

# LUKA RIJEKA - POTENCIJALNI IZVOR ONEČIŠĆENJA OKOLNOG PODRUČJA

---

**Brkić, Evita-Lara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*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:184:219797>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ**  
**SANITARNOG INŽENJERSTVA**

**Evita-Lara Brkić**

**LUKA RIJEKA – POTENCIJALNI IZVOR ONEČIŠĆENJA**  
**OKOLNOG PODRUČJA**

**Diplomski rad**

**Rijeka, 2024.**

**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ**  
**SANITARNOG INŽENJERSTVA**

**Evita-Lara Brkić**

**LUKA RIJEKA – POTENCIJALNI IZVOR ONEČIŠĆENJA**  
**OKOLNOG PODRUČJA**

**Diplomski rad**

**Rijeka, 2024.**

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

Diplomski rad obranjen je dana 5.6.2024. na sveučilištu u Rijeci, Medicinski fakultet, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc.dr.sc. Arijana Cenov, dipl.sanit.ing.

2. doc.dr.sc. Marin Glad, dipl.sanit.ing.

3. izv.prof.dr.sc. Darija Vukić Lušić, dipl.sanit.ing.

Rad ima 53 stranice, 19 slika, 4 tablice, 76 literaturnih navoda.

## **ZAHVALA**

*Prije svega veliku zahvalu dugujem svojoj mentorici Dariji Vukić-Lušić koja mi je omogućila podatke i svu potrebnu literaturu vezanu uz ovaj rad, koja me usmjerila u pisanju rada te je uvijek bila dostupna i puna razumijevanja za sva moja pitanja i propuste. Hvala Vam na nesebično prenesenom znanju te korisnim i stručnim savjetima!*

*Najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima i sestri bez kojih ovo studiranje ne bi bilo moguće. Hvala vam na svakom ohrabrujućem zagrljaju, potpori, svakoj riječi utjehe, i na svim živicima koje ste potrošili na moje studiranje zajedno sa mnom. Volim vas!*

*Zadnji, ali ne i najmanje bitni, oni bez kojih vjerojatno ne bi „preživjela“ stresne situacije na fakultetu, oni s kojima sam se smijala svaki dan i s kojima su studentski dani postali lakši, oni uz koje sam učila do kasno u noć i išla u provode, dijelila s njima sretne, ali i one malo manje sretne trenutke. Hvala mojim divnim prijateljima, Iris i Toniju te kolegici Ines, u vama sam stekla prijatelje za cijeli život!*

*Hvala svima koji su bili dio ovog mog šestogodišnjeg putovanja zvano studiranje!*

Ovaj se rad temelji na rezultatima iz projekta ProtectAs - Razvoj sustava kontrole i obrane luka od unosa stranih vrsta (Development of systems of port control and defence against the introduction of allochthone species) - KK.05.1.1.02.0013. Operativni program „Konkurentnost i kohezija 2014.-2020.“ (OPKK) od Europskih strukturnih i investicijskih fondova (ESIF)

## SAŽETAK

Kvaliteta morskog okoliša važan je javnozdravstveni problem. Brodovi, kako bi poboljšali stabilnost prilikom iskrcaja tereta, uvlače morsku vodu (balast), koju potom ispuštaju u luci ukrcanja tereta. Pri tome, osim tereta, transportiraju i mikroorganizme koji se nastanjuju u novim staništima. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mikrobiološko opterećenje najveće hrvatske pomorske luke Rijeka, u vodenom stupcu i sedimentu, te procijeniti utjecaj luke na mikrobiološko onečišćenje okolnog rekreacijskog područja.

