterija koristili smo TGYA, čiji je sastav i priprema dana u Tablici 6 dok je izgled bakterijskih kolonija na ovoj podlozi prikazan je na Slici 15 (Carozzi 2003).

Tablica 6. Sastav i priprema agara za ukupni broj bakterija (TGYA)

Naziv podloge i proizvođač	Agar za ukupni broj bakterija Tryptyc glucose Yeast agar Bioinstitut d.o.o. Čakovec								
Oznaka	TGYA								
Sastav g / L	<table> <tr> <td>Tripton</td> <td>5,0 g</td> </tr> <tr> <td>Kvaščev ekstrakt</td> <td>2,5 g</td> </tr> <tr> <td>Glukoza</td> <td>1,0 g</td> </tr> <tr> <td>Agar</td> <td>15,0 g</td> </tr> </table>	Tripton	5,0 g	Kvaščev ekstrakt	2,5 g	Glukoza	1,0 g	Agar	15,0 g
Tripton	5,0 g								
Kvaščev ekstrakt	2,5 g								
Glukoza	1,0 g								
Agar	15,0 g								
Priprema	<ul style="list-style-type: none"> <li>- u suhu bočicu odmjeri 100 ml destilirane vode</li> <li>- odvagaj 23,5 g i stavi u Erlenmeyerovu tikvicu</li> <li>- kružno miješaj dok se ne rastopi prašak</li> <li>- dopuni do 1000 mL hladne destilirane vode</li> <li>- začepi čepom od staničevine i na čep stavi alu foliju</li> <li>- steriliziraj u autoklavu 121 ° C / 15 minuta</li> <li>- ohladi na 45 ° C</li> <li>- rastoči u inokulirane Petrijeve zdjelice</li> </ul>								
Opis podloge	Mliječno bijela								
Skladištenje gotove podloge i rok uporabe	-pri 10-30 ° C, 21 dan								



Slika 15. Ukupne mezofilne aerobne bakterije porasle na TGYA  
(Vlastita fotografija)

d) Nacjepivanje filtra i inkubacija

Filtar smo nacijepili na TGYA agar i inkubirali pri 22 ° C / 48 h i 37 ° C / 72 h.

#### 2.4. FIZIKALNO - KEMIJSKA ANALIZA UZORAKA VODE

U toplicama na licu mjesta smo određivali temperaturu (Slika 16), pH (Slika 17), slobodni rezidualni klor (Slika 18). pH smo mjerili pomoću prijenosnog aparata (Dulco Test DT1) tako da smo prvo samo uzorak bazenske vode snimili u aparatu (takvo mjerenje zove se nuliranje). Nakon toga u uzorak smo dodali fenol red fotometar i ponovno izmjerili pH uzorka. Slobodni rezidualni klor smo mjerili pomoću istog aparata. Prvo smo mjerili samo uzorak bazenske vode a zatim smo u taj uzorak dodali 2 kapi DPD1 reagens, nakon toga smo dodali DPD pufer i nakon toga smo uzorak stavili u aparat i izmjerili slobodni klor. U institutu određivali nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), amonijev ion ( $\text{NH}_4^+$ ), kloride ( $\text{Cl}^-$ ), prozirnost i mutnoću vode.



Slika 16. Mjerenje temperature vode u bazenu (Digital termometer)  
(Vlastita fotografija)



Slika 17. Mjerenje pH vrijednosti aparatom Dulco Test DT1 (Vlastite fotografije)



Slika 18. Mjerenje slobodnog rezidualnog klora aparatom Dulco Test DT1  
(Vlastita fotografija)

## KLORIDI U VODI ( $\text{Cl}^-$ )

Uzme se 50 mL uzorka i dodala se 0,5 mL kalijevog kromata. To se pomiješa i titrira otopinom srebrnog nitrata. Uz uzorak se pripremi i slijepa proba za koju se uzima destilirana voda. Standard se priprema tako da se uzme 1 mL otopine za standard u 100 mL, dopuni se destiliranom vodom i uzme 50 mL kao uzorak (Slika 19) ( APHA, AWA i WEF 1998).

Računa se koncentracija klorida ( $\text{Cl}^-$ ) u uzorku na temelju volumnog utroška srebrnog nitrata poznate koncentracije.



Slika 19. Titracija otopinom srebrnog nitrata za određivanje klorida (Vlastita fotografija)

## AMONIJEVI IONI U VODI ( $\text{NH}_4^+$ )

U odmjernu tikvicu od 50 mL doda se 40 mL uzorka, 4 mL *Otopine I* i 4 mL *Otopine II*. Otopina I je reagens za razvijanje boje, a sastoji se od natrijevog silikata ( 65 g), 3 natrijeva citrata ( 65 g), natrijevog nitroprusida (0,48 g) i to sve je otopljeno u odmjernoj tikvici sa destiliranom vodom. *Otopina II* sadrži natrijev hidroksid 16 g; 2 klor izocijanourat 1 g. Uz uzorak se pripremi i slijepa proba za koju se uzme destilirana voda. To se pusti da odstoji 30 min i nastali obojeni kompleks se izmjeri na spektrofotometru (Perkin Elmer  $\alpha$  25, UV/VIS spektrometar, program: UV/ WIN Lab Software). Standard se pripremi tako da se uzme 5 mL otopine poznate koncentracije u 50 mL, doda se 4 mL *Otopine I* i 4 mL *Otopine II* te se nadopuni do oznake destiliranom vodom u odmjernoj tikvici (HRN ISO 7150 -1:1998).



Račun:

Očita se apsorbancija nastalog kompleksa i rezultat se korigira za razrjeđenje.

#### NITRATI U VODI ( $\text{NO}_3^-$ )

U tikvicu se otpipetira 35 mL sumporne kiseline, doda 5 mL uzorka i 5 mL 2,6 dimetil fenola. Uz uzorak se pripremi i slijepa proba za koju se uzima destilirana voda kao uzorak. Pusti se da odstoji 30 min i izmjeri se na spektrofotometru količina nitrata (Perkin Elmer  $\alpha$  25, UV/VIS spektrometar, program: UV/ WIN Lab Software). Priprema standarda: Uzme se 5 mL standarda poznate koncentracije i razrijedi na 100 mL s destiliranom vodom u odmjerne tikvici. Od toga se uzme 5 mL i stavi se u postupak kao uzorak (HRN ISO 7870 – 1:1998).

Račun:

Koncentracija nitrata u uzorku vode se direktno očitava sa spektrofotometra.

### 3. REZULTATI

Istraživanje kvalitete vode u Toplicama Sveti Martin provedeno je na temelju 46 uzorkovanja i analiziranja vode u 11 bazena.

Legenda:

1. Dječji unutarnji bazen
2. Jakuzi 1
3. Jakuzi 2
4. Rekreativski vanjski bazen
5. Rekreativski unutarnji bazen
6. Dječji vanjski bazen
7. Jakuzi 3
8. Jakuzi 4
9. Terapijski unutarnji
10. Terapijski vanjski
11. Jakuzi 5

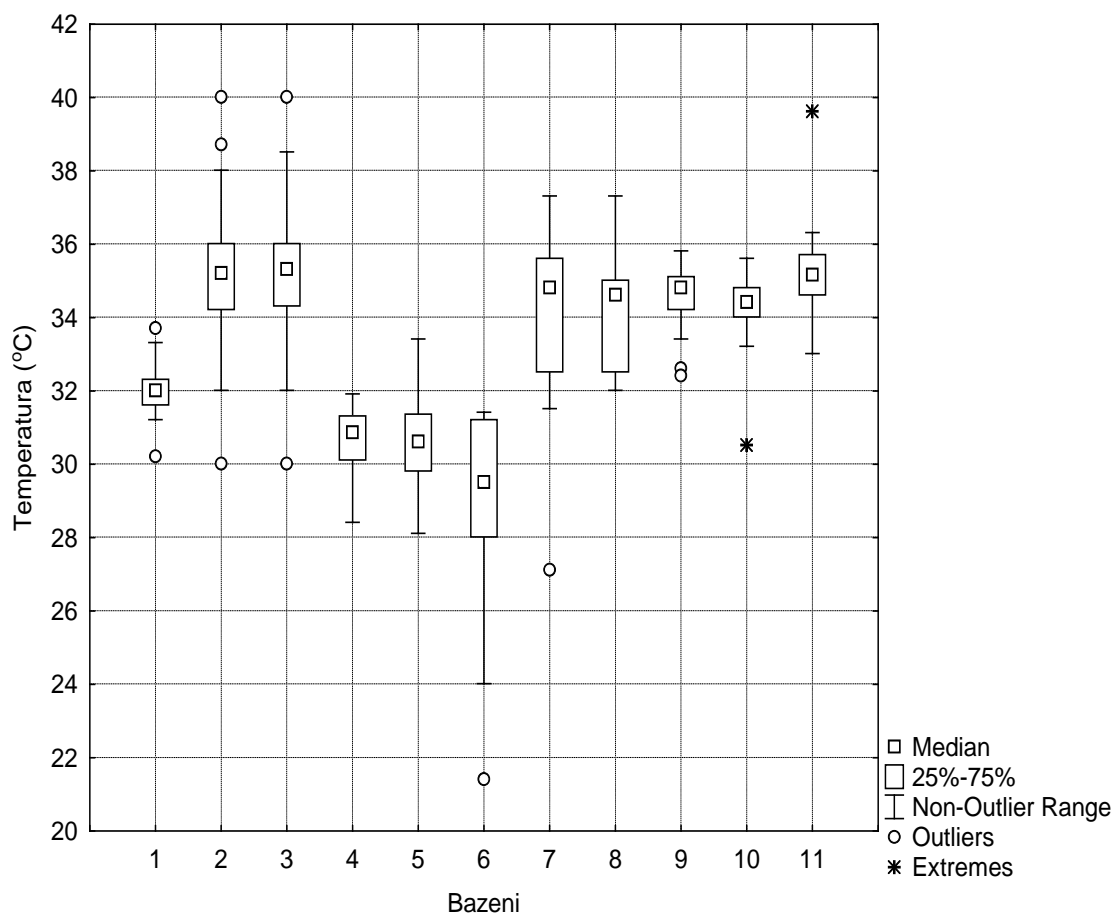
Prvih osam bazena punjeno je sa vodovodnom vodom i njihova MDK vrijednost se razlikuje od MDK vrijednosti 9., 10., i 11. bazena jer su oni punjeni sa termalnom vodom iz izvora. MDK vrijednost za te bazene ovisi o sirovoj vodi koja dolazi iz bušotine termalne vode kojom se poslije pune bazeni. Kolonije izraslih bakterija su izbrojane i na temelju njih je izračunat CFU. Kod kemijske analize vode postoji MDK vrijednost maksimalno dopuštena koncentracija prema prijedlogu Pravilnika o kvaliteti i nadzoru nad kvalitetom vode u bazenima za kupanje. Uspoređivanjem dobivenih rezultata sa MDK vrijednostima svakog parametra sam dobila podatak da li voda odgovara odredbama članka 5, stavka 2 glede fizikalno kemijskih pokazatelja, te stavka 3 glede bakterioloških pokazatelja prijedloga pravilnika o kvaliteti i nadzoru nad kvalitetom vode u bazenima za kupanje točke 5,3 norme DIN 19543-1. Rezultati u grafovima su pokazani pomoću medijana (medijan je vrijednost u sredini grupe brojeva; odnosno, pola brojeva u grupi ima vrijednost veću od medijana, a pola brojeva u grupi ima vrijednost manju od medijana).

## TEMPERATURA

Dobiveni rezultati temperature prikazani su u Slici 20, a MDK vrijednosti u Tablici 7.

Tablica 7. MDK vrijednosti temperature za pojedine bazene

MDK	Otvoreni i zatvoreni bazeni sa slatkom vodom	Zatvoreni i otvoreni bazeni za terapiju (s termalnom vodom)	Hidromasažne kade i bazeni sa dodatnim strujanjem vode (jakuzi, whirlpool)
Temperatura / ° C	>19	32-35	>23



Slika 20. Temperatura ( ° C) vode u 11 bazena Toplica Sveti Martin u razdoblju od 01.06. 2009. do 01.06.2010. (n=46).

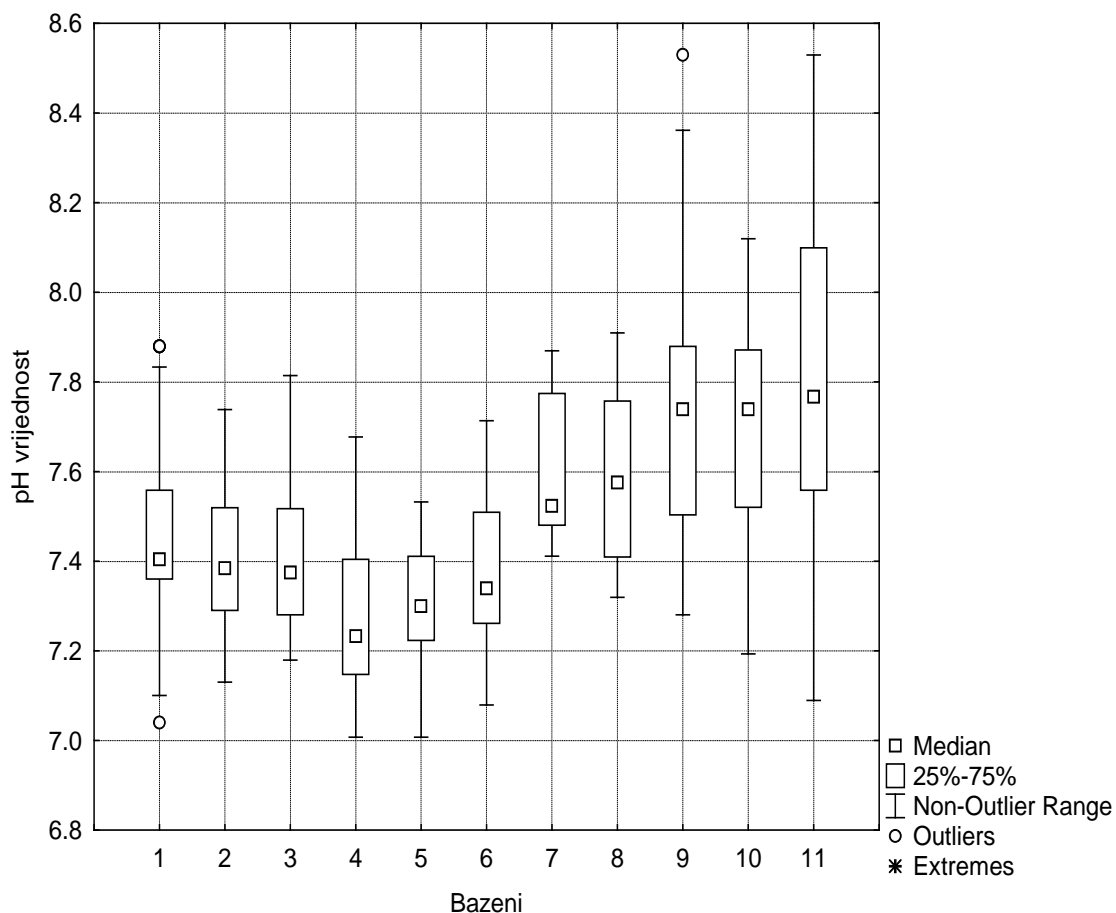
Rezultati su pokazali kako je temperatura vode u bazenima ispravna odnosno u skladu sa MDK vrijednostima danim u Tablici 7. Osim u bazenu 10 i 11 (bazeni punjeni termalnom vodom) vidimo po jedan ekstrem. Postoje i značajna odstupanja od ostalih rezultata u bazenima 1, 2, 3 ali koja su još uvijek unutar dopuštenih vrijednosti.

## pH VRIJEDNOST

Dobiveni rezultati pH vrijednosti prikazani su u Slici 21, a odgovarajuće MDK vrijednosti u Tablici 8.

Tablica 8. MDK za pH vrijednosti određenih bazena

MDK	Otvoreni i zatvoreni bazeni sa slatkom vodom	Zatvoreni i otvoreni bazeni za terapiju (s termalnom vodom)	Hidromasažne kade i bazeni sa dodatnim strujanjem vode (jakuzi, whirlpool)
pH vrijednost	7,0- 8,5	7,0- 8,5	7,0- 8,5



Slika 21. pH vrijednost vode u 11 bazena Toplica Sveti Martin u razdoblju od 01.06.2009. do 01.06.2010. (n=46).

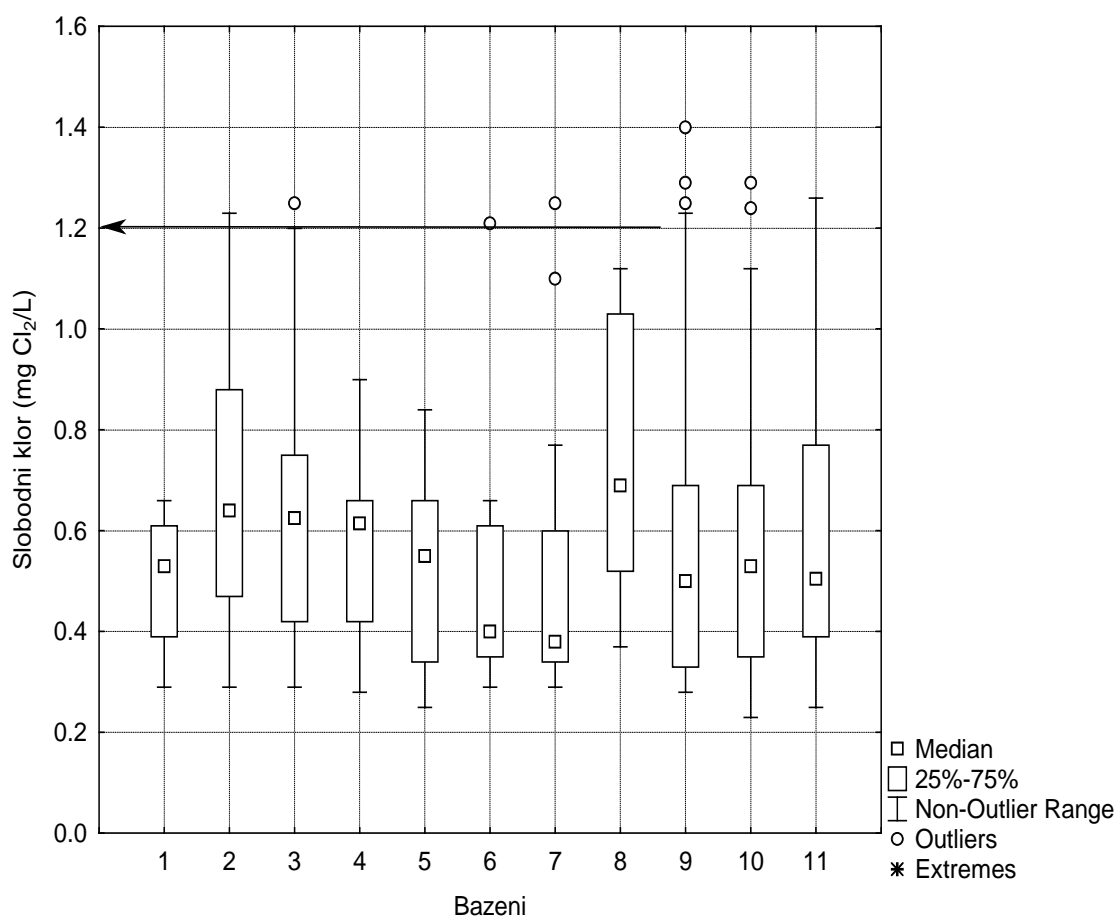
Prikazani rezultati su u skladu sa MDK vrijednostima danim u Tablici 9 što također znači da su svi uzorci ispravni.

## SLOBODNI KLOR

Dobiveni rezultati slobodnog klora prikazani su u Slici 22, a odgovarajuće MDK vrijednosti u Tablici 9.

Tablica 9. MDK vrijednosti za slobodni klor u određenim bazenima

MDK	Otvoreni i zatvoreni bazeni sa slatkom vodom	Zatvoreni i otvoreni bazeni za terapiju (s termalnom vodom)	Hidromasažne kade i bazeni sa dodatnim strujanjem vode (jakuzi, whirlpool)
Slobodni klor ( $\text{Cl}_2/\text{L}$ )	0,3-1,2	-	0,3-1,2



Slika 22. Slobodni klor ( $\text{mg Cl}_2/\text{l}$ ) vode u 11 bazena Toplica Sveti Martin u razdoblju od 01.06.2009. do 01.06.2010. (n=46).

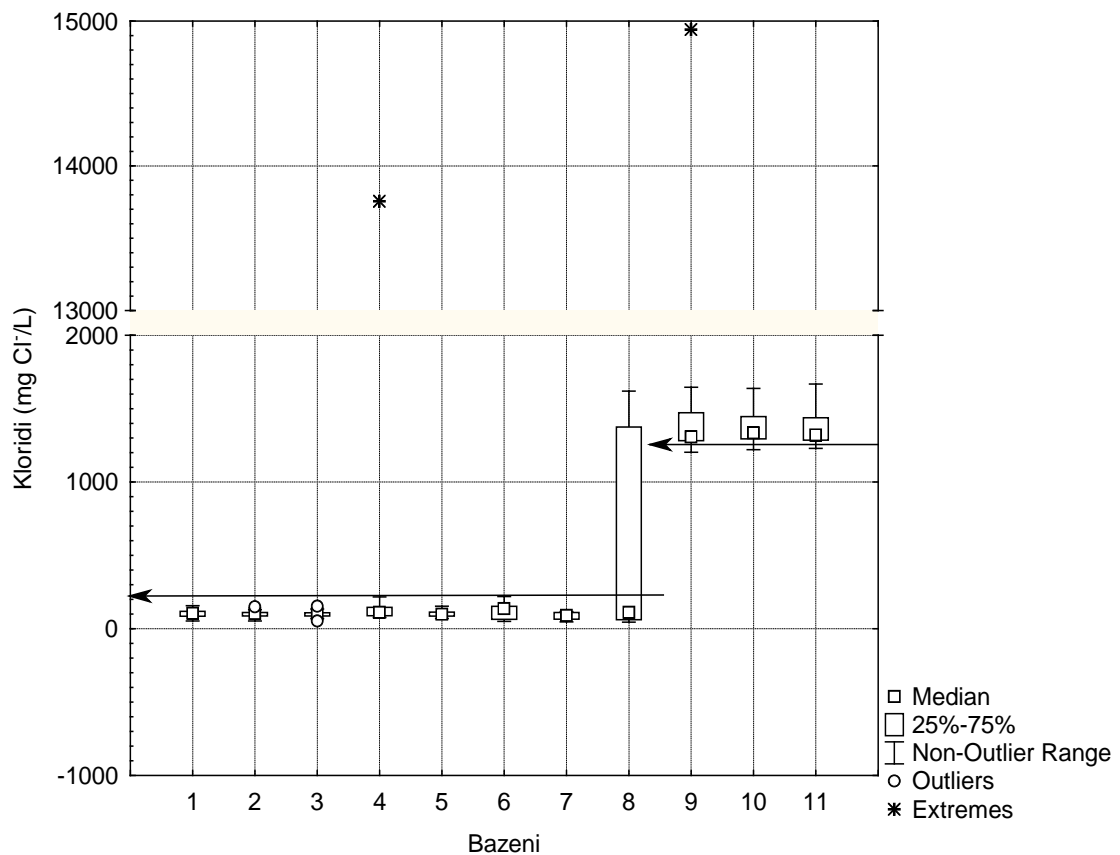
Prikazani rezultati su u skladu sa MDK vrijednostima jedino u bazenima 9, 10 i 11 postoje značajna odstupanja od ostalih rezultata ali pošto za bazene koji su punjeni termalnom vodom nemamo MDK vrijednosti uzorci se smatraju ispravnima. U bazenima 2, 3, 6, 7 postoje značajna odstupanja koja su iznad MDK vrijednosti što znači da ti uzorci nisu ispravni.

## KLORIDI

Dobiveni rezultati za kloride prikazani su u Slici 23, a odgovarajuće MDK vrijednosti u Tablici 10.

Tablica 10. MDK vrijednosti klorida u određenim bazenima

MDK	Otvoreni i zatvoreni bazeni sa slatkom vodom	Zatvoreni i otvoreni bazeni za terapiju (s termalnom vodom)	Hidromasažne kade i bazeni sa dodatnim strujanjem vode (jakuzi, whirlpool)
Kloridi (mg Cl <sup>-</sup> /L)	200	1170	200



Slika 23. Kloridi (mg Cl<sup>-</sup> / L) vode u 11 bazena Toplica Sveti Martin u razdoblju od 01.06.2009. do 01.06.2010. (n=46).

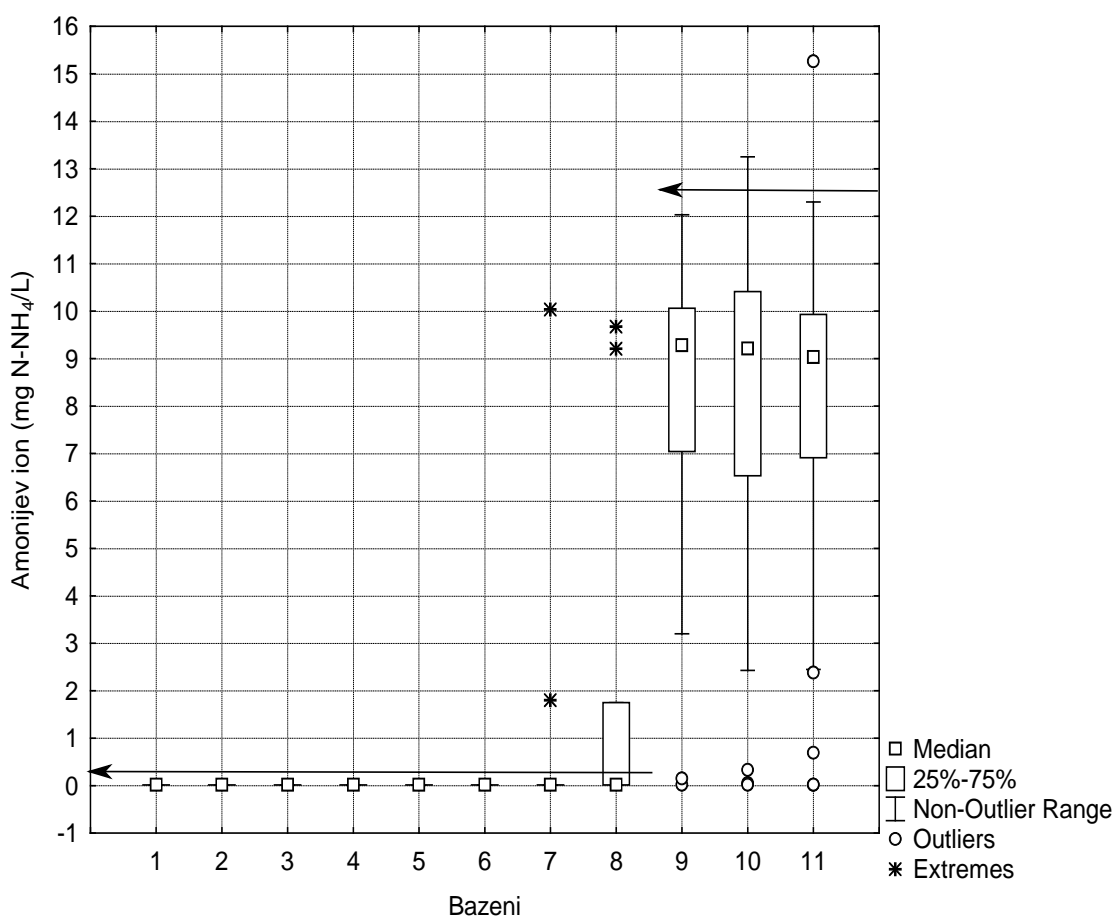
Prikazani rezultati pokazuju da su svi uzorci ispravni osim u bazenu 4 postoji uzorak čija je vrijednost puno veća od MDK vrijednosti što ukazuje na njegovu neispravnost. U bazenima 9, 10 i 11 rezultati su veći od MDK vrijednosti a to je zbog toga što je za MDK vrijednost uzeto 1170 mg Cl<sup>-</sup> / L a to ne može biti MDK vrijednost za sve uzorke jer rezultati tih bazena ovise o ulaznoj vodi odnosno o sirovoj vodi koja dolazi iz bušotine i vrijednost klorida u njoj varira.

## AMONIJEV ION

Dobiveni rezultati amonijevog iona prikazani su u Slici 24, a odgovarajuće MDK vrijednosti u Tablici 11.

Tablica 11. MDK vrijednosti amonijaka u određenim bazenima

MDK	Otvoreni i zatvoreni bazeni sa slatkom vodom	Zatvoreni i otvoreni bazeni za terapiju (s termalnom vodom)	Hidromasažne kade i bazeni sa dodatnim strujanjem vode (jakuzi, whirlpool)
Amonijak(mgNH <sub>4</sub> /L)	< 0,2	12,69	< 0,2



Slika 24. Amonijev ion (mg N-NH<sub>4</sub> / L) vode u 11 bazena Toplica Sveti Martin u razdoblju od 01.06.2009. do 01.06.2010. (n=46).

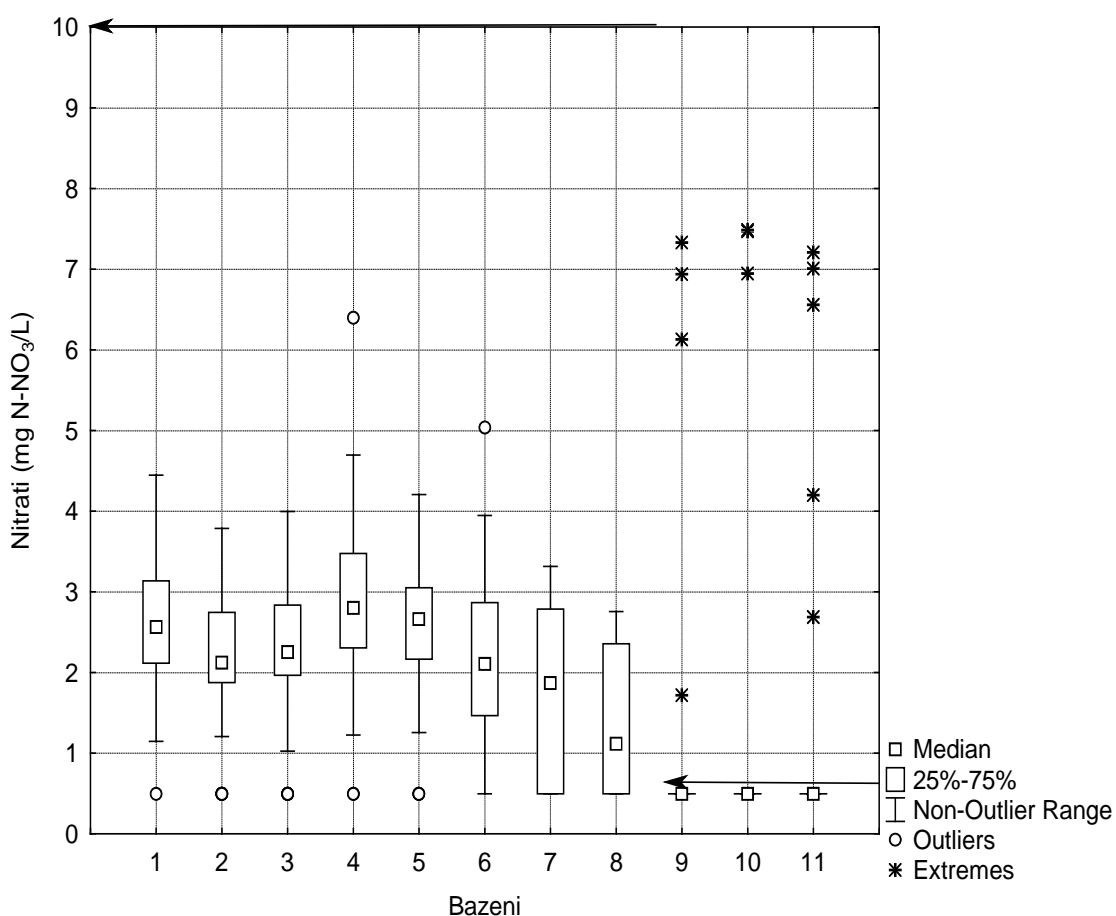
Prikazani rezultati pokazuju da su svi uzorci u prvih 6 bazena ispravni. U bazenima 7 i 8 postoje ekstremi odnosno uzorci koji nisu ispravni. Bazeni 9, 10 i 11 imaju ponovno višu MDK vrijednost koja također ovisi o ulaznoj vodi.

## NITRATI

Dobiveni rezultati za nitrati prikazani su u Slici 25, a odgovarajuće MDK vrijednosti u Tablici 12.

Tablica 12. MDK vrijednosti nitrata u određenim bazenima

MDK	Otvoreni i zatvoreni bazeni sa slatkom vodom	Zatvoreni i otvoreni bazeni za terapiju (s termalnom vodom)	Hidromasažne kade i bazeni sa dodatnim strujanjem vode (jakuzi, whirlpool)
Nitrati (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	< 10	<0,5	< 10



Slika 25. Nitrati (mg N-NO<sub>3</sub> / L) vode u 11 bazena Toplica Sveti Martin u razdoblju od 01.06.2009. do 01.06.2010. (n=46).

Prikazani rezultati u prvih 8 bazena pokazuju da su svi uzorci ispravni dok bazeni 9, 10 i 11 imaju nekoliko uzoraka koji nisu ispravni jer značajno odskaku od dopuštenih MDK vrijednosti.



## MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

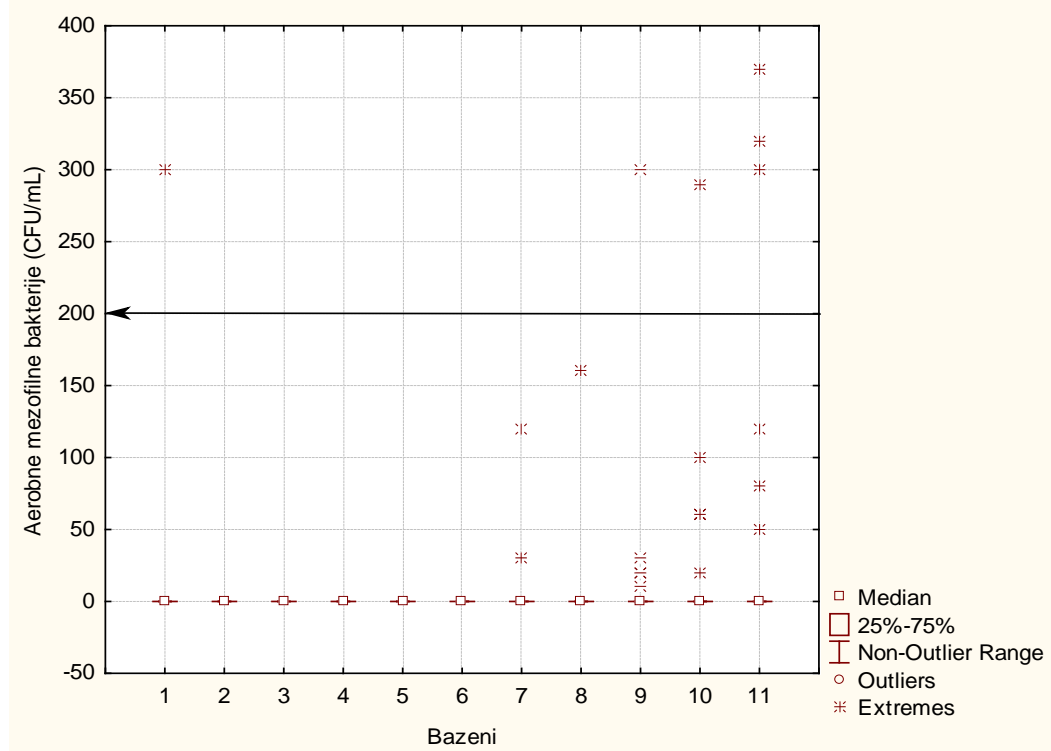
Osim aerobnih mezofilnih i ukupnih fekalnih koliformnih bakterija, radili smo mikrobiološku analizu vode na *Pseudomonas aeruginosa* i fekalnih koliforma ali rezultati nisu prikazani grafički pošto su sve analize bile negativne (< 1 CFU/100 mL).

## AEROBNE MEZOFILNE BAKTERIJE

Dobiveni rezultati za aerobne mezofilne bakterije prikazani su u Slici 26, a odgovarajuće MDK vrijednosti dane su u Tablici 13.

Tablica 13. MDK vrijednosti aerobnih mezofilnih bakterija u bazenima

MDK	Otvoreni i zatvoreni bazeni sa slatkom vodom	Zatvoreni i otvoreni bazeni za terapiju (s termalnom vodom)	Hidromasažne kade i bazeni sa dodatnim strujanjem vode (jakuzi, whirlpool)
Broj aerobnih mezofilnih bakterija/ 1 mL, 37 ° C	200	200	200



Slika 26. Aerobne mezofilne bakterije (CFU / mL) vode u 11 bazena Toplica Sveti Martin u razdoblju od 01.06.2009. do 01.06.2010. (n=46).

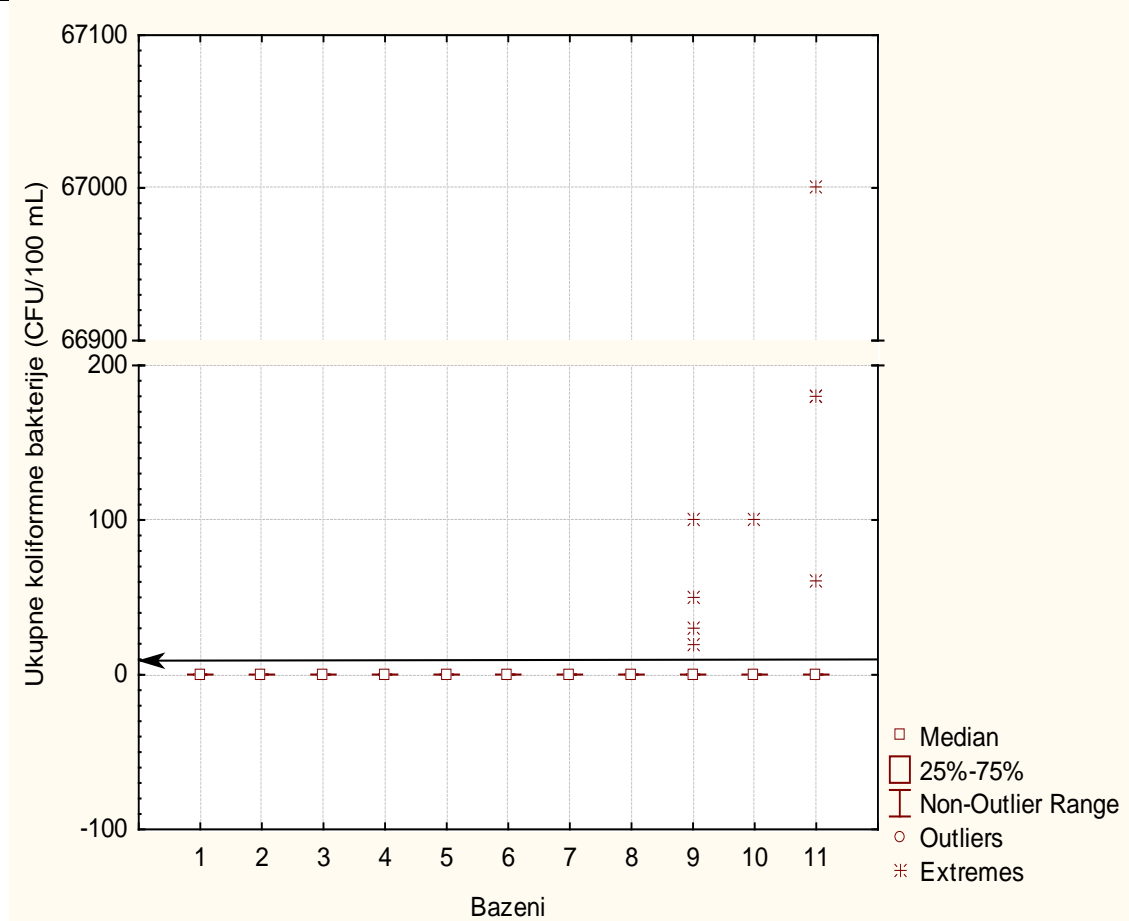
Prikazani rezultati pokazuju da u prvom bazenu ima jedan neispravan uzorak, te bazeni 9, 10 i 11 imaju nekoliko neispravnih uzoraka. U ostalim bazenima postoje uzorci koji su pokazali zagađenje ali u dopuštenim vrijednostima te se ti uzorci smatraju ispravnim.

## UKUPNE KOLIFORMNE BAKTERIJE

Dobiveni rezultati ukupnih koliformnih bakterija u bazenima prikazani su u Slici 27, a odgovarajuće MDK vrijednosti prikazane su u Tablici 14.

Tablica 14. MDK vrijednosti ukupnih koliforma u bazenima

MDK	Otvoreni i zatvoreni bazeni sa slatkom vodom	Zatvoreni i otvoreni bazeni za terapiju (s termalnom vodom)	Hidromasažne kade i bazeni sa dodatnim strujanjem vode (jakuzi, whirlpool)
Ukupni koliformi / 100 mL, 37 ° C	10	10	10



Slika 27. Ukupne koliformne bakterije (CFU / 100mL) vode u 11 bazena Toplica Sveti Martin u razdoblju od 01.06.2009. do 01.06.2010. (n=46).

Prikazani rezultati pokazuju kako su svi uzorci u prvih 8 bazena negativni na ukupne koliformne bakterije dok u 9, 10 i 11 bazenu postoje uzorci koji su neispravni jer broj ukupnih koliforma u njima je viši od dozvoljenog.

## 4. RASPRAVA

pH vrijednost bazenske vode je jedna od najznačajnijih vrijednosti jer utječe na puno faktora bitnih za čistoću vode. Neovisno o tome koje se dezinfekcijsko sredstvo upotrebljava prvo što je potrebno kod tretmana vode je pH vrijednost dovesti u optimalno područje koje je 7,2 – 7,6. Niska pH vrijednost (niži od pH 7) vodi daje kiseli karakter što korozivno djeluje na metale, nagrizava bakrene navoje i grijače te dolazi do taloženja oksida metala na površinama bazena, što se može vidjeti u obliku mrlja. Kod pH vode ispod 7 dolazi također do nagrizanja betona i fugir mase između pločica bazena. Visoka pH vrijednost (viši od pH 7,6) vodi daje lužnati karakter što pospješuje izdvajanje vodenog kamenca na površinama bazena. Visoka pH vrijednost također uzrokuje zamućenje vode koja dobiva "mliječni" izgled, filter se brže puni nečistoćama i dolazi do taloženja nečistoća na površinama bazena i bazenskoj opremi. Uz sve navedeno sa povećanjem pH vrijednosti iznad 7,6 dolazi do rapidnog smanjenja učinkovitosti dezinfekcijskog sredstva što sa svim ostalim negativnim učincima bitno smanjuje kvalitetu vode, što upućuje na izuzetnu važnost praćenja pH vrijednosti vode. Najčešća pojava je previsoka pH vrijednost jer prisutnost različitih nečistoća koje u vodu dospijevaju iz okoline, sa kože kupaca ili ostataka detergenata povećava pH vrijednost vode, stoga je puno češće potrebno vršiti smanjenje pH vrijednosti vode nego povećavanje (Dadić 2001). Kako je bazenska voda pri temperaturi 25 ° C ili većoj, upravo idealno stanište za razvoj mikroorganizama potrebno ju je ispravno i redovito dezinficirati i kontrolirati količinu slobodnog klora prisutnog u vodi. Viša temperatura vode i zraka, te prisutnost većeg broja kupaca u bazenu proporcionalno povećava broj mikroorganizama u vodi, koji se u takvim uvjetima razmnožavaju eksponencijalno. Upravo zbog tako brzog razmnožavanja mikroorganizama dezinfekcija bazenske vode je od presudne važnosti za sigurnost kupaca. Uz reguliranje pH vrijednosti vode najvažniji tretman vode u bazenu je dezinfekcija (Boklajić 2002).

Dezinfekcijom uništavamo mikroorganizme prisutne u vodi i osiguravamo bakteriološki ispravnu vodu pogodnu za kupanje. Navedene vrijednosti slobodnog klora osiguravaju dobru "bakteriološku sliku" vode i jamče sigurno kupanje bez opasnosti od stvaranja potencijalnih infekcija. Kod tzv. "šok

kloriranja" količina slobodnog klora u vodi treba biti od 100 – 150 mg Cl<sub>2</sub> / L. Kao dezinfekcijska sredstva najčešće se upotrebljavaju klorna sredstva koja zbog svojih karakteristika imaju prednost pred dezinfekcijom ozonom ili aktivnim kisikom u tome što stvaraju rezistenciju, odnosno nakon početnog dezinfekcijskog djelovanja u vodi ostaje određena količina slobodnog klora koji nije izreagirao i koji omogućuje dezinfekciju još neko vrijeme, do nestanka. Iz tog razloga kod upotrebe nekih alternativnih metoda dezinfekcije kao npr. ozoniranje potrebno je dodatno klorirati vodu zbog rezistencije.

Prednost dezinfekcije sa klornim sredstvima je i u tome što je klor oksidans te osim djelovanja na mikroorganizme uništava i suspendirane organske tvari koje nije moguće izdvojiti filtriranjem. Slobodni klor je u vodi nestabilan. Raspadanje klora se događa kontinuirano tijekom vremena u kojem je prisutan u vodi. Na većim temperaturama (>25 ° C) raspadanje klora je brže nego pri nižim temperaturama. UV zrake pri većim temperaturama uzrokuju najbrže raspadanje klora. Da bi imali odgovarajuću kontinuiranu dezinfekciju vode u bazenu potrebno je u njoj stalno održavati propisanu količinu slobodnog klora (0,3 – 0,6 mg Cl<sub>2</sub> / L za bazene sa negrijanom vodom i 0,5 – 1,0 mg Cl<sub>2</sub> / L za bazene sa grijanom vodom). Kako je topla voda od 25 ° C i više gotovo idealno stanište za razvoj mikroorganizama to upućuje da pri višim temperaturama treba povećati pozornost na koncentraciju slobodnog klora jer ga se više troši na dezinfekciju. Porast temperature vode je u većini slučajeva vezan za povećanje temperature zraka što znači pojačano zračenje i UV zraka koje "uništavaju" klor. Slobodni klor koji tako izgubimo moramo nadoknaditi dodavanjem novog, što povećava troškove tretmana vode (Esterman i sur. 1983).

Što se tiče slobodnog amonijaka u vodi dozvoljene vrijednosti su < 0,2 mg N / L dok je u termalnoj vodi dozvoljeno 12,69 mg N-NH<sub>4</sub> / L. Nitrati u vodi su dozvoljeni do < 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / L, a kod termalne vode dozvoljena vrijednost nitrata je < 0,5 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / L ali tu je bilo nekoliko uzorka koji nisu bili prema pravilniku.

Iako u Republici Hrvatskoj nema propisa koji bi regulirao zdravstvenu ispravnost i nadzor nad vodama za rekreaciju, rezultati ovog rada, ali i općeniti epidemiološki podaci i rezultati ostalih ispitivanja ukazuju na potrebu sustavnog ispitivanja i praćenja ovih voda, te potrebu donošenja zakonske regulative.

Mišljenje o zdravstvenoj ispravnosti uzoraka daje se na temelju Prijedloga Pravilnika o kvaliteti i nadzoru nad kvalitetom vode u bazenima za kupanje, no kako se radi samo o prijedlogu Pravilnika koji nema pravnu snagu, teško je provoditi kvalitetan sanitarni nadzor, te je teško provoditi upravne mjere. Podloga za provođenje upravnog postupka može se naći jedino u Zakonu o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti, te u Zakonu o sanitarnoj inspekciji, što u biti nisu provedbeni akti, te direktno ne reguliraju problematiku bazenskih voda, a nikako ne reguliraju tehničke zahtjeve za bazene (Senta i Zebec 1987).

U rezultatima je bilo prikazano da najveći broj zdravstveno neispravnih uzoraka otpada na fizikalno – kemijsko onečišćenje, i to pojedinačno na povećanu koncentraciju nitrata (mg N / L). Prema prethodno citiranom prijedlogu pravilnika MDK za nitrata u bazenima iznosi  $< 10$  (mg N / L).

Iz predloženih rezultata u prethodnom poglavlju može se vidjeti da je najveći broj zdravstveno neispravnih uzoraka u terapijskim bazenima, što se može protumačiti činjenicom da je u tim bazenima voda toplija od rekreacijskih. Dok najmanji broj zdravstveno neispravnih uzoraka otpada na jakuzije, što pak se opravdava činjenicom da je u tim bazenima zbog sistema djelovanja hidromasaže, cirkulacija tj. izmjena vode znatno brža po jedinici vremena.

Prema balneološkoj analizi termalna voda ima jaka balneološka svojstva po mineralizaciji, jodu, fluoru i temperaturi. Mineralizacija ukazuje da u vodi dominira hidrogen-karbonat i natrijev klorid. Po ionskom sastavu voda ima minimalne količine kalcija, magnezija i sulfata. Od otkrivanja vode do danas, temperatura vode se nije promijenila i iznosi 33-34 ° C. Zbog svega navedenoga voda se preporučuje za liječenje degenerativnih bolesti zglobova i kralježnice (artroze, lumbalgije, lumboišijalgije, cervikalnog sindroma i dr.), upalnih reumatskih bolesti (reumatoidnog artritisa), kontrakture zglobova s atrofijom mišića te ožiljcima (posljedice iščašenja, prijeloma, oštećenja mekih tkiva, opsežnih ožiljaka i dr.), izvanzglobnih bolova i smetnji mekih dijelova (raznih neuralgija, neuritisa, mialgija, i dr.). Način liječenja je namakanje u termalnoj vodi, masiranje termalnom vodom, stavljanje obloga (Bartolić i sur. 2000).

Dakle kako se radi o vodi koja ima deklarirana ljekovita svojstva te pošto se daju upute za liječenje spomenutih bolesti, osim u rekreacijske svrhe voda se koristi i u zdravstvene, za liječenje. Stoga se može zaključiti da je dobar dio

korisnika narušenog zdravlja, tj. oslabljenog imuniteta. Upravo radi toga bi vode sa deklariranim ljekovitim učinkom trebale biti strože kontrolirane od ostalih rekreacijskih voda.

Glavnu ulogu u svemu tome igra povišena temperatura vode koja se kreće u bazenima od 30 – 35 ° C. Takva temperatura blizu je temperaturi tijela, dakle gotovo je idealna za rast i razvoj mikroorganizama. Stoga je potrebno osigurati veći protok, odnosno bržu izmjenu vode kroz filtre, češću zamjenu svježje vode, te provoditi učinkovitije kloriranje. No, kako je najčešće riječ o povećanim koncentracijama nitrata može se reći da je to posljedica organskog raspadanja, te bi svakako uzrok trebalo tražiti u načinu filtriranja, a napore usmjeriti ka primarnom smanjenju organske tvari (Bilajac i Lušić 2009).

U bazenima u Grčkoj od 462 analiziranih uzoraka, 310 (ili 67,1 %) uzoraka bilo je mikrobiološki ispravno, dok 152 (ili 32,9 %) uzorka su pokazala mikrobiološku neispravnost (Papadopoulou i sur. 2007). Usporedimo li rezultate analize Toplica Sv. Martin sa bazenima u Grčkoj možemo vidjeti da su rezultati Toplica Sv. Martin daleko bolji, jer je njihova analiza pokazala da je od 347 uzoraka 53 uzorka (ili 15,27 %) zdravstveno neispravno. Od toga 15 uzorka (ili 4,32 %) otpada na mikrobiološku neispravnost, što je daleko manji postotak nego u Grčkoj, a 38 uzorka spada u fizikalno kemijsku neispravnost.

Zbog relativno niskog postotka neispravnih uzoraka mislim da se analize vode rade dovoljno često (jednom tjedno) i da je to dovoljno. Ukoliko se situacija promijeni trebalo bi razmotriti da se analize vrše dva puta tjedno.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih, obrađenih i analiziranih rezultata, te na temelju diskusije mogu se konstatirati slijedeći zaključci:

Od 347 uzoraka, 11 uzorka nisu bili ispravni što se tiče slobodnog klora, 7 uzoraka što se tiče klora, 9 uzoraka s neispravnim slobodnim amonijevim ionom, 11 uzorka sa neispravnim nitratima, 9 uzoraka zagađenim ukupnim koliformnim bakterijama i 6 uzoraka zagađenim aerobnim mezofilnim bakterijama. Sve ukupno 53 (15,27 %) uzorka smatraju se neispravnim, a od toga (4,32 %) uzoraka otpada na mikrobiološku neispravnost.

- 1.) Po vrsti onečišćenja najveći broj zdravstveno neispravnih uzoraka otpada na fizikalno – kemijsko onečišćenje, i to pojedinačno na povećanu koncentraciju nitrata (mg N / L).
- 2.) Po mjestu onečišćenja najveći broj zdravstveno neispravnih uzoraka je u terapijskim bazenima zbog povećane temperature, a najmanji broj zdravstveno neispravnih uzoraka otpada na jakuzije zbog brže cirkulacije vode (Boklaić 2002).
- 3.) Potrebno je sustavno ispitivanje i praćenje bazenskih voda i bazena općenito, te je potrebno što prije donošenje zakonske regulative po tom pitanju.



## 6. LITERATURA

1. APHA, AWWA and WEF (1998): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20<sup>th</sup> ed. United Book Press, Baltimore.
2. Boklaić Ž. (2002): Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2002. godinu, HZJZ, Zagreb.
3. Bilajac M., Lušić D. (2009): Zbornik radova, Upravljanje zdravstvenim rizicima u hotelskim sustavima, Opatija.
4. Carozzi F. (2003): Biolife Manual, 3<sup>rd</sup> ed., Rev.0. Ingraf, Milan.
5. Dadić Ž. (2001): Priručnik o temeljnoj kakvoći vode u Hrvatskoj, HZJZ, Zagreb.
6. Duraković S (1996): Opća mikrobiologija. PTI, Zagreb,
7. Bartolić A., Bobinac D., Bratović E., Brožičević I., Matacin I., Peršić M., Peršić V., Potrebica S. (2000): Zbornik radova, Zdravstveni turizam za 21. stoljeće. Tisak, Rijeka.
8. Esterman A., Roder D. M., Cameron S. A., Robinson B. S., Walters R. P., Lake J. A., Christy P. E. (1983): Determinants of the Microbiological Characteristics of South Australian Swimming Pools. South Australian Health Commission, Epidemiology Branch, Adelaide 5001, and State Water Laboratories, Salisbury, South Australia.
9. HRN ISO 7150 -1:1998.
10. HRN ISO 7870 – 1:1998.
11. Kučišec-Tepeš N. (1994): Specijalna bakteriologija i odabrana poglavlja iz opće i specijalne mikologije. Školska knjiga, Zagreb.
12. Naglič T., Hajsig D., Madić J., Pinter Lj. (1992): Praktikum opće mikrobiologije i imunologije. Školska knjiga, Zagreb.
13. NN (2007): Prijedlog Pravilnika o kvaliteti i nadzoru nad kvalitetom vode za kupanje, (NN br. 107/07).
14. NN (1992): Zakon o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti, (NN br. 60/92).
15. Papadopoulou C., Economou V., Sakkas H., Gousia P., Dontorou G. C., Filioussis G., Gessouli H., Karanis P., Leveidiotou S. (2007): Microbiological quality of indoor and outdoor swimming pools in Greece: Investigation of the antibiotic resistance of the bacterial isolates.
16. Pelczar M. J., Reid R. R. (1965): Microbiology, McGraw-Hill, Inc.

17. Senta A., Zebec M. (1987): Sanacija bazena za plivanje i rezidualni klor u vodi, Zbornik radova stručnog sastanka prehrambeno sanitarnih kemičara, Tuheljske toplice.
18. Stilinović B., Hrenović J. (2009): Bakteriološki praktikum. Kugler, Zagreb.
19. Topolnik, E., Naglič T., Hajsig D. (1980): Opća mikrobiologija i imunologija. Veterinarski fakultet Zagreb, Zagreb.

Korištene web stranice:

<http://www.biol.pmf.hr/e-skola/odgovori/odgovor258.htm>

[http://www.dbe.uns.ac.rs/files/pdf/./Odredjivanje\\_brojnosti\\_mikroorganizama.ppt](http://www.dbe.uns.ac.rs/files/pdf/./Odredjivanje_brojnosti_mikroorganizama.ppt)

[http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/predavanje\\_2\\_03.pdf](http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/predavanje_2_03.pdf)

<http://www.toplicesvetimartin.hr>

<http://www.aquachem.hr/aquachem/wp-content/uploads/2010/05/IVAPOOL-tretman-vode.pdf>