

# BAKTERIOLOŠKA ANALIZA IZVORSKE VODE UZ NAJPOZNATIJA IZLETIŠTA PARKA PRIRODE MEDVEDNICA

**Svjetlana Dekić, mag. oecol.**

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb  
svjetlana.dekic@biol.pmf.hr

**prof. dr. sc. Jasna Hrenović, dipl. ing. biol.**

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Unutar Parka prirode Medvednica postoje brojni izvori pitke vode. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti je li voda iz odabranih izvora uz popularna izletišta u trenutku uzorkovanja pogodna za piće. Uzorci vode sakupljeni su 11. prosinca 2016. iz izvora Vidovec, Baćun, Bliznec, izvora na vrhu Leustekove staze i iz Kraljičinog zdenca. Određen je broj ukupnih heterotrofnih bakterija, fekalnih koliforma, crijevnih enterokoka i bakterija roda *Pseudomonas* te koncentracija suspendiranih čestica i pH vode. Rezultati analize upućuju da je u trenutku uzorkovanja voda iz izvora Vidovec, Baćun i Bliznec bila pogodna za piće. Voda iz izvora na vrhu Leustekove staze zbog prevelikog broja heterotrofa i voda iz Kraljičinog zdenca zbog jednog nalaza bakterije *Escherichia coli* u trenutku uzorkovanja nije bila pogodna za piće. Kako bi dobili potpuniju sliku o tome je li voda s istraživanih izvora pogodna za piće potrebno je provesti sustavno praćenje kvalitete vode.

**Ključne riječi: kvaliteta vode, izvori, PP Medvednica, bakterije**

## 1. UVOD

Park prirode Medvednica popularna je destinacija brojnih izletnika. Na području Parka postoje brojni označeni izvori pitke vode, no međutim, ne provodi se sustavno praćenje kvalitete vode (<http://www.pp-medvednica.hr/priroda/covjek-i-priroda/>). Prema Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju (NN 125/13) zdravstveno ispravnom vodom za piće smatra se voda koja ne sadrži mikroorganizme, parazite niti njihove razvojne oblike u broju koji predstavlja opasnost za zdravlje ljudi. Prema pravilniku, za određivanje mikrobiološke ispravnosti vode za piće potrebno je u određenom volumenu vode odrediti broj kolonija ukupnih heterotrofnih bakterija, crijevnih enterokoka, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Ukupnim heterotrofnim bakterijama smatraju se sve bakterije koje su sposobne tvoriti kolonije na neselektivnim hranjivim bakteriološkim podlogama tijekom kultivacije u mraku (Stilinović i Hrenović, 2009.).

Koliformne bakterije su primarno nepatogene bakterije koje čine fiziološku floru donjeg intestinalnog trakta u čovjeka i u toplokrvnih životinja (Bitton, 2005., Stilinović i Hrenović, 2009., Hrenović i Šimunović, 2010., Antolović et al., 2016.). Koliformne bakterije se izlučuju fekalijama, te tako dospijevaju u okoliš. Koriste se od 1912. godine kao indikatori higijenske kakvoće vode (Hrenović i Šimunović, 2010.). Uključuju vrstu *E. coli* i srodne vrste rodova *Citrobacter*, *Enterobacter* i *Klebsiella*. Koliformne bakterije su fakultativno anaerobne, Gram-negativne, štapičaste, nesporogene bakterije koje fermentiraju laktozu stvarajući kiselinu i plin. Među koliformnim bakterijama razlikujemo skupinu ukupnih i fekalnih koliforma. Ukupne koliformne bakterije se uzgajaju i razgrađuju laktozu pri  $35.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  / 48h, a fekalne koliformne bakterije toleriraju višu temperaturu uzgoja pri  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  / 24h. Fekalni koliformi čine termotolerantnu frakciju ukupnih koliforma. Smatra se

da nalaz termotolerantnih fekalnih koliforma ukazuje sa sigurnošću na recentna fekalna onečišćenja okoliša. Vrsta *E. coli* čini oko 90% populacije fekalnih koliforma. Ukupni koliformi, boraveći u vanjskoj sredini izgubili su sposobnost termotolerancije i znak su starijih fekalnih onečišćenja.

Crijevni enterokoki su primarno nepatogene bakterije koje uz koliformne bakterije čine fiziološku floru donjeg intestinalnog trakta u čovjeka i u toplokrvnih životinja (Stilinović i Hrenović 2009., Antolović et al., 2016.). Crijevni enterokoki se koriste kao indikatori higijenske kakvoće vode (Mote et al., 2012.). Ovu skupinu čine bakterije roda *Enterococcus* s ukupno 16 vrsta, među kojima su, s higijenskog stajališta, najvažniji: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* i *E. hirae*, koji se izlučuju fekalijama ljudi i toplokrvnih životinja. Ostale vrste enterokoka (*E. avium*, *E. cecorum*, *E. columbae* i *E. gallinarum*) ne preživljavaju dugo u okolišu. *E. casseliflavus* i *E. mundtii* su nefekalne vrste i mogu biti prisutne u vodi zbog utjecaja biljnog materijala ili industrijskih otpadnih voda (proizvode žuti pigment). Crijevni enterokoki su Gram-pozitivni, jajoliko izduženi koki, raspoređeni u parove i kratke lance. Na krvnom agaru ne stvaraju zone hemolize. Broj crijevnih enterokoka u pravilu pozitivno korelira s brojnošću fekalnih i ukupnih koliformnih bakterija, ali u slučajevima da koliformne bakterije nisu dokazane u uzorku i sam nalaz enterokoka pouzdan je znak loše higijenske kakvoće. Njihova je prednost u bakteriološkoj analizi vode sposobnost dužeg preživljavanja u okolišu u odnosu na koliformne bakterije (Ashbolt et al., 2001.).

Bakterije roda *Pseudomonas* smatraju se normalnim stanovnicima prirodnih voda (Garrity et al., 2005.). Vrstu *P. aeruginosa* smatramo oportunističkim patogenom zbog toga što kod imunosuprimiranih pacijenata može uzrokovati teške infekcije, često s fatalnim ishodom (Garrity et al., 2005., Mena i Gerba, 2009.). Veliki problem kod bakterijskih infekcija predstavlja povećanje rezistencije na antibiotike. Kod vrste *P. aeruginosa* zabilježena je povećana rezistencija na karbapeneme, a kod vrste *E. coli* na kinolone i cefalosporine treće generacije (Tambić Andrašević et al., 2015.).

Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti na osnovu bakterioloških i fizikalno-kemijskih parametara odgovaraju li tijekom zimskog dijela godine u trenutku uzorkovanja izvorske vode u PP Medvednica za piće.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1 Područje istraživanja

Uzorci izvorske vode sakupljeni su 11.12.2016. u Parku prirode Medvednica (slika 1). Uzorkovani izvori su : 1. izvor Vidovec – iznad naselja Vidovec (296 m n.m.) 2. Bačun- iznad Markuševečke ceste (304 m n.v.) 3. izvor Bliznec- početak Sljemenske ceste (331 m n.v.) 4. Leustekova staza- pri vrhu najpoznatije planinarske staze, podno Sljemena (855 m n.v.) 5. Kraljičin zdenac-

iznad Medvedgrada (536 m n.v.). Svi uzorkovani izvori nalaze se u granicama PP Medvednica i poznata su izletišta, te se voda iz tih izvora koristi za piće izletnika. Svi uzorkovani izvori su kaptirani i izdašni s konstantnim tokom, osim izvora na vrhu Leustekove staze koji je imao smanjeni protok u vrijeme uzorkovanja. Uzorci vode uzeti su u sterilne boce od 1L te analizirani unutar 6h od uzorkovanja.



Slika 1: Istraživani izvori unutar PP Medvednica (a) i karta Hrvatske s označenim mjestom uzorkovanja (b), izvor: Google Maps, 2017.

### 2.2 Analiza bakterioloških i fizikalno-kemijskih parametara vode

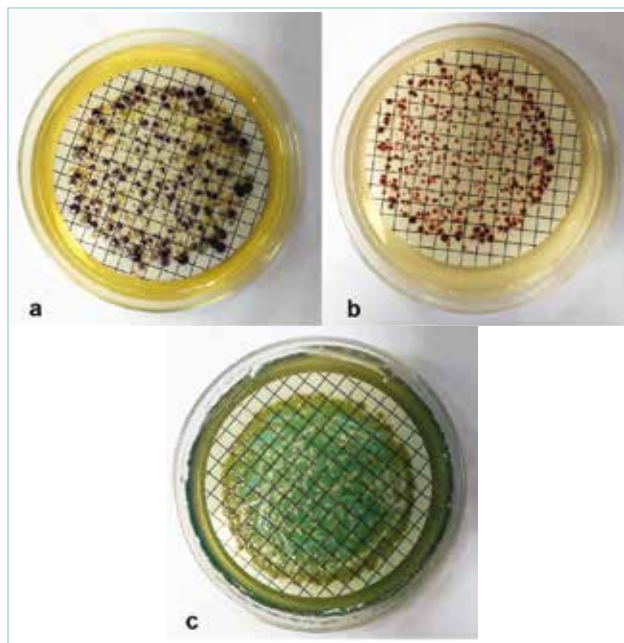
Ukupne heterotrofne bakterije (tablica 1) određene su iz 1 mL uzorka vode uzgojem na neselektivnom Nutrient agaru (Biolife) na 22°C i 37°C (Eaton et al., 2005.). Po 100 mL uzorkovane vode profiltrirano je kroz membranske filtre promjera pora 0.45 µm, koji su zatim stavljeni na komercijalne selektivne i diferencijalne hranjive bakteriološke podloge za uzgoj koliforma, crijevnih enterokoka i bakterija roda *Pseudomonas* (tablica 1).

Tablica 1: Analizirani bakteriološki pokazatelji, hranjive podloge, temperature i vremena inkubacije.

Pokazatelj	Hranjivi agar	Temperatura i vrijeme inkubacije
Ukupni heterotrofi	Nutrient	37°C/2d i 22°C/3d
Fekalni koliformi	Rapid E. coli 2	44°C/1d
Crijevni enterokoki	Slanetz-Bartley agar i Bile Azide Esculin	35°C/3d i 44°C/4h
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas</i> agar + glicerol i CN	35°C/2d

Rapid E. coli 2 agar (Biorad) je selektivno-diferencijalna kromogena podloga za uzgoj koliformnih bakterija (ISO 16140-1 i ISO 16140-2, 2016). Omogućuje diferencijaciju bakterije *E. coli* čije kolonije porastu kao ljubičaste od ostalih koliformnih bakterija čije kolonije porastu kao plavo-zelene (slika 2 a). Slanetz-Bartley agar (Biolife) visoko je selektivna kromogena podloga za uzgoj crijevnih enterokoka čije kolonije porastu kao

crvene (slika 2 b), a potvrda crijevnih enterokoka se dalje dokazuje na Bile Azide Esculin agaru 44°C/4h (ISO 7899-2, 2000). U slučaju pozitivnog nalaza crijevnih enterokoka oko kolonija se pojavi smeđe-crno obojenje uslijed hidrolize eskulina. *Pseudomonas* agar s glicerolom i CN suplementom (Centrimide i Nalidixic Acid, Biolife) korišten je za uzgoj bakterija roda *Pseudomonas* (ISO 16266, 2006). U slučaju porasta bakterije *P. aeruginosa* kolonije imaju plavo-zeleno obojenje (slika 2 c), dok su ostale vrste iz roda *Pseudomonas* žute boje.



**Slika 2:** Primjeri pozitivnih rezultata bakteriološke analize zdravstveno neispravne vode: fekalni koliformni na Rapid *E.coli* 2 agaru (a), crijevni enterokoki na Slanetz-Bartley agaru (b), bakterije roda *Pseudomonas* na *Pseudomonas* agaru s CN suplementom (c).

Koncentracija suspendiranih čestica u vodi određena je spektrofotometrijski (DR/2500 Hach spektrofotometar), a pH vrijednost vode pH-metrom (WTW inoLab pH7110).

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati bakteriološke i fizikalno-kemijske analize uzoraka izvorske vode s PP Medvednica prikazani su u tablici 2. Broj ukupnih heterotrofnih bakterija uzgojenih na 22°C bio je veći nego na 37°C u svim uzorcima. Ovaj podatak je očekivan, jer će na 22°C porasti sve nativne psihrofilne bakterije, a na 37°C samo mezofilne bakterije koje su antropogenog porijekla. Broj ukupnih heterotrofnih bakterija bio je najveći u vodi izvora Leustekova staza i za razliku od ostalih uzoraka taj je broj premašio maksimalno dopuštene koncentracije bakterija prema Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju (NN 125/13). Fekalne koliformne bakterije su nađene samo kao jedna kolonija *E. coli* u vodi izvora Kraljičin zdenac te nisu bile prisutne

u ostalim uzorcima. Crijevni enterokoki nisu nađeni ni u jednom uzorku izvorske vode. Iako su u vodi iz svih izvora detektirane vrste iz roda *Pseudomonas*, nijedna kolonija nije imala karakteristično plavo-zeleno obojenje te se nije radilo o vrsti *P. aeruginosa*. Uzevši u obzir maksimalno dopuštene koncentracije bakterija prema Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju (NN 125/13), voda iz izvora Leustekova staza i Kraljičin zdenac nisu bile podobne za piće, dok je voda s izvora Vidovec i Bliznec bila pogodna za piće.

**Tablica 2:** Rezultati bakteriološke i fizikalno-kemijske analize izvorske vode s PP Medvednica. Maksimalno dopuštene koncentracije bakterija prema Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju, NN 125/13 iznose: ukupni heterotrofi 22°C = 100/1mL, ukupni heterotrofi 37°C = 20/1mL; *E. coli*, crijevni enterokoki, *P. aeruginosa* = 0/100mL.

Izvor	Ukupni heterotrofi 22°C/1mL	Ukupni heterotrofi 37°C/1mL	Fekalni koliformi/100mL	Crijevni enterokoki/100mL	<i>Pseudomonas</i> sp./100mL	Suspendirane čestice (mg/L)	pH vrijednost
Vidovec	50	0	0	0	44	0	7.45
Baćun	40	10	0	0	328	0	7.16
Bliznec	30	20	0	0	91	0	7.33
Leustekova staza	410	30	0	0	79	0	7.34
Kraljičin zdenac	70	0	1	0	32	0	7.31

Svi analizirani uzorci imali su neutralne vrijednosti pH, što ih također čini pogodnim za piće. Suspendirane čestice nisu bile prisutne u uzorcima. Odsutnost suspendiranih čestica u bistroj vodi odgovara nalazu ukupno malog broja bakterija u uzorcima. Naime, pojava suspendiranih čestica u uzorku vode uglavnom je posljedica prisutnosti koloidnih čestica u koje ubrajamo i bakterije. U ekosustavima rijeka, jezera i mora broj kultivabilnih bakterija kreće se između 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>/mL vode (Ehrlich i Newman, 2009.). U izvorskim vodama PP Medvednica ovaj je broj značajno manji (ispod 10<sup>3</sup>/mL). Stoga možemo zaključiti da su izvori PP Medvednica još uvijek dobre kvalitete.

Povećan broj ukupnih heterotrofnih bakterija u vodi iz izvora na Leustekovoj stazi može se objasniti time što je u vrijeme uzorkovanja izvor imao slabiji intenzitet toka. Nalaz samo jedne kolonije *E. coli*/100mL prilikom jednog uzorkovanja vode iz izvora Kraljičin zdenac može biti sporadičan. Slično istraživanje provedeno je na odabranim izvorima u Gorskom kotaru (Crnković i Gobin, 2013.), u kojem autori navode hidrološki režim, klimatske uvjete i prisutnost naselja kao važne čimbenike koji uvjetuju bakteriološku kvalitetu izvorske vode. Nadalje, bakteriološka analiza pokazuje trenutno stanje vode, stoga bi bilo potrebno provesti sustavno praćenje kvalitete vode na izvorima kako bismo stekli uvid u zdravstvenu ispravnost vode iz izvora unutar PP Medvednica te time utjecali na odgovorno korištenje i zaštitu izvora. ■

## LITERATURA

- Antolović, R.; Frece, J.; Gobin, I.; Hrenović, J.; Kos, B.; Markov, K.; Mlinarić-Missoni, E.; Novak, J.; Ožanić, M.; Pinter, L.J.; Plečko, V.; Pleško, S.; Šantić, M.; Ševgjić Klarić, M.; Šeruga Musić, M.; Škorić, D.; Šušković, J. (2016.): *Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije*. Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, Hrvatska.
- Ashbolt, N. J.; Grabow, W. O. K.; Snozzi, M. (2001.): Indicators of microbial water quality. *Water quality: Guidelines, standards and health – Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease* (ur. L. Fewtrell, J. Bartram), 289–315, WHO Water Series, IWA Publishing, London.
- Bitton, G. (2005.): *Wastewater Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA.
- Crnković, G.; Gobin, I. (2013.): Mikrobiološka ispravnost prirodne izvorske vode u odabranim izvorima na području Gorskog kotara. *Hrvatske vode*, 21(83), 17–24.
- Eaton, A. D.; Clesceri, L. S.; Rice, E. W.; Greemberg, A.E. (2005.): *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition*, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, USA.
- Garrity, G. M.; Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley J. T. (2005.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, Part B*. Springer, New York, USA.
- Hrenović, J.; Šimunović, S. (2010.): Pogodnost komercijalnih krutih hranjivih podloga za kultivaciju ukupnih koliformnih bakterija iz površinskih voda. *Hrvatske vode*, 18(71), 35–40.
- ISO 16140-1 (2016.): Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 1: Vocabulary
- ISO 16140-2 (2016.): Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method
- ISO 16266 (2006.): Water quality -- Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* -- Method by membrane filtration
- ISO 7899-2 (2000.): Water quality -- Detection and enumeration of intestinal enterococci -- Part 2: Membrane filtration method
- Ehrlich, L. H.; Newman, D.K. (2009.): *Geomicrobiology, Fifth Edition*. CRC Press Taylor & Francis Group, New York, USA.
- Mena, K. D.; Gerba, C. P., (2009.): Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol*, 201:71–115. doi: 10.1007/978-1-4419-0032-6\_3.
- Mote B. L.; Turner J. W.; Lipp, E. K. (2012.): Persistence and growth of the fecal indicator bacteria enterococci in detritus and natural estuarine plankton communities. *Appl Environ Microbiol*. 78(8):2569–77. DOI: 10.1128/AEM.06902-11 PMID: 22327586
- Pravilnik o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju (NN 125/13).
- Stilinović, B.; Hrenović, J. (2009.): *Praktikum iz bakteriologije*. Kugler, Zagreb, Hrvatska.
- Tambić Andrašević, A.; Tambić, T.; Katalinić-Janković, V.; Payerl Pal, M.; Bukovski, S., Butić, I.; Šoprek, S. (2015.): *Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2014. g.* Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb, Hrvatska.
- [www.pp-medvednica.hr/priroda/covjek-i-priroda/](http://www.pp-medvednica.hr/priroda/covjek-i-priroda/)

### Bacteriological analysis of spring water in the vicinity of popular visitor spots in the Nature Park Medvednica

**Abstract.** There are numerous freshwater springs within the Nature Park Medvednica. The purpose of this investigation was to determine whether water from selected springs close to popular visitor spots is suitable for drinking at the sampling time. Water samples were collected on 11 December 2016 from the springs Vidovec, Bačun, Bliznec, the spring at the top of the Leustek trail and from the Queen's Well. The number of total heterotrophic bacteria, faecal coliforms, intestinal enterococci and bacteria of the genus *Pseudomonas* as well as the concentrations of suspended solids and pH of water were determined. The analysis results indicate that water from the springs Vidovec, Bačun and Bliznec was suitable for drinking at the sampling time, whereas water from the spring at the top of the Leustek trail (due to excessive heterotrophic bacteria numbers) and water from the Queen's Well (due to *Escherichia coli* found in one sample) were unsuitable for drinking at the sampling time. In order to gain a more comprehensive insight regarding the suitability for drinking of water from the investigated springs, a systemic monitoring of water quality should be performed.

**Key words:** water quality, springs, PP Medvednica, bacteria

### Bakteriologische Analyse des Wassers aus den Quellen an den bekanntesten Ausflugsorten des Naturparks Medvednica

**Zusammenfassung.** Innerhalb des Naturparks Medvednica befinden sich zahlreiche Trinkwasserquellen. Das Ziel dieser Untersuchung war zu bestimmen, ob das Wasser aus den gewählten Quellen in der Nähe von den beliebten Ausflugsorten zum Zeitpunkt der Probenahme trinksicher war. Die Proben wurden am 11. Dezember 2016 von den Quellen Vidovec, Bačun, Bliznec und Kraljičin zdenac entnommen sowie von der Quelle, die sich am Ende des Leustek-Pfades befindet. Die Gesamtzahl der heterotrophen Bakterien, fäkalcoliformen Bakterien, Darmenterokokken und Bakterien der Gattung *Pseudomonas* sowie die Feinstaubkonzentration und der pH-Wert des Wassers wurden bestimmt. Die Ergebnisse der Analyse zeigen, dass zum Zeitpunkt der Probenahme das Wasser aus den Quellen Vidovec, Bačun und Bliznec trinksicher war. Das Wasser aus der sich am Ende des Leustek-Pfades befindenden Quelle war wegen der zu hohen Zahl von Heterotrophen und das Wasser aus der Quelle Kraljičin zdenac wegen eines *Escherichia coli*-Befundes zum Zeitpunkt der Probenahme nicht trinksicher. Um ein möglichst vollständiges Bild davon zu bekommen, ob das Wasser aus den untersuchten Quellen trinksicher ist, sollte eine systematische Überwachung der Wasserqualität durchgeführt werden.

**Schlüsselwörter:** Wasserqualität, Quellen, Naturpark Medvednica, Bakterien