Istraživanje je provedeno u okviru projekta ProtectAs, u razdoblju od 10. mjeseca 2020. godine do 9. mjeseca 2021. godine, na 3 lokacije u luci Rijeka: JPG 28, RI bwB i RI bwS. Ukupno je ispitan 63 uzoraka, 51 uzorak morske vode te 12 uzoraka sedimenta. Također, analizirani su podaci iz nacionalnog monitoringa kakvoće mora za kupanje za sezonu kupanja 2021., na 29 lokacija (292 uzorka) u rekreativnom području u blizini luke Rijeka (16 istočno i 13 zapadno od luke Rijeka). Prema Pravilniku o upravljanju i nadzoru balastnih voda (NN 128/2012) ispitani su mikrobiološki pokazatelji *Escherichia coli*, crijevni enterokoki te *Vibrio cholerae* (O1 i O139). Kao dodatni pokazatelji kakvoće ispitani su sljedeći mikroorganizmi: *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp. te *Legionella* spp. Vodeni stupac najopterećeniji je fekalnim bakterijama u hladnijem razdoblju godine, a sediment u ljetnoj sezoni. Vodeni stupac opterećeniji je koliformnim bakterijama, dok su više koncentracije UBB, *C. perfringens* i *P. aeruginosa* zabilježene su u sedimentu. Koncentracije *E. coli* 10 puta je veća u vodenom stupcu, u odnosu na sediment, a koncentracija crijevnih enterokoka je 1,5 puta veća u sedimentu u odnosu na vodeni stupac. Vrste roda *Vibrio* dokazane su u 25,5 % uzoraka (u najvećoj mjeri *V. alginolyticus* u 13,7 %), a *V. cholerae* O1 i O139 nisu dokazani u ni jednom ispitanom uzorku. Prisutnost *Salmonella* spp. dokazana je u 5,9 % uzoraka. Mikrobiološki najopterećenija lokacija bila je RI bwS (vodeni stupac i sediment). Najveće opterećenje *E. coli* i crijevnim enterokokima, uz najniži salinitet, zabilježeno je na zapadnoj obali užeg područja oko luke Rijeka. Rezultati istraživanja ukazuju na prostorne i sezonske varijacije fekalnog onečišćenja u luci Rijeka, u vodenom stupcu i sedimentu. Uz balastne vode, na kvalitetu morskog okoliša moguće utječu i mikrobiološki opterećeni donosi slatkih voda. Luka Rijeka predstavlja moguće žarište onečišćenja za okolno rekreacijsko područje.

Ključne riječi: luka Rijeka, mikrobiološko opterećenje, salinitet, balastne vode, priobalni izvori

## SUMMARY

The quality of the marine environment is an important public health issue. Ships, in order to improve stability during cargo unloading, take in seawater (ballast), which they then discharge at the cargo loading port. In doing so, they transport not only cargo but also microorganisms that settle in new habitats. The aim of this research was to examine the microbiological load of Croatia's largest maritime port, Rijeka, in the water column and sediment, and to assess the port's impact on the microbiological pollution of the surrounding recreational area.

The research was conducted within the ProtectAs project, from October 2020 to September 2021, at three locations in the port of Rijeka: JPG 28, RI bwB, and RI bwS. A total of 63 samples were tested, including 51 seawater samples and 12 sediment samples. Additionally, data from the national monitoring of bathing water quality for the 2021 bathing season were analyzed at 29 locations (292 samples) in the recreational area near the port of Rijeka (16 to the east and 13 to the west of the port of Rijeka). According to the Regulation on the Management and Control of Ballast Waters (NN 128/2012), the following microbiological indicators were tested: *Escherichia coli*, intestinal enterococci, and *Vibrio cholerae* (O1 and O139). As additional quality indicators, the following microorganisms were tested: *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., and *Legionella* spp. The water column was most burdened with fecal bacteria during the colder period of the year, while the sediment was more contaminated in the summer season. The water column was more burdened with coliform bacteria, while higher concentrations of UBB, *C. perfringens*, and *P. aeruginosa* were recorded in the sediment. The concentration of *E. coli* was 10 times higher in the water column compared to the sediment, while the concentration of intestinal enterococci was 1.5 times higher in the sediment compared to the water column. *Vibrio* species were detected in 25.5% of the samples (most notably *V. alginolyticus* in 13.7%), while *V. cholerae* O1 and O139 were not detected in any tested sample. The presence of *Salmonella* spp. was confirmed in 5.9% of the samples. The most microbiologically burdened location was RI bwS (water column and sediment). The highest load of *E. coli* and intestinal enterococci, along with the lowest salinity, was recorded on the western coast of the narrow area around the port of Rijeka. The research results indicate spatial and seasonal variations in fecal contamination in the port of Rijeka, in both the water column and sediment. Besides ballast waters, microbiologically burdened freshwater inflows may also impact the quality of

the marine environment. The port of Rijeka represents a potential hotspot of pollution for the surrounding recreational area.

Keywords: port of Rijeka, microbiological load, salinity, ballast waters, coastal sources



## SADRŽAJ

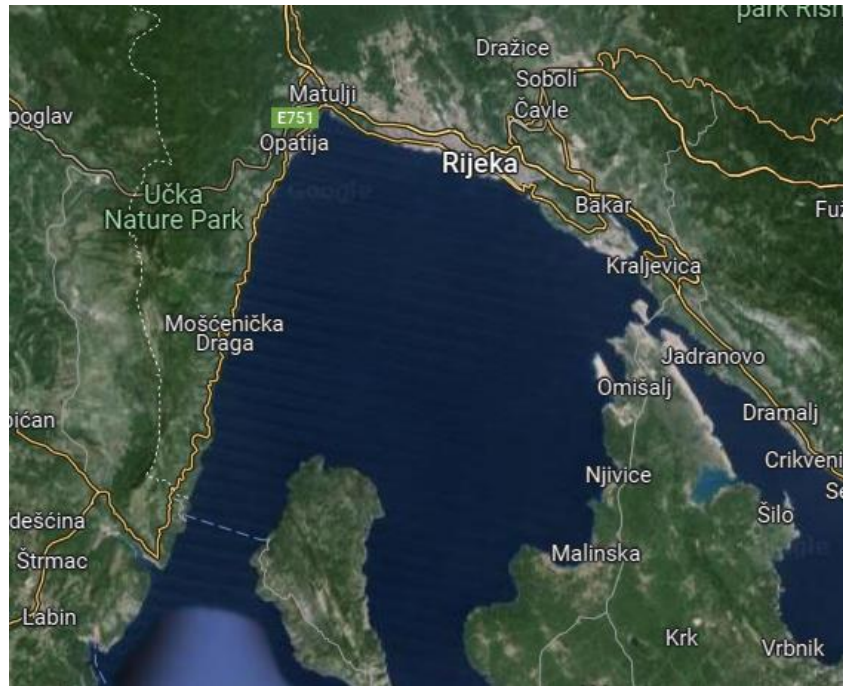
1	UVOD.....	1
1.1	Balastne vode.....	2
1.2	Zakonska regulativa.....	4
1.2.1	Konvencija o upravljanju vodama iz balastnih spremnika.....	4
1.2.2	Pravilnik o upravljanju i nadzoru balastnih voda .....	5
1.2.3	Uredba o kakvoći mora za kupanje 73/08 .....	5
1.3	Bakteriološki pokazatelji kakvoće vode .....	6
1.3.1	Broj kolonija pri 22°C i 37°C.....	6
1.3.2	Ukupne koliformne bakterije i <i>Escherichia coli</i> .....	7
1.3.3	Crijevni enterokoki .....	7
1.3.4	<i>Clostridium perfringens</i> .....	8
1.3.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	8
1.3.6	<i>Salmonella</i> spp.....	8
1.3.7	<i>Shigella</i> spp. ....	9
1.3.8	<i>Vibrio cholerae</i> .....	9
1.3.9	<i>Legionella</i> spp. ....	10
2	CILJ ISTRAŽIVANJA .....	11
3	MATERIJALI I METODE .....	12
3.1	Lokacija istraživanja.....	12
3.1.1	Luka Rijeka .....	12
3.1.2	Plaže u blizini luke Rijeka i u širem području.....	13
3.2	Uzorkovanje morske vode i sedimenta – Luka Rijeka .....	14
3.3	Mikrobiološko ispitivanje.....	14
3.3.1	Uzorci morske vode.....	14
3.3.2	Uzorci sedimenta .....	14
3.4	Mikrobiološki parametri .....	15

3.4.1	„Pour plate“ tehnika .....	15
3.4.2	Tehnika membranske filtracije .....	16
3.5	Statistička obrada podataka .....	20
4	REZULTATI.....	21
4.1	Luka Rijeka – rutinski mikrobiološki pokazatelji .....	21
4.1.1	Vodeni stupac .....	21
4.1.2	Sediment .....	23
4.1.3	Vodeni stupac vs sediment .....	25
4.2	Luka Rijeka – dodatni mikrobiološki pokazatelji.....	28
4.2.1	UBB/37/22, koliformne bakterije, <i>C. perfringens</i> , <i>P. aeruginosa</i> .....	28
4.2.2	<i>Vibrio</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Legionella</i> spp. ....	33
4.3	Kakvoća mora na okolnim plažama .....	35
4.3.1	Mikrobiološki pokazatelji.....	35
4.3.2	Salinitet.....	35
4.4	Korelacijska analiza.....	36
5	RASPRAVA .....	38
6	ZAKLJUČAK .....	43
7	LITERATURA .....	44
8	POPIS SLIKA .....	52

# 1 UVOD

Kao jedan od vodećih ekoloških problema današnjice javlja se onečišćenje mora i morskog okoliša. Glavni problem onečišćenja mora predstavljaju fekalne bakterije koje se sve lakše prilagođavaju novim okolišnim uvjetima. Glavni izvor fekalnih bakterija u prvom redu predstavljaju kanalizacijski sustavi, odvodnja oborinskih voda, ispiranje poljoprivrednih oranica, ilegalne septičke jame te ispusti iz morskih plovila. Svi navedeni faktori predstavljaju problem kontaminacije podzemnih voda u krškim područjima. Fekalnom kontaminacijom mora mogu se prenijeti razne infektivne bolesti, ali i različiti nepoželjni organizmi. Način prenošenja ovih bakterija među lukama vrši se morskim transportom, odnosno pomoću balastnih voda – vode koje se pune u tankove broda radