

Prisutnost i vrste gljiva u pijesku i moru na plaži u Primorsko-goranskoj županiji

Krmpotić, Ines

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:184:775929>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ines Krmpotić

**PRISUTNOST I VRSTE GLJIVA U PIJESKU I MORU NA PLAŽI U PRIMORSKO-
GORANSKOJ ŽUPANIJI**

Završni rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ines Krmpotić

**PRISUTNOST I VRSTE GLJIVA U PIJESKU I MORU NA PLAŽI U PRIMORSKO-
GORANSKOJ ŽUPANIJI**

Završni rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Darija Vukić Lušić, dipl.sanit.ing.

Završni rad obranjen je dana _____ na sveučilištu u Rijeci, Medicinski fakultet, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc.dr.sc. Arijana Cenov dipl.sanit.ing.
2. izv.prof.dr.sc. Dražen Lušić_dipl.sant.ing.
3. doc.dr.sc. Marin Glad dipl.sanit.ing.

Rad ima __ stranica, __ slika, ___ tablica, __ literaturna navoda.

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Dariji Vukić Lušić, dipl.sanit.ing. na ukazanom povjerenju kao i na nesebičnoj pomoći koju mi je pružila tijekom izrade ovog završnog rada. Velika mi je čast imati mentoricu koja mi je svojim umijećem i zalaganjem prenijela veliko znanje iz područja mikrobiologije. Zahvaljujem i doc.dr.sc. Arijani Cenov dipl.sanit.ing. i Nevenu Sučiću, mag.med.lab.diag. na svoj pruženoj pomoći prilikom realizacije rada. Također veliko hvala i svim ostalim djelatnicima Odsjeka za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša, Odjel za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju, Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije (NZZJZ PGŽ) koji su svojim zalaganjem pridonijeli izradi praktičnog dijela rada.

Zahvaljujem i svojoj obitelji i Karlu na bezuvjetnom razumijevanju i podršci tijekom cijeloga školovanja.

SAŽETAK

Carstvo gljiva velika je i raznolika skupina organizama, od kojih su određene vrste sposobne izazvati bolesti u ljudi. Hrvatska je turistička zemlja, u kojoj korištenje plaža predstavlja jednu od glavnih ljetnih aktivnosti. Za razliku od bakteriološke analize mora za kupanje, koje se već desetljećima provodi, istraživanje gljiva tek je u povojima. Cilj ovoga rada bio je istražiti bakteriološko opterećenje te brojnost i vrste kvasaca i plijesni, u različitim okolišnim uvjetima na urbanoj pješčanoj plaži (Crikvenica, Primorsko-goranska županija). Uzorkovanje pijeska i morske vode provedeno je pet puta u zimskom razdoblju, (svakih 14 dana). Za određivanje mikrobioloških pokazatelja primijenjene su standardne metode, a za kultivaciju gljiva dva hranjiva medija i različiti uvjeti inkubacije: SDA agar (40°C/3 dana i 37°C/10 dana) i Fungisel agar (30°C/20 dana). Za identifikaciju vrsta poraslih gljiva korišten je instrument MALDI-TOF MS. U uzorcima pijeska pronađeno je sedam vrsta: *Aspergillus nidulans*, *A. calidoustus*, *A. niger*, *A. flavus oryzae group*, *Schizophyllum commune*, *Trichoderma reesei*, *Beauveria bassiana*, a u uzorcima morske vode tri vrste: *A. niger*, *A. terreus* i *Mucor circinelloides.*, od kojih se niti jedna ne ubraja u WHO-definirane prioritetne skupine gljivičnih patogena (kritična, visoka ili srednju). Najveći broj vrsta, ali s najmanjim brojem kolonija, porastao je na SDA agaru 37°C/10 dana. *A. niger* je jedina vrsta koja je dokazana i u pijesku i u morskoj vodi. U pijesku su gljive dokazane u svih pet uzorkovanja, u vrijednostima od 1,7 – 13,4 CFU/g, a u uzorcima morske vode samo u četvrtom i petom uzorkovanju, u nižim koncentracijama (1,7 – 2,6 CFU/mL). To ukazuje na znatno veće opterećenje gljivama u pijesku, u usporedbi s morskom vodom, što se odnosi i na bakteriološko opterećenje. Porast gljiva iz uzoraka mora dobiven je jedino na podlozi Fungisel agar (30°C/20 dana). Prema kriterijima Uredbe (NN 73/2008) za *E. coli* i enterokoke, more je u svim ispitivanjima ocjenjeno kao izvrsno, izuzev u trećem, kada je ocjenjeno kao dobro, s istovremeno najvišom utvrđenom koncentracijom gljiva u pijesku, pri temperaturi mora od 8°C i zraka od 11°C. Prema trenutno važećim kriterijima za kvalitetu pijeska (portugalski i Svjetske zdravstvene organizacije), vrijednosti za enterokoke bile su iznad portugalskih graničnih vrijednosti samo u jednom uzorku, tijekom drugog ispitivanja, a vrijednosti za gljive ispod Mycosand kriterija (ukupan broj gljiva od 89 CFU/g), što ukazuje na dobro stanje pijeska ispitane plaže. U cilju smanjenja rizika za ljudsko zdravlje, potrebno je provoditi dugoročna istraživanja gljiva, u različitim okolišnim uvjetima.

Ključne riječi: pijesak na plažama, morska voda, gljive, okolišni čimbenici, zdravstveni rizik

SUMMARY

The kingdom of fungi is a large and diverse group of organisms, of which certain species are capable of causing diseases in humans. Croatia is a tourist country, where the use of beaches is one of the main summer activities. Unlike the bacteriological analysis of bathing seas, which has been carried out for decades, research on fungi is still in its infancy. The aim of this work was to investigate the bacteriological load and the abundance and species of yeasts and molds in different environmental conditions on an urban sandy beach (Crikvenica, Primorsko-goranska County). Sampling of sand and sea water was carried out five times in the winter period (every 14 days). Standard methods were used to determine microbiological indicators, and two nutrient media and different incubation conditions were used for mushroom cultivation: SDA agar (40°C/3 days and 37°C/10 days) and Fungisel agar (30°C/20 days). MALDI-TOF MS instrument was used to identify the types of fungi grown. Seven species were found in the sand samples: *Aspergillus nidulans*, *A. calidoustus*, *A. niger*, *A. flavus oryzae* group, *Schizophyllum commune*, *Trichoderma reesei*, *Beauveria bassiana*, and in seawater samples three types: *A. niger*, *A. terreus* and *Mucor circinelloides*, none of which are included in the WHO-defined priority groups of fungal pathogens (critical, high or medium). The largest number of species, but with the smallest number of colonies, grew on SDA agar 37°C/10 days. *A. niger* is the only species that has been proven in both sand and seawater. In the sand, fungi were detected in all five samplings, in values of 1.7 - 13.4 CFU/g, and in seawater samples only in the fourth and fifth sampling, in lower concentrations (1.7 – 2.6 CFU/mL). This indicates a significantly higher load of fungi in the sand, compared to seawater, which also applies to the bacteriological load. The growth of fungi from sea samples was obtained only on Fungisel agar (30°C/20 days). According to the criteria of the Regulation (Official Gazette 73/2008) for *E. coli* and enterococci, the sea was evaluated as excellent in all tests, except for the third, when it was evaluated as good, with at the same time the highest determined concentration of fungi in the sand, at a sea temperature of 8°C and air of 11°C. According to the currently valid sand quality criteria (Portuguese and World Health Organization), values for enterococci were above the Portuguese limit values in only one sample, during the second test, and values for fungi were below the Mycosand criteria (total fungal count of 89 CFU/g), which indicates the good condition of the sand of the examined beach. In order to reduce the risk to human health, it is necessary to conduct long-term research on fungi, in different environmental conditions.

Keywords: beach sand, sea water, fungi, environmental factors, health risk

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Mikrobna flora pješčanih plaža i mora	2
1.1.1	Kvasci i plijesni	3
1.1.1.1	Prioritetne skupine gljivičnih patogena	5
1.1.2	Bakterijske vrste	7
1.1.2.1	<i>Escherichia coli</i>	7
1.1.2.2	Crijevni enterokoki	7
1.1.2.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.1.2.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
1.1.2.5	<i>Clostridium perfringens</i>	8
1.1.2.6	<i>Salmonella</i> spp.	8
1.1.2.7	Broj aerobnih mezofilnih bakterija na 37° C i 22° C	9
1.2	Utjecaj okolišnih čimbenika	9
1.3	Razvoj istraživanja	10
1.4	Kriteriji ocjenjivanja	11
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3	MATERIJALI I METODE	13
3.1	Materijali	13
3.1.1	Lokacija	13
3.1.2	Korišteni laboratorijski pribor i uređaji	14
3.1.3	Kemikalije i hranjive podloge	14
3.1.4	Uzorkovanje	15
3.2	Metode	17
3.2.1	Kvasci i plijesni	17
3.2.2	Bakterijske vrste	18
3.2.2.1	Membranska filtracija	18
3.2.2.1.1	Određivanje <i>Escherichia coli</i>	20
3.2.2.1.2	Određivanje crijevnih enterokoka	20
3.2.2.1.3	Određivanje <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.2.2.1.4	Određivanje <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
3.2.2.1.5	Određivanje <i>Clostridium perfringens</i>	23
3.2.2.1.6	Određivanje <i>Salmonella</i> spp.	24
3.2.2.1.7	Broj aerobnih mezofilnih bakterija	25
3.2.2.2	Identifikacija vrsta gljiva pomoću instrumenta MALDI-TOF MS	25
3.2.3	Fizikalno-kemijski pokazatelji	27
3.2.3.1	Temperatura zraka i vode	27
3.3	Statistička obrada podataka	27
3.3.1	Spearmanov koeficijent korelacije	28
3.3.2	Mann-Whitney U test	28
4	REZULTATI	30
4.1	Opterećenje gljivama pijeska i morske vode	30
4.2	Bakteriološko opterećenje pijeska i morske vode	35
5	RASPRAVA	43
6	ZAKLJUČAK	51
7	LITERATURA	52

1 UVOD

Razvojem molekularne biologije ustanovljeno je da na Zemlji postoje tri domene živih bića: arheje (*Archaea*), bakterije (*Eubacteria*) i eukarioti (*Eucarya*). Arheje su poput bakterija jednostanični organizmi, a karakterizira ih sposobnost preživljavanja u ekstremnim okolišnim uvjetima (1). Eukarioti su jednostanični ili višestanični organizmi u koje se ubrajaju protisti, gljive, biljke i životinje (2). Za razliku od bakterija i arheja, eukarioti su mnogo složeniji organizmi čija se DNA molekula nalazi unutar jezgre obavijene membranom (1).

U ovome radu naglasak je stavljen na carstvo gljiva (*Fungi*), zasebno carstvo eukariotskih organizama. Carstvo gljiva velika je i raznolika skupina organizama, a po brojnosti predstavlja treću najveću skupinu nakon biljaka i bakterija (3). Procjenjuje se da je bogatstvo gljivičnih vrsta negdje između 1,5 i 7,1 milijuna, a ta brojka neprestano raste kako se identificiraju nove gljivične vrste diljem svijeta (2). Tijekom evolucije stekle su sposobnost prilagodbe na različite životne uvjete, stoga nastanjuju gotovo sva kopnena i vodena staništa na Zemlji, uključujući i ona najekstremnija (3). U okolišu razgrađuju organske tvari i pretvaraju uginule biljke u hranjive tvari koje drugi organizmi iskorištavaju u prehrani (2). Obzirom na veliku bioraznolikost koriste se u industriji, poljoprivredi, medicini, prehrambenoj industriji, bioremedijaciji te kao bio-gnojiva i bio-pesticidi. Zbog morfoloških karakteristika, gljive se razlikuju u veličini, strukturi i metaboličkoj aktivnosti, tvoreći različite tipove kolonija (2). Na različite načine narušavaju ljudsko zdravlje, dovodeći do infekcija, alergijskih reakcija, iritacija i toksičnih reakcija (4). Određene vrste gljiva su sposobne izazvati površinske, kožne, potkožne ili sustavne bolesti u ljudi, stoga sve veći broj studija ukazuje na važnost identificiranja onih vrsta koje predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje (2,4). Tako se primjerice brojne vrste kandidate, koje se često nalaze u pijesku, smatraju oportunističkim patogenima. To su poznati fekalni zagađivači koji imaju tendenciju uzrokovati infekcije sluznice pojedinaca osjetljivih na infekciju uslijed nekog medicinskog stanja, poput dijabetesa ili supresije imuniteta. Također se i dojenčad i mala djeca, čiji je imunološki sustav još uvijek nedovoljno razvijen, ubrajaju u još jednu rizičnu skupinu (5).

Obzirom na dobru prilagođenost mikroorganizama na različite okolišne uvjete, nastanjuju gotovo sve pješčane plaže i mora (5). Za većinu mikroorganizama, uključujući bakterije, viruse, kvasce i plijesni, pješčani mediji predstavljaju vrlo pogodan habitat za rast i razvoj. Osim mikroorganizama koji stalno obitavaju u pijesku i moru na plažama, u njih dospijevaju i mikroorganizmi iz brojnih drugih izvora: oborina, otpadnih voda, atmosferskih kretanja,

probavnog sustava ljudi i životinja i dr. (5,6). Iako je većina tih mikroorganizama bezopasna, neki od njih pokazuju patogena svojstva i uzrokuju infekcije kod ljudi. Stoga njihova prisutnost na pješčanim plažama predstavlja stalni javnozdravstveni problem (6), uzimajući u obzir da su upravo ta mjesta omiljena za rekreacijske aktivnosti poput, sunčanja, kupanja, plivanja, ronjenja i zabave domaćeg stanovništva i turista (7). More, a također i pijesak, su s vremena na vrijeme pod utjecajem različitih izvora onečišćenja i štetnih događaja poput izlivanja nafte ili plina, koji mogu dodatno doprinijeti razvoju gljiva. Najčešći oblici bolesti povezani s pijeskom i morem uključuju smetnje dišnog trakta, keratitis te kožne i potkožne infekcije (2). Stoga je mikrobiološka čistoća pijeska i morske vode bitan činitelj održavanja zdravlja korisnika plaža, posebice stanovnika primorskih gradova koji te plaže koriste tijekom cijele sezone kupanja. U svrhu bolje procjene rizika od gljivičnih infekcija, osim brojnosti gljiva u pijesku i moru važno je identificirati i gljivične vrste.

1.1 Mikrobna flora pješčanih plaža i mora

Istraživanja mikrobne flore pijeska na plaži i morske vode provedena širom svijeta ukazala su na prisutnost različitih vrsta mikroba, uključujući bakterije, viruse i gljive (5,6,7,8). Rezultati provedenih istraživanja također ukazuju da gljivična flora ima manji negativan utjecaj na ljudsko zdravlje u odnosu na bakterijsku floru, obzirom da je gljivična flora još uvijek nedovoljno istražena i po brojnosti puno manja u odnosu na bakterijsku (5,7). U prošlosti je pozornost bila uglavnom usmjerena na otkrivanju bakterija i virusa od zdravstvene važnosti, osobito onih koji uzrokuju gastrointestinalne bolesti. Odnedavno su gljive u pijesku i moru na plažama postale predmetom većeg zanimanja, posebice nakon što su otkrivene vrste koje uzrokuju upalu srednjeg uha (otitis media), alergijske reakcije i dermatomikoze (5). Procjena utjecaja gljiva na ljudsko zdravlje još je kompleksnija zbog klimatskih promjena koje se javljaju uslijed globalnog zatopljenja. Naime, promjena temperature u okolišu može prouzročiti promjene u strukturi mikrobne zajednice te rezultirati većom globalnom distribucijom mikrobnih vrsta iz jednog zemljopisnog područja na drugo (6). Životni uvjeti u mnogim nišama u prirodi se često mijenjaju, što dovodi do neprestane izmjene vrsta i brojnosti organizama. Kombinacijom tih promjena neprestano se mijenja ukupno mikrobno opterećenje pijeska i morske vode na plaži (8). Iako gljive imaju sposobnost preživljavanja pri različitim uvjetima okoliša (svjetlost, UV zračenje, temperatura i salinitet), neki od parametara s vremenom mogu postati štetni za njihov rast i razmnožavanje. Najznačajniji parametri su temperatura vode i zraka te salinitet vode s obzirom da utječu na biljni i životinjsku floru u moru i na pijesku. (2,5).

Kao osnovni mikrobiološki pokazatelji kakvoće morske vode i pijeska, u cijelom se svijetu koriste dva osnovna pokazatelja fekalnog onečišćenja (eng. Faecal Indicator Bacteria, FIB), *Escherichia coli* i crijevni enterokoki. Osim navedenih bakterijskih indikatora, onečišćenje se dokazuje i uz pomoć dodatnih pokazatelja, patogena ili oportunističkih patogena: *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. (8). U novije vrijeme u procjenu rizika za zdravlje ljudi, sve češće se analizu uključuju i gljive. Za potrebe ovoga rada ispitana je prisutnost i/ili brojnost svih navedenih mikroorganizama te broj aerobnih mezofilnih bakterija na 37° C i 22° C, pokazatelji koji ukazuju na opće mikrobiološko opterećenje nekog sustava. Otkrivanje navedenih mikroorganizama u pijesku na plaži i moru pruža informacije o potencijalnom zdravstvenom riziku od obolijevanja (8).

1.1.1 Kvasci i plijesni

Do danas je opisano više od 100.000 vrsta gljiva, a oko 500 vrsta su dokazani kao uzročnici bolesti u ljudi i životinja (2). Gljive se međusobno razlikuju po obliku, veličini i građi stanica. Mogu se pojaviti u nekoliko oblika, a najčešći oblici su kvasci i plijesni. Također, neke se gljive mogu pojaviti u oba oblika, a takve gljive nazivamo dimorfima (3). Kvasci su jednostanične gljive koje se razmnožavaju pupanjem. Osnovna stanica kvasca naziva se blastokonidija, a promjer joj varira od 2 do 15 µm. Blastokonidije se mogu pojavljivati u izduženom, ovalnom ili okruglom obliku, a identifikacija se temelji na fiziološkim i morfološkim osobinama. S obzirom da gljive pripadaju domeni eukariota u citoplazmi blastokonidije nalazi se jezgra, mikrotubuli, mitohondriji, endoplazmatski retikul, Golgijev aparat, pričuvna zrnca i vakuole. Plijesni su višestanične gljive sastavljene od brojnih cjevastih stanica – hifa koje čine micelij. Kod plijesni razlikujemo vegetativni micelij, koji apsorbira hranjive tvari iz okoliša i prehranjuje plijesan te reproduktivni micelij koji nosi strukture za razmnožavanje plijesni. Međusobno se razlikuju po izgledu hifa te po broju i građi poprečnih pregrada koje mogu biti potpune ili imati jednu ili više pora. U citoplazmi hife, kao i kod stanice kvasca nalazi se jezgra, mikrotubuli, mitohondriji, endoplazmatski retikul, Golgijev aparat, pričuvna zrnca i vakuole (2,3).

Većina gljivičnih vrsta za optimalni rast zahtjeva kiseli pH i relativno visoku vlažnost od 40 do 50%, stoga su češći uzročnici bolesti u tropskom području (2,5). Prema potencijalnoj patogenezu kod ljudi, gljive se mogu podijeliti u tri glavne skupine: primarni patogeni koji se mogu razviti invazijom na tkiva zdravog domaćina, oportunistički patogeni koji su obično saprofiti i uzrokuju infekciju kod imunokompromitiranih osoba i dermatofiti koji napadaju

domaćina i infiltriraju se u keratinska tkiva (5). Gljive se razmnožavaju spolnim i nespolnim putem, a na učestalost razmnožavanja utječe količina dostupne svjetlosti (2). Svjetlost igra važnu ulogu i u disperziji konidija, obzirom da se one oslobađaju na svjetlosti. Nespolnim razmnožavanjem nastaju stanice genetski identične roditeljskoj stanici. Kvasci se nespolno razmnožavaju pupanjem i diobom, a plijesni taličnom ili blastičnom konidiogenezom. Spolno razmnožavanje se sastoji od plazmogamije, kariogamije i mejoze, a rezultat je nastanak spora, odnosno stanica s haploidnim brojem kromosoma. Plazmogamiju karakterizira spajanje citoplazme stanica u dikariotsku stanicu ($n + n$). Kariogamiju karakterizira nastanak diploidne zigote, dok posljednju fazu – mejozu karakterizira nastanak spora. U rastu i razmnožavanju gljive se koriste takozvanim primarnim metabolizmom, a posjeduju i takozvani sekundarni metabolizam. Tijekom primarnoga metabolizma gljive oslobađaju velik broj izvanstaničnih enzima što je pod kontrolom gena i okolišnih čimbenika. Oslobođeni enzimi dalje služe gljivičnoj stanici za razgradnju makromolekula koje nadalje koriste kao izvor hranjivih tvari. Kao produkti sekundarnog metabolizma nastaju sekundarni metaboliti koji nisu važni za rast i razvoj gljivičnih stanica, već se njihova važnost očituje u stvaranju i izlučivanju antibiotika i mikotoksina (2,3). Kvasci i plijesni uglavnom naseljavaju čovjekov organizam u slučaju oslabljenja njegova imunološkog sustava i u čovjeka mogu uzrokovati širok spektar bolesti kao što su mikoze (infekcije), alergijske reakcije, mikotoksikoze (otrovanje toksinima plijesni) i micetizam (otrovanje toksinima nejestivih makroskopskih gljiva) (5). Glavni preduvjet za mogućnost izazivanja bolesti je sposobnost njihova rasta i razmnožavanja na tjelesnoj temperaturi čovjeka, na 37° C, zatim sposobnost adhezije na različite stanice u domaćinu te posjedovanje različitih čimbenika virulencije. Posjedovanje kapsule, promjena oblika gljiva, fenotipske promjene kao i promjena antigenske strukture omogućava preživljavanje kvasaca i plijesni unatoč obrambenom mehanizmu domaćina (2,3). Alergijske reakcije su uglavnom posljedica preosjetljivosti imunološkog sustava i pretjerane reakcije domaćina na staničnu stijenu gljiva, uključujući hitin, glukan, manan, manoprotein i galaktomanan te gljivične metabolite, kao što su enzimi i toksini (2).



Slika 1. Porast kvasca na čvrstoj hranjivoj podlozi (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)






















Slika 2. Porast plijesni na čvrstoj hranjivoj podlozi (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

1.1.1.1 Prioritetne skupine gljivičnih patogena

Svjetska zdravstvena agencija (WHO) je 2022. godine objavila popis prioriternih skupina gljivičnih patogena koji predstavljaju prijetnju globalnom zdravlju. Za cilj je imala sustavno odrediti prioritne skupine gljivičnih patogena kako bi se dobio što bolji odgovor na gljivične infekcije i antifungalnu otpornost (9). Popis sačinjava 19 gljivičnih patogena, prema mogućnosti izazivanja invazivnih akutnih i subakutnih gljivičnih infekcija te prema potencijalnim terapijskim preprekama. Popis gljivičnih patogena svrstan je u tri prioritne skupine (kritična, visoka i srednja) prikazane na Slici 3. Jedan od predstavnika kritične prioritne skupine je *Cryptococcus neoformans* koji uzrokuje kriptokokozu. To je

oportunistička infekcija koja primarno zahvaća imunokompromitirane pacijente, poglavito HIV pozitivnu populaciju. Kriptokokoza uzrokuje visoku smrtnost između 41 i 61 %, obzirom da je rasprostranjena diljem svijeta. Lokalizirana kriptokokoza tretira se flukonazolom. *Candida auris* smjestila se visoko na popisu gljivičnih patogena zbog svojih brojnih mehanizama rezistencije i tendencije da uzrokuje bolničke epidemije po svijetu. Najčešći je uzročnik kandidijaze čija se smrtnost kreće u rasponu od 29 do 53 %. *C. auris* razvila je antimikotsku rezistenciju na flukonazol. Uz *C. albicans* i druge vrste kandidate zabilježene su na pješčanim plažama diljem svijeta, gdje su razvile toleranciju na veći salinitet i postale otpornije na veći broj nekad učinkovitih lijekova. Najčešći uzročnici invazivnih gljivičnih infekcija su *Aspergillus fumigatus* i *C. albicans* koja može biti prisutna i u obliku plijesni i kvasca. Povećana rezistentnost *A. fumigatus* na terapiju azolima, dovela je do smrtnosti u rasponu od 47 do 88 %. Invazivna kandidijaza uzrokovana s *C. albicans* ima smrtnost od 20 do 50 %, unatoč djelotvornoj antifungalnoj terapiji. Najvažniji čimbenici klasifikacije su: antifungalna rezistencija, smrtnost, dostupnost liječenja utemeljenog na dokazima, pristup dijagnostičkim pretragama, incidencija te razvoj komplikacija (9,10).

Critical group	High group	Medium group
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffei</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

Slika 3. Prikaz gljivičnih patogena svrstanih u tri prioritete skupine (kritična, visoka i srednja)

1.1.2 Bakterijske vrste

1.1.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli pripada porodici *Enterobacteriaceae*. To je gram-negativna, fakultativno anaerobna štapičasta bakterija s velikom sposobnošću prilagodbe na prisutnost ili odsutnost kisika (11). *E. coli* su mezofilne bakterije s obzirom da je optimalna temperatura rasta 37° C (2). Obitava u donjem dijelu probavnog sustava sisavaca gdje sudjeluje u probavi hrane, a mnoge vrste žive i u okolišu (u tlu, vodi i na bilju) (11). U čovjekovu probavnom sustavu čine 1-2% ukupne normalne crijevne flore. *E. coli* je raznolika skupina bakterija koja obuhvaća šest različitih podvrsta enterotoksična *E. coli* (ETEC), enteropatogena *E. coli* (EPEC), enteroagregativna *E. coli* (EAEC), enteroinvazivna *E. coli* (EIEC), enterohemoragična *E. coli* (EHEC/STEC) i uropatogena *E. coli* (UPEC). Prisutnost *E. coli* u vodi za kupanje ukazuje na izvor svježe fekalne kontaminacije, kao što je otpadna voda iz sustava javne odvodnje, obzirom na kratko preživljavaju *E. coli* u vodi tijekom pojave onečišćenja (12).

1.1.2.2 Crijevni enterokoki

Crijevni enterokoki su gram-pozitivni izduženi koki okruglog oblika. Pripadaju rodu bakterija *Enterococcus* (3). Ranije su bili klasificirani u rod streptokoka, a razvoj molekularnih metoda doveo je do klasifikacije enterokoka kao zasebnog roda. Od streptokoka se razlikuju po hidrolizi žuč-eskulina, rastu u 6,5%-tnom NaCl-u i na temperaturi od 42° C (2). Danas postoji najmanje 37 vrsta enterokoka razvrstanih u 6 skupina, među kojima su najznačajniji *E. faecalis* i *E. faecium*, obzirom da se u većoj mjeri izlučuju izmetom ljudi i životinja (3). Crijevni enterokoki čine normalnu floru probavnoga sustava čovjeka i životinja. Njihova prisutnost u pitkoj vodi ukazuje, za razliku od *E. coli*, na stariju fekalnu kontaminaciju obzirom da te bakterije imaju duže preživljavaju u morskoj vodi u usporedbi s *E. coli* (2,12). Enterokoki se koriste kao dopunski pokazatelji fekalne kontaminacije sustavima gdje *E. coli* nije otkrivena ili je otkrivena vrlo rijetko (12).

1.1.2.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus jedan je od četiri najvažnije vrste stafilokoka. Danas je poznato više od 40 vrsta stafilokoka, a samo njih desetak su dokazani uzročnici infekcija u ljudi. Stafilokoki su gram-pozitivni koki koji se formiraju u grozdove, pojedinačno, u paru ili u kratke lance. Svi stafilokoki su fakultativni anaerobi, iako najbolje rastu aerobno (2). Jedan

je od najčešćih i najuobičajenijih patogena koji izazivaju bolesti u ljudi. Kod 30% ljudi je normalni stanovnik nosnog vestibula, vlažnih dijelova kože i probavnog sustava (3). *S. aureus* se od ostalih vrsta razlikuje po tome što je koagulaza pozitivan (13). Osjetljiv je na povišenu temperaturu i na dezinficijense. Međutim, vrlo dobro mogu rasti u sredinama s visokom koncentracijom NaCl i šećera. Uzrokuje različite infekcije kao što su infekcije kože i tkiva, bakterijemiju te pneumoniju (2).

1.1.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa su aerobne bakterije s oksidativnim metabolizmom. Također, to su nesporogeni gram-negativni štapići koji su pokretni zbog posjedovanja monotrihe flagele. Poznat je i kao oportunistički patogen kojeg pronalazimo u različitim sredinama kao što su voda, tlo i materijali nastalim organskim raspadom. Vrlo je otporan na nepovoljne uvjete okoliša i na antimikrobne lijekove (3). Katkad su i sastavni dio normalne flore zdravih pojedinaca. U mikroskopskom preparatu pojavljuju se pojedinačno, u parovima, lancima ili su složeni jedan pokraj drugog. To su mezofilne bakterije s optimalnom temperaturom za rast od 37° C. *P. aeruginosa* može izazvati oboljenja kod ljudi s oslabljenim imunološkim sustavom, i to bakterijske infekcije, sepse, infekcije uha, oka, infekcije dišnog sustava, infekcije kože i dr. (2).

1.1.2.5 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens je gram-pozitivni anaerobni štapić koji stvara spore (13). Spore mogu biti smještene centralno, supterminalno, terminalno te mogu biti unutar štapića ili veće od njegove širine te deformiraju štapić (2). *C. perfringens* pripadaju rodu *Clostridium* koji žive u slobodnoj prirodi i kao normalna flora u gastrointestinalnom sustavu ljudi i životinja (13). Tijekom rasta i razmnožavanja *C. perfringens* stvaraju najmanje 12 enzima i toksina, koji su čimbenici virulencije i sudjeluju u patogenezi infekcija. Egzotoksinima uzrokuje plinsku gangrenu nakon traume, dok enterotoksinima koji djeluju kao superantigeni u crijevu dovode do otrovanja hranom. Toksini tipa A i tipa C uzrokuju bolesti kod ljudi. Termolabilni toksin tip A odgovoran je za trovanje hranom, dok je tip C povezan s endemskim nekrotičnim enteritisom (14,2,3).

1.1.2.6 *Salmonella* spp.

Salmonela je vrsta primarno patogenih bakterija iz obitelji *Enterobacteriaceae* (2). To su gram-negativni, fakultativno anaerobni, asporogeni štapići. Nemaju vidljive kapsule, a

većina salmonela posjeduje peritrihijalne flagele na tijelu, zbog čega su pokretne (3). Salmonele su kemotrofi, što znači da dobivaju energiju iz reakcija oksidacije i redukcije koristeći organske izvore. Obitavaju u tlu i vodi te su dio normalne crijevne flore stoke, peradi i insekata (2). Postoje samo dvije vrste salmonele – *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori* s 2500 serotipova (3). Serotipovi salmonele mogu se podijeliti u dvije glavne skupine — tifusne i netifusne. Salmonele su otporne na vanjske uvjete i dugo preživljavaju izvan domaćina. Za razliku od ostalih enterobakterija, otpornije su na žučne soli u probavnom sustavu domaćina (2).

1.1.2.7 Broj aerobnih mezofilnih bakterija na 37° C i 22° C

Broj aerobnih mezofilnih bakterija na 37° C i 22° C (UBB/22 i UBB/37) poznatih i pod nazivom „ukupan broj bakterija – UBB“, „broj izraslih kolonija“ te „ukupne heterotrofne bakterije“ obuhvaćaju raznoliku skupinu mikroorganizama prisutnih u moru. One čine najveći udio živoga svijeta u moru, a zahvaljujući svojim biokemijskim aktivnostima imaju značajnu ulogu u morskom ekosustavu (15). Na njihovu brojnost i aktivnost u morskom okolišu utječe svaka promjena u količini otopljene organske tvari u moru, kao i sposobnosti korištenja i razgrađivanja organskih tvari (12). Najbolje rastu uz prisutnost zraka (aerobno) na umjerenoj temperaturi s rasponom od 20 do 45° C. Temperatura od 22 °C predstavlja temperaturu okoliša te je pogodnija za rast heterotrofnih bakterija iz morske vode, dok temperaturu od 37 °C predstavlja čovjekovu tjelesnu temperaturu i koristi se za detekciju patogenih bakterija standardiziranim metodama u vodi. Povećan ukupan broj aerobnih mezofilnih mikroorganizama ne predstavlja javnozdravstveni problem, već je indikator narušene mikrobiološke kvalitete mora i upućuje na potrebu redovitog monitoringa kakvoće mora (12,15).

1.2 Utjecaj okolišnih čimbenika

Istraživanja „Mycosands“ (5,16) provedena duž europskih obala ukazuju da na distribuciju kvasaca i plijesni u pijesku i moru utječe niz okolišnih čimbenika: klimatološki uvjeti (temperatura, oborine i sunčevo zračenje), karakteristike tla (kemijska i fizikalna svojstva) i vode (temperatura, salinitet i koncentracija klorofila-a). Također, morfološke, fiziološke i biokemijske razlike između plijesni i kvasaca ukazuju na njihovu različitu distribuciju u okolišu (2). Osim navedenih, i mnogi drugi čimbenici kao što su vlažnost, teški metali, hranjive tvari i biotički čimbenici kao što su kompeticija i predacija utječu na

mikrobnu zajednicu u pijesku na plaži (7). Temperatura zraka i vode jedna je od glavnih varijabli distribucije gljiva. Rezultati istraživanja su pokazali da kvasci bolje podnose niske temperature tijekom zime nego plijesni, a razlog se krije u razlikama u morfologiji i načinu rasta i razmnožavanja (4). Stoga su kvasci zastupljeniji duž hladnijih obala, a plijesni uz tople obale. Rasprostranjenost gljiva na plažama povezana je i s kemijskim karakteristikama kao što su pH, koncentracija CaCO_3 , dušika i fosfora (16). Gljive za optimalni rast preferiraju kiseli pH, a Jadransko more je zbog svog poluzatvorenog oblika izloženo trendu zakiseljavanja. Sjeverni dio Jadrana je posebno okarakteriziran kiselim pH zbog utjecaja brojnih industrijskih područja, unosa hranjivih tvari i ugljika s kopna (2,14). Na rasprostranjenost kvasaca i plijesni utječe i koncentracija teških metala u tlu. Kvasci imaju afinitet prema tlu bogatom kadmijem, dok plijesni prema tlu bogatom niklom, a tla s visokom koncentracijom dušika nisu prikladna za rast gljiva, nasuprot tome, optimalna su za rast biljaka (16,14). Također, tla bogata CaCO_3 predstavljaju prikladna staništa za plijesan s obzirom da su potrebna za rast hifa (2). Uz kalcij, prisutnost optimalnih koncentracija dušika i fosfora u tlu su također čimbenici bitni za rast gljiva (16).

Prema podacima projekta Mycosands, pH je presudni čimbenik koji utječe na gljivičnu zajednicu u morskoj vodi (8). Mjerenja su pokazala da Jadransko more ima najveće vrijednosti pH tijekom ljeta i rane jeseni, a najniže vrijednosti tijekom zimskih mjeseci (14). U mjesecima s najvišim pH (>8,11) brojnost gljiva je bila manja, a razlog tome mogao bi biti negativan učinak alkalnog pH na stvaranje pigmenta kod pojedinih rodova gljiva (8).

1.3 Razvoj istraživanja

S obzirom da je mikrobna flora gljiva u odnosu na bakterijsku vrlo slabo istražena, osmišljen je i pokrenut europski projekt Mycosands. Cilj ovog projekta bio je istražiti raznolikost i brojnost gljiva u pijesku plaža i voda, morskih i slatkovodnih, u različitim okolišnim uvjetima, kako bi se procijenio mogući rizik za zdravlje ljudi (8). Za potrebe projekta formiran je tim različitih stručnjaka, medicinskih mikologa i stručnjaka za kvalitetu vode, koji su dobrovoljno sudjelovali u istraživanju mikrobiote pijeska i vode, od Atlantika do obala istočnog Sredozemlja, uključujući talijanska jezera, Jadransko, Baltičko i Crno more te Sydney. U projektu je sudjelovalo 13 zemalja bez financijske potpore (5,17). Formirani tim istraživao je nekoliko gljivičnih parametara, sve gljive, nekoliko vrsta iz roda *Aspergillus* i *Candida*, druge kvasce, gljive koje uzrokuju alergijske reakcije, dematske gljivice (dematiaceous) i dermatofe. U obzir su uzete slijedeće varijable za koje se pretpostavljalo da će utjecati na rezultate: morska ili kopnena lokacija, urbano ili neurbano područje, razdoblje

u godini, zemljopisna blizina i klimatske karakteristike (regije ili zemlje grupirane prema zemljopisnoj blizini i klimatološkim karakteristikama: Crno more, Mediteran, sjeverozapadna Europa, jugozapadna Europa i Australija) i vrsta sedimenta (miješani ili čisti) (5,8). Rodovi koji su najčešće pronađeni u pijesku i u vodi su *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus calidoustus*, *Aspergillus niger*, *Schizophyllum commune*, *Aspergillus flavus oryzae* group, *Trichoderma reesei*, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus nige*, *Mucor circinelloides* te *Aspergillus terreus*. Rezultati istraživanja ukazuju da se plaže trebaju redovito kontrolirati na gljive radi sigurnijeg korištenja i boljeg upravljanja.

1.4 Kriteriji ocjenjivanja

Kriteriji za ocjenjivanje kakvoće pijeska na plažama još uvijek nisu definirani EU Direktivom o vodi za kupanje (engl. European Union Bathing Water Directive, EU BWD, 2006/7/EZ) (18), koja je trenutno u reviziji. U Smjernicama o kvaliteti rekreacijskih voda: Volumen 1. obalne i slatke vode (19), izdanim od strane Svjetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization, WHO) preporučeni su kriteriji za crijevne enterokoke <60 CFU/g. U Portugalu je u 2022. godini kao kriterij dobivanja Plave zastave dodana kvaliteta pijeska, temeljena na broju enterokoka (<10 CFU/g) i *E. coli* (<25 CFU/g), temeljeno na rezultatima istraživanja Sabino et al. provedenog 2011. godine (20). Također je kao kriterij ocjenjivanja pijeska uključen i ukupan broj gljiva od 89 CFU/g, što je izravno proizašlo iz prvog projekta inicijative Mycosands, koji je trajao od 2018. do 2020., a istraživano je opterećenje gljivama u pijesku i vodi (5).

Kakvoća mora za kupanje ocjenjuje se prema kriterijima definiranih u Uredbi o kakvoći mora za kupanje (73/2008), koja je temeljena na EU BWD (2006/7/EZ). U Tablici 1 navedeni su kriteriji ocjenjivanja pojedinačnih uzoraka, prema Uredbi (73/2008).

Tablica 1. Standardi za ocjenu kakvoće mora nakon svakog ispitivanja (NN 73/08)

Pokazatelj	Kakvoća mora			Metoda ispitivanja
	Izvrсна	dobra	zadovoljavajuća	
crijevni enterokoki (bik*/100 mL)	<60	61-100	101-200	HRN EN ISO 7899-1 ili HRN EN ISO 7899-2
<i>Escherichia coli</i> (bik*/100 mL)	<100	101-200	201-300	HRN EN ISO 9308-1 ili HRN EN ISO 9308-3

* bik – broj izraslih kolonija

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je istražiti brojnost i vrste kvasaca i plijesni te bakteriološko opterećenje u pijesku i morskoj vodi na pješčanoj plaži Primorsko-goranske županije. Također, istražen je utjecaj okolišnih čimbenika na prisutnost i raznolikost gljiva u dvije ekološke niše (pijesak na plaži i morska voda).

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Lokacija

Za ispitivanje prisutnosti gljiva i bakterija u pijesku i moru na plaži u Primorsko–goranskoj županiji, izabrana je rekreacijska pješčana plaža u Kvarnerskome zaljevu, u gradu Crikvenici. Grad Crikvenica je vrlo naseljeno mjesto u Republici Hrvatskoj koja se ubraja u zemlje Sredozemlja. Zahvaljujući smještaju u umjerenom klimatskom pojasu Primorsko–goranska županija se odlikuje blagim zimama sa velikim količinama padalina i rijetkom pojavom snijega te suhim i toplim ljetima. Kriteriji odabira mjesta ispitivanja bio je da je plaža pješčana (čisti pijesak), obzirom na povećan rizik od izloženosti gljivama kod tog tipa plaža. Povoljni položaj joj omogućava dostupnost sunčeve svjetlosti tijekom cijele godine, a zahvaljujući obroncima planine Kapele i otoku Krku plaža je zaštićena od naleta jakih vjetrova. U neposrednoj blizini plaže nalazi se šetnjica okružena bujnom vegetacijom i brojnim građevinama i lokalima (21). Uzorci mora i pijeska uzimali su se u zimskom razdoblju, od studenog 2022. do siječnja 2023. godine.



Slika 4. Pješčana plaža u gradu Crikvenici

3.1.2 Korišteni laboratorijski pribor i uređaji

- Sterilne prozirne boce
- Sterilne plastične vrećice
- Teleskopski štap za uzorkovanje mora
- Termostat temperature 37° C
- Termostat temperature 42° C
- Termostat temperature 44° C
- Analitička vaga
- Filter papiri
- Aparatura za membransku filtraciju
- Čačkalica za stavljanje kulture
- Pločica sa 96 kružića
- MALDI - TOF MS



Slika 5. Sterilne prozirne boce

3.1.3 Kemikalije i hranjive podloge

- Fiziološka otopina
- TWIN 80
- Chrom agar
- CN agar (engl. Centrimide Nalidixic Agar)
- PPV agar (engl. Buffered Peptone Water)
- SBA agar (engl. Slanetz-Bartley agar)
- CCA agar (engl. Chromogenic Coliform Agar)
- Marine agar
- SDA agar (engl. Sabouraud Dextrose Agar)
- Fungisel agar (FS agar)
- TSC agar (engl. Tryptose Sulfite Cycloserine)

- Otopina vode i alkohola
- Mravlja kiselina
- Acetonitril
- 1 μ L supernatanta suspenzije gljive i alkohola
- 1 μ L HCCA matriksa



Slika 6. SBA agar (Sabouraud Dextrose Agar)

3.1.4 Uzorkovanje

Za potrebe ovog završnog rada uzeto je ukupno pet uzoraka u zimskom razdoblju od studenog 2022. do siječnja 2023. godine. Uzorci su se prikupljali u razmaku od 14 dana između 8 i 11 sati ujutro te je pri svakom uzorkovanju mjerena temperatura zraka i mora. Odabrana pješčana plaža podijeljena je u 3 jednaka dijela, a uzorci pijeska uzimali su se na 4 točke duž graničnog transeкта. Uzorke pijeska smo prikupljali na dubini između 5 i 10 cm pomoću sterilne plastične vrećice, između 100 i 200 g kako je opisano u Sabino et al. (2011). Poduzorci su dobro homogenizirani pomoću ruke, kako bi osigurali reprezentativnost uzorka, odnosno da će ispitni uzorak predstavljati prosjek 4 točke prikupljanja. Uzorke vode smo prikupljali na dubini od 20 cm u sterilne boce za uzorkovanje od 500 mL i 1 L. Boce su se otvorile na način da se nisu doticali grlo boce ni unutarnji dio poklopca, kako ne bi došlo do sekundarnog onečišćenja. Boce su se punile oko 1 cm do vrha, zbog lakše homogenizacije uzorka (4,5,8). Uzorci su u transportnim hladnjacima u najkraćem roku prevezeni u laboratorij Odsjeka za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša, Odjel za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju, Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije (NZZJZ PGŽ), gdje su se dalje obradili. Zbog bolje usporedbe opterećenosti sedimenta s morskom vodom, rezultati se izražavaju kao CFU/100 mL (broj izraslih kolonija – BIK,

engl. Colony Forming Units). Broj gljiva i bakterija u sedimentu izražen je kao CFU/100 g sedimenta, za sve pokazatelje osim za UBB/22 i UBB/37, za koje su rezultati za pijesak i morsku vodu izraženi kao CFU/mL.



Slika 7. Uzorak pijeska prikupljen u sterilnu plastičnu vrećicu (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

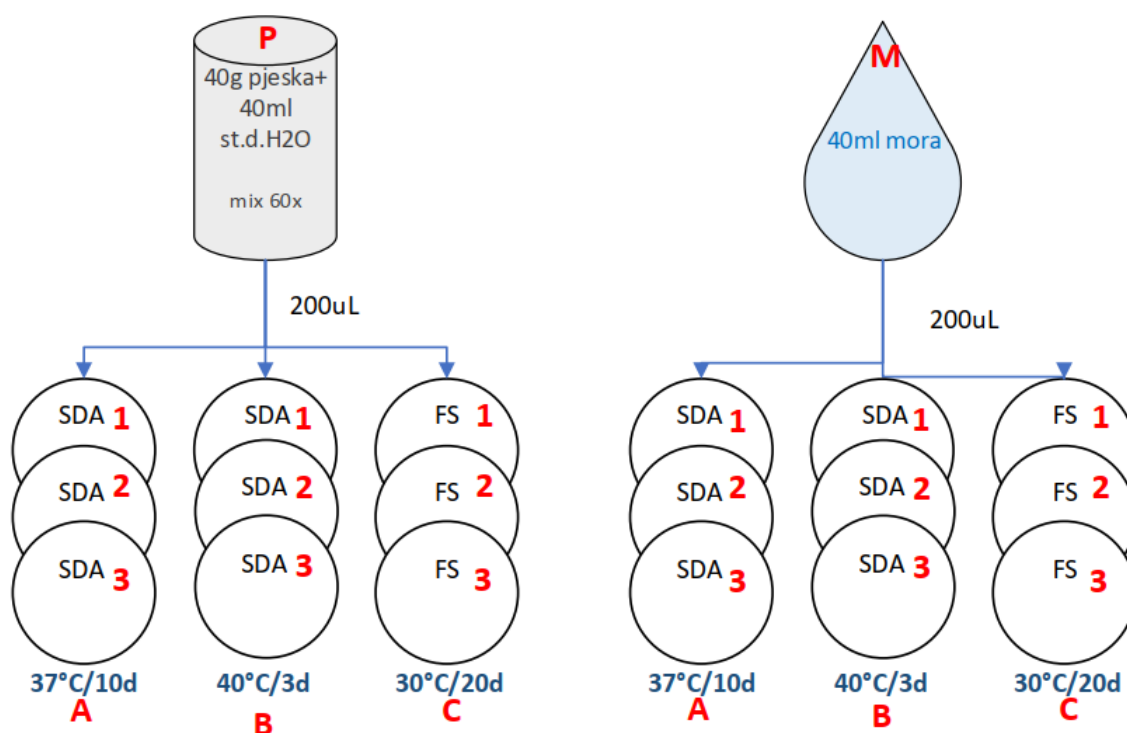


Slika 8. Prikupljanje uzoraka mora u sterilne prozirne boce (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okolišan NZZJZ PGŽ)

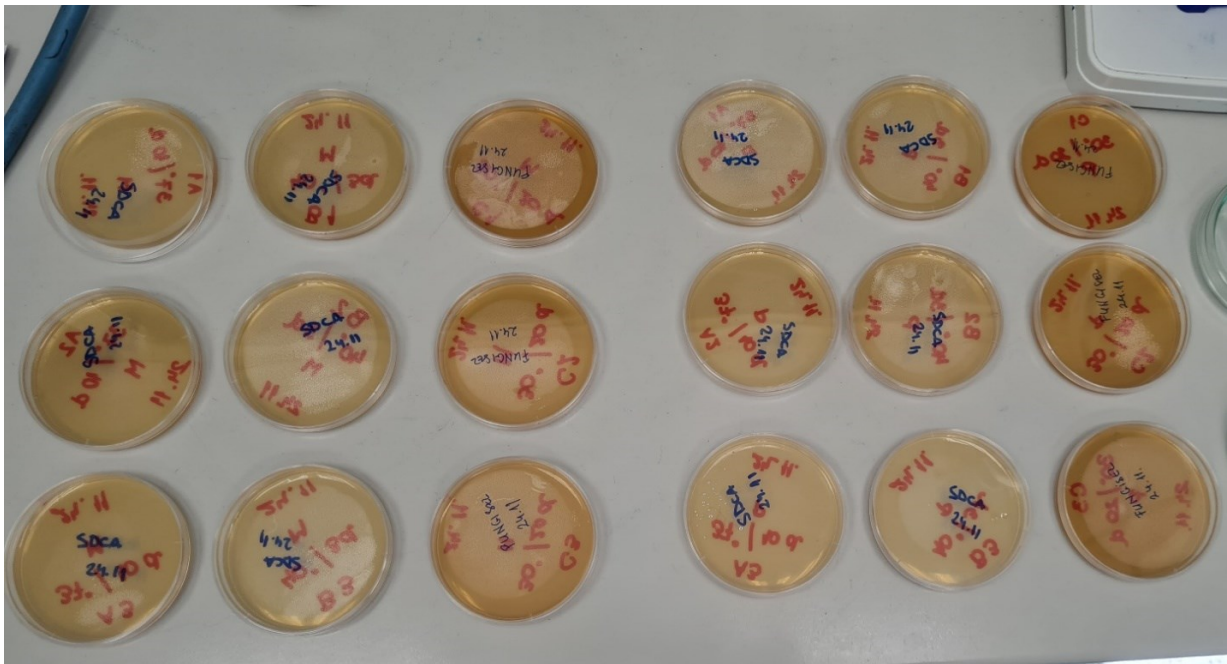
3.2 Metode

3.2.1 Kvasci i plijesni

Četrdeset grama prikupljenog suhog pijeska pomiješano je s 40 mL sterilne destilirane vode mućkanjem 60 puta. Ekstrakt je priređen u omjeru 1:1 i zatim nasađen na ploču (0,2 mL) u triplikatu po mediju SDA agar i FS agar. SDA ploče su inkubirane 3 dana na temperaturi 40° C i 10 dana na temperaturi 37° C dok je FS ploča inkubirana 20 dana na temperaturi od 30°C. Uzorci morske vode nakon transporta za razliku od pijeska su izravno naneseni u tri primjerka po 0,2 mL na SDA agar i FS agar i zatim su SDA ploče inkubirane 3 dana na temperaturi 40° C i 10 dana na temperaturi 37° C dok je FS ploča inkubirana 20 dana na temperaturi od 30° C, kako je prethodno opisano za pijesak. Kvantitativno je procijenjeno opterećenje gljiva u moru i pijesku brojanjem poraslih kolonija koje se izražavaju CFU/mL. Porasle kolonije su identificirane pomoću instrumenta MALDI-TOF (4,6).



Slika 9. Shema ispitivanja pijeska i morske vode na kvasce i plijesni (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)



Slika 10. Priprema hranjivih podloga za ispitivanje uzoraka pijeska i morske vode na prisustvo i broj gljiva (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

3.2.2 Bakterijske vrste

3.2.2.1 Membranska filtracija

Za određivanje mikrobioloških pokazatelja kakvoće pijeska i mora primijenjena je tehnika membranske filtracije, koja je vrlo jednostavna i praktična za kvantitativno određivanje mikroorganizama. Funkcionira po principu zadržavanja mikroorganizama iz uzorka na membranskom filteru, obzirom da su pore filtera ($0,45 \mu\text{m}$) manje od promjera bakterijske stanice ($\sim 1 \mu\text{m}$). Filter se zatim prenosi na određenu vrstu hranjive podloge, ovisno o mikroorganizmu koji se ispituje. Zatim slijedi inkubacija hranjive podloge (na definiranoj temperaturi i kroz definirano vrijeme), koja rezultira porastom kolonija karakterističnih morfoloških svojstava (11). Sustav membranske filtracije prikazan je na Slici 11.



Slika 11. Aparatura za tehniku membranske filtracije (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

Prije samog korištenja aparature za membransku filtraciju potrebno je dezinficirati radnu površinu. Potom se aparatura poveže na vakuum pumpu koja je priključena na bocu za prihvatanje tekućine. Prije pokretanja aparature pomoću plamenika steriliziraju se sve rešetkaste metalne ploče kao i svi lijevci i pinceta koja služi za postavljanje filter papira na rešetkastu ploču. U lijevak se ulije 100 mL (1000 mL za *Salmonella* spp.) uzorka ispitivane vode koja se prethodno promućka te se željeni sadržaj profiltrira. Pomoću sterilne pincete prenesemo filtere na određenu selektivnu podlogu u Petrijevoj zdjelici, ovisno o kojem je mikroorganizmu riječ. Pri tome je potrebno paziti da između membrane i površine hranjivog agara ne zaostanu mjehurići zraka. Ukoliko zaostanu mjehurići zraka, membranu je potrebno odići od površine i ponovo postaviti na hranjivu podlogu. Ukoliko se isti uzorci nastavljaju filtrirati na istim ljevicama, nije potrebno sterilizirati plamenikom aparaturu, no ukoliko je riječ o novim uzorcima, aparaturu je potrebno sterilizirati (11,13).

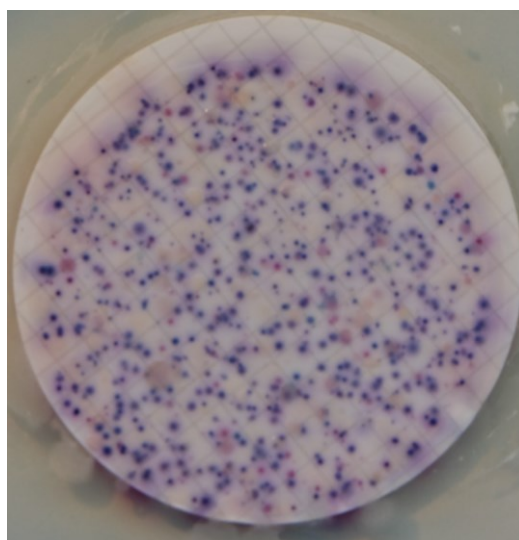
Kod ispitivanja uzoraka pijeska, postupku membranske filtracije prethodi priprema uzoraka. Uzorke pijeska pripremamo na način da na analitičkoj vagi odvažemo 35 g sedimenta u sterilnu staklenu bocu i zatim dodamo 348 mL fiziološke otopine i 2 mL TWIN 80 (odnos pijeska i fiziološke otopine 1:10). TWIN 80 (polietilen sorbitol ester) se dodaje radi smanjenja adhezija bakterijskih stanica na zrnca pijeska (22). Pripremljenu suspenziju dobro promućkamo, pustimo potrebno vrijeme da se istaloži te potom profiltriramo 50 mL po parametru. Uzorke mora nije potrebno dodatno pripremati.

Tablica 2. Mikrobiološki parametri određivani u uzorcima morske vode i pijeska

PARAMETAR	MORE	PIJESAK
<i>E. coli</i>	100 mL	50 mL
Crijevni enterokoki	100 mL	50 mL
<i>S. aureus</i>	100 mL	50 mL
<i>P. aeruginosa</i>	100 mL	50 mL
<i>C. perfringens</i>	100 mL	50 mL
<i>Salmonella</i> spp.	1000 mL	50 mL
UBB/22	1 mL	1 mL
UBB/37	1 mL	1 mL

3.2.2.1.1 Određivanje *Escherichia coli*

E. coli se dokazuje tehnikom membranske filtracije prema normi temperaturno modificiranoj metodi HRN EN ISO 9308-1:2014/A1:2017 (23). Za uzorak morske vode filtrirano je 100 mL vode, dok je za pijesak filtrirano 50 mL pripremljene suspenzije. Filter papir se sterilnom pincetom prenosi na selektivnu podlogu CCA agar. Zatim slijedi inkubacija 24 sata na 37° C. Pozitivnim porastom se smatra pojava tamno plavih/ljubičastih kolonija (24).

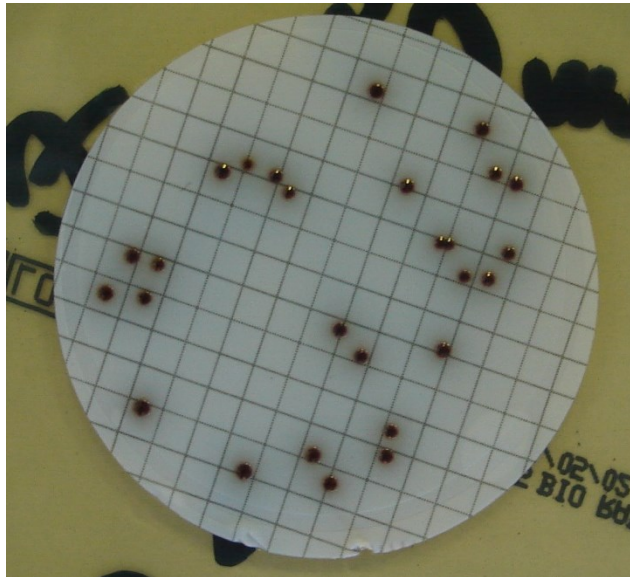


Slika 12.. Izgled *E. coli* na CCA agaru (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

3.2.2.1.2 Određivanje crijevnih enterokoka

Za određivanje crijevnih enterokoka koristi se tehnika membranske filtracije prema normi HRN EN ISO 7899-2:2000 (25). Za uzorak morske vode filtrirano je 100 mL vode, dok je za pijesak filtrirano 50 mL pripremljene suspenzije. Filter papir se sterilnom pincetom

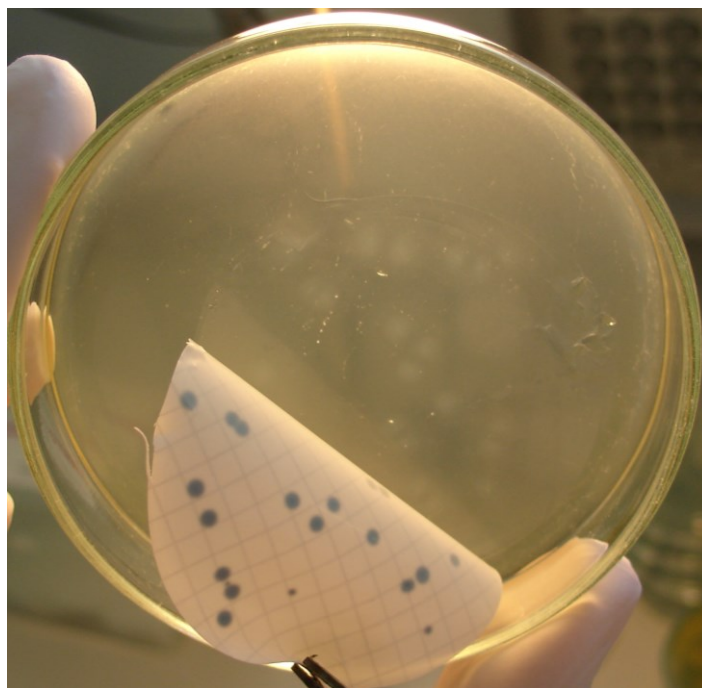
prenosi na selektivnu podlogu SBA agar. Zatim slijedi inkubacija 48 sati na 37° C, a pozitivnim porastom se smatra pojava karakterističnih kolonija crvene, smeđe – ljubičaste i ljubičaste boje. Ukoliko porastu karakteristične kolonije, slijedi provedba potvrdnog testa na način da se filter s karakterističnim kolonijama prenese na BEA agar koji se inkubira 2 sata na 44°C. Pojava crnog halo-a (crnog kruga) oko kolonije ukazuje na crijevne enterokoke (13).



Slika 13. Izgled crijevnih enterokoka na BEA agaru (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okolišan NZZJZ PGŽ)

3.2.2.1.3 Određivanje *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus se dokazuje tehnikom membranske filtracije prema normi HRN EN ISO 6888-2:2004 (26). Za uzorak morske vode filtrirano je 100 mL vode, dok je za pijesak filtrirano 50 mL pripremljene suspenzije. Filter papir se sterilnom pincetom prenosi na BP agar (Baird Parker agar) s dodatkom Egg Yolk Tellurite Emulsion (suspenzija žumanjka s teluritom). Zatim slijedi inkubacija 24 sata na 37° C. Pozitivnim porastom smatramo crne ili sive kolonije, sjajne, konveksne okružene s dvije halo zone (oko kolonije mutna a uz mutnu bistra zona). Kao potvrdne testove radimo: test katalaze, reakciju koagulaze i bojanje po Gramu (24).



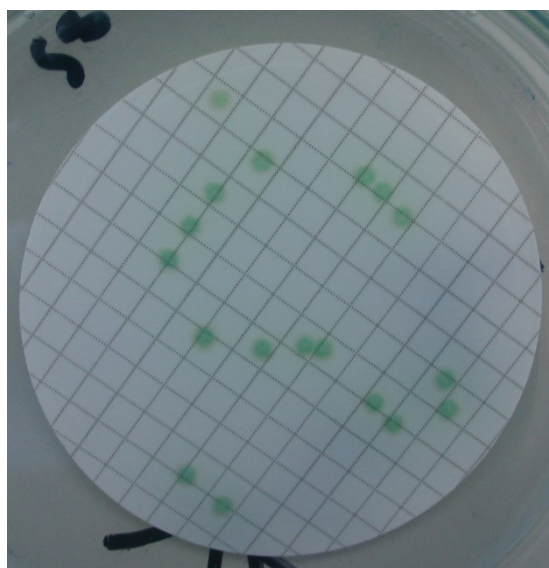
Slika 14. Izgled *S. aureus* na BP agaru (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

3.2.2.1.4 Određivanje *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa se dokazuje metodom membranske filtracije prema normi HRN EN ISO 16266:2008 (27). Za uzorak morske vode filtrirano je 100 mL uzorka, dok je za pijesak filtrirano 50 mL pripremljene suspenzije. Filter papir se sterilnom pincetom prenosi na selektivnu podlogu CN agar i inkubira 48 sati na 37° C. Zatim slijedi očitavanje brojanjem plavo-zelenih kolonija koje stvaraju pigment piocijanin (plavo-zeleni ne fluorescirajući pigment) (13). Membranski filter se ispituje pod UV lampom, što kraće zbog štetnog djelovanja na bakterije i nemogućnosti provedbe potvrdnih testova. Sve suspektne kolonije (koje fluoresciraju a ne produciraju piocijanin i crvenkasto-smeđe kolonije) presaditi sa CN agara na Nutrient agar te inkubirati 24 sata na 37° C. Kolonije koje fluoresciraju a ne produciraju piocijanin (nisu plave/zelene) brojati kao sumnjive na *P. aeruginosa* te potvrditi njihov identitet testom produkcije amonijaka upotrebom acetamid bujona. Crvenkasto-smeđe kolonije koje ne floresciraju brojati kao sumnjive na *P. aeruginosa* te ih potvrditi slijedećim testovima: oksidaza testom (pozitivna reakcija), testom produkcije amonijaka upotrebom acetamid bujona, pojavom fluorescencije na King's B mediju.

Tablica 3 – Preporučeni postupci za potvrdu kolonija poraslih na CN agaru

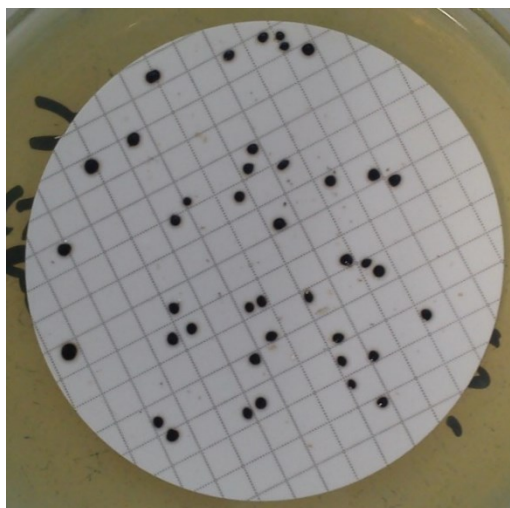
Opis kolonija na CN-agaru	Amonijak iz acetamida	Stvaranje oksidaze	Fluorescencija Na King's B	Potvrđeno kao <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Plavo/zelena	NT	NT	NT	Da
Fluorescentna (nije plavo/zelena)	+	NT	NT	Da
Crveno-smeđa	+	+	+	Da
Ostali tipovi	NT	NT	NT	Ne
NT: nije testirano				



Slika 15. Izgled *P. aeruginosa* na CN agaru (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

3.2.2.1.5 Određivanje *Clostridium perfringens*

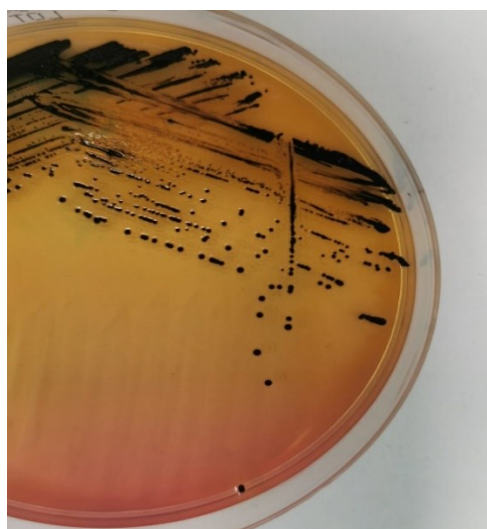
Clostridium perfringens se dokazuje tehnikom membranske filtracije prema HRN EN ISO 14189:2016 (28). Za uzorak morske vode filtrirano je 100 mL, dok je za pijesak filtrirano 50 mL pripremljene suspenzije. Filter papir se sterilnom pincetom prenosi na selektivnu podlogu TSC agar. Zatim slijedi inkubacija 24 sata na 44° C u anaerobnim uvjetima koje postižemo u Gas-Pack sustavu dodavanjem reagensa za stvaranje plina. Pozitivnim porastom se smatra pojava crnih ili sivih do žuto-smeđih kolonija. Ukoliko porastu karakteristične kolonije kao potvrdni test koristi se kisela fosfataza pri čemu dolazi do pojave ljubičastog obojenja kolonija (13).



Slika 16. Izgled *C. perfringens* na TSC agaru (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

3.2.2.1.6 Određivanje *Salmonella* spp.

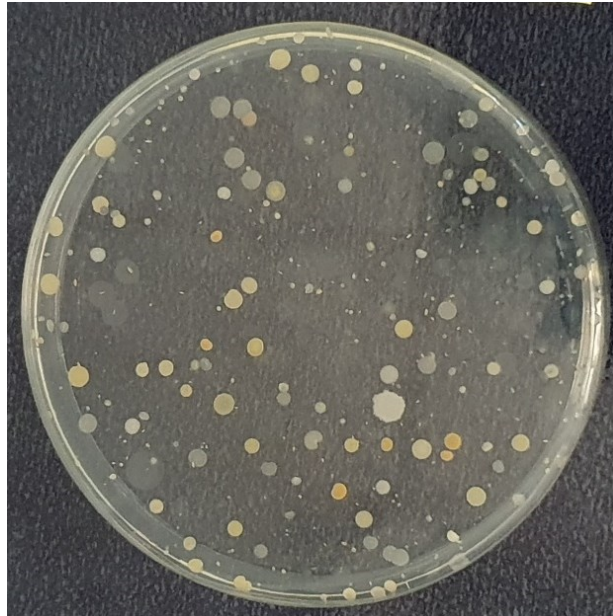
Salmonella spp. se dokazuje tehnikom membranske filtracije prema HRN EN ISO 19250:2013 (29). Za identifikaciju u morskoj vodi filtriran je uzorak vode od 1000 mL, dok je za pijesak filtriran uzorak od 50 mL. Filter papir prenosimo sterilnom pincetom u 50 mL puferirane peptonske vode (PPV) koja predstavlja medij za obogaćivanje *Salmonella*. Zatim slijedi inkubacija 24 sata na 37° C. Potom filter papir prenosimo u RVS i MKTTn bujon i inkubiramo 24 sata na 42° C te na 37° C tijekom 24 sata. Potom kulture nasadujemo na selektivni XLD agar (Xylose Lysine Deoxycholate agar) i inkubiramo na 37° C tijekom 24 sata. Pozitivnim porastom smatramo pojavu nježno crvenih kolonija s crnim centrom. Potvrdni test je test aglutinacije (24).



Slika 17. Izgled *Salmonella* spp. na XLD agaru (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

3.2.2.1.7 Broj aerobnih mezofilnih bakterija

Kako bi dobili broj aerobnih mezofilnih bakterija primjenjuje se metoda ulijevanja (engl. pour plate method), sukladno modificiranoj normi HRN EN ISO 6222:2000 (30). Metoda je modificirana na način da se umjesto YEA agara (Yeast Extract Agara) koristio Marine agar, koji je zbog svog bogatijeg sastava solima, prikladniji za uzgoj bakterija iz morskog okoliša. To je metoda koja pruža podatke o broju živih mikroorganizama u ispitivanim uzorcima. Prije izvođenja metode, uzorke je potrebno razrijediti kako konačni broj mikroorganizama ne bi premašio 300 CFU/mL, odnosno kapacitet agar ploče. Potom se 1 mL uzorka prenese u praznu Petrijevu ploču, koja se zatim prelijeva s 10-15 mL rastopljenog i temperiranog Marine agara. Petrijeve ploče se preokrenu i inkubiraju 48 sati na 37° C te na 22 °C 72 sata. Porast se izračunava te se broj kolonija iskazuje kao CFU/mL (31, 32).



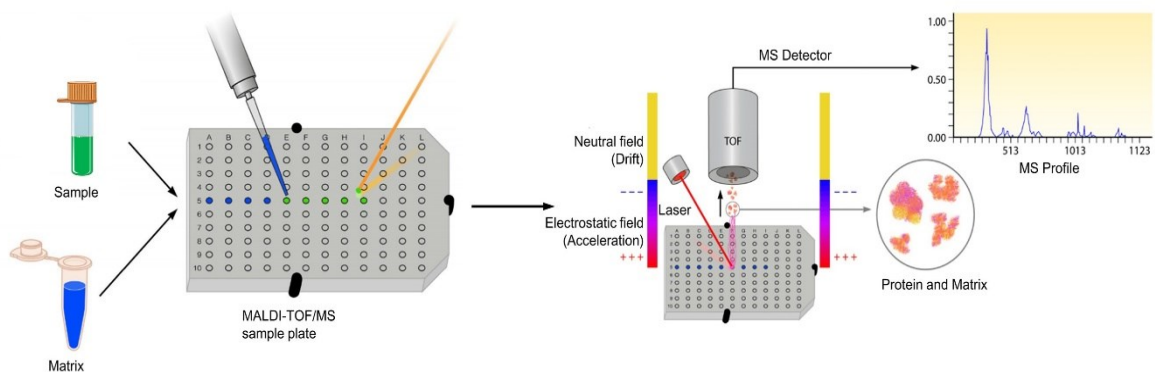
Slika 18. Određivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija na Marine agaru izraženih kao CFU/mL (izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

3.2.2.2 Identifikacija vrsta gljiva pomoću instrumenta MALDI-TOF MS

Razvoj uređaja za masenu spektrometriju s laserskom desorpcijom uz pomoć matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) zamjenjuje konvencionalne tehnike identifikacije fenotipa i gena mikroba koje su se donedavno koristile u mikrobiološkim laboratorijima (33). MALDI TOF-MS je vrlo osjetljiva analitička tehnologija koja ima široku primjenu u različitim područjima kemije,

osobito kliničke, laboratorijske medicine i kliničke mikrobiologije. Predstavlja oblik masene spektrometrije koji se temelji na mjerenju signala ovisnog o masi i naboju analiziranih molekula, što u konačnici omogućava identifikaciju tih molekula (34). MALDI-TOF MS je iznimno korisna tehnologija u mikrobiološkom laboratoriju obzirom da je karakterizira brza, precizna, jeftina i učinkovita tehnika identifikacije uzgojenih bakterija i gljiva. Omogućuje točnu identifikaciju većine gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, s izuzetkom nekoliko kompleksnih sojeva koji zahtijevaju više pažnje i daljnji razvoj metode. Tehnologija je automatizirana i primjenjiva na širok raspon različitih vrsta mikroorganizama, kao što su bakterije, gljive i virusi. Identifikacija izolata kvasca pomoću MALDI-TOF MS pouzdana je i puno brža od konvencionalnih tehnika (33).

Izolirane kolonije gljiva na SDA i FS hranjivim pločama identificirane su pomoću MALDI-TOF MS. Uzorci su pripremljeni slijedeći protokol za identifikaciju gljivica prema proizvođaču. Spektri su dobiveni pomoću Autoflex sustava, a identifikacija je izvršena pomoću MBT-a softvera, s najnovijom nadogradnjom Brukerove biblioteke gljiva. Paralelno, spektri su također analizirani korištenjem MSI biblioteke kojoj se pristupa online (6).



Slika 19. Postupak identifikacije pomoću MALDI-TOF MS



Slika 20. MALDI TOF-MS

3.2.3 Fizikalno-kemijski pokazatelji

3.2.3.1 Temperatura zraka i vode

Za potrebe određivanja temperature morske vode korišten je alkoholni termometar, s podjelom skale od 0,1. Podaci o temperaturi zraka preuzeti su sa stranice Državni hidrometeorološki zavod (DHMZ).

3.3 Statistička obrada podataka

Za potrebe ovoga rada koristili smo se deskriptivnom statistikom, relativnom frekvencijom, aritmetičkom sredinom (AS) i medijanom kao mjerama središnje vrijednosti, standardnom devijacijom (SD), interkvartilnim rasponom (IKR), whisker = non-outlier range (hrv. brkovi – najveća i najmanja vrijednost koje nisu „stršeće vrijednosti“, engl. Outlieri) te rasponom podataka (min-maks) kao mjerama raspršenosti podataka kako bi prikazali rezultate. Normalnost raspodjele podataka testirana je pomoću Kolmogorov-Smirinavljevog testa. Obzirom da distribucija podataka nije pratila Gaussovu krivulju, korišteni su neparametrijski testovi (Spearmanov koeficijent korelacije, Mann-Whitney U test) pomoću programa Statistica 14.0.1.25. (Stat.Sof.Inc., Tulsa, SAD), uz razinu značajnosti od $P < 0,05$.

3.3.1 Spearmanov koeficijent korelacije

Spearmanov koeficijent korelacije poznat i pod nazivom korelacija ranga označava se slovima ρ ili r_s . Uz Pearsonov koeficijent korelacije primjenjuje se za brojčano iskazivanje vrijednosti korelacije, odnosno povezanosti dviju varijabli. Primjenjiv je kada uvjeti ne zadovoljavaju kriterije za izračun pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije. Odnosno, kada podaci nemaju normalnu distribuciju te kada podaci obje ili jedne od varijabli slijede ordinalnu ljestvicu. Suprotno Pearsonovom koeficijentu, Spearmanov je primjenjiv na manjim uzorcima ($N < 35$) i ne zahtjeva linearnu povezanost podataka. Za interpretaciju rezultata potrebno je navesti koeficijent korelacije (r) i značajnost koeficijenta korelacije (P). Koeficijent korelacije se navodi brojem s 2 decimalna mjesta, a značajnost koeficijenta korelacije s tri decimalna mjesta. Ukoliko je dobiveni koeficijent korelacije značajan obzirom na postavljenu granicu značajnosti $P < 0,05$, tada se smije tumačiti. Povezanost dviju varijabli obzirom na dobivene vrijednosti koeficijenta korelacije mogu biti u rasponu od:

1. od 0 do 0,25 ili od 0 do -0,25 gdje nema povezanosti
2. od 0,25 do 0,50 ili od -0,25 do -0,50 gdje je slaba povezanost
3. od 0,50 do 0,75 ili -0,50 do -0,75 gdje je umjerena do dobra povezanost
4. od 0,75 do 1 ili -0,75 do -1 gdje je vrlo dobra do izvrsna povezanost (35)

3.3.2 Mann-Whitney U test

Mann-Whitney U test poznat i pod nazivom Wilcoxonov test zbroja rangova je neparametrijski test za statističku obradu podataka. Glavni preduvjet za njegovu provedbu je postojanje dviju neovisnih skupina. Njegov ekvivalent je parametrijski t-test dva uzorka. Za razliku od svog dvojnika, Mann-Whitney U test primjenjuje se za ispitivanje nulte hipoteze, odnosno razlike između dviju neovisnih skupina koje nemaju normalnu distribuciju. Mann-Whitney U test se temelji na uspoređivanju medijana neovisnih skupina, dok t-test koji je poželjniji jer je osjetljiviji i prije će uočiti razliku između dviju skupina uspoređuje njihove srednje vrijednosti. Stoga, je Mann-Whitneyev U-test primjenjiv kada nije zadovoljen dovoljan broj podataka, uvjet homogenosti varijance i kada nema normalne distribucije.

Mann-Whitney U test uključuje obradu podataka, izračunavanje medijana, interpretacija dobivenih rezultata i utvrđivanje utjecaja među varijablama. Prilikom izvođenja testa vrijednosti obje skupine podataka rangiraju se od najniže ka najvišoj uz pridruživanje odgovarajućega ranga. Najnižoj vrijednosti pridružuje se prvi rang, a najvišoj maksimalan

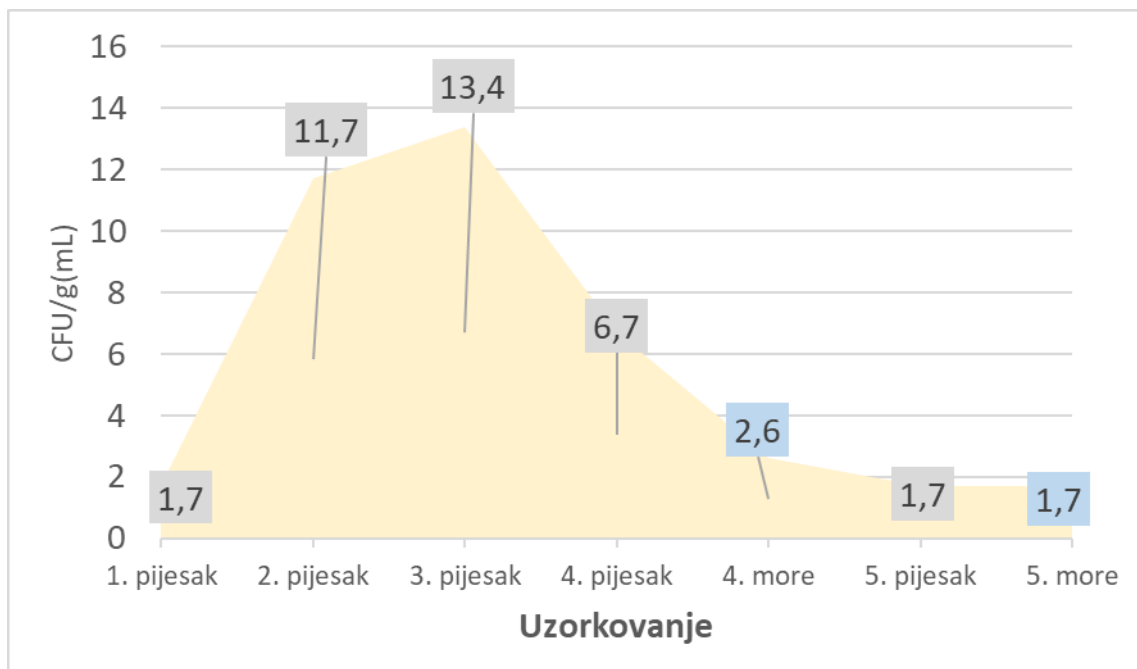
rang koji predstavlja ukupnu vrijednost za obje skupine. Ukoliko imamo više jednakih vrijednosti, svakoj od njih se pridružuju rangovi izračunati aritmetičkom sredinom. Zatim se zasebno zbrajaju rangovi pridruženi vrijednostima za obje skupine podataka i prema formuli Mann-Whitney testa izračunava se z-vrijednost. Za potrebe izračuna z-vrijednosti uzimaju se vrijednosti jedne od skupine podataka, odnosno suma rangova odabrane skupine. Bez obzira na odabranu skupinu z-vrijednost se neće razlikovati među dvjema skupinama podataka. Ukoliko je izračunata z-vrijednost veća od 1,96 na razini statističke značajnosti od 5 %, ispitivane skupine podataka se statistički značajno razlikuju (36).

4 REZULTATI

4.1 Opterećenje gljivama pijeska i morske vode

Tijekom istraživanja provedeno je pet uzorkovanja u zimskom razdoblju, od studenog 2022. do siječnja 2023. godine. Na Slici 21 je vidljivo najveće ukupno opterećenje gljivama u drugom (11,7 CFU/g) i trećem (13,4 CFU/g) uzorkovanju i to u pijesku. Zabilježena temperatura zraka bila je 8 °C, odnosno 11 °C (Tablica 4). U moru su gljive pronađene samo u uzorcima prikupljenim u 4. (temperaturi mora i zraka 11 °C, Tablica 4) i 5. uzorkovanju (temperaturi mora 11 °C i zraka 6 °C, Tablica 4, u niskoj koncentraciji od 2,6 CFU/mL, odnosno 1,7 CFU/mL).

Sve dobivene vrijednosti za ukupan broj gljiva ispod su Mycosand kriterija od 89 CFU/g.



Slika 21. Ukupno opterećenje uzoraka pijeska i mora s gljivama tijekom pet uzorkovanja, od studenog 2022. do siječnja 2023. godine

Tablica 4. Datumi uzorkovanja s podacima o temperaturi zraka i mora

Broj uzorkovanja	Datum uzorkovanja	Temperatura zraka (°C)	Temperatura mora (°C)
1	10.11.2022.	9	17,5
2	24.11.2022.	9	16
3	8.12.2022.	8	11
4	22.12.2022	11	11
5	5.1.2023.	6	11

U Tablici 5 su navedene identificirane vrste gljiva u pijesku i morskoj vodi, po uzorkovanju te različitim podlogama i uvjetima inkubacije. Ukupno ih je devet, sedam u pijesku i tri u morskoj vodi.

Pijesak:

- 1) *Aspergillus nidulans*
- 2) *Aspergillus calidoustus*
- 3) *Aspergillus niger*
- 4) *Schizophyllum commune*
- 5) *Aspergillus flavus oryzae* group
- 6) *Trichoderma reesei*
- 7) *Beauveria bassiana*

Morska voda:

- 1) *Aspergillus terreus*
- 2) *Aspergillus niger*
- 3) *Mucor circinelloides*

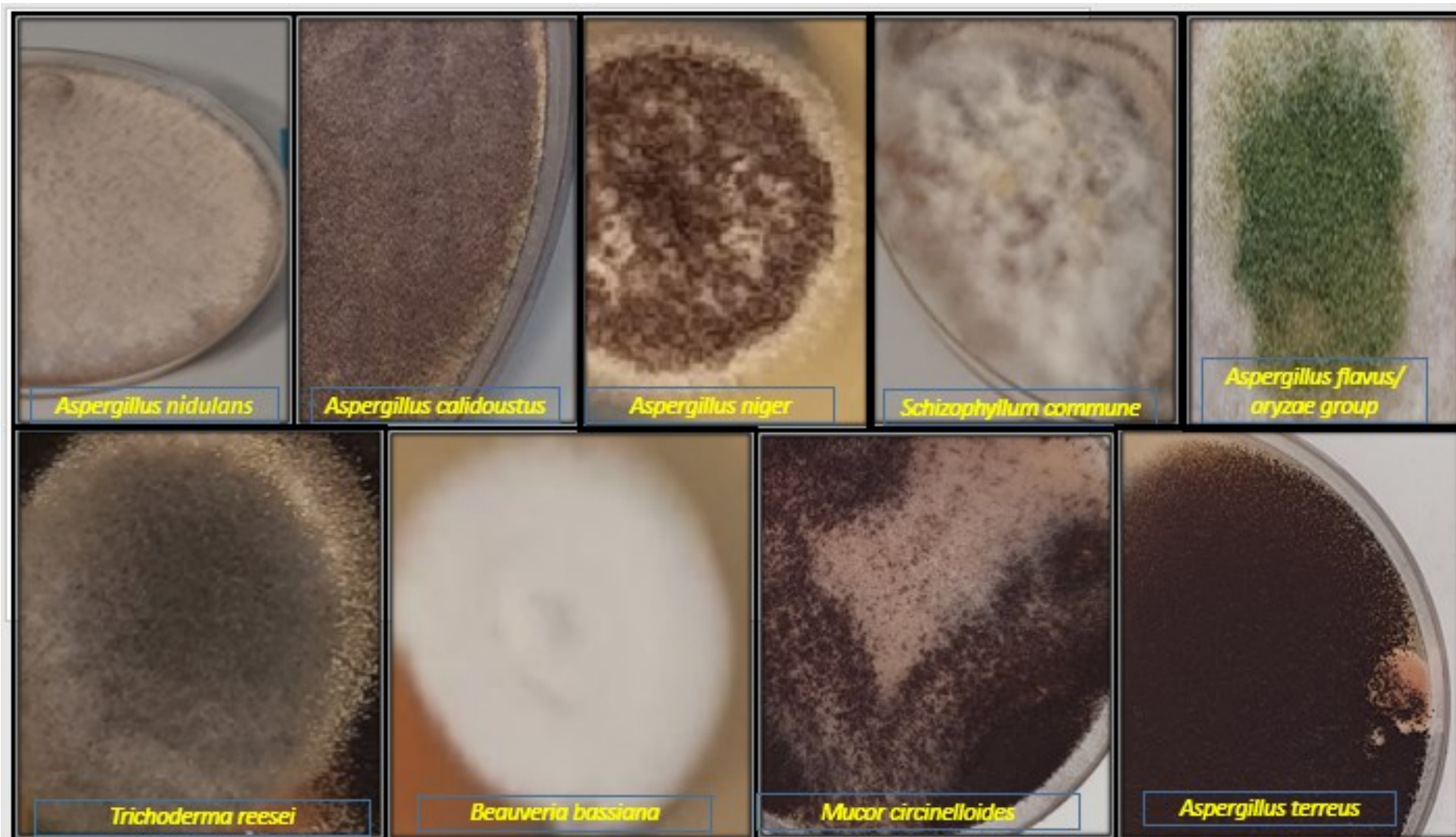
Aspergillus niger je jedina vrsta koja je dokazana i u pijesku i u morskoj vodi.

Jedino na podlozi FUNG/30, tijekom 20 dana inkubacije porasle su kolonije gljiva iz uzoraka morske vode, dok na SDA podlozi u primijenjenim uvjetima inkubacije, nije bilo porasta.

Na Slici 22 prikazan je porast pojedine vrste i izgled kolonija.

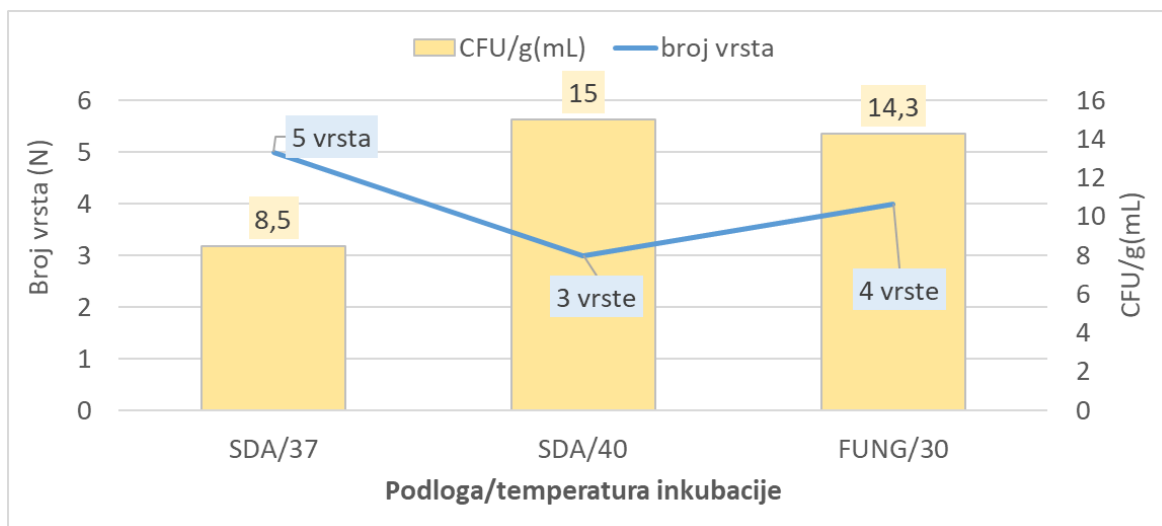
Tablica 5. Identificirane vrste gljiva tijekom pet uzorkovanja, u pijesku i morskoj vodi, na različitim podlogama i uvjetima inkubacije

	PIJESAK															MORSKA VODA	
	1 uzorkovanje, tv = XY °C			2 uzorkovanje			3 uzorkovanje			4 uzorkovanje			5 uzorkovanje			4 uzorkovanje	5 uzorkovanje
	SDA/37	SDA/40	Fung/30	SDA/37	SDA/40	Fung/30	SDA/37	SDA/40	Fung/30	SDA/37	SDA/40	Fung/30	SDA/37	SDA/40	Fung/30	Fung/30	Fung/30
<i>Aspergillus nidulans</i>		1,7						6,7		1,7							
<i>Aspergillus calidoustus</i>				1,7													
<i>Aspergillus niger</i>							1,7	3,3				3,3				1,7	
<i>Schizophyllum commune</i>										1,7							
<i>Aspergillus flavus oryzae</i> group					3,3												
<i>Trichoderma reesei</i>							1,7										
<i>Beauveria bassiana</i>						6,7											
<i>Mucor circinelloides</i>																1,7	
<i>Aspergillus terreus</i>																	1,7



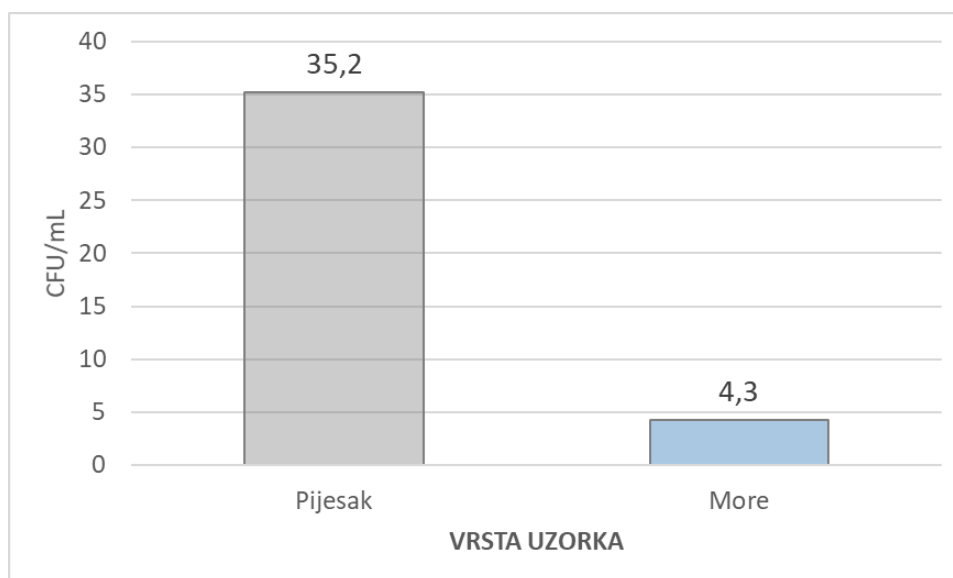
Slika 22. Porast identificiranih vrsta gljiva na SDA i Fungisel hranjivim podloga

Gljive su kultivirane na različitim podlogama, u različitim inkubacijskim uvjetima (temperaturi i vremenu inkubacije). Na Slici 23 je vidljivo da je najveći broj vrsta, njih pet porastao na SDA/37 tijekom deset dana inkubacije. Međutim, na toj je podlozi istovremeno porastao najmanji broj kolonija. Najveći broj kolonija porastao je na SDA/40 (uz tri dana inkubacije), uz istovremeno najmanji broj vrsta (tri).



Slika 23. Broj detektiranih vrsta gljiva i broj izraslih kolonija po pojedinoj hranjivoj podlozi i različitim uvjetima inkubacije (SDA/37 – SDA podloga pri temperaturi inkubacije 37 °C tijekom 10 dana; SDA/40 – SDA podloga pri temperaturi inkubacije 40 °C tijekom 3 dana; FUNG/30 – Fungisel podloga pri temperaturi inkubacije 30 °C tijekom 20 dana)

Promatrajući dva ispitana matriksa, pijesak i morsku vodu, na Slici 24 može se vidjeti značajno veće ukupno opterećenje pijeska gljivama, 35,2 CFU/g, u odnosu na morsku vodu, 4,3 CFU/mL.



Slika 24. Ukupno opterećenje pijeska i morske vode gljivama

4.2 Bakteriološko opterećenje pijeska i morske vode

Od pet provedenih uzorkovanja, samo je u trećem uzorkovanju kakvoća mora ocjenjena kao dobra (označeno zelenom bojom, Tablica 6) prema dobivenoj vrijednosti za *E. coli* (105 CFU/100 mL), prema kriterijima iz Uredbe (NN 73/2008), dok su sve ostale vrijednosti i za *E. coli* i za enterokoke ukazale na izvrsnu kakvoću mora (označeno plavom bojom, Tablica 6).

Tablica 6. Vrijednosti ispitanih mikrobioloških pokazatelja u morskoj vodi te ocjena kakvoće mora prema Uredbi (73/2006)

Br. uz.	EC CFU/100 mL	ENT CFU/100 mL	UKB CFU/100 mL	CP CFU/100 mL	PA CFU/100 mL	UBB/22 CFU/mL	UBB/37 CFU/mL
1	2	7	3	0	0	174	56
2	37	11	50	5	3	200	800
3	105*	19*	121	8	1	380	1000
4	80	35	130	13	1	120	240
5	27	15	57	10	0	900	700

*Uzorak ocjenjen kao dobar, prema kriterijima za *E. coli* iz Uredbe (73/2006)

U Tablici 7 prikazane su vrijednosti ispitanih mikrobioloških pokazatelja u pijesku, izražene na 100 g pijeska (za UBB/37 i UBB/22 u jednom mL), zbog jednostavnije usporedbe s mikrobiološkim opterećenjem u morskoj vodi.

Tablica 7. Vrijednosti ispitanih mikrobioloških pokazatelja u pijesku izraženih u CFU/100 g

Br. uz.	EC CFU/100 g	ENT CFU/100 g	UKB CFU/100 g	CP CFU/100 g	PA CFU/100 g	UBB/22 CFU/g	UBB/37 CFU/g
1	60	260	240	720	0	20.000	20.000
2	400	1800	1120	440	600	20.000	350
3	600	600	1100	600	0	5200	18.000
4	500	600	40.000	600	0	1800	200
5	100	200	200	200	0	12.000	5000

Sagledavajući mikrobiološke kriterije prema WHO preporukama iz 2021. godine (19) te portugalskim kriterijima za Plavu zastavu (37), u Tablici 8 je vidljivo da su vrijednosti u svim uzorcima bile ispod definiranih kriterija (<60 CFU/g, odnosno <10 CFU/g), osim kod drugog uzorkovanja, kada je vrijednost za enterokoke (18 CFU/g) bila iznad portugalskih kriterija. Vrijednosti *E. coli* bile su ispod definiranih vrijednosti za Plave zastave u Portugalu (<25 CFU/g).

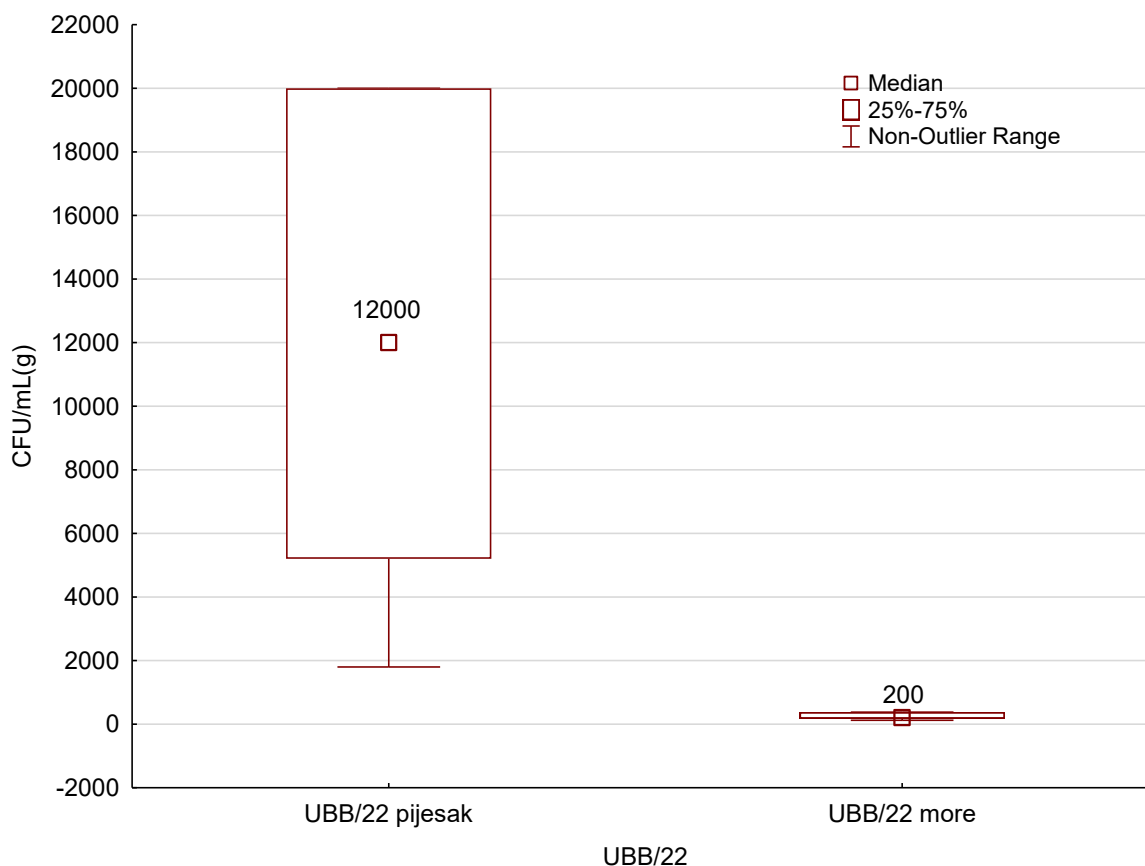
Tablica 8. Vrijednosti ispitanih mikrobioloških pokazatelja u pijesku izraženih u CFU/g, s osvrtom na postojeće kriterije kakvoće

Br. uz.	ENT CFU/g	EC CFU/g
1	3	1
2	18*	4
3	6	6
4	6	5
5	2	1

Portugalski kriterij: enterokoki <10 CFU/g i *E. coli* <25 CFU/g
 WHO kriterij: enterokoki <60 CFU/g

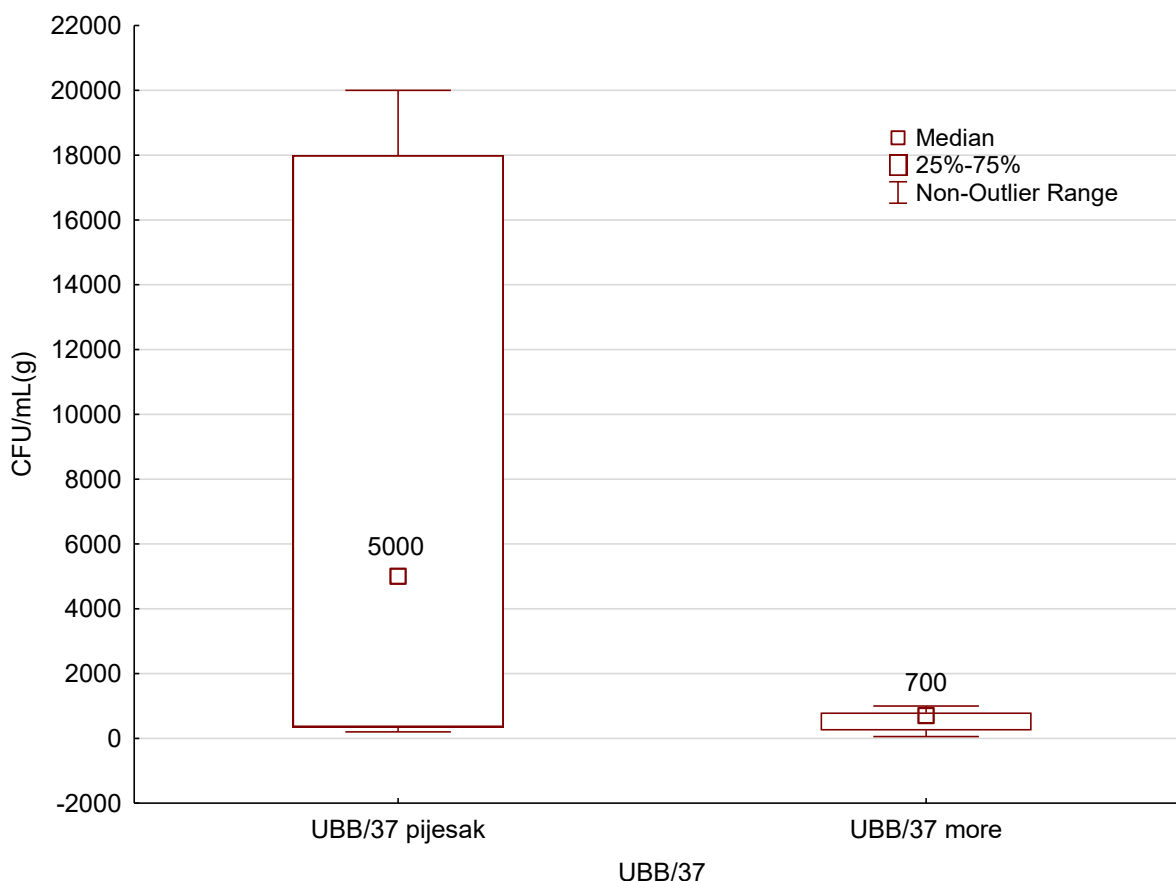
*Vrijednost iznad kriterija za Plave zastave u Portugalu (<10 CFU/g)

Srednja vrijednost za pokazatelj UBB/22 u pijesku od 11.800 ± 8338 CFU/100 g, raspon vrijednosti 1800-20.000 CFU/100 g, uz medijan od 12.000 CFU/100 g (IKR 1800-20.000 CFU/100 g) značajno se razlikovala (Mann-Whitney U test, $Z = 2,5143$, $p < 0,01$) od srednje vrijednosti u morskoj vodi (355 ± 320 CFU/100 mL), raspon vrijednosti 120-900 CFU/100 mL i medijan od 200 CFU/100 mL (IKR = 120 – 900 CFU/100 mL).



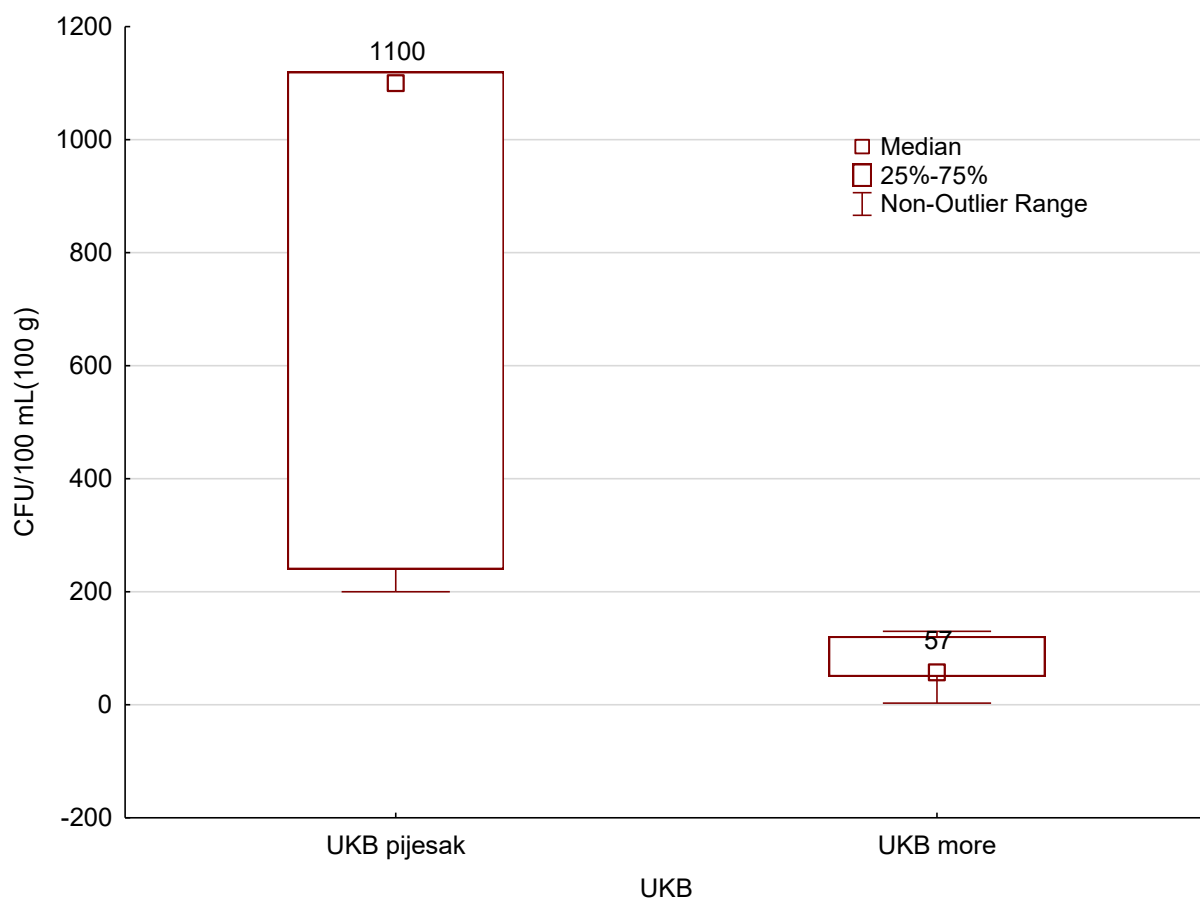
Slika 25. Medijan UBB/22 (broj kolonija na inkubaciji pri 22 °C) u pijesku i morskoj vodi, s prvim (25 %) i trećim kvartilom (75 %) i whisker = non-outlier range (hrv. brkovi – najveća i najmanja vrijednost koje nisu „stršćeće vrijednosti“, engl. outliers)

Vrijednosti pokazatelja UBB/37 u pijesku, uz srednju vrijednost od 8710 ± 9616 CFU/100 g, raspon vrijednosti 200-20.000 CFU/100 g, medijan 5000 CFU/100 g (IKR 200-20.000 CFU/100 g) bile su više, ali bez statistički značajne razlike od srednje vrijednosti u morskoj vodi (559 ± 396 CFU/100 mL), raspon vrijednosti 56-1000 CFU/100 mL, uz medijan 200 CFU/100 mL (IKR = 240 – 800 CFU/100 mL).



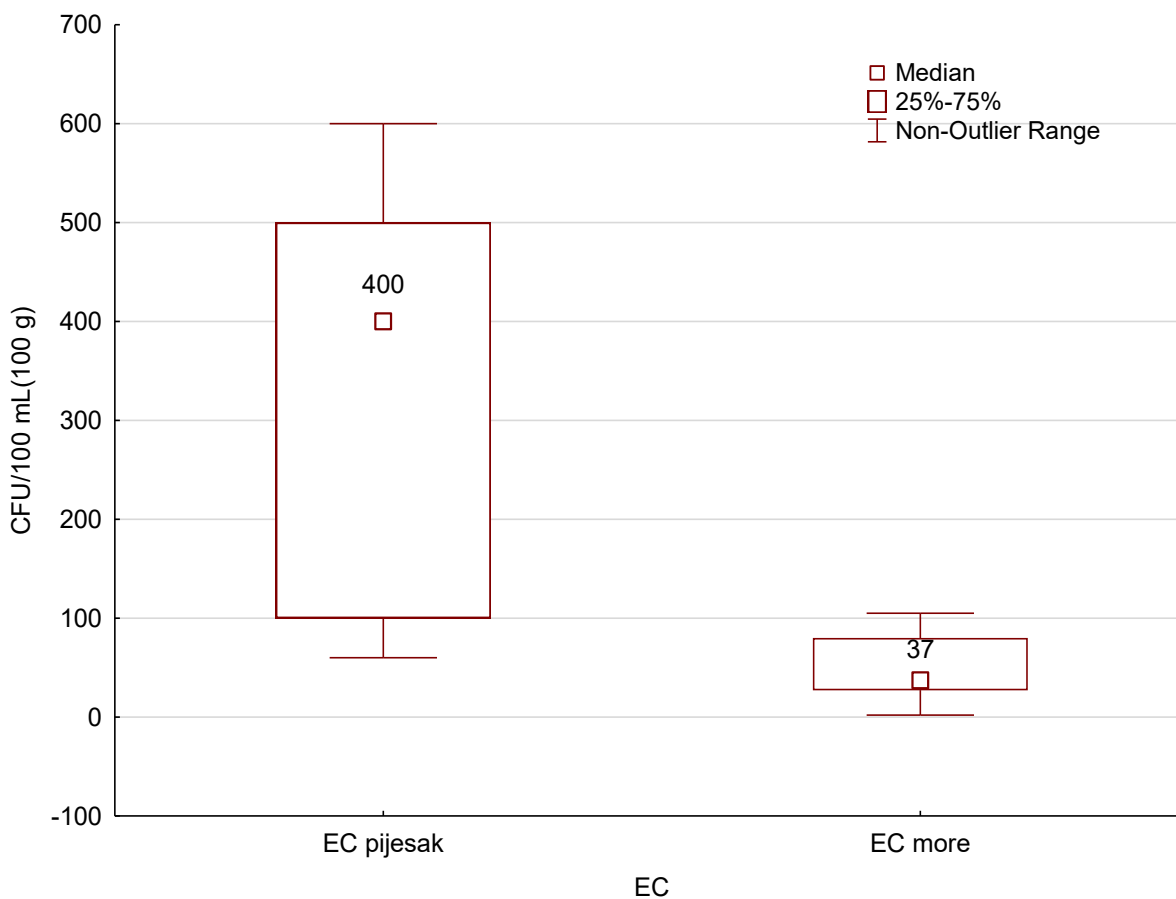
Slika 26. Medijan UBB/37 (broj kolonija na inkubaciji pri 37 °C) u pijesku i morskoj vodi, s prvim (25 %) i trećim kvartilom (75 %) i whisker = non-outlier range (hrv. brkovi – najveća i najmanja vrijednost koje nisu „stršćeće vrijednosti“, engl. outliers)

Koncentracija UKB, sa srednjom vrijednosti od 8532 ± 17597 CFU/100 g, rasponom vrijednosti 200-40.000 CFU/100 g, medijanom od 11 CFU/100 g (IKR 240-1120 CFU/100 g) statistički je značajno bila više (Mann-Whitney U test, $Z = 2,5067$, $p < 0,01$) u pijesku u usporedbi s morskom vodom, u kojoj je srednja vrijednost iznosila 72 ± 53 CFU/100 mL, raspon vrijednosti 3-130 CFU/100 mL, medijan 57 CFU/100 mL (IKR 3-130 CFU/100 mL).



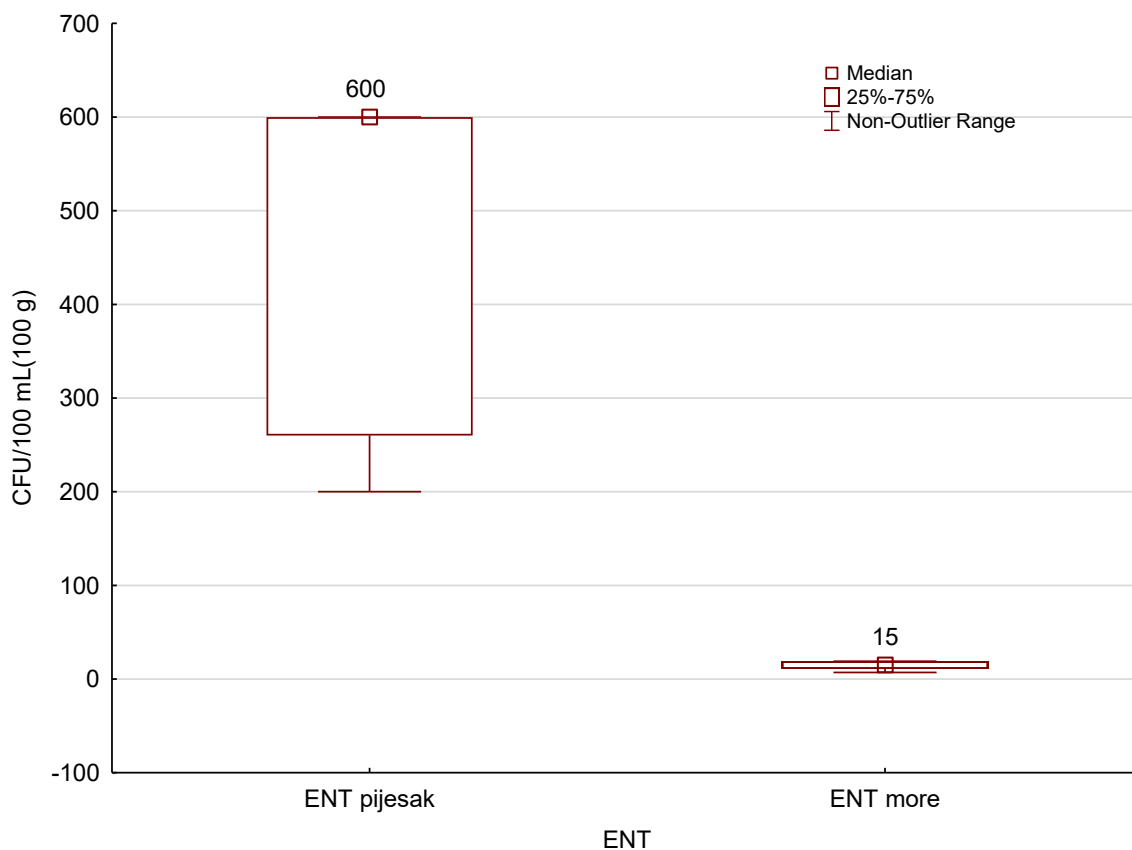
Slika 27. Medijan UKB (ukupnih koliformnih bakterija) u pijesku i morskoj vodi, s prvim (25 %) i trećim kvartilom (75 %) i whisker = non-outlier range (hrv. brkovi – najveća i najmanja vrijednost koje nisu „stršeće vrijednosti“, engl. outlieri)

U sedimentu je srednja vrijednost EC bila 332 ± 241 CFU/100 g, raspon vrijednosti 60-600 CFU/100 g, medijan 400 CFU/100 g (IKR 100-500 CFU/100 g), što je ukazalo na veće opterećenje EC u usporedbi s morskom vodom, u kojoj je srednja vrijednost bila 50 ± 42 CFU/100 mL, raspon vrijednosti 2-105 CFU/100 mL, medijan 37 CFU/100 mL (IKR 27-80 CFU/100 mL), međutim statistički značajna razlika nije utvrđena.



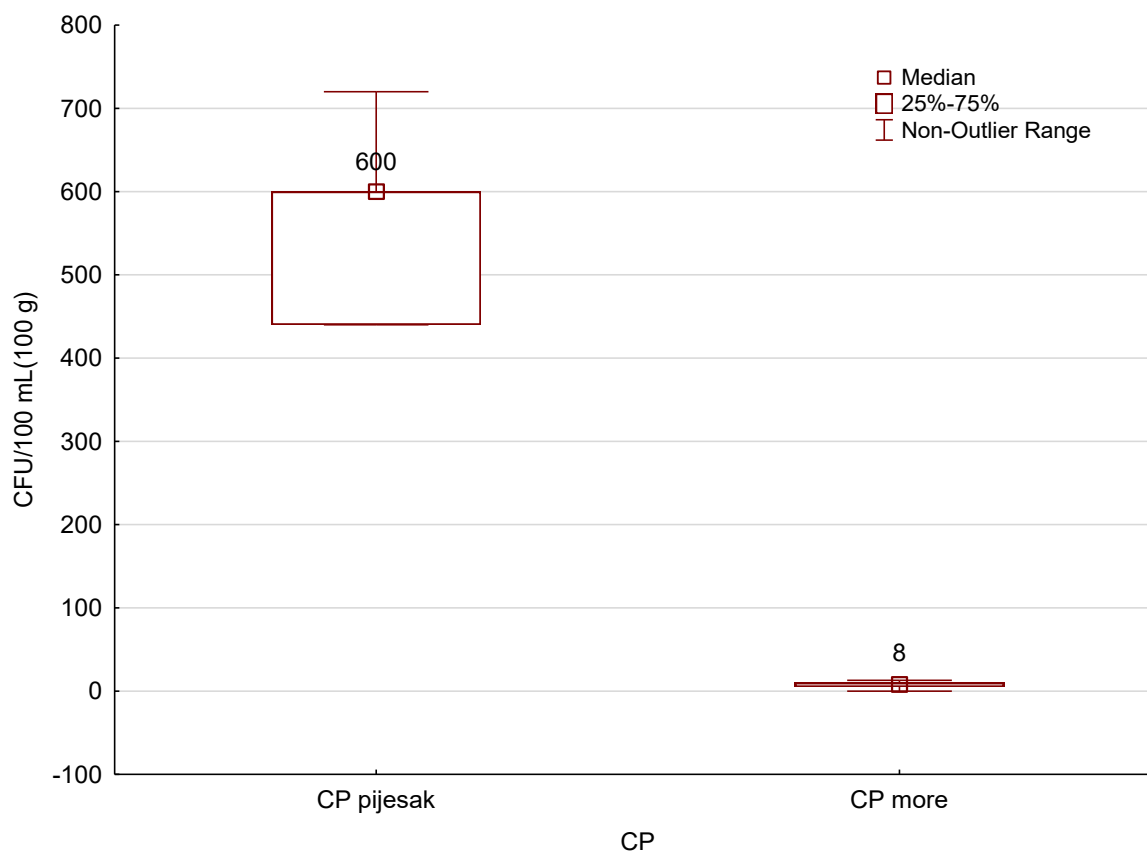
Slika 28. Medijan EC (*Escherichia coli*) u pijesku i morskoj vodi, s prvim (25 %) i trećim kvartilom (75 %) i whisker = non-outlier range (hrv. brkovi – najveća i najmanja vrijednost koje nisu „stršeće vrijednosti“, engl. outliers)

Srednja vrijednost indikatora fekalnog onečišćenja enterokoka bila je statistički značajno viša (Mann-Whitney U test, $Z = 2,5143$, $p < 0,01$) u sedimentu (692 ± 647 CFU/100 g), raspon vrijednosti 200-1800 CFU/100 g, medijan 600 CFU/100 g (IKR 260-600 CFU/100 g) u odnosu na morsku vodu, sa srednjom vrijednošću od 17 ± 11 CFU/100 mL, raspon vrijednosti 7-35 CFU/100 mL, medijan 15 CFU/100 mL (IKR 11-19 CFU/100 mL).



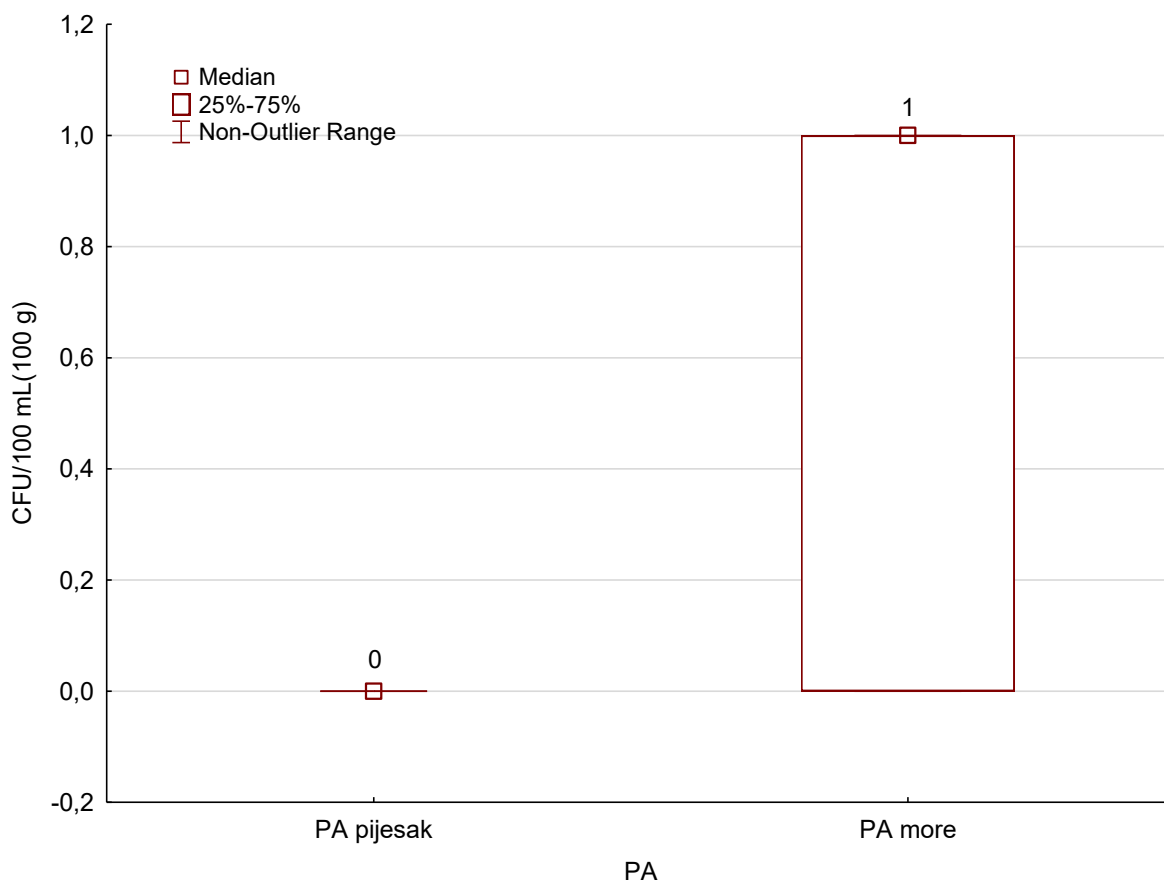
Slika 29. Medijan ENT (crijevnih enterokoka) u pijesku i morskoj vodi, s prvim (25 %) i trećim kvartilom (75 %) i whisker = non-outlier range (hrv. brkovi – najveća i najmanja vrijednost koje nisu „stršeće vrijednosti“, engl. outliers)

Srednja vrijednost broja *C. perfringens* u sedimentu bila je 512 ± 201 CFU/100 g, raspon vrijednosti od 200-720 CFU/100 g, medijan 600 CFU/100 g (IKR 440-600 CFU/100 g), što je bilo statistički značajno veće opterećenje (Mann-Whitney U test, $Z = 2,5143$, $p < 0,01$) u usporedbi s morskom vodom (srednja vrijednost $7,2 \pm 5,0$ CFU/100 mL, raspon vrijednosti 0-13 CFU/100 mL, medijan 8, IKR 5-10 CFU/100 mL).



Slika 30. Medijan CP (*Clostridium perfringens*) u pijesku i morskoj vodi, s prvim (25 %) i trećim kvartilom (75 %) i whisker = non-outlier range (hrv. brkovi – najveća i najmanja vrijednost koje nisu „stršeće vrijednosti“, engl. outliers)

Srednja vrijednost broja pseudomonasa od 120 ± 268 CFU/100 g u pijesku, rasponom vrijednosti 2-600 CFU/100 g, medijanom 0 CFU/100 g (IKR 0-0 CFU/100 g), nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na morsku vodu (srednja vrijednost 1 ± 1 CFU/100 mL, raspon vrijednosti 0-3 CFU/100 mL, medijan 1, IKR 0-1 CFU/100 mL).



Slika 31. Medijan PA (*Pseudomonas aeruginosa*) u pijesku i morskoj vodi, s prvim (25 %) i trećim kvartilom (75 %) i whisker = non-outlier range (hrv. brkovi – najveća i najmanja vrijednost koje nisu „stršeće vrijednosti“, engl. outliers)

Mikrobiološki pokazatelji *S. aureus* i *Salmonella* spp. nisu dokazani niti u jednom uzorku pijeska i vode.

Korelacijska analiza podataka za ispitane pokazatelje u morskoj vodi pokazala je značajnu pozitivnu korelaciju između CP i UKB ($r_s = 0,9$; $p < 0,05$) te CP i ENT ($r_s = 0,9$; $p < 0,05$). Značajna korelacija mikrobioloških pokazatelja u sedimentu nije utvrđena.

5 RASPRAVA

Na raspodjelu i raznolikost mikroba u morskoj vodi i pijesku utječu brojni čimbenici, poput položaja plaže, saliniteta, relativne vlažnosti te načina na koji drugi ljudi i životinje stupaju u interakciju s pijeskom i morskom vodom (8). Neki mikrobi dospijevaju u pijesak i morsku vodu izravno od drugih domaćina, dok nekima to predstavlja cjelogodišnje stanište. Njihova prisutnost povezana je s nizom štetnih učinaka na ljudsko zdravlje, uključujući zarazne ili alergijske bolesti i toksične reakcije. Infekcije gljivama, u usporedbi s virusnim i bakterijskim, imaju duži tijek inkubacije te se stoga simptomi obično javljaju kasnije (3). Iz tog je razloga pojavu gljivične infekcije teže povezati s određenim okolišem. Obzirom da je gljivični svijet, u odnosu na virusni i bakterijski, općenito slabije istražen, od velikog su značaja studije u kojima se proučava brojnost i raznolikost gljiva u različitim staništima, što daje bolji uvid u gljivičnu populaciju. Jedna od takvih studija je europska inicijativa "Mycosands", koja istražuje brojnost i gljivičnu raznolikost u pijesku na plaži i morskoj vodi, u različitim okolišnim uvjetima (5). U skladu s inicijativom „Mycosands“, cilj ovoga rada bio je istražiti brojnost i vrste kvasaca i plijesni te bakteriološko opterećenje u pijesku i morskoj vodi na pješčanoj plaži Primorsko-goranske županije. Također, ispitan je i utjecaj okolišnih čimbenika na prisutnost i raznolikost gljiva u dvije ekološke niše (pijesak na plaži i morska voda). Pri odabiru lokaliteta istraživanja, uzet je kriterij inicijative „Mycosands“, te je odabrana pješčana plaža u gradu Crikvenici, koja u sezoni proljeće/ljeto predstavlja popularnu destinaciju za rekreaciju u Primorsko-goranskoj županiji. Povoljni položaj joj omogućava dostupnost sunčeve svjetlosti tijekom cijele godine, a zahvaljujući obroncima planine Kapele i otoku Krku plaža je zaštićena od naleta jakih vjetrova (21). Obzirom da je Hrvatska jedna od zemalja koju okružuju Sredozemno more, i grad Crikvenicu odlikuje blaga mediteranska klima. Tako su zime blage s velikom količina oborina i rijetkom pojavom snijega, a ljeta suha i topla. U neposrednoj blizini pješčane plaže nalazi se šetnjica okružena bujnom vegetacijom kao i brojne građevine i lokali što ju klasificira u „urbane plaže“.

Temeljem rezultata provedenog istraživanja utvrđeno je znatno veće opterećenje pijeska s bakterijama i gljivama, u usporedbi s morskom vodom. Statistički veće opterećenje pijeska u odnosu na morsku vodu dokazano je za većinu ispitanih mikrobioloških pokazatelja: UBB/22, ukupne koliformne bakterije, enterokoki te *C. perfringens*. To su mikrobiološki pokazatelji koji su otporniji od ostalih pokazatelja na nepovoljne vanjske uvjete. Aerobne mezofilne bakterije na 22 °C su bakterije čija je optimalna temperatura za rast i razmnožavanje 22°C. Sposobnost

rasta uz prisutnost kisika im omogućava preživljavanje u okolišu (12). Ukupni koliformi su fakultativno anaerobi stoga se vrlo brzo prilagode na prisustvo ili odsustvo kisika. Vrlo dobro su prilagođeni na niske temperature stoga lako preživljavaju ekstremne uvjete okoliša (2). Enterokoki su vrlo izdržljivi i dugo mogu podnijeti nepovoljne okolišne uvjete. Sposobni su preživjeti ekstremne vrijednosti pH i temperature (između 10 °C i 45 °C) te visoke koncentracije soli (3). Anaerobna patogena bakterija *C. perfringens* otpornija je u vanjskoj sredini, obzirom da stvara spore. Spore su vrlo otporne na toplinu i dezinfekcijska sredstva što im omogućava duže preživljavanje u okolišu (13). Statistički značajna pozitivna korelacija utvrđena je između pokazatelja *C. perfringens* i ukupnih koliformnih bakterija te enterokoka. To je i očekivano, obzirom da su to indikatori fekalne kontaminacije, koji kao normalna flora ljudskih crijeva dospiju u fekalije. Također, osim bakterijama, pijesak je znatno više opterećen gljivama. Gljive su pronađene u svim prikupljenim uzorcima pijeska, u većem broju i s većim brojem vrsta, dok su u uzorcima morske vode utvrđene samo povremeno. Stoga se pijesak pokazao povoljnijim medijem za rast i opstanak bakterija i gljiva, u odnosu na morsku vodu. Neki od čimbenika koji utječu na pojavu mikroorganizama u pijesku su: sadržaj vlage, kemijski sastav pijeska, temperatura, UV zračenje, broj kupača te prisutnost životinja i ptica. Sadržaj vlage varira ovisno o veličini zrna i dubini prodiranja podzemne vode. Voda vrlo lako prodire kroz pore pijeska i osigurava relativnu vlažnost između 12 i 25% potrebnu za rast gljiva (8). Pijesak svojom površinom osigurava zaštitu od grabežljivaca i zaštitu od g ultraljubičastog (UV) zračenja koje obuhvaća UVA, UVB i UVC zračenje. Zračenje u UV rasponu ispod 300 nm, pridonosi inaktivaciji mikroba u vodenom okolišu. UVC zračenje kratke valne duljine (100-280 nm) ima najmikrobicidniji učinak, no ozonski omotač apsorbira sve UVC zrake. Ozonski omotač blokira i 90% UVB zraka (280-320 nm) koje imaju sposobnost oštećenja genoma. Nasuprot tome, UVA zračenje (320-400 nm) u potpunosti dopijeva u atmosferu i predstavlja najveću opasnost za mikroorganizme (38). Također, jedna od prednosti pijeska nad morskom vodom je ta što omogućuje pričvršćivanje složenih biofilmova na svoju površinu opskrbljujući ih hranjivim tvarima. Općenito, biofilmovi uključuju brojne vrste mikroba poput bakterija, algi i protozoa, pričvršćenih na različite površine i omogućuju njihovo preživljavanje u različitim okruženjima, poput pijeska i morske vode. Mikrobne zajednice mogu se proširiti kako biofilm sazrijeva te se nakupine stanice se mogu odvojiti ako resursi postanu ograničeni. Velik utjecaj imaju kupači i kućni ljubimci koji mogu utjecati na promjenu rasprostranjenosti gljivičnih vrsta. Kupači mogu biti asimptomatski nosioci i uzrokovati kontaminaciju pijeska pa se infekcija na plaži može prenijeti na druge ljude.

Kako bi se dobio što bolji uvid u gljivičnu floru spomenutih plaža, za kultivaciju gljiva korištena su dva hranjiva medija i različiti uvjeti inkubacije. SDA agar inkubiran je 3 dana na temperaturi 40° C i 10 dana na temperaturi 37° C dok je Fungisel agar inkubiran 20 dana na temperaturi 30° C. SDA agar je selektivni medij koji se koristi za izolaciju, uzgoj i održavanje dermatofita, kvasaca i mnogih drugih patogenih i nepatogenih gljiva. Tri bitne komponente koje omogućuju rast gljiva su pepton, dekstroza (glukoza) i pH. Mikološki pepton osigurava hranjivi izvor aminokiselina i dušičnih spojeva, dok dekstroza djeluje kao izvor ugljika i energije. Obje komponente su značajne za rast gljiva. SDA agar karakterizira kiseli pH (oko 5,0) koji ima važnu ulogu u rastu gljiva. pH od približno 5,6 djeluje inhibirajuće za većinu bakterija, no bakterije koje su adaptirane na kiseli pH uspješno rastu i na SDA agaru. U SDA agar, moguće je dodati i različite antibiotike poput kloramfenikola i/ili tetraciklina, koji uz kiseli pH inhibiraju rast gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Neka od ograničenja su da osim bakterija, antimikrobna sredstva dodana u medij mogu inhibirati i određene patogene gljivice te je moguće da neki sojevi vrlo slabo ili uopće ne rastu na SDA agaru (39). Fungisel agar je bazični medij u čijem se sastavu nalazi dekstroza, pepton te selektivni agensi, cikloheksimid i kloramfenikol. Primjenjuje se za uzgoj i izolaciju patogenih gljiva. Sojin pepton osigurava dušik, vitamine, minerale i aminokiseline neophodne za rast. Dekstroza je važan izvor energije. Cikloheksimid inhibira većinu saprofitskih gljivica dok kloramfenikol inhibira veliki broj gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Neka od ograničenja su da antimikrobna sredstva ugrađena u medij za inhibiciju bakterija mogu suprimirati rast određene patogene gljive te da su potrebni dodatni postupci za potpunu identifikaciju patogenih gljiva (40). Najveći broj vrsta, ali s najmanjim brojem kolonija, porastao je na SDA agaru na 37° C tijekom 10 dana inkubacije, a porast kolonija iz uzoraka mora dobiven je jedino na podlozi Fungisel agar pri 30° C tijekom 20 dana inkubacije. Najoptimalniji uvjeti inkubacije za porast gljiva, od primijenjenih u ovom istraživanju, pokazali su se pri korištenju hranjivog medija SDA, kod temperature od 37 °C, tijekom deset dana inkubacije, obzirom da se većina identificiranih gljiva ubraja u mezofilne organizme čija je optimalna temperatura za rast 37° C. Također, dobri uvjeti inkubacije ostvareni su i primjenom SDA, pri 40 °C, tijekom tri dana inkubacije, što odgovara termotolerantnim identificiranim vrstama. Na SDA/37 tijekom deset dana inkubacije porastao je najveći broj vrsta, njih pet. Međutim, na toj je podlozi istovremeno porastao najmanji broj kolonija. Na SDA/40 tijekom tri dana inkubacije porastao je najveći broj kolonija, uz istovremeno najmanji broj vrsta gljiva (tri). Pomoću MALDI-TOF MS iz pijeska na plaži identificirani su: *A. nidulans*, *A. calidoustus*, *A. niger*, *S. commune*, *A. flavus oryzae* group, *T. reesei* te *B. bassiana*. Iz morske vode identificirane su slijedeće vrste: *A. niger*, *M. circinelloides*

te *A. terreus*. U ispitanim uzorcima dominiraju patogene gljive za čovjeka roda *Aspergillus* spp.. *Aspergillus* spp. je plijesan koja je široko rasprostranjena u okolišu. Na hranjivoj podlozi raste u obliku crnih, smeđih, zelenih, žutih i bijelih kolonija, ovisno o vrsti i uvjetima rasta. Na temelju izgleda kolonija, moguće je pretpostaviti o kojoj je vrsti riječ. No identifikacija pojedinačnih vrsta aspergilusa zahtjeva pregled hifa i plodnih struktura. Zbog velike distribucije konidije aspergilusa nalazimo u zraku i tlu. Izloženost konidijama aspergilusa može dovesti do alergijskih reakcija u preosjetljivih osoba, a ukoliko kolonizira paranazalne sinuse i donji respiratorni trakt, može nastati opstruktivna bronhalna aspergiloza i aspergilom. Težina alergijskih reakcija ovisi o stupnju osjetljivosti zahvaćene osobe. Opstruktivna bronhalna aspergiloza nastaje kod prethodno oboljelih cističnom fibrozom ili kroničnim bronhitisom. Liječenje nije potrebno obzirom da ne dovodi do oštećenja tkiva. Aspergilom nastaje u paranazalnim sinusima te je asimptomatski i ne zahtjeva liječenje. U imunokompromitiranih osoba izloženost konidijama aspergilusa može dovesti do destruktivne, invazivne plućne i diseminirane bolesti. Najčešći uzročnici bolesti u ljudi su vrste *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* i *A. terreus* (3). *A. nidulans* je saprofitna filamentozna gljiva koja je široko rasprostranjena u prirodi. Uglavnom nema utjecaja na ljudsko zdravlje, no može dovesti do invazivne aspergiloze u bolesnika s kroničnom granulomatoznom bolešću (CGD). Poznata je po svom industrijskom i medicinskom značaju, obzirom da predstavlja izvrstan model za proučavanje brojnih procesa, kao što su razvoj, regulacija gena, mitozu, stanični ciklus i sekundarni metabolizam (7). *A. calidoustus* je filamentozna gljiva koja je prisutna u hrani, tlu i zraku. Iako je rijedak ljudski patogen, može izazvati invazivnu infekciju kod osoba oslabljenog imunološkog sustava (41). *A. flavus oryzae group* je izoliran iz tla, zraka i osušenih dijelova biljke. *A. flavus* je saprotrofna i patogena gljiva s velikom rasprostranjenošću. Nakon *A. fumigatus*, *A. flavus* je drugi vodeći uzročnik invazivne aspergiloze. Poznat je po svojoj patogenosti za žitarice, mahunarke i orašaste plodove. *A. oryzae* je aerobna filamentozna gljiva koja nije štetna za ljude, životinje i biljke (7). *S. commune* je bazidiomiceta koja je široko rasprostranjena u prirodi. Rijetko je uključena u bolesti ljudi, no može uzrokovati širok spektar kliničkih manifestacija, od alergijskih reakcija do invazivnih infekcija, ali prvenstveno je odgovorna za infekcije dišnog sustava. Infekcija može ostati lokalizirana ili se proširiti s izvornog mjesta na druga tkiva i organe, ovisno o čimbenicima kao što su imunološki status domaćina, devijacija nosnog septuma i trajanje izloženosti sporama (42). *T. reesei* je mezofilna i filamentozna gljiva. Raste na trulom biljnom materijalu te se pokazala nepatogenom za čovjeka, obzirom da ne proizvodi gljivične toksine. Jedna je od najplodnijih proizvođača enzima koji razgrađuju stanične stijenke biljaka i često se koristi u industriji za proizvodnju proteina (43). *B. bassiana* je patogena gljiva

za više od 1000 vrsta insekata. Glavni put infekcije je prodiranje kroz kutikulu kukca, koja predstavlja barijeru između gljive i domaćina. *B. bassiana* se koristi za suzbijanje brojnih štetnih insekata (44). *M. circinelloides* je oportunistička dimorfna gljiva koja u okolišu raste kao plijesan ili kao kvasac. Jedna je od najčešćih vrsta unutar roda *Mucorales* koja može uzrokovati smrtonosnu mukormikozu kod pacijenata s oslabljenim imunitetom. To je vrlo agresivna infekcija koju je teško liječiti zbog brze diseminacije unutar tkiva domaćina i visoke tolerancije na antifungalne agense (45). *A. terreus* jedna je od vrsta *Aspergillus* spp. pronađena u uzorcima morske vode. To je saprofitna gljiva (plijesan) koja prevladava u toplijim klimatskim područjima kao što su tropska i subtropska područja. Rasprostranjena je širom svijeta, a nalazi se u tlu, vodi i prašini. *A. terreus* stvara i izlučuje brojne sekundarne metabolite kao što su: patulin, citrinin i glikotoksini, koji mogu uzrokovati oportunističku infekciju kod imunokompromitiranih osoba. Otporan je na amfotericin B, koji se primjenjuje kao uobičajeni lijek u borbi protiv infekcija gljivama (7). Oba staništa imala su samo jednu zajedničku vrstu, *A. niger*. *A. niger* je najčešća vrsta *Aspergillus* spp. To je saprofitna filamentozna gljiva koja živi u tlu, vodi te raspadajućoj vegetaciji kao što su hrpe komposta i mrtvo lišće, a može se naći i na žitaricama, sušenom voću i orašastim plodovima. Vrlo je termotolerantan, stoga dobro uspijeva na ekstremno niskim i ekstremno visokim temperaturama. Uz termotoleranciju, pokazuje veliku otpornost na visoke koncentracije soli, zbog čega ima široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Staljećima se koristi u proizvodnji limunske kiseline koja je uobičajeni konzervans hrane u konzerviranom voću, šamponima i konzervansima. Vrlo je otporan na UV zračenja i na zračenje sunčevim zrakama, formirajući visoko pigmentirane spore u zraku. Preživljavanje spora ovisi o debljini stanične stijenke spora koja štiti DNA od radijacije. Iako vrlo rijetko izaziva bolest u ljudi i životinja, spore se mogu udahnuti i dospjeti u alveolarno tkivo pluća. Tako udahnute mogu izazvati blage oportunističke respiratorne infekcije kod imunokompromitiranih osoba. Češće uzrokuje bolest kikirikija, grožđa i luka. Stanična stijenka spore sastoji se od polisaharida (uglavnom hitina i glukana), a prekrivena je vanjskim slojem štapića (hidrofobina) i pigmentata, najčešće melanina. Vanjski slojevi stanične stijenke čine spore visoko hidrofobnim i visoko pigmentiranim, što im omogućuje da izdrže teške uvjete okoline. Također, pigmenti poput melanina, uključeni su u različite stanične procese, od adhezije do virulencije te štite gljivu od stresa izazvanog zračenjem. U borbi protiv infekcije *A. niger* primjenjuje se antifungalni lijek, amfotericin B (46). Niti jedna od identificiranih vrsta gljiva u ovom istraživanju, ne ubraja se u WHO-definirane prioritete skupine gljivičnih patogena (kritična, visoka ili srednja), što ukazuje na dobro stanje plaža i mora u Primorsko-goranskoj županiji.

Rezultati ispitivanja ukazali su na značajnu razliku između gljivične flore morske vode i pijeska na plaži. U uzorcima morske vode zabilježene su niske koncentracije gljiva u usporedbi s pijeskom. Najveće opterećenje gljivama zabilježeno je tijekom trećeg uzorkovanja i to u pijesku, pri temperaturi mora od 8 °C i zraka od 11 °C. Jedino tada kakvoća mora prema vrijednosti za *E. coli* nije ocjenjena kao izvrsna, nego kao dobra. U moru su gljive pronađene samo u uzorcima prikupljenim u četvrtom uzorkovanju, pri temperaturi mora i zraka od 11 °C i petom uzorkovanju, pri temperaturi mora od 11 °C i zraka od 6 °C, u niskim koncentracijama. Istraživanja su pokazala da vrste roda *Aspergillus* podnose široki temperaturni raspon (15 - 37 °C), međutim u nešto užem rasponu producenta aflatoksin (25 - 37 °C) (47). Najznačajniji čimbenik koji utječe na prisutnost gljiva u morskoj vodi je pH (8). Sjeverno Jadransko more ima najniži pH tijekom zimskih mjeseci, a najviši tijekom kasnog proljeća i ljeta (48). Istraživanje provedeno u susjednoj Sloveniji pokazalo je da se mjeseci u kojima je zabilježena viša pH vrijednost, odlikuju najmanjim brojem gljiva (8) obzirom da gljive za optimalni rast preferiraju kiseli pH. Razlog navedenom je negativni učinak alkalnog pH na stvaranje pigmenta kod određenih rodova. S druge strane, u mjesecima u kojima su mjerene niže pH vrijednosti, broj izoliranih gljiva bio je veći. Osim pH, na brojnost utječu i drugi fizikalno-kemijski čimbenici kao što su: sunčeva svjetlost, temperatura, oborine, salinitet, oksidoredukcijski potencijal i prisutnost betonskih staza koje sprječavaju ispiranje pijeska i njegovo miješanje s morskom vodom. Iako gljive za rast ne zahtijevaju svjetlost, ona utječe na učestalost njihovog spolnog i nespornog razmnožavanja. Svjetlost inducira stvaranje karotenoidnih pigmenta u hifama i stvaranje spora u nekih vrsta gljiva. Ima bitnu ulogu i u disperziji konidija, obzirom da ih organi koji ih nose oslobađaju uz prisutnost svjetlosti (3). Obzirom da je sjeverni Jadran smješten u umjerenom klimatskom pojasu, povoljan položaj mu osigurava raznoliku gljivičnu floru. Temperatura mora zimi varira između 6 i 12° C, a ljeti između 23 i 26° C. Varijacije u temperaturi čine ga optimalnim staništem za većinu gljiva tijekom cijele godine. Idealan je za rast većine mezofilnih gljiva kao što su: *A. calidoustus*, *S. commune*, *A. flavus oryzae group*, *T. reesei*, *B. bassiana* i *M. circinelloides* kojima pogoduje temperatura između 25 i 37° C. U toplijem dijelu godine, Jadran je idealno stanište za termofilne organizme koji ne mogu rasti na temperatura nižim od 20° C. Pogoduje i termotolerantnim vrstama kao što su: *A. terreus*, *A. nidulans* i *A. niger*, koje rastu u rasponu temperatura između 37 i 50° C. U hladnijim mjesecima dobro uspijevaju psihrofilne vrste, koje ne rastu na temperaturama višim od 20° C. Iako je uočeno da gljive bolje rastu pri nižim koncentracijama soli, tijekom godina razvile su toleranciju na salinitet što ukazuje na prilagodbu na morski okoliš (8). Oksidacijsko-redukcijska reakcija je iznimno bitna za karakterizaciju mikrobnih skupina, budući da se svaka vrsta

prilagodila različitim vrijednostima oksido-redukcijskih potencijala. Redoks-potencijal je u interakciji s pH, obzirom da oksidacija dovodi do zakiseljavanja te pridonosi većem broju gljiva. Gljive najbolje preživljavaju u oksidiranim i umjereno reduciranim tlima (49). Iako tijekom našeg istraživanja nije praćen utjecaj oborina na raznolikost gljivičnih zajednica u morskoj vodi i pijesku, istraživanje u susjednoj Sloveniji ukazalo je na pozitivnu korelaciju između oborina i gljivičnih zajednica (8). Najveća raznolikost gljiva utvrđena je pri jakim oborinama koje uzrokuju ispiranje stijena i prijenos gljivičnih zajednica u vodu.

U sveobuhvatnom istraživanju gljivičnog i bakteriološkog opterećenja u pijesku i morskoj vodi na izraelskim plažama odabrano je šest urbanih plaža prema kriterijima inicijative „Mycosands“ (6). Plaže na lokacijama Haifa, Tel Aviv, Ashdod i Ashkelon čine većinu izraelske obale i daju najbolji uvid u njenu mikrobnu floru. To su plaže velikih gradova s velikom naseljenošću, dok su Haifa i Ashdod lučki gradovi s pomorskom aktivnošću. Istraživanje je ukazalo na prisutnost oportunističkih gljivičnih patogena i potencijalnih alergena kao što su: *A. fumigatus* i ostale vrste *Aspergillus* vrste, vrste *Fusarium*, *Penicillium* i *Mucorales*, *C. albicans*, *C. tropicalis* te vrste *Cryptococcus* i *Rhodotorula*, među kojima se pojedine vrste ubrajaju u WHO-definirane prioritetne skupine gljivičnih patogena. Rezultati upućuju na potrebu redovitog nadziranja plaža zbog prisutnosti patogenih gljiva radi očuvanja zdravlja korisnika plaža.

U susjednoj Sloveniji u okviru inicijative „Mycosands“, za uzorkovanje je izabrana pješčana plaža Central Portorož (8), na kojoj se pratila pojavnost i raznolikost gljiva te mogući utjecaj na zdravlje ljudi. Ova umjetno nastala plaža s finim kvarcnim pijeskom, smještena na Sjevernom Jadranskom moru, za navedeno istraživanje je odabrana, jer osim što je jedna od najpopularnijih turističkih destinacija u Sloveniji, okružena je građevinama, prometnicama i bujnom vegetacijom, što je također klasificira u „urbane plaže“. Neki od izoliranih rodova poput *F. brachygibbosum*, *F. ipomoeae*, *F. nirenbergiae*, *F. solani* klasificirani su u WHO-definirane prioritetne skupine gljivičnih patogena. Prisutnost ovih gljiva ukazuje na nužnost održavanja plaža pod kontrolom i poštivanja općih higijenskih standarda u svrhu očuvanja zdravlja pojedinaca i okoliša.

Osim brojnosti i vrsta kvasaca i plijesni, cilj je bio istražiti i bakteriološko opterećenje u pijesku i morskoj vodi u svrhu zaštite ljudskoga zdravlja. Mikrobiološka čistoća pijeska i morske vode bitan je činitelj održavanja zdravlja korisnika plaža, posebice stanovnika primorskih gradova koji te plaže koriste tijekom cijele sezone kupanja. Stoga je ispitivanje kakvoće mora i pijeska od iznimne važnosti, obzirom da upućuju na potencijalni rizik od

zaraznih bolesti. Kakvoća mora za kupanje ocjenjuje se prema kriterijima Uredbe o kakvoći mora za kupanje (73/2008), koja je temeljena na EU BWD (2006/7/EZ). Uredba propisuje standarde kakvoće mora za kupanje na plaži, granične vrijednosti mikrobioloških pokazatelja i druge značajke mora. Mikrobiološki pokazatelji se smatraju najvažnijim indikatorima zagađenosti morske vode sanitarno-fekalnim otpadnim vodama. Kriteriji za ocjenjivanje kakvoće pijeska na plažama još uvijek nisu definirani EU Direktivom o vodi za kupanje (engl. European Union Bathing Water Directive, EU BWD, 2006/7/EZ) (18). Nakon svakog provedenog uzorkovanja kakvoća mora klasificirana je u jednu od četiri kategorije (izvrsno, dobro, zadovoljavajuće i nezadovoljavajuće) te označena odgovarajućom bojom (plavo – izvrsno, zeleno – dobro, žuto – zadovoljavajuće, crveno – nezadovoljavajuće). Svi ispitani uzorci ocijenjeni su kao izvrsni, izuzev uzorka iz trećeg uzorkovanja. Taj je uzorak prema broju *E. coli* (105 CFU/100 mL) ocijenjen kao dobar (označeno zelenom bojom), prema kriterijima iz Uredbe (NN 73/2008). Sagledavajući mikrobiološke kriterije prema WHO preporukama iz 2021. godine te portugalskim kriterijima za Plavu zastavu, vidljivo je da su vrijednosti u svim uzorcima bile ispod definiranih kriterija (<60 CFU/g, odnosno <10 CFU/g), osim kod drugog uzorkovanja, kada je vrijednost za enterokoke (18 CFU/g) bila iznad portugalskih kriterija. Vrijednosti *E. coli* bile su ispod definiranih vrijednosti za Plave zastave u Portugalu (<25 CFU/g). To ukazuje na dobro stanje ispitanih okolišnih sastavnica u odnosu na opterećenje gljivama. Kako bi se poboljšala kakvoća mora preporuča se izgradnja sustava za odvodnju oborinskih voda, kako ne bi došlo do miješanja s fekalnim otpadnim vodama, održavanje septičkih jama nepropusnim te izgradnja adekvatnog sustava za odvodnju komunalnih otpadnih voda u naseljima bez kanalizacije. Također na mjestima gdje je kakvoća mora ocijenjena kao nezadovoljavajuća nužno je uspostaviti dodatna praćenja s ciljem otkrivanja uzroka onečišćenja. Jedan od načina kako sami kupaci mogu doprinijeti zaštiti mora za kupanje i plažnog prostora je izbjegavanje boravka na plaži tijekom infekcije te odgovorno zbrinjavanje otpada. Svakako će zaštiti javnog zdravlja doprinijeti i bolji uvid u put prijenosa infekcija na plaži te načini njihovog sprječavanja.

6 ZAKLJUČAK

- utvrđeno je znatno veće opterećenje pijeska s bakterijama i gljivama, u usporedbi s morskom vodom
- statistički značajno veće opterećenje pijesku u odnosu na morsku vodu dokazano je za slijedeće pokazatelje: UBB/22, UKB, ENT, CP
- utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između pokazatelja CP i UKB te ENT
- u svim ispitivanjima gljive su pronađene u uzorcima pijeska, a u uzorcima morske vode samo povremeno; u pijesku su bile prisutne u većem broju i s većim brojem vrsta, u odnosu na morsku vodu
- u uzorcima pijeska pronađeno je sedam vrsta, u svih pet provedenih uzorkovanja: *A. nidulans*, *A. calidoustus*, *A. niger*, *A. flavus oryzae group*, *S. commune*, *T. reesei*, *B. bassiana*
- sve vrijednosti za gljive u pijesku bile su ispod Mycosand kriterija (ukupan broj gljiva od 89 CFU/g)
- u uzorcima morske vode pronađene su tri vrste, u dva od pet provedenih uzorkovanja: *A. niger*, *A. terreus* i *M. circinelloides*
- Vrste iz roda *Aspergillus* najčešće su detektirane
- *A. niger* je jedina vrsta koja je dokazana i u pijesku i u morskoj vodi
- niti jedna vrsta dokazana u ovom ispitivanju ne spada u jednu od tri prioritetne skupine gljivičnih patogena (kritična, visoka i srednja), definirane od strane WHO
- od pet provedenih uzorkovanja, tijekom trećeg uzorkovanja utvrđeno je najveće opterećenje gljivama, pri temperaturi mora od 8 °C i zraka od 11 °C, pri čemu kakvoća mora prema vrijednosti za *E. coli* jedino tom prilikom nije ocjenjena kao izvrsna, nego kao dobra
- najveći broj vrsta, ali s najmanjim broju kolonija, porastao je na SDA agaru na 37° C tijekom 10 dana inkubacije, a porast kolonija iz uzoraka mora dobiven je jedino na podlozi Fungisel agar pri 30° C tijekom 20 dana inkubacije
- prema aktualnim, trenutno jedinim postojećim portugalskim i WHO kriterijima za kakvoću pijeska, vrijednosti za enterokoke bile su iznad portugalskih kriterija samo u drugom ispitivanju
- potrebna su daljnja dugoročna istraživanja, tijekom različitih okolišnih uvjeta, u cilju utvrđivanja vrsta i broja gljiva u plažnom okruženju

7 LITERATURA

1. Robinson NP. Archaea, from obscurity to superhero microbes: 40 years of surprises and critical biological insights. *Emerg Top Life Sci.* 2018 Dec 14;2(4):453-458. doi: 10.1042/ETLS20180022.
2. Kalenić S, i sur. *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2013. Str. 511-568.
3. Mlinarić Galinović G, Ramljak Šešo M, i sur. *Specijalna medicinska mikrobiologija i parasitologija*. Zagreb: Merkur A.B.D.; 2003. Str. 3-249.
4. Frenkel M, Yunik Y, Fleker M., Blum SE, Sionov E, Elad D., i sur. Fungi in sands of Mediterranean Sea beaches of Israel—Potential relevance to human health and well-being. *J Fungi (Basel)*. 2022 Sep 10; 8(9): 950. doi: 10.3390/jof8090950.
5. Brandão J, Gangneux JP, Arikian-Akdagli S, Barac A, Bostanaru AC, Brito S, i sur. Mycosands: Fungal diversity and abundance in beach sand and recreational waters — Relevance to human health. *Sci Total Environ*. 2021 Aug 10;781:146598. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146598.
6. Frenkel M, Serhan H, Blum SE, Fleker M, Sionov E, Amit S, i sur. What Is Hiding in the Israeli Mediterranean Seawater and Beach Sand. *J Fungi (Basel)*. 2022 Sep 10;8(9):950. doi: 10.3390/jof8090950.
7. Ozkan VK. Fungal Diversity in Marmaris Public Beach Sand (Turkey). *Res Square*. 2022 May 05. doi: 10.21203/rs.3.rs-1605405/v1.
8. Novak Babič M, Gunde-Cimerman N, Breskvar M, Džeroski S, Brandão J. Occurrence, Diversity and Anti-Fungal Resistance of Fungi in Sand of an Urban Beach in Slovenia—Environmental Monitoring with Possible Health Risk Implications. *J. Fungi* 2022, 8(8), 860. doi: 10.3390/jof8080860.
9. Fisher, M.C., Denning, D.W. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. *Nat Rev Microbiol* 21, 211–212 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00861-x>
10. Dinah V. Parums. Editorial: The World Health Organization (WHO) Fungal Priority Pathogens List in Response to Emerging Fungal Pathogens During the COVID-19 Pandemic. *Med Sci Monit*. 2022; 28:e939088. doi: 10.12659/MSM.939088
11. Forster B, Arango Pinedo C. Bacteriological Examination of Waters: Membrane Filtration Protocol. American Society for Microbiology. 2015 Jun 23. Dostupno na:

<https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Bacteriological-Examination-of-Waters-Membrane-Filtration-Protocol.pdf?ext=.pdf>

12. Šaško I. Analiza mikrobioloških pokazatelja kakvoće vode za kupanje. Varaždin: Sveučilište u Zagrebu, Geotehnički fakultet; 2017.
13. Šantić M, Gobin I, Ožanić M, Marečić V. Mikrobiologija hrane i vode za studente preddiplomskog studija sanitarnog inženjerstva. Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju; 2014.
14. Sedlar J. Kemijska svojstva morske vode. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2021.
15. Baron Samuel i sur. Medical microbiology 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Pristupljeno: 1.06.2023. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>
16. Cogliati M, Arikan-Akdagli S, Barac A, Bostanaru AC, Brito S, Çerikçioğlu N, i sur. Environmental and bioclimatic factors influencing yeasts and molds distribution along European shores. *Sci Total Environ.* 2023 Feb 10;859(Pt 1):160132. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.160132.
17. Prigitano A, Trovato L, Esposto MC, Brandão J, Cogliati M, Gatta GD, i sur. Fungal diversity in lake and sea beaches of Italy: Relevance to human health. *Sci Total Environ.* 2023 Feb 10;859(Pt 2):160417. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.160417.
18. European Union. Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 Concerning the Management of Bathing Water Quality and Repealing Directive 76/160/EEC; Official Journal of the European Union: Maastricht, The Netherlands, 2006.
19. World Health Organization. (2021). WHO guidelines on recreational water quality: volume 1: coastal and fresh waters. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342625>.
20. Sabino R, Veríssimo C, Cunha MA, Wergikoski B, Ferreira FC, Rodrigues R. Pathogenic fungi: an unacknowledged risk at coastal resorts? New insights on microbiological sand quality in Portugal. *Mar Pollut Bull.* 2011 Jul;62(7):1506-11. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.04.008.
21. Trupeljak, I. (2020). 'UTJECAJ TURIZMA NA RAST I RAZVOJ CRIKVENIČKE RIVIJERE', Završni rad, Veleučilište u Karlovcu, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:128:099044>

22. Nielsen CK, Kjems J, Mygind T, Snabe T, Meyer RL. Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1878. doi: 10.3389/fmicb.2016.01878
23. HRN EN ISO 9308-1:2014. Kvaliteta vode -- Brojenje *Escherichia coli* i koliformnih bakterija -- 1. dio: Metoda membranske filtracije za vode s niskom pozadinom bakterijske flore
24. Kraus R., Baljak V., Vukić Lušić D., Kranjčević L., Cenov A., Glad M., i sur. Impacts of Atmospheric and Anthropogenic Factors on Microbiological Pollution of the Recreational Coastal Beaches Neighboring Shipping Ports. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Jul 13;19(14):8552. doi: 10.3390/ijerph19148552.
25. HRN EN ISO 7899-2:2000. Kakvoća vode -- Detekcija i brojenje crijevnih enterokoka -- 2. dio: Metoda membranske filtracije
26. HRN EN ISO 6888-2:2004. Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalni postupak brojenja koagulaza-pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) -- 2. dio: Postupak primjene agara s fibrinogenom i plazmom kunića
27. HRN EN ISO 16266:2008. Kakvoća vode -- Detekcija i brojenje *Pseudomonas aeruginosa* -- Metoda membranske filtracije
28. Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće NN47/08: Detekcija i brojanje *Clostridium perfringens* metodom membranske filtracije
29. HRN EN ISO 19250:2013. Detekcija vrsta roda *Salmonella*
30. HRN EN ISO 6222:2000. Kakvoća vode -- Brojenje uzgojenih mikroorganizama – Broj kolonija nacjepljivanjem na hranjivi agar
31. Improvement of the Pour Plate Method by Separate Sterilization of Agar and Other Medium Components and Reduction of the Agar Concentration
32. Dekić Rozman S, Hrenović J. Bakteriološka analiza izvorske vode uz najpoznatija izletišta parka prirode Medvednica. *Hrvatske vode.* 2017 Jan;25(99):13-16
33. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Mar;36(2):380-407. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
34. Rychert J. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *J Infectiology.* 2019; 2(4): 1-5. doi: 10.29245/2689-9981/2019/4. 1142
35. Udovičić M. i sur. Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije?. *Biochemia Medica* 2007;17(1):1-138

36. Z. M. Milenovic. Application of mann-whitney u test in research of professional training of primary school teachers. *Metodički obzori : časopis za odgojno-obrazovnu teoriju i praksu*, Vol.6(2011)1 No.11 Travanj 2011. Serbia. 73-79.
37. Marlisco, 2013, Blue Flag Programme in Portugal (Portugal), Marine Litter in European Seas - Social Awareness and Co – Responsibility. Dostupno na: https://www.marlisco.eu/Blue_Flag_Programme_in_Portugal.en.html
38. Yemmireddy V, Adhikari A, Moreira J. Effect of ultraviolet light treatment on microbiological safety and quality of fresh produce: An overview. *Front Nutr*. 2022 Jul 22;9:871243. doi: 10.3389/fnut.2022.871243.
39. Acharya T., Hare J. (2022) Sabouraud Agar and Other Fungal Growth Media. In: Gupta V.K., Tuohy M. (eds) *Laboratory Protocols in Fungal Biology*. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-83749-5_2
40. Acumedia, 2017, FUNGISEL AGAR (72005). Dostupno na: <http://biotrading.com/assets/productinformatie/acumedia/tds/7205.pdf>
41. Glampedakis E, Erard V, Lamoth F. Clinical Relevance and Characteristics of *Aspergillus calidoustus* and Other *Aspergillus* Species of Section *Usti*. *J Fungi (Basel)*. 2020 Jun 12;6(2):84. doi: 10.3390/jof6020084.
42. Mahajan M. *Schizophyllum commune*. *Emerg Infect Dis*. 2022 Mar;28(3):725. doi: 10.3201/eid2803.211051
43. Nevalainen H, Suominen P, Taimisto K. On the safety of *Trichoderma reesei*. *J Biotechnol*. 1994 Nov 15;37(3):193-200. doi: 10.1016/0168-1656(94)90126-0.
44. Yadav, Sonam and Vaghasiya, Prakash and Thakar, Megha, Growth Pattern of *Beauveria Bassiana* in Different Eco-Friendly Media (March 15, 2020). *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 2020; 11(1):37-39, Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3785780>
45. Vellanki S, Navarro-Mendoza MI, Garcia A, Murcia L, Perez-Arques C, Garre V, Nicolas FE, Lee SC. *Mucor circinelloides*: Growth, Maintenance, and Genetic Manipulation. *Curr Protoc Microbiol*. 2018 May;49(1):e53. doi: 10.1002/cpmc.53. Epub 2018 Apr 27.
46. Hinton-Sheley, Phoebe. 2018. What is *Aspergillus niger*?. News-Medical, viewed 29 August 2023, <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Aspergillus-niger.aspx>.
47. Lahouar A, Marin S, Crespo-Sempere A, Saïd S, Sanchis V. Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by

toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Rev Argent Microbiol.* 2016 Jan-Mar;48(1):78-85. doi: 10.1016/j.ram.2015.10.001. Epub 2016 Feb 23. PMID: 26920121.

48. Luchetta, A., Cantoni, C., Cozzi, S. Dissolved carbon dioxide, nutrients and oxygen in the Adriatic Sea. A regional observing effort, 2010., Proceedings of the OceanObs '09 Conference. Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/257483724_Monitoring_pH_of_seawater_in_the_Adriatic_Sea_results_from_a_regional_observing_effort
49. Husson, O. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant Soil* 362, 389–417 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1429-7>

ŽIVOTOPIS

Ines Krmpotić rođena je 6.10.2000. godine u Rijeci. Osnovnu školu Ivana Zajca pohađala je i završila u Rijeci u razdoblju od 2007. do 2015. godine. Nakon završene osnovne škole, upisuje Prvu sušačku hrvatsku gimnaziju u Rijeci koju završava 2019. godine. Iste godine upisuje redoviti studij Sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.