

Prisutnost *Clostridium perfringens* u moru za kupanje na području grada Rijeka

Juričić, Inge

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:564768>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Inge Juričić

PRISUTNOST *Clostridium perfringens* U MORU ZA KUPANJE NA PODRUČJU GRADA
RIJEKA

Završni rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Inge Juričić

PRISUTNOST *Clostridium perfringens* U MORU ZA KUPANJE NA PODRUČJU GRADA
RIJEKA

Završni rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: doc.dr.sc. Arijana Cenov, dipl.sanit.ing.

Završni rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1.

2.

3.

Rad sadrži 49 stranica, 17 slika, 4 tablice, 45 literaturnih navoda

Zahvala

Veliko hvala mojoj mentorici Naslovnoj doc.dr.sc. Arijani Cenov, dipl.sanit.ing. na strpljenju, razumijevanju, posvećenosti i stručnim savjetima tijekom izrađivanja ovog završnog rada.

Hvala obitelji, kolegama i prijateljima na nesebičnoj podršci i potpori.

Sažetak

Republika Hrvatska kao turistička zemlja ima reguliranu obvezu praćenja kakvoće mora za kupanje prema europskoj Direktivi o vodi za kupanje (2006/7/EC) te nacionalnoj Uredbi o kakvoći mora za kupanje (NN 73/2008). Praćenje kakvoće mora temelji se na utvrđivanju broja mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja, *Escherichia coli* i crijevni enterokoki. Ovim istraživanjem praćeno je prisustvo dodatnog indikatora fekalnog onečišćenja, bakterije *Clostridium perfringens* te njena prostorna i vremenska distribucija na urbanim plažama zapadnog dijela Grada Rijeke (Kantrida). Istraživanje je provedeno tijekom dvije sezone kupanja (2021. i 2022. godine), s učestalosti uzorkovanja jedanput tjedno. U istraživanje je uključeno 12 lokacija opterećenih dotocima slatkih voda. Prema dobivenim rezultatima, na koncentraciju *Clostridium perfringens* utječu fizikalno-kemijski parametri, temperatura mora i zraka i salinitet. Od istraživanih lokacija najopterećenije su A i B, u rujnu, u obje promatrane godine, kada su i oborine najintenzivnije. Koncentracije *Clostridium perfringens* nije značajno varirala ovisno o dobu dana (ujutro – popodne). U manje od 1 % uzoraka koncentracija *Clostridium perfringens* bila je preko 1000 CFU/100 mL, što moguće predstavlja rizik za zdravlje kupaca.

Ključne riječi: *Clostridium perfringens*, kakvoća mora za kupanje, fekalni indikatori, fizikalno-kemijski parametri

Summary

As a tourist country, the Republic of Croatia is obliged to monitor the quality of the sea for bathing in accordance with the European Bathing Water Directive (2006/7/ EC) and the National Bathing Water Quality Regulation (Official Gazette 73/2008). The monitoring of coastal water quality is based on the determination of the number of microbiological indicators of faecal pollution, *Esherishia coli* and intestinal enterococci. In this study, the presence of an additional indicator of faecal pollution, the bacterium *Clostridium perfringens*, and its spatial and temporal distribution on the urban beaches of the western part of the city of Rijeka (Kantrida) was monitored. The survey was conducted during two bathing seasons (2021 and 2022), with sampling once a week. 12 locations polluted by freshwater inflows were included in the survey. The results obtained show that the concentration of *Clostridium perfringens* is influenced by physico-chemical parameters, sea and air temperature and salinity. Of the sites studied, A and B are the most polluted in September in both years observed, when precipitation is most intense. The concentration of *Clostridium perfringens* did not vary significantly depending on the time of day (morning - afternoon). In less than 1% of the samples, the concentration of *Clostridium perfringens* was above 1000 CFU/100 ml, which may pose a risk to the health of bathers.

Keywords: *Clostridium perfringens*, the water quality, faecal indicators, physio-chemical parameters

SADRŽAJ

1. UVOD	3
1.1. MONITORING KAKVOĆE MORA ZA KUPANJE.....	3
1.1.1. Klasifikacija mora za kupanje	4
1.2. Fekalno onečišćenje.....	6
1.3. Fekalni indikatori.....	8
1.3.1. <i>Escherichia coli</i>	8
1.3.2. Crijevni enterokoki.....	9
1.3.3. Humani crijevni virusi i kolifagi	9
1.3.4. <i>Clostridium perfringens</i>	10
1.3.5. Ostali	11
1.4. ZAKONSKA LEGISLATIVA I OSTALI RELEVANTNI DOKUMENTI	13
1.4.1. Direktiva o vodi za kupanje (2006/7/EC)	13
1.4.2. Nova Direktiva o vodi za kupanje.....	14
1.4.3. Uredba o kakvoći mora za kupanje (NN/73/2008)	15
1.4.4. Smjernice o kvalitete vode za rekreaciju- Svezak 1: Obalne i slatke vode.....	15
1.4.5. Preporuke WHO-a o znanstvenom, analitičkom i epidemiološkom razvoju relevantnom za parametre kvalitete voda za kupanje u Direktivi o vodama za kupanje (2006/7/EZ).....	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	18
3.1. Područje istraživanja.....	18
3.2. Uzorkovanje.....	21
3.3. Mikrobiološki pokazatelj	23
3.4. Fizikalno- kemijski pokazatelji	26
3.5. Statistička obrada rezultata	27

4. REZULTATI.....	27
4.1. Deskriptivna statistika.....	27
4.2. Korelacija.....	27
4.3. Lokacija	28
4.4. Godina	29
4.5. Mjeseci.....	30
4.6. Udio pozitivnih uzoraka i kategorizacija opterećenja	31
4.7. Razdoblje dana	32
5. RASPRAVA	34
6. ZAKLJUČAK.....	36
7. LITERATURA.....	37
8. ŽIVOTOPIS	42

1. UVOD

S obzirom da je Republika Hrvatska turistička zemlja, čijih gotovo 20% BDP-a dolazi iz prihoda turizma, nužno je osigurati najbolju kakvoću resursa koji privlači ljude iz različitih krajeva (World Tourism Organization UNWTO, 2018). Taj resurs je Jadransko more. Budući da se more Lijepe naše najviše koristi u rekreacijske svrhe potrebno je voditi računa o zdravlju i sigurnosti kupaca, ali i okoliša. Sustavno praćenje kvalitete mora za kupanje provodi se duž cijele jadranske obale pa tako i na području grada Rijeke te omogućuje ljudima sigurnost i pravovremenu informaciju o stanju kakvoće. Kvalitetu mora karakteriziraju različiti fizikalni, kemijski i mikrobiološki parametri pri čemu se najveći naglasak stavlja na posljednje. U mikrobiološki aspekt parametara ubrajaju se bakterije, virusi, praživotinje, a dijeleći ih na manje skupine dolazi se do specifičnih vrsta prepoznatljivih po svojstvima koja mogu upućivati, primjerice, na onečišćenje. Prema Uredbi o kakvoći mora za kupanje (NN 73/2008) praćenje kvalitete mora temelji se na mikrobiološkom ispitivanju prisutnosti indikatora fekalnog zagađenja *Escherichia coli* i crijevnih enterokoka. Međutim, u ovom istraživanju naglasak je stavljen na utvrđivanje prisustva bakterijske vrste koja duže preživljava u za nju nepovoljnim uvjetima, *Clostridium perfringens*.

1.1. MONITORING KAKVOĆE MORA ZA KUPANJE

Sedamdesetih godina prošloga stoljeća, u Europi je uočeno veliko povećanje ljudskih aktivnosti na moru, posebno u okviru industrijalizacije i urbanizacije. Shodno tome došlo je do povećanja broja turista, odnosno kupaca na Sredozemnom moru pa time i razvijanja same djelatnosti. Uočavanjem rizika za zdravlje ljudi i okoliša, pojavila se potreba za uspostavljenjem stalnog praćenja kakvoće mora za kupanje koje je, između ostalog, ozakonila Barcelonska konvencija (1). Njome su ispisane mjere koje se države članice moraju pridržavati, a Republika Hrvatska uspješno provodi isto već 34 godine. Ključan dio održavanja kvalitete mora na što višoj razini čini monitoring. To je proces kontinuiranog promatranja jednog ili više pokazatelja kakvoće mora za kupanje prema utvrđenim zakonima i programima. Najčešće se analizira odnos mikrobioloških pokazatelja i okolišnih čimbenika, kao što su temperatura vode i zraka, salinitet, količina oborina, jakost Sunčevog zračenja (2). Najbitnije je pravilno uzimanje uzoraka mora te osiguravanje njihove reprezentativnosti. Uzorkovanje mora za kupanje se provodi na godišnjoj razini u periodu od 15. svibnja do 30. rujna svakih 15 dana. Ono je definirano

Uredbom o kakvoći mora za kupanje NN 73/2008 koje propisuje i sam postupak uzorkovanja mora: na minimalnoj dubini od 1 m te 30 cm ispod površine. Mikrobiološki pokazatelji stanja kakvoće mora za kupanje su *Escherichia coli* i crijevni enterokoki čija se količina uspoređuje sa standardima koji definiraju ocjenu kvalitete mora. Osim Uredbe, postoji i Direktiva o vodi za kupanje kojom je propisano obavezno izvješćivanje Europske komisije o godišnjoj i konačnoj ocjeni. Izvješćivanje vrši Agencija za zaštitu okoliša (AZO) koristeći Europski informacijski sustav za vode (Water Information System for Europe, WISE) kao bazu podataka. Baza podataka je javno dostupna na web stranicama Europske Agencije za okoliš (EEA), a sastoji se od slikovitih prikaza lako razumljivih laicima. Osim na razini svjetskih razmjera, obavješćivanje javnosti o kakvoći mora na pojedinom području moguće je putem web stranice predstavničkog tijela županije što je, u ovom slučaju, Nastavni Zavod za javno zdravstvo.

1.1.1. Klasifikacija mora za kupanje

Kao što je već rečeno, svakom analizom uzorka mora za kupanje utvrđuju se dva mikrobiološka parametra- *Escherichia coli* i crijevni enterokoki- čiji se broj uspoređuje sa standardom propisanim Uredbom o kakvoći mora za kupanje. Ovisno o njihovom broju, svaka točka iz koje je uzet uzorak, nakon analize dobiva ocjenu. Ocjena može biti izvrsna, dobra, zadovoljavajuća i nezadovoljavajuća (tablica 1). Takva ocjena naziva se pojedinačnom. Nakon završetka sezone uzorkovanja, koja traje od 15. svibnja do 30. rujna, svaka uzorkovana točka dobiva godišnju ocjenu na osnovu deset rezultata. Osim pojedinačne i godišnje ocjene pojedinoj točki uzorkovanja daje se i konačna ocjena. To je ocjena koja obuhvaća prethodne tri sezone kupanja te sezonu obavljenju u toj godini. Ukupno četrdeset rezultata. Godišnja i konačna ocjena imaju iste kriterije ocjenjivanja koji se razlikuju od kriterija pojedinačne ocjene. Svaka ocjena dodatno je naznačena bojom (tablica 2). Za pojedinačnu ocjenu navedena je i metoda ispitivanja koja točno određuje svaki korak analize uzorka (3).

Tablica 1: Standardi za pojedinačnu ocjenu kakvoće mora za kupanje

Mikrobiološki pokazatelj	Ocjena			Metoda ispitivanja
	Izvrсна	Dobra	Zadovoljavajuća	
<i>Escherichia coli</i> (bik*/100ml)	< 60	61-100	101-200	HRN EN ISO 7899-1 ili HRN EN ISO 7899-2
Crijevni enterokoki (bik*/100ml)	<100	101-200	201-300	HRN EN ISO 9308-1 ili HRN EN ISO 9308-3

*bik- broj izraslih kolonija

Tablica 2: Standardi za godišnju i konačnu ocjenu kakvoće mora za kupanje

Mikrobiološki pokazatelj	Izvrсна	Dobra	Zadovoljavajuća	Nezadovoljavajuća
<i>Escherichia coli</i> (bik*/100ml)	≤100**	≤200**	≤185***	>185***
Crijevni enterokoki (bik*/100ml)	≤150**	≤300**	≤300***	>300***

*bik- broj izraslih kolonija

**Temeljeno na vrijednosti 95-og percentila (1)

***Temeljeno na vrijednosti 90-og percentila (1)

- (1) Temeljeno na log10 normalnoj raspodjeli koncentracija mikrobioloških pokazatelja, vrijednosti pojedinih percentila dobivaju se na sljedeći način:
- izračunavaju se logaritmi (log10) svih bakterijskih koncentracija (u slučaju nultih vrijednosti koncentracija uzimaju se logaritamske vrijednosti koncentracija koje predstavljaju graničnu vrijednost detekcije korištene analitičke metode)
 - izračunava se aritmetička sredina logaritmiranih vrijednosti koncentracija (μ)
 - izračunava se standardna devijacija logaritamskih vrijednosti (σ)
 - 90-i i 95-i percentili izračunavaju se na sljedeći način:
 - 90-i percentil = antilog ($\mu + 1.282 \sigma$)
 - 95-i percentil = antilog ($\mu + 1.65 \sigma$)

1.2. Fekalno onečišćenje

Prema Hrvatskom hidrografskom institutu, Kaštelančić opisuje oceanografske značajke mora poput morskog dna, morskih mijena, temperature mora, saliniteta, gustoće, morskih struja, valova uzrokovanih vjetrom. Na oceanografske značajke utječu meteorološke značajke poput klime, temperature zraka, padalina, vjetra koje mijenjaju ponašanje mora (4). More je izloženo različitim utjecajima, stoga je važno znati da njegova obilježja neće uvijek biti ista već će se mijenjati. Mijenjanjem značajke saliniteta, koji u prosjeku iznosi za Jadransko more 38,3 promila, možemo zaključiti kako je, primjerice, došlo do izljeva slatke vode u more (4,5). Istim tim izljevom došlo je do promjene i drugih značajki mora-gustoće, temperature, ali i mikrobioloških promjena. Morski ekosustav je dom brojnim životinjama i biljkama, eukariotima i prokariotima, koji su prilagođeni uvjetima u moru. Nazivamo ih još i autohtonim organizmima. S druge strane, poznajemo alohtone organizme koji dospijevaju u more iz različitih izvora kao što može biti zemlja, zrak, rijeka, otpadna voda (5). Nekad su komunalne i oborinske vode završavale svoj tok neposredno u more pri čemu je češće dolazilo do fekalnog opterećenja i lokacija koje se koristi za kupanje. Danas je taj problem reguliran Zakonom o vodama gdje je nužno bilo kakvu vrstu otpadne vode pročititi (6). Međutim, različite tehničke nepravilnosti ili oštećenja sustava za odvodnju i pročišćavanje komunalnih otpadnih voda, postojanje aktivnih priobalnih dotoka i vrulja, utjecaj samih kupaca i životinja te drugi izvora mogu utjecati na fekalno opterećenja mora koje se koristi u rekreacijske svrhe. Termin fekalno onečišćenje upućuje na prisutnost mikroorganizama iz probavnog trakta ljudi i životinja koji mogu naštetiti ljudskom zdravlju, a mogu biti bakterije, paraziti, virusi i helmiti (tablica 3).

Tablica 3: Broj najčešćih patogena u otpadnoj vodi (7)

Patogeni organizmi	Bolest/ uloga	bik*/l
Bakterije		
<i>Campylobacter spp</i>	Gastroenteritis	$10^3 - 10^6$ bik*
<i>Escherichia coli</i>	Indikator organizma	$10^7 - 10^8$ bik*
<i>Intestinalni enterokoki</i>	Indikator organizma	$10^6 - 10^7$ bik*
<i>Salmonella spp</i>	gastroenteritis	$> 10^5$ bik*
<i>Shigella spp</i>	Bacilarna dizenterija	$10^2 - 10^8$ bik*
<i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio vulnificus</i>	Kolera, gastroenteritis	$< 10 - 10^5$ bik*
Helminti		
<i>Ascaris spp</i>	Askarioza	5-450 jajašaca
<i>Ancylostoma spp</i> <i>Necator spp</i>	Amebna dizenterija	5-190 jajašaca
<i>Trichuris spp</i>	Dijarea	10-40 jajašaca
Paraziti		
<i>Cryptosporidium spp</i>	Dijarea	$10 - 10^4$ oocita
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebna dizenterija	> 100 cista
<i>Giardia duodenalis</i>	Dijarea	$10 - 10^5$ cista
Virusi		
<i>Adenovirus</i>	Respiratorne bolesti, gastroenteritis	$10^2 - 10^9$ bik*
<i>Astrovirus</i>	Gastroenteritis	$10^3 - 10^7$ bik*
<i>Hepatitis A virus</i>	Hepatitis	$> 10^9$ bik*
<i>Hepatitis E virus</i>	Hepatitis	$> 10^5$ bik*
<i>Norovirus (Caliciviridae)</i>	Dijarea, povraćanje	$10^2 - 10^9$ bik*
<i>Enterovirus</i>	Poliomijelitis, blaga febrilna bolest, miokarditis, meningitis	$> 10^4$ staničnih kultura
<i>Rotavirus</i>	Dijarea, povraćanje	$10^2 - 10^8$ bik*

*bik- broj izraslih kolonija

1.3. Fekalni indikatori

Možemo reći kako su navedeni patogeni mikroorganizmi (tablica 3.) ujedno i indikatori fekalnog onečišćenja. Indikatori ili pokazatelja fekalnog onečišćenja karakteriziraju obilježja poput isključive prisutnosti u fecesu ljudi i toplokrvnih životinja, kvantitativnost, jednostavne i jeftine metode njihova dokazivanja. Postoji još veliki broj patogenih mikroorganizama u vodi prispjelih iz različitih izvora, ali su metode za njihovu detekciju tehnički vrlo zahtjevne i neekonomične (8). Indikatori fekalnog onečišćenja u moru čija se koncentracija rutinski ispituje su: *Escherichia coli* i crijevni enterokoki. Provedeno je nekoliko studija u morskoj vodi pod utjecajem antropogenog onečišćenja, koje potvrđuju navedene indikatore kao dobre pokazatelje kvalitete vode. No, ni *Escherichia coli* ni crijevni enterokoki se ne smatraju idealnim parametrima, posebno zato što su većinom oboljenja dobivena u vodi za kupanja ona čija je etiologija virusna, a ne bakterijska (9,10,11). Zbog toga i virusi imaju vrijednu ulogu u istraživanjima praćenja kvalitete mora za kupanje te postoji prijedlog da bi crijevni virusi i/ili bakteriofagi mogli postati zakonski obavezni u monitoringu istog (12).

1.3.1. *Escherichia coli*

Koliformna bakterija koja čini normalnu ljudsku mikrobiotu jest *Escherichia coli*, jedini pripadnik istoimene vrste koji ne potječe iz okoliša (8). To je gram- negativna, oksidaza-negativna štapičasta bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* (13). Poznata je kao bezopasan, dapače koristan, stanovnik ljudskih crijeva iako postoje neki sojevi koji uzrokuju gastrointestinalne probleme (14). U fecesu ljudi može biti zastupljena 10^6 - 10^7 CFU/g (15). *Escherichia coli* je 1893. godine po prvi put uvedena kao indikator fekalnog onečišćenja, a izolirana je iz otpadnih voda tvornice celuloze i papira (13). Trenutno se koristi kao regulatorni parametar i u Direktivi Europske unije o vodama za kupanje i u nizu drugih propisa o rekreacijskim vodama diljem svijeta. Njezino ispitivanje pruža informacije o nedavnoj kontaminaciji, podržava vremenski trend analize te služi kao alat budućim istraživanjima (12). Za njezino određivanje u moru za kupanje koristi se tehnika membranske filtracije te modificirana metoda HRN EN ISO 9308-1/2014 (ISO 9308-1:2014; EN ISO 9308-1:2014).

1.3.2. Crijevni enterokoki

Crijevni ili intestinalni enterokoki su kuglaste gram-pozitivne bakterije koje pripadaju porodici *Enterococci*. Kao i *Escherichia coli*, i oni su normalni stanovnici crijevne mikroflore u ljudi zbog čega je logično reći da se u velikom broju izlučuju fecesom (16,17). U fecesu ljudi zastupljen je 10^5 - 10^6 CFU/g (15). Najpoznatiji predstavnici su *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*, a jedna od ključnih značajki im je ta što su halofilne i termofilne bakterije. Zbog takvih karakteristika duže će preživljavati u moru za kupanje što će upućivati na dugotrajnije fekalno onečišćenje dok će koliformne bakterije biti dokaz kratkotrajnog zagađenja (18). Kao i *Escherichia coli*, enterokoki se dokazuju tehnikom membranske filtracije te normiranom metodom HRN EN ISO 7899-2:200 (ISO 7899-2:2000; EN ISO 7899-2:2000).

1.3.3. Humani crijevni virusi i kolifagi

Nova istraživanja sve više opravdavaju određivanje pojedinih skupina virusa u moru za kupanje. Većinom se temelje na humanim crijevnim virusima, čijoj skupini pripadaju adenovirusi, enterovirusi i norovirusi, te bakteriofazima, čijoj skupini pripadaju kolifagi (12).

Humani adenovirusi su dvolančani DNA virusi te pripadaju porodici *Adenoviridae*. Uzročnici su gastrointestinalnih i respiratornih bolesti, a zbog nukleinske kiseline koje sadrže su izrazito otporni. Rasprostranjeni su u cijelom svijetu, a najčešći medij kojim se prenose jest voda. Ljudi zaraženi ovim virusom dugo ga izlučuju i nakon prestanka simptoma (19,20). Osim njih, i enterovirusi se prenose vodom te su pronađeni i u moru. To su jednolančani RNA virusi iz porodice *Picornaviridae*. Podijeljeni su u četiri vrste: enterovirusi A, B, C i D, ali uključuju i različite tipove poliovirusa, coxackievirusa te ehovirusa. Najčešći su uročnici gastrointestinalnih bolesti iako su mogući uzročnik i konjuktivitisa, meningitisa, miokarditisa ili bolesti ekstremiteta (12). Norovirusi, također, posjeduju jednolančanu RNA, ali bez ovojnice. Pripadaju porodici *Calciviridae* te od svih navedenih virusa prednjače kada je riječ o bolestima gastrointestinalnog sustava. Dosad je dokazana njihova prisutnost u slatkim vodama poput rijeka i jezera te bazenima, ali i kanalizaciji (10,21,22). Sudeći po dosadašnjim saznanjima o izljevima takvih vrsta voda s kopna u more, postoji mogućnost pronalaska norovirusa i u moru za kupanje.

S druge strane postoje virusi kojima ciljni domaćin nije čovjek, već bakterija. Takvi virusi nazivaju se bakteriofagi. Bakteriofagi koliformnih bakterija nazivaju se i kolifagima. Dije se

u dvije skupine: somatski i F-specifični, a osnovna im je razlika način inficiranja koliforma. Somatski kolifagi inficiraju bakteriju preko svojih somatskih receptora koji se nalaze na staničnoj stjenki te su veći od F-specifičnih. F- specifični kolifagi se koriste spolnim ili F-pilima, a dijele se u još dvije skupine ovisno o sadržaju nukleinske kiseline. Općenito, kolifagi su detektirani u otpadnim vodama, kao i u fecesu mnogih životinja, a izolirani su i iz morske rekreacijske vode iako u malom broju (23). Mogu se odrediti različitim metodama, premda je najčešća ona koja se temelji na učinku tj. lizi bakterijske stanice koju inficiraju. Nastali plakovi izražavaju brojnost virusa. Standardizirane metode (USEPA i ISO metode) definiraju određivanje somatskih i F-specifičnih kolifaga (12).

1.3.4. *Clostridium perfringens*

Još jedan indikator fekalnog onečišćenja, je gram pozitivna, sporogena anaerobna bakterija *Clostridium perfringens* (24). Rasprostranjena je širom svijeta. Možemo je pronaći u slatkovodnom, morskom i kopnenom okolišu, a prirodan je stanovnik gastrointestinalnog trakta ljudi i životinja (25). Prvi put je opisana 1892.godine kao *Bacillus aerogenes captulatus*, a onda je 1899. preporučena kao pokazatelj fekalnog onečišćenja (26,27). Zbog svojih karakteristika puno duže preživljava u okolišu od koliformnih bakterija i enterokoka, a dosadašnja istraživanja pokazala su njezinu prisutnost pri pojavnosti drugih patogenih mikroba poput *Cryptosporidiuma* i *Giardije spp.* posebice u otpadnim površinskim vodama (28). Spore *Clostridium perfringensa* mogu biti i indikator taloga otpadnih čestica u morskom okolišu (29). U nekim zemljama ova bakterija je obavezan parametar pri ispitivanju kvalitete voda, ali je ipak potrebno još mnogo istraživanja o istoj kako bi bila obuhvatnije zastupljena u zakonodavstvu ostalih zemalja (30). Navedena bakterija reducira nitrata do nitrita, sulfite do sulfida, fermentira šećer laktozu i otapa želatinu. *Clostridium perfringens* u okolišu može biti prisutna u dva oblika: vegetativnom i u obliku spore. Bakterija jest normalan stanovnik crijeva ljudi. Međutim, ista može izazvati infekciju i/ili intoksikaciju ukoliko u kontakta sa čovjekom dođe iz nekog drugog izvora kao na primjer komunalnom otpadnom vodom opterećenog mora za kupanje, hranom inficiranom bakterijom i slično. Na ovaj način u organizam unesena bakterija, enterotoksinom koji producira može izazvati vodene proljeve s izrazitom abdominalnom boli koji obično kratko traju. Međutim, da bi došlo do oboljenja, bakteriju ili njezine spore, potrebno je unijeti u organizam oralnim putem i to u dozi od 10^6 . Oralni put najčešće podrazumijeva konzumiranje hrane nakon koje se u crijevima procesom sporulacije razvija toksin (31). *Clostridium*

pefringens može ući u organizam čovjeka i drugim putem. Primjerice, duboke ozljede ili kirurške rane mogu biti dobra ulazna vrata za navedenu bakteriju. Smjestivši se u rani, bakterija producira toksin koji uzrokuje nekrozu tkiva, razvijanje lezija i drastično smanjenje neutrofila. Takvo stanje naziva se plinska gangrena. Toksin bakterije razgrađuje fosfolipide i na taj način uništava membranu stanice čovjeka te ulazi u cirkulacijski sustav (32). Na mjestu infekcije potiče stvaranje agregata trobocita i leukocita izazivajući ishemiju i nekrozu tkiva (33,34). Napredak bakterijske infekcije bilježi pojava septičkog šoka popraćenog s hipotenzijom i zatajenjem više organa što može biti fatalno za čovjeka. Septički šok se razvija radi poremećaja homeostaze uzrokovanog pretjeranom reakcijom imunološkog sustava domaćina na toksin bakterije (35). Postoji više tipova bakterije *Clostridium perfringens*- tip A, B, C, D i E, a svaki od njih može producirati neku vrstu toksina. Dakle, postoji i veći broj toksina od kojih je najbolje istražen alfa-toksin, a upravo je on glavni krivac razvijanja plinske gangrene u čovjeka. Produciraju ga svi tipovi bakterije, iako je najbolje istražen u bakteriji tipa A (36). Serotipizaciju *Clostridium perfringens* je moguće raditi u samo nekoliko laboratorija u svijetu što je jedan od razloga nedovoljnog broja istraživanja na tu temu. Drugi je razlog gotovo nemoguć uzgoj enterotoksina u *in vitro* uvjetima (31). Neka istraživanja navode kako je *Clostridium perfringens* uzročnik sindroma iznenadne smrti dojenčadi jer ima mogućnost potaknuti niz biokemijskih događaja koji mijenjaju kontrolu kardiorespiratorne funkcije i u konačnici izazivaju smrt (37). Iako je vrlo mala vjerovatost da će se kupaći na navedene načine zaraziti *Clostridium perfringensom* važno je poznavati moguće indikacije. Ipak, zbog indikatorskih obilježja u prisutstvu drugih patogenih organizama važno ga je istraživati. Također, zbog otpornosti spora duže opstaje nakon pojava onečišćenja, čak i na udaljenim područjima od izvora onečišćenja. Dokazuje se tehnikom membranske filtracije te normiranom metodom HRN EN ISO 14189:2016 (ISO 14189:2013; EN ISO 14189:2016) u anaerobnim uvjetima.

1.3.5. Ostali

1.3.5.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je gram negativan, pokretan, aerobni štapić zastupljen u tlu, vodi, biljkama, probavnom traktu životinja, ali i ljudi. Jedno od njegovih glavnih obilježja jest izlučivanje pigmenata: pioverdin, piocijanin, piorubin, a raste na podlogama s niskim udjelom nutrijenata. Optimalna temperatura rasta je 37° C, ali podnosi i veće temperature od primjerice

42° C dok na 55° C ugiba tek nakon sat vremena. Niže temperature, poput temperature hladnjaka, ne pogoduje rastu ovih bakterija. Iako je aerobna, bakterija može rasti i u anaerobnim uvjetima, ali joj je tada potrebna prisutnost nitrata. Ova oportunistička bakterija u imunokompromitiranih ljudi lako izaziva bolest poput upale dišnog i mokraćnog sustava, meningitis, osteomijelitis, endokarditis, septički sindrom i artritis (38). Dokazana je i pozitivna korelacija između infekcija kože i sluznica s njegovom prisutnošću u moru, a preporučuje se njegovo uključivanje kao dodatan parametar u proces određivanja kakvoće mora na plažama (39,40).

1.3.5.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je gram pozitivni kok koji je normalan stanovnik gornjih dišnih puteva i probavnog sustava čovjeka te rodnice. Optimalna temperatura rasta je 30 do 37° C, a na jednostavnim bakterijskim podlogama prepoznaje se po glatkim, sjajnim, pravilnim kolonijama bijele do zlatne boje. Ima beta hemolizu, a razlikuje se od beta- hemolitičkog streptokoka po tome što posjeduje enzim katalazu. Njegovo obilježje je i sposobnost izlučivanja egzotoksina (38). U studijama ispitivanja mora za kupanje, dokazano je kako svaki kupač tijekom 15 minuta kupanja otpusti 10⁶ CFU što ukazuje na još veću prisutnost *Staphylococcus aureus* tijekom sezone kupanja (39). Može se prenositi zrakom, kontaktom sa inficiranom osobom, hranom, rekreacijskim vodama. Kod imunokompromitiranih osoba može izazvati kožna oboljenja (38).

1.4. ZAKONSKA LEGISLATIVA I OSTALI RELEVANTNI DOKUMENTI

Kada govorimo o kvaliteti mora za kupanje, nekoliko važnih zakona i propisa dolazi u obzir kako bi se osigurala zaštita i očuvanje zdravlja ljudi, ali i morskog okoliša. Jedan od ključnih zakona jest Direktiva o vodi za kupanje kojom se postavljaju standardi za kvalitetu u obalnih voda. S obzirom na godine koje su prošle od njezina donošenja, nužno je razmotriti prilike za poboljšanje Direktive pa je pitanje vremena kada će nova stupiti na snagu. U donošenju nove Direktive o vodi za kupanje sudjeluju različite publikacije od strane Svjetske zdravstvene organizacije iz 2018. i 2021. godine. Također, važno je napomenuti kako i Hrvatska ima svoju zakonsku regulativu usklađenu s europskom, a riječ je o Uredbi o kakvoći mora za kupanje iz 2008. godine.

1.4.1. Direktiva o vodi za kupanje (2006/7/EC)

Direktiva o vodi za kupanje (Bathing Water Directive) je glavni zakonodavni okvir koji provodi Europska unija kako bi se osigurala kvaliteta i sigurnost voda za kupanje u svim državama članicama. Ona omogućava zaštitu javnog zdravstva postavljanjem posebnih standarda za kvalitete vode, čime smanjuje rizik od bolesti koje se prenose vodom te infekcija povezanih s kupanjem u onečišćenim vodama. Također, promiče zaštitu okoliša poticanjem praćenja kakvoće voda čime doprinosi očuvanju vodenih ekosustava i biološke raznolikosti. Osim toga, Direktiva o vodi za kupanje unaprjeđuje turističke i rekreacijske aktivnosti osiguravajući da mjesta za kupanje zadovoljavaju higijenske i sigurnosne standarde, čime se privlače posjetitelji, a tako i jača lokalno gospodarstvo. Kao što je već rečeno, Direktiva je donesena 2006. godine te je na snazi već 17 godina. U tom periodu su se promijenile različite okolnosti, koje se dotiču i mjera propisanih ovom Direktivom. Okolnosti se tiču globalnog zatopljenja, razvoja turističke djelatnosti, novih istraživanja, razvoja digitalizacije (41).

1.4.2. Nova Direktiva o vodi za kupanje

Uviđanjem problema u Direktivi o vodi za kupanje, doneseni su prijedlozi za njezino poboljšanje. U sesijama Europskog Vijeća raspravljalo se o učestalosti uzorkovanja, procjenama rizika za onečišćenje, identifikaciji kupališta, kriterijima za ocjenu kupališta te modeliranju i digitalizaciji. Prema Direktivi o vodi za kupanje koja je još uvijek na snazi, zahtijevaju se najmanje četiri uzorka po sezoni kupanja za pojedinu točku uzorkovanja, što znači jedan uzorak mjesečno. Prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije iz 2018. (12) preporučeno je povećanje minimalnog godišnjeg broja uzoraka na 20 po sezoni kupanja, vodeći se time da je s mjesečnim uzorkovanjem 15-20% kupališta potencijalno pogrešno ocijenjeno. Samim time je i zdravlje kupaca ugroženo. S obzirom da bi takva mjera dovela do većih troškova, alternativna rješenja se još uvijek razrađuju. Smjernice Svjetske zdravstvene organizacije iz 2021. godine (7) uvode koncept planova sigurnosti rekreacijske vode kao alat za procjenu i upravljanju rizicima povezanih s korištenjem istih. Osim Direktivom propisanih fekalnih bakterija, identificirale su se i nove mikrobne opasnosti novijim istraživanjima, poput plivačkog svrbeža ili *Vibria* zastupljenog u slatkim vodama i moru, te se preporučuju kao parametar u profilu vode za kupanje i razmatranju rizika za plan sigurnosti rekreacijske vode. Direktivom nisu obuhvaćene kemikalije, ali Svjetska zdravstvena organizacija ipak predlaže da se njihova koncentracija u vodama ispituje. Što se tiče mikroorganizama, smatra se da je njihova koncentracija uvelike prisutna u pijesku pa ga se zato preporučuje kao relevantan parametar u planu sigurnosti rekreacijske vode, a preporučuju se i privremene smjernice od 60 CFU/g za crijevne enterokoke te od 90 CFU/g za gljive. Direktivom je prepuštena odluka državama članicama na odluku definiranja “velikog broja kupaca” što može obuhvaćati broj od 10 do 300. Termin “veliki broj kupaca” je važan u definiranju mjesta za kupanje, ali i očekivanju kvalitete rezultata pa se tako planira i jasna definicija navedenog termina. Direktiva objavljena 2006. godine, člankom 5. je zahtijevala od država članica da do 2015. godine osiguraju kvalitetu vode za kupanje na svim točkama do zadovoljavajuće ocjene što se ni do danas nije dogodilo. Još jedan razlog promjeni pridonosi razvijanje modeliranja kao specifičnog procesa koji će omogućiti predviđanje kvalitete mora u budućnosti. Veliku važnost tu nosi i digitalizacija koja sam proces razvijanja modeliranja može olakšati ali i omogućiti javnosti brži i lakši dotok informacija.

1.4.3. Uredba o kakvoći mora za kupanje (NN/73/2008)

Uredba o kakvoći mora za kupanje (NN/73/2008) se je već spominjala u odjeljcima ovog rada: Monitoring kakvoće mora za kupanje i Klasifikacija mora za kupanje gdje je objašnjen način uzorkovanja i ocjenjivanja uzrokovanih točaka te obavješćivanje javnosti o kvalitete mora pojedinog području. Uredba je donesena je 1. siječnja 2009. godine, a njome se određuju granične vrijednosti mikrobioloških pokazatelja i druge značajke mora. Njezina glavna zadaća je uskladiti Direktivu o vodi za kupanje s hrvatskim zakonodavstvom. Kao što je već navedeno, uvedene su nove indikatorske bakterije onečišćenja mora za kupanje: *Escherichia coli* i crijevni enterokoki, ali se njihovi standardi u Uredbi razlikuju od onih u Direktivi o vodi za kupanje. Uredba definira strože kriterije za istu kategoriju kvalitete od Direktive, a razlog tome je visoka kakvoća mora na najvećem broju plaža u Hrvatskoj. Kako bi se osigurala što bolja kvaliteta mora za kupanje, Hrvatska i dalje ima u planu provoditi strože kriterije. Tako ispada da, primjerice, točka uzorkovanja zadovoljavajuće kakvoće Uredbom, ima dobru kakvoću definiranu Direktivom. No, kada se u odnos stavljaju kakvoće mora država članica Europske unije primijenjuju se kriteriji Direktive. Uredba opisuje obradu rezultata pomoću 90-og i 95-og percentila (vidjeti odjeljak Klasifikacija mora za kupanje). Monitoring kakvoće mora za kupanje provode ovlaštene osobe u ovlaštenim laboratorijima, kao temperaturu zraka i mora ili salinitet, laboratorijsku analizu, pisanje izvješća te izradu i obnovu profila mora za kupanje (42).

1.4.4. Smjernice o kvalitete vode za rekreaciju- Svezak 1: Obalne i slatke vode

“Smjernice o kvaliteti vode za rekreaciju- Svezak 1: Obalne i slatke vode” je publikacija koja uključuje sveobuhvatne smjernice o kvaliteti vode u rekreacijskim okruženjima s posebnim naglaskom na obalna područja i slatke vode. Smjernice postavljaju jasne i znanstveno utemeljene standarde za kvalitetu rekreacijskih voda, a cilj im je zaštita i sigurnost pojedinaca koji dolaze u kontakta s vodom. Smjernice uključuju preporuke, kao što su “Preporuke WHO-a o znanstvenom, analitičkom i epidemiološkom razvoju relevantnom za parametre kvalitete voda za kupanje u Direktivi o vodama za kupanje (2006/7/EZ)”, te metodologije za praćenje i ocjenu kvalitete vode. Pomažu nadležnim tijelima u provedbi učinkovitih programa praćenja kako bi se osigurala usklađenost s utvrđenim standardima, ali i u kontroli onečišćenja te razvoju javne svijesti (7).

1.4.5. Preporuke WHO-a o znanstvenom, analitičkom i epidemiološkom razvoju relevantnom za parametre kvalitete voda za kupanje u Direktivi o vodama za kupanje (2006/7/EZ)

Značajna publikacija objavljena 2018. godine od strane Svjetske zdravstvene organizacije jest “Preporuke WHO-a o znanstvenom, analitičkom i epidemiološkom razvoju relevantnom za parametre kvalitete voda za kupanje u Direktivi o vodama za kupanje (2006/7/EC)”. Kao što joj i samo ime govori, publikacija donosi preporuke o poboljšanju Direktive za kupanje temeljeći se na najnovijim znanstvenim i epidemiološkim istraživanjima koja se odnose na kvalitetu voda za kupanje. Publikacija olakšava državama članicama Europske unije donošenje odluka o praćenju, procjeni i upravljanju vodama za kupanje, a Direktivi osigurava ispunjavanje svojih temeljnih ciljeva zaštite javnog zdravlja i očuvanja vode za kupanje (12).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je ispitati prostornu i vremenski varijaciju pojavnosti mikrobiološkog pokazatelja *Clostridium perfringens* na području urbanih plaža zapadnog dijela grada Rijeke, konkretno govoreći o području Kantride. Koncentracija spomenute bakterije će se uspoređivati sa fizikalnim parametrima mora- salinitetom, temperaturom mora i zraka, te u različitim razdobljima dana: ujutro i popodne.

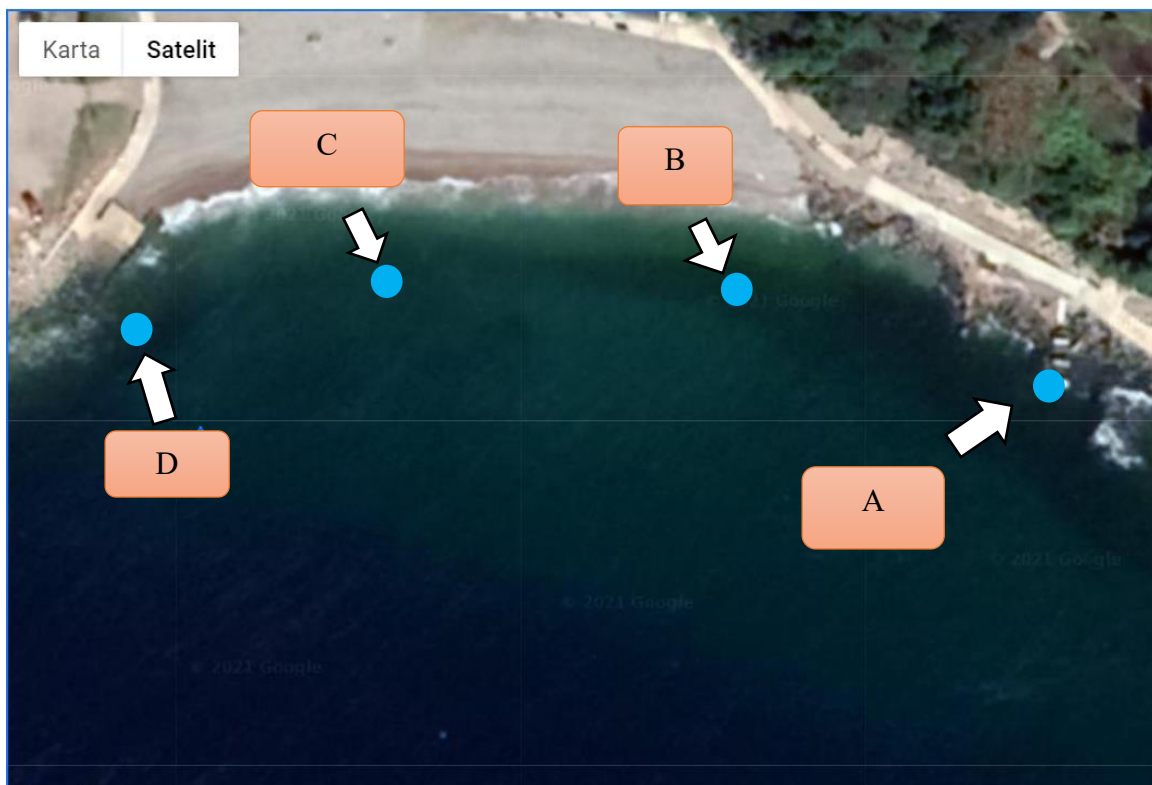
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Područje istraživanja

Istraživanjem je obuhvaćeno šest lokacija podjeljenih u dvije točke. Jedna od točaka ispitivanja je službena točka monitoringa kakvoće mora, dok je druga odabrana kao dodatna reprezentativna označena nazivom “profilna”. Zbog velikog broja dotoka slatke vode (Slika 6) u radu su odabrane lokacije sa područja zapadnog dijela grada Rijeke, Kantride. Popis lokacija i oznake kojima su obilježene za potreba ovog rada prikazane su u Tablici 4. Na slikama u nastavku teksta prikazana je i njihova točna lokacija (Slika 1, 2, 3 i 4)

Tablica 4: Ispitivane točke

RB	Lokacija	Oznaka slova
1.	Kantrida – istok	A
2.	Kantrida – istok profilna	B
3.	Kantrida – zapad profilna	C
4.	Kantrida – zapad	D
5.	Kantrida – 3. Maj	E
6.	Kantrida - 3. Maj profilna	F
7.	Nogometno igralište profilna	G
8.	Nogometno igralište	H
9.	Ploče – istok profilna	I
10.	Ploče – istok	J
11.	Ploče – zapad profilna	K
12.	Ploče – zapad	L



Izvor: Internet-Karta- Satelit

Slika 1.: Satelitski prikaz četiri točke ispitivanja: A, B, C i D



Izvor: Internet- Karta- Satelit

Slika 2.: Satelitski prikaz dviju točkaka ispitivanja: E i F



Izvor: Internet- Karta- Satelit

Slika 3.: Satelitski prikaz dviju točaka ispitivanja: G i H



Izvor: Internet- Karta- Satelit

Slika 4.: Satelitski prikaz četiri točke ispitivanja: I, J, K i L

3.2. Uzorkovanje

Istraživanje je obuhvaćalo dvije sezone kupanja, dakle period od 15. svibnja do 30. rujna 2021. i 2022. godine. Uzorkovale su se gore navedene lokacije od strane kopna prema normama HRN EN ISO 5667-14:2016 i HRN EN ISO 19458:2008 (Slika 5, 10). Učestalost uzorkovanja je bila svakih 7 dana u jutarnjim terminima, a svakih 14 dana i u jutarnjim i u popodnevnim terminima. U danima predviđenim isključivo za jutarnji termin uzorkovane su tzv. rutinske točke. U danima predviđenim i za jutarnji i za popodnevni termin uzorkovano je svih 12 točaka i tzv. rutinske ili službene te dodatne ili profilne.

Uzorak se prikupljao u staklene boce s plastičnim čepom kapaciteta 0,5 L koje su prethodno autoklavirane na temperaturi od 121° C tijekom 15 minuta. Na svakoj boci naznačeno je vrijeme i mjesto uzorkovanja. Uz svako uzorkovanje ispunjavao se Zapisnik. Na Zapisnicima se bilježilo ime i oznaka uzorka, analitički broj uzorka, vrijeme uzorkovanja, vremenske prilike (prisustvo ili odsustvo kiše ili vjetra te njihova jačina odnosno smjer), temperature zraka i mora te salinitet. Nakon prikupljanja uzoraka, isti su dostavljeni u nadležni laboratorij za mikrobiologiju voda Odjela za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije unutar maksimalno četiri sata. Obrada uzoraka vršena je odmah po dostavi u laboratorij ili s maksimalnim odstupanjem od 24 sata pri čemu su uzorci čuvani na temperaturi od 2-8 °C do obrade.



Izvor: osobna fotografija

Slika 5.: Uzorkovanje mora



Izvor: osobna fotografija

Slika 6.: Izvor na Kantridi

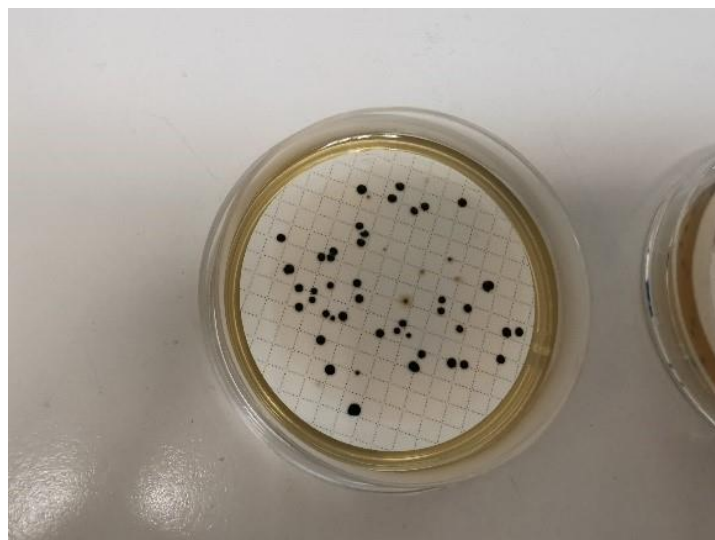
3.3. Mikrobiološki pokazatelj

Za mikrobiološku analizu uzorak se mora dobro homogenizirati. To podrazumijeva polagano miješanje vode u boci kružnim i okomitim pokretima. Time postizemo ravnomjerniju raspodjelu mikroorganizama po uzorku kako bi analiza istog bila što reprezentativnija. Nakon homogenizacije boca se otvara, a njezino se grlo sterilizira plamenom. Mikrobiološka analiza radi se u 100 ml vode koja se ulijeva u sterilne lijevke postavljene na sustavu za membransku filtraciju. Membranskom filtracijom, na sterilnom, bijelom graduiranom filteru 47 mm, promjera pora od 0,45 μm miješanih celuloznih estera zaostaju traženi mikroorganizmi (Slika 7). Filteri se potom stavljaju na hranjivu selektivnu podlogu. Izolacija i identifikacija *Clostridium perfringens* u vodi radi se standardiziranom i akreditiranom metodom prema HRN EN ISO 14189:2016 normi. Njome se u uzorcima vode detektiraju i spore i vegetativne stanice. *Clostridium perfringens* je sulfid-reducirajuća bakterija što znači da reducira sulfite do sulfida, a to se obično očituje stvaranjem crnih do žuto- smeđih kolonija na podlozi koja sadrži željezne soli. Selektivna podloga na koju se prenosi filter nakon membranske filtracije je TSC (Tryptose sulphite cycloserin agar) (Slika 8), a inkubira se u anaerobnim uvjetima na $44\pm 1^\circ\text{C}$ tijekom 24 sata. Kao potvrdni test koristi se reagens kisele fosfataze gdje se na filter papiru razmaže kolonija te nanese 2-3 kapi navedenog reagensa. Pozitivna reakcija očituje se kao pojava ljubičaste boje kolonije u roku 3- 4 minute (Slika 9). Broj izraslih kolonija izražen je kao CFU (eng. Colony Forming Units) u 100 ml uzorka.



Izvor: Nastavni zavod za javno zdravstvo

Slika 7: Membranska filtracija



Izvor: Nastavni zavod za javno zdravstvo

Slika 8: TSC selektivna podloga s pozitivnim porastom



Izvor: Nastavni zavod za javno zdravstvo

Slika 9: Potvrdni test -pozitivan test kisele fosfataze

3.4. Fizikalno- kemijski pokazatelji

U ovom radu mjereni fizikalno – kemijski pokazatelji su: temperaturu mora, temperaturu zraka i salinitet. Temperatura mora mjerena je termometrom, temperatura zraka mobilnim uređajem pomoću aplikacije, a salinitet terenskim salinometrom marke "YSI Model 30" koji sadrži niklove elektrode za mjerenje provodljivosti otopine (Slika 10).



Izvor: osobna fotografija

Slika 10: Mjerenje saliniteta

3.5. Statistička obrada rezultata

Rezultati su statistički obrađeni pomoću TIBCO Statistica v. 14.0.1.25 programskog paketa (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, SAD). Za izračunavanje i opisivanje osnovnih karakteristika podataka koristila se deskriptivna statistika, a od mjera centralne tendencije korištene su srednja vrijednost i medijan. Kako bi ispitali normalnost raspodjele podataka, koristili smo Kolmogorov-Smirnovljev test. Za provjeru povezanosti dviju skupina podataka upotrijebili smo Spearmanov koeficijent korelacije, a značajnost razlike između skupina podataka provjerena je Kruskal-Wallis-ovim i Mann-Whitney-jevim testom. Svaki korišteni test nalazio se unutar pouzdanosti od 95% i p-vrijednosti manjom od 5%.

4. REZULTATI

4.1. Deskriptivna statistika

Prisutnost bakterije *Clostridium perfringens* ispitivana je u 600 uzoraka. Njezina koncentracija kretala se od 0 do 2000 CFU/100ml sa srednjom vrijednosti $46,18 \pm 207,77$ CFU/100 ml, medijanom 6,00 CFU/100ml te interkvartilnim rasponom 1,00 do 17,00 CFU/100ml.

U istim uzorcima određeni su i fizikalno kemijski pokazatelji:

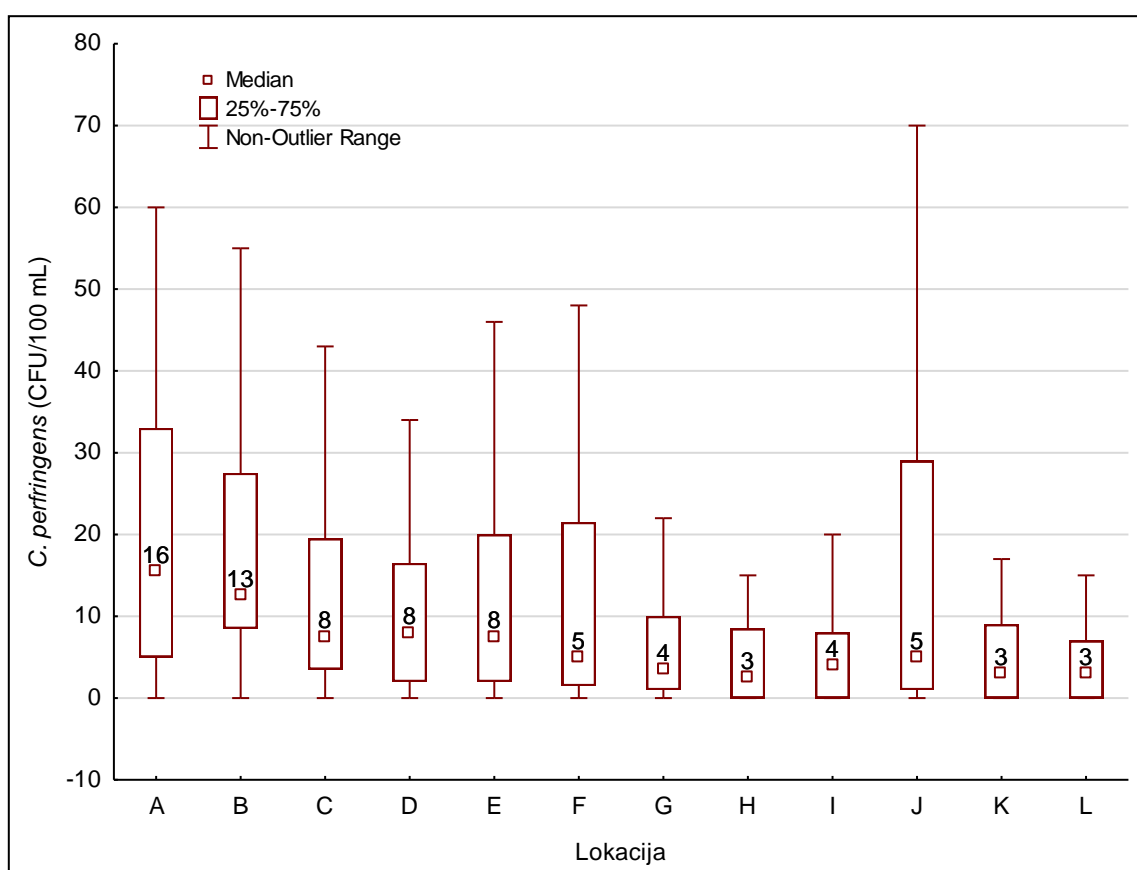
salinitet, temperatura zraka i temperatura mora. Salinitet se kretao u rasponu od 0,5 do 38 ‰ sa srednjom vrijednosti $33,08 \pm 5,60$ ‰, medijanom 34,70 ‰ i interkvartilnim rasponom od 32,9 do 35,9 ‰. Najniža zabilježena temperatura zraka bila je 15, a najviša 38 °C sa srednjom vrijednosti od $26,31 \pm 4,70$ °C, medijanom 27,00 °C i interkvartilnim rasponom od 24 do 29 °C. Raspon temperature mora varirao je od 12,50 do 29,30°C sa srednjom vrijednosti $22,97 \pm 3,09$ °C, medijanom 23,00 °C i interkvartilnim rasponom od 21,60 do 25,00 °C.

4.2. Korelacija

Povezanost koncentracije *Clostridium perfringens* je u negativnoj korelaciji s fizikalno-kemijskim pokazateljima mora. Dakle, postoji statistička značajka između varijabli što nije nužno i njihova uzročno- posljedična veza.

4.3. Lokacija

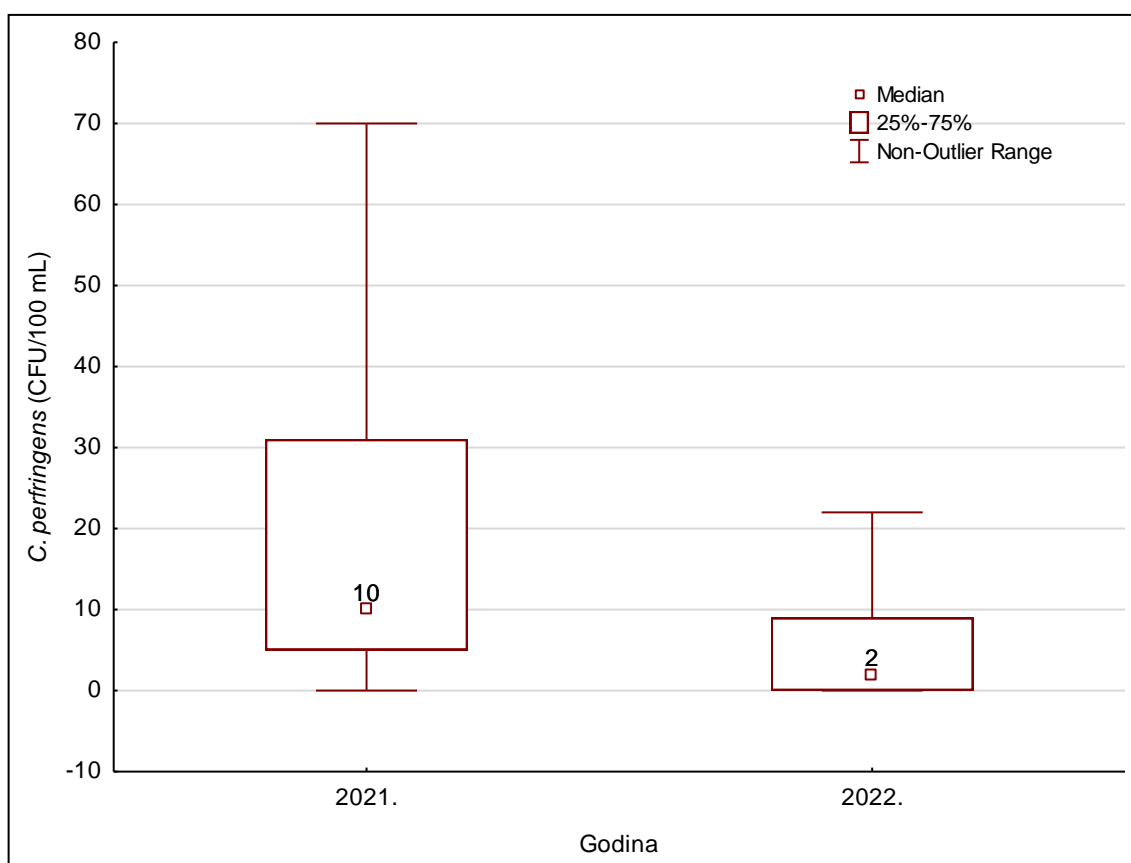
Statistički značajna razlika (Kruskal-Wallis, $N=600$ $H=48,775$; $p<0,0001$) utvrđena je između točke A i točaka G, H, I, K i L te točke B i točaka H, I, K i L. Od ukupno 600 uzoraka, 60 ih pripada točki A. Koncentracijske vrijednosti *Clostridium perfringens* kretale su se od 0 do 2000 CFU/100 ml sa srednjom vrijednosti $90,20\pm359,07$ CFU/100ml, medijanom 15,50 CFU/100ml i interkvartalnim rasponom od 5,00 do 33,00 CFU/100ml. Ukupno 40 uzoraka uzeto je s točke B gdje je koncentracijska vrijednost *Clostridium perfringens*, također, varirala od 0 do 2000 CFU/100ml, ali sa srednjom vrijednosti od $119,53\pm437,54$ CFU/100ml, medijanom 12,50 CFU/100ml i interkvartalnim rasponom od 8,5 do 27,50 CFU/100ml (Slika 11).



Slika 11: Medijan koncentracije *Clostridium perfringens* po ispitivanim lokacijama

4.4. Godina

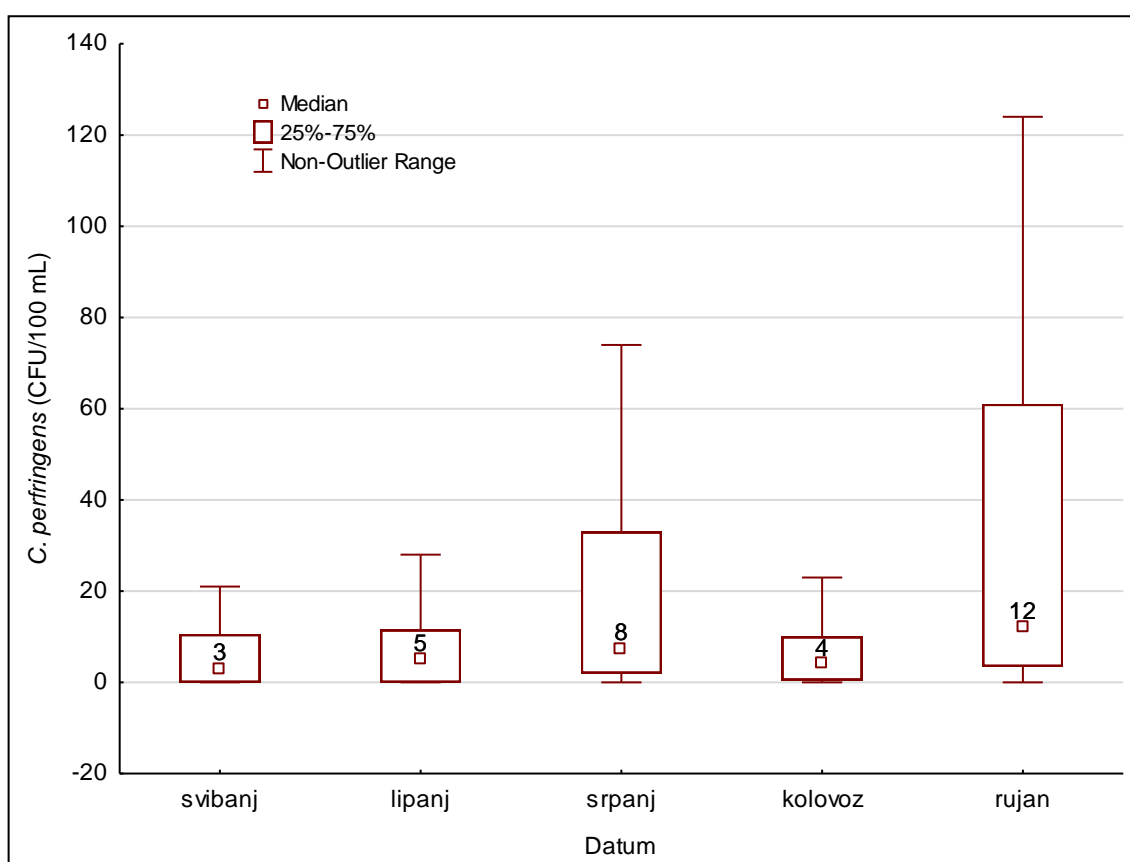
Istraživanje je provedeno u sezonama dviju godina 2021. i 2022. godine. Obradom rezultata utvrđena je statistički značajna razlika (Mann-Whitney; $N=600$; $Z=10,36$; $p<0,0001$) između navedenih godina. Od ukupno 600 uzoraka, jedna polovica je prikupljena 2021., a druga 2022. godine. Koncentracijska vrijednost *Clostridium perfringens* u 2021. godini kretala se od 0 do 380 CFU/100ml sa srednjom vrijednosti $25,18\pm 38,68$ CFU/100ml, medijanom 10,00 CFU/100ml i interkvartilnim rasponom od 5,00 do 31,00 CFU/100ml. Za 2022. godinu koncentracija bakterije varira od 0 do 2000 CFU/100ml sa srednjom vrijednosti $67,18\pm 290,00$ CFU/100ml, medijanom 2,00 CFU/100ml i interkvartilnim rasponom od 0 do 9,00 CFU/100ml (Slika 12).



Slika 12: Medijan koncentracije *Clostridium perfringens* po godinama

4.5. Mjeseci

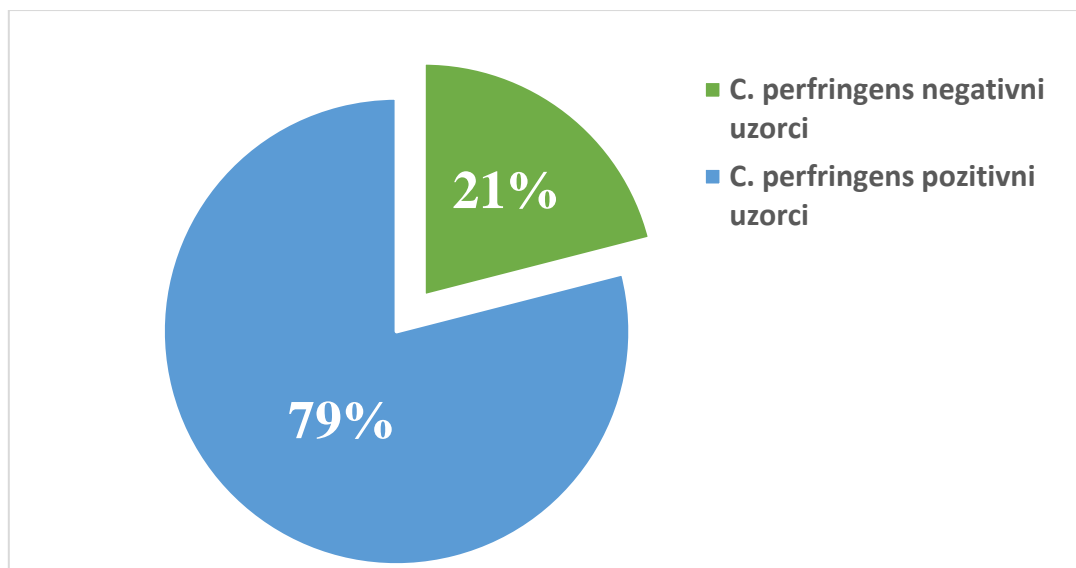
Razdoblje istraživanja u obje godine uključuje svibanj, lipanj, srpanj, kolovoz i rujna. Obradom podataka utvrđena je statistički značajna razlika (Kruskal-Wallis, $N=600$; $H=48,90$; $p<0,0001$) između rujna od ostalih mjeseci, isključivši srpanj. Od ukupno 600 uzoraka, 120 ih je uzeto u periodu mjeseca rujna. Koncentracija bakterije *Clostridium perfringens* varirala je od 0 do 2000 CFU/100ml sa srednjom vrijednosti $170,62 \pm 440,26$ CFU/100ml, medijanom 12,00 CFU/100ml i interkvartilnim rasponom od 3,50 do 61,00 CFU/100ml (Slika 13).



Slika 13: Medijan koncentracije *Clostridium perfringens* po mjesecima

4.6. Udio pozitivnih uzoraka i kategorizacija opterećenja

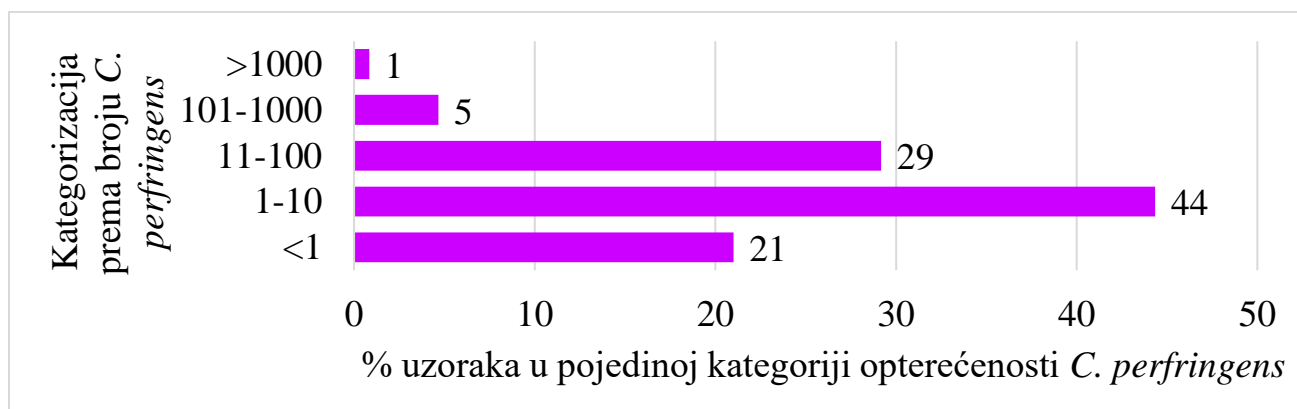
Prisutnost bakterije *Clostridium perfringens* ispitivana je u 600 uzoraka, od čega u 21% (N=126) uzoraka nije dokazana, dok je u gotovo u 80% uzoraka (N=474) dokazana (Slika 14).



Slika 14: Udio pozitivnih i negativnih uzoraka na prisustvo bakterije *Clostridium perfringens* u dvogodišnjem razdoblju ispitivanja (N= 600 uzoraka)

Prema broju bakterija *Clostridium perfringens* u 100 ml uzorka isti su podijeljeni u 5 kategorija:

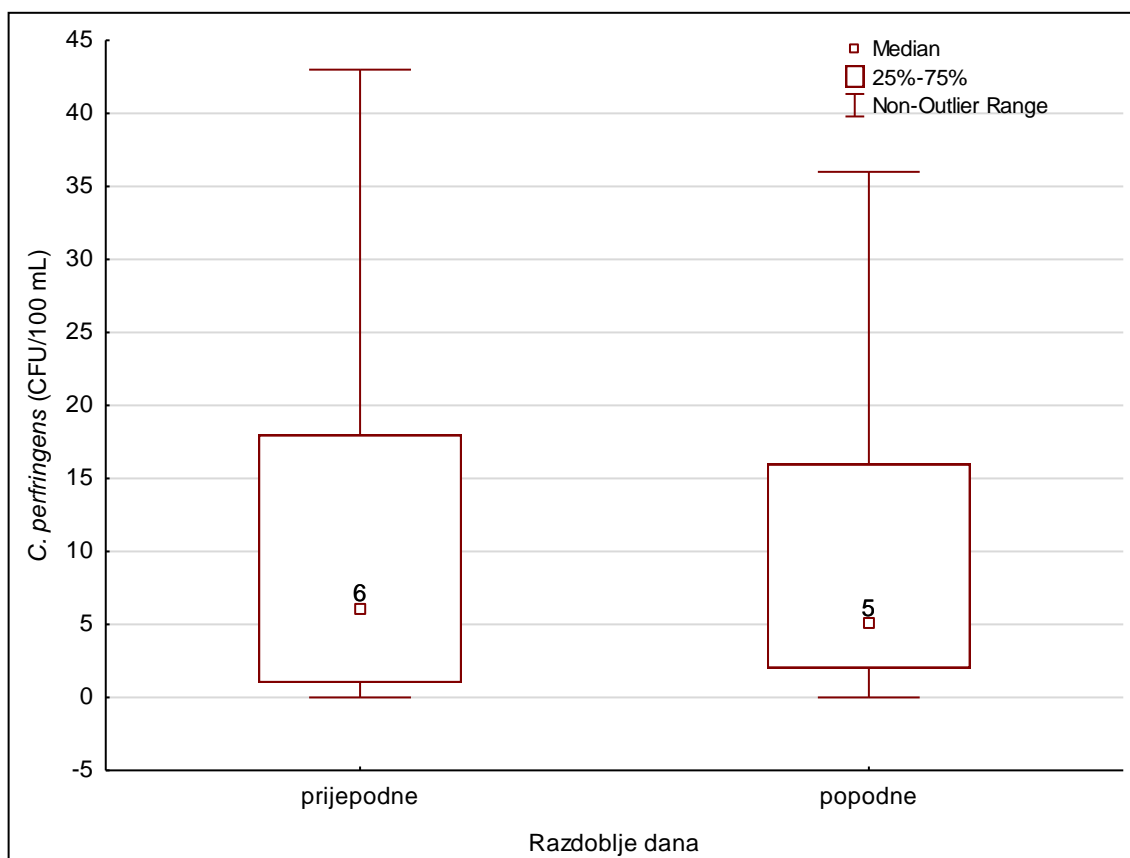
: <1, 1-10, 11-100, 101-1000 i > 1000). Najveći postotak uzoraka (44%) nalazi se u kategoriji sa brojem bakterija od 1-10. Slijedi kategorija sa 11-100 bakterija (29%) te ona u kojoj je bilo manje od 1 bakterije u 100 ml uzorka (21%). Dok je samo 1% bakterijom opterećenih uzoraka u kategoriji >1000 CFU/100 ml morske vode (Slika 15).



Slika 15: Udio uzoraka u pojedinoj kategoriji opterećenja *Clostridium perfringens* (N=600)

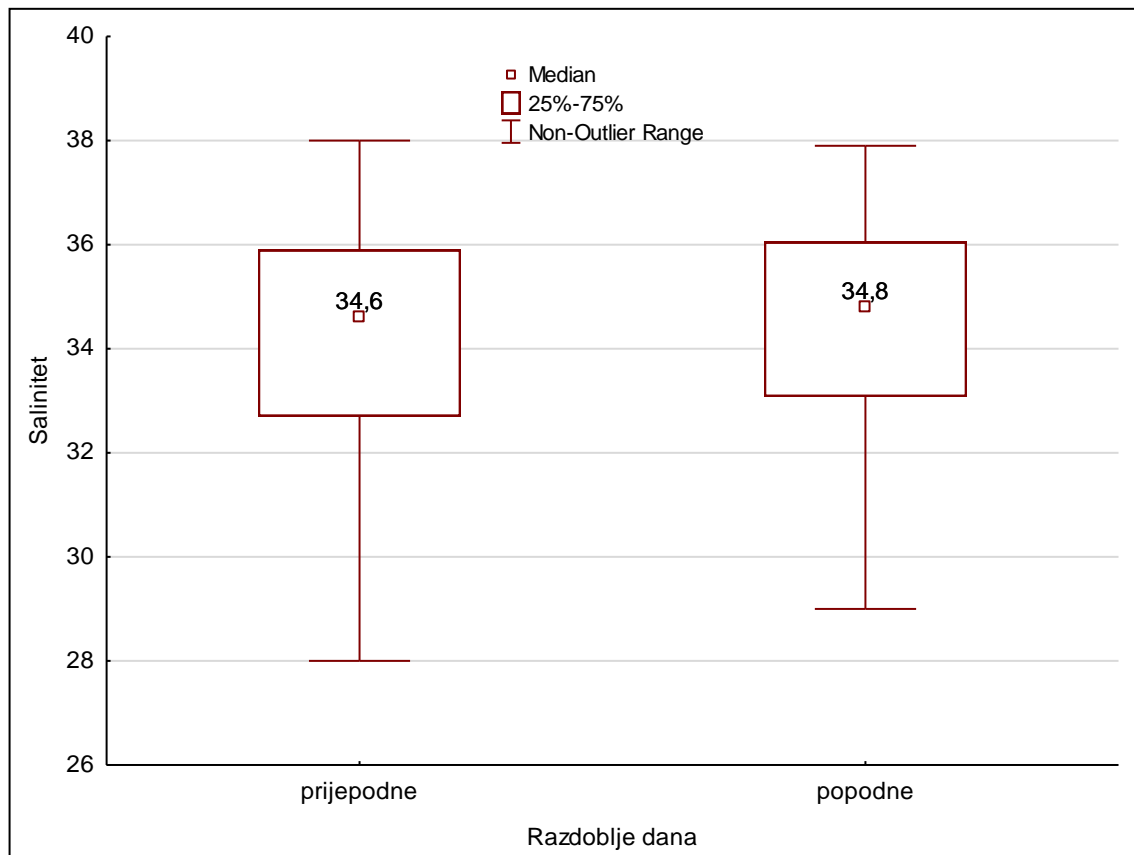
4.7. Razdoblje dana

Provedenim istraživanjem obuhvaćena su i dva perioda u danu (ujutro i popodne) kako bi se potvrdila eventualna vremenska varijacija u koncentraciji bakterije ispitivanih točaka. Obradom podataka (Mann-Whitney; N=600; U=42959,00; p>0,5000) utvrđeno je da nema statističke značajke između doba dana i koncentracije *Clostridium perfringens* (Slika 16).



Slika 16: Medijan koncentracije *Clostridium perfringens* ovisno o razdoblju dana

Isto je uspoređeno i sa salinitetom gdje, također, nije zabilježena statistički značajna razlika (Mann-Whitney; $U=40470,50$; $p> 0,5000$) obzirom na vremensku varijablu (Slika 17).



Slika 17: Medijan saliniteta ovisno o razdoblju dana

5. RASPRAVA

Clostridium perfringens je kozmopolit prisutan svugdje u okolišu. Međutim, obzirom da je uobičajeni stanovnik probavnog trakta ljudi i toplokrvnih životinja, koristi se i kao indikator fekalnog onečišćenja. Zbog svojih karakteristika, među kojima je i stvaranje spora, ima sposobnost dugotrajnog preživljavanja u nepovoljnim uvjetima. Komunalne i oborinske otpadne vode opterećene fekalnim sadržajem u priobalnim sredinama dopijevaju u more te bakterije poput *Clostridium perfringens* mogu biti dobri indikatori fekalnog zagađenja pri ispitivanju kvalitete mora za kupanje. Prema Direktivi o vodi za kupanje (2006/7/EC) i Uredbi o kakvoći mora za kupanje (NN 73/2008), rutinski se ispituju koncentracije *Escherichia coli* i crijevnih enterokoka, kako bi se ocijenila kvaliteta vode za kupanje. Međutim, brojna istraživanja pokazuju kako bi se u praćenje kakvoće mora mogao uvrstiti i dodatni mikrobiološki parametar, kao što je *Clostridium perfringens*. Istraživanjem Curiel-Ayala i suradnika (43) praćena je kakvoća morske vode u sušnim i kišnim razdobljima mjerenjem koncentracije crijevnih enterokoka, *Staphylococcus aureus* i *Clostridium perfringens*. Zaključeno je da je praćenje fekalnog onečišćenja u određenim okolnostima uspješnije pomoću indikatora *Clostridium perfringens*. Dokazano je da 95,8% analiziranih uzoraka premašuje vrijednost postavljenu havajskim izvješćem o praćenju i procjeni kvalitete vode od 50 CFU/100 ml, što autori objašnjavaju velikim izljevima slatke vode s kopna kontaminirane fekalnim tvarima (43). Dotoci slatkih voda s kopna, razlog su odabira lokacija i za ovo istraživanje. Osim vidljivih dotoka i vrulja, mjereni fizikalno-kemijski parametri, primarno temperatura mora i salinitet, idu u prilog postavljenoj tezi. Salinitet otvorenog dijela Jadranskog mora iznosi 38 ‰, dok priobalni dio varira obzirom na dotoke slatke vode s kopna. U ovom istraživanju salinitet je varirao od 0,5 do 38 ‰. Dotok hladnije slatke vode s kopna utječe i na temperaturu mora. Možemo pretpostaviti da je i pojavnost bakterije *Clostridium perfringens*, također vezana uz dotok slatke vode s kopna, koja na putu do mora prenosi različita onečišćenja komunalnog porijekla, poput sadržaja iz neadekvatno izvedenih septičkih jama. Stoga je značajna negativna povezanost bakterije *Clostridium perfringens*, saliniteta i temperature mora, uvjetovana dotokom slatke vode s kopna. Također, dobivenu negativnu korelaciju između temperature zraka i koncentracije bakterije u ovom istraživanju možemo tumačiti utjecajem Sunčevog zračenja na broj bakterija. Obzirom da povišenje temperature zraka prati pojačano Sunčevo zračenje, broj *Clostridium perfringens* brže se smanjuje pri višim temperaturama zraka. Od ukupno 12 lokacija, na lokacijama A i B dokazana je najveća koncentracija bakterije *Clostridium perfringens*, a za istaknuti je da su upravo to lokacije gdje su izvori slatke vode

prisutni u većem broju nego na ostalim lokacijama. Moguće je da osim obimnijeg dotoka i slabije gibanje mora na predmetnim lokacijama utječe na dulje zadržavanje većeg broja bakterija. U prilog tome ide istraživanje obavljeno na području 11 plaža kolumbijskog grada Baranquilla (44), gdje je dokazana povezanost između koncentracija fekalnih indikatora i morfologije ispitivane lokacije plaža. Autori opisuju jednu lokaciju kao zatvorenu vodu između pješčane plaže i kopna, a drugu na ušću same rijeke ograđenu molovima. Na lokaciji s izgrađenim molovima u neposrednoj blizini ušća rijeke, za koju se pretpostavlja da nosi različite tipove onečišćenja, dokazala se niska koncentracija fekalnih indikatora. Može se pretpostaviti kako postojeći molovi utječu na dotok slatke vode u ispitivanu lokaciju plaže. S druge strane, ispitivana lokacija zatvorene plaže pokazala je veću koncentraciju *Clostridium perfringens*, što se objasnilo sporijim gibanjem mora u odnosu na ostale lokacije ispitivanja. Nadalje, našim istraživanjem dobivena je statistički značajna razlika u koncentraciji *Clostridium perfringens* između dvije promatrane godine (2021. i 2022.), kao i između pojedinih mjeseci tijekom sezone kupanja. Od ispitivanih mjeseci (svibanj – rujna), najveća koncentracija *Clostridium perfringens* zabilježena je tijekom rujna, što se može povezati s većom količinom oborina. Prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda najviše oborina u sezoni kupanja zabilježeno je u rujnu tijekom 2021. i 2022 (45). Povećanjem količine oborina, povećava se količina dotoka slatke vode u more i ispiranje kopna, što vjerojatno rezultira većom količinom ispitivane bakterije. Promatranjem promjene koncentracije *Clostridium perfringens* obzirom na doba dana (ujutro i popodne), nije utvrđena statistički značajna razlika. Suprotno ovim rezultatima, prethodno navedeno istraživanje (43) pokazalo je da se opterećenje *Staphylococcus aureus* u moru za kupanje u različitim razdobljima razlikuje te da su koncentracije *Staphylococcus aureus* veće u popodnevnom satima. Autori pretpostavljaju da je razlog tome veći broj kupaca i činjenica da je izvor ovoj bakteriji koža kupaca, a ne probavni sustav, kao što je to za *Clostridium perfringens*. Na lokacijama obuhvaćenim našim istraživanju, koncentracija *Clostridium perfringens* najčešće je pripadala kategorijama nižeg opterećenja (1-10 i 11-100 CFU). Međutim, u 1 % uzoraka broj bakterija prešao je 1000 CFU, s nemogućnošću utvrđivanja točnog broja, zbog metodoloških ograničenja. Obzirom da infektivna doza *Clostridium perfringens* iznosi 10^6 CFU (31), a da ovim istraživanjem nije utvrđen točan broj u kategoriji s najvećim opterećenjem (već je prikazan kao >1000), može se smatrati da je u tim situacijama more za kupanje predstavljalo rizik za zdravlje kupaca.

6. ZAKLJUČAK

- Za pretpostaviti je da o količini i učestalosti dotoka slatke vode s kopna te opterećenosti iste sa fekalnim sadržajem, što svakako ovisi o smjeru prolaska vode prije ulaska u more, ovisi i koncentracija *Clostridium perfringens* u priobalnoj morskoj vodi.
- Dotokom hladnije slatke vode s kopna smanjuje se temperatura mora te je moguće da niža temperatura pretpostavlja i prisutnost bakterija pa tako i *Clostridium perfringens*.
- Dotokom slatke vode s kopna smanjuje se i salinitet na mjestu ulaska u more te je moguće da niži salinitet pretpostavlja i prisutnost bakterija pa tako i *Clostridium perfringens*.
- Kod viših temperatura zraka, a time i jačeg Sunčevog utjecaja, detektirana je niža koncentracija bakterije *Clostridium perfringens*.
- Nije uočena razlika u salinitetu i koncentracijama bakterije *Clostridium perfringens* u različito doba dana (jutro- poslijepodne).
- Svrstavanjem uzoraka u kategorije prema broju CFU u 100ml uočeno je da najveći postotak (44%) obuhvaćaju uzorci od 1-10 CFU, slijedi 21% uzoraka od 10-100 CFU te 21% manjim od 1 CFU. Samo 1% uzoraka ima broj koji može biti štetan za ljudsko zdravlje ako uzmemo u obzir da je infektivna doza 10^6 CFU.
- Rezultati ovog istraživanja ukazuju da zbog svojih karakteristika *Clostridium perfringens* može biti dobar dodatni indikator opterećenja mora za kupanje fekalnim sadržajem, a posljedična i ostalim patogenim mikroorganizmima.

7. LITERATURA

1. Službeni list Europske Unije, Protokol o zaštiti Sredozemnog mora od onečišćenja s kopna *OJL 67, 12.3.1983, p. 3–18*
2. Vukić Lušić D, Cenov A, Lušić D, Glad M, Jozić S, Alvir M i sur. Kakvoća mora za kupanje u Primorsko-goranskoj županiji i na riječkom području u posljednjem desetljeću. *Hrvatske vode* [Internet]. 2021 [pristupljeno 01.08.2023.];29(116):103-112. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/261223>
3. International Standard, Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci in surface and waste water — Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium, Switzerland: International Organization for Standardization, 1998 Nov 15 (citirano: 13. kolovoza 2023). Dostupno: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/14852/9af1ccde6d1c4c09a33c20524397c16a/ISO-7899-1-1998.pdf>
4. Kaštelančić T. Meteorološki i oceanografski parametri opisani u peljaru (završni rad). Split: Sveučilište u Splitu, Pomorski fakultet, 2020. 7-30.str.
5. Topić N. Kakvoća mora za kupanje na plaži Kantrida u Rijeci 1998-2015. (završni rad). Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, 2016. 10.str.
6. Ovčariček S. Kućanske otpadne vode (završni rad). Karlovac: Veleučilište u Karlovcu, 2017. 45.str.
7. Guidelines on recreational water quality. Volume 1: coastal and fresh waters. Table 4.1 Numbers of faecal pathogens and indicator organisms in raw sewage. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
8. Edberg SC, Rice EW, Karlin RJ, Allen MJ. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*. 2000 Dec;88(S1):106S116S.
9. Kauppinen A, Al-Hello H, Zacheus O, Kilponen J, Maunula L, Huusko S, et al. Increase in outbreaks of gastroenteritis linked to bathing water in Finland in summer 2014. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* [Internet]. 2017 Feb 23;22(8):30470. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28251888>

10. Yumpu.com. Annual Report 2012 - 2013 - NHS Lanarkshire [Internet]. yumpu.com. 2015 [cited 2023 Aug 13]. Available from: <https://www.yumpu.com/s/3vdIWsZHhTGhrBOn>
11. Zlot A, Simckes M, Vines J, Reynolds L, Sullivan A, Scott MK, et al. Norovirus Outbreak Associated With a Natural Lake Used for Recreation-Oregon, 2014. *American Journal of Transplantation*. 2015 Jun 18;15(7):2001–5.
12. WHO recommendations on scientific, analytical and epidemiological developments relevant to the parameters for bathing water quality in the Bathing Water Directive (2006/7/EC), Geneva, 2018, 11-56.
13. Tallon P, Magajna B, Lofranco C, Leung KT. Microbial Indicators of Faecal Contamination in Water: A Current Perspective. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2005 Sep;166(1-4):139–66.
14. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2023 Aug 14];26(4):822–80. Available from: <https://cmr.asm.org/content/26/4/822.full>
15. Lunestad BT, Frantzen S, Svanevik CS, Roiha IS, Duinker A. Time trends in the prevalence of *Escherichia coli* and enterococci in bivalves harvested in Norway during 2007–2012. *Food Control*. 2016 Feb;60(ISSN 0956-7135):289–95.
16. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [Internet]. 2012 Nov 29 [cited 2023 Aug 14];76(4):685–706. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3510518/>
17. Wright ME, Solo-Gabriele HM, Elmir S, Fleming LE. Microbial load from animal feces at a recreational beach. *Marine Pollution Bulletin*. 2009 Nov;58(11):1649–56.
18. Godfree AF, Kay D, Wyer MD. Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. *Journal of Applied Microbiology*. 1997 Oct;83(S1):110–9.
19. Hokajärvi AM, Pitkänen T, Siljanen HMP, Nakari UM, Torvinen E, Siitonen A, et al. Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. and adenoviruses in Finnish bathing waters and purified sewage effluents. *Journal of Water and Health*. 2012 Nov 17;11(1):120–34.
20. Silva AM, Vieira H, Martins N, Granja ATS, Vale MJ, Vale FF. Viral and bacterial contamination in recreational waters: a case study in the Lisbon bay area. *Journal of*

- Applied Microbiology [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2023 Aug 16];108(3):1023–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19761463/>
21. Mocé-Llivina L, Lucena F, Jofre J. Enteroviruses and Bacteriophages in Bathing Waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005 Nov;71(11):6838–44.
 22. EPA Office of Water Office of Science and Technology Health and Ecological Criteria Division. Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality 820-R-15-098 [Internet]. 2015 Apr [cited 2023 Aug 16]. Available from: https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-07/documents/review_of_coliphages_as_possible_indicators_of_fecal_contamination_for_ambient_water_quality.pdf
 23. Wiedenmann A, Krüger P, Dietz K, López-Pila JM, Szewzyk R, Botzenhart K. A Randomized Controlled Trial Assessing Infectious Disease Risks from Bathing in Fresh Recreational Waters in Relation to the Concentration of *Escherichia coli*, Intestinal Enterococci, *Clostridium perfringens*, and Somatic Coliphages. *Environmental Health Perspectives*. 2006 Feb;114(2):228–36.
 24. Rongoei PJK, Outa NO. APHA (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation, Washington DC. - References - Scientific Research Publishing [Internet]. www.scirp.org. 2016 [cited 2023 Aug 17]. Available from: [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgict55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1909322](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgict55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1909322)
 25. Alkheraije KA. L. D. S. Smith, “The Pathogenic Anaerobic Bacteria,” 2nd Edition, Charles C. Thomas Publisher, 1975. - References - Scientific Research Publishing [Internet]. scirp.org. 2013 [cited 2023 Aug 18]. Available from: [https://scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=827948](https://scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=827948)
 26. Welch WH, Nuttall GHF. A gas-producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*, Nov. spec.) capable of rapid development in the blood-vessels after death - Digital Collections - National Library of Medicine [Internet]. collections.nlm.nih.gov. 1941 [cited 2023 Aug 16]. Available from: <https://collections.nlm.nih.gov/catalog/nlm:nlmuid-61950480R-bk>

27. Gleeson C, Gray N. The Coliform Index and Waterborne Disease. Problems of Microbial Drinking Water Assessment. 1st Ed. London: Chapman and Hall; 1997.page 191
28. Szewzyk U, Szewzyk R, Manz W, Schleifer KH . Microbiological Safety of Drinking Water. Annual Review of Microbiology. 2000 Oct;54(1):81–127.
29. Skanavis C, Yanko WA. Clostridium perfringens as a Potential Indicator for the Presence of Sewage Solids in Marine Sediments. Marine Pollution Bulletin. 2001 Jan;42(1):31–5.
30. Fung, D.Y.C.; Fujioka, R.; Vijayavel, K.; Sato, D.; Bishop, D. Evaluation of fung double tube test for Clostridium perfringens and Easyphage test for F-specific RNA coliphages as rapid screening tests for fecal contamination in recreational waters of Hawaii.J. Rapid Methods Autom. Microbiol.2007 Sep; 15 (21715): 411.
31. Abubakar I, Irvine L, Aldus C, Wyatt G, Fordham R, Schelenz S, et al. A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. Health Technology Assessment. 2007 Sep;11(36).
32. Takehara M. [Study on the interaction between Clostridium perfringens and the host]. Nihon Saikingaku Zasshi Japanese Journal of Bacteriology [Internet]. 2021 [cited 2023 Aug 19];76(3):149–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34789601/>
33. Bryant Amy E, Chen Richard Y Z., Nagata Y, Wang Y, Lee C H., Finegold S, et al. Clostridial Gas Gangrene. II. Phospholipase C–Induced Activation of Platelet gpIIbIIIa Mediates Vascular Occlusion and Myonecrosis in Clostridium perfringens Gas Gangrene. The Journal of Infectious Diseases. 2000 Sep;182(3):808–15.
34. Hickey MJ, Kwan RYQ, Awad MM, Kennedy CL, Young LF, Hall P, et al. Molecular and Cellular Basis of Microvascular Perfusion Deficits Induced by Clostridium perfringens and Clostridium septicum. Gilmore MS, editor. PLoS Pathogens. 2008 Apr 11;4(4):e1000045.
35. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. Longo DL, editor. New England Journal of Medicine. 2020 Dec 3;383(23):2255–73.
36. Meer RR, Songer JG, Park DL. Human disease associated with Clostridium perfringens enterotoxin. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology [Internet]. 1997 [cited 2023 Aug 20];150(150):75–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8978214/>

37. Siarakas S, Damas E, Murrell WG. Is cardiorespiratory failure induced by bacterial toxins the cause of sudden infant death syndrome? Studies with an animal model (the rabbit). *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* [Internet]. 1995 May 1 [cited 2023 Aug 20];33(5):635–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7660368/>
38. Galinović, G., M., Šešo, M., R. i sur.: *Specijalna medicinska mikrobiologija i parasitologija*, MERKUR A.B.D., Zagreb, 2003, 41
39. Mohammed RL, Echeverry A, Stinson CM, Green M, Bonilla TD, Hartz A, et al. Survival trends of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Clostridium perfringens* in a sandy South Florida beach. *Marine Pollution Bulletin*. 2012 Jun;64(6):1201–9.
40. Mates A. The significance of testing for *Pseudomonas aeruginosa* in recreational seawater beaches. *Microbios* [Internet]. 1992 [cited 2023 Aug 21];71(287):89–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1453986/>
41. EZ 2006/07/EZ. Direktiva Europskog parlamenta i Vijeća od 15. veljače 2006. o upravljanju kakvoćom vode za kupanje kojom se ukida Direktiva 76/160/EEC, Službeni list Europske unije. 2006: L64/37.
42. Uredba o kakvoći mora za kupanje (NN 73/08)
43. Curiel-Ayala F, Quiñones-Ramírez EI, Pless RC, González-Jasso E. Comparative studies on *Enterococcus*, *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* as quality indicators in tropical seawater at a Pacific Mexican beach resort. *Marine Pollution Bulletin*. 2012 Oct;64(10):2193–8.
44. Sánchez Moreno H, Bolívar-Anillo HJ, Soto-Varela ZE, Aranguren Y, González CP, Villate Daza DA, et al. Microbiological water quality and sources of contamination along the coast of the Department of Atlántico (Caribbean Sea of Colombia). Preliminary results. *Marine Pollution Bulletin* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2023 Sep 4];142(ISSN 0025-326X):303–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X19302401>
45. Državni hidrometeorološki zavod: *Oborina i trajanje sijanja Sunca*. Dostupno na: https://meteo.hr/klima.php?section=klima_pracenje¶m=klel&Grad=rijeka&Mjesec=09&Godina=2021 (pristupljeno: 6. rujna 2023.)

8. ŽIVOTOPIS

Inge Juričić je rođena 12. rujna 2001. godine u Rijeci. 2016. godine upisuje Salezijansku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Rijeci, klasični smjer. Maturirala je 2019. godine te je iste godine upisala Prijediplomski studij sanitarnog inženjerstva u Rijeci. Što se tiče iskustva u svojoj budućoj struci radila je tijekom pandemije Covid-19 u Nastavnom zavodu za javno zdravstvu u unosu novooboljelih u sustav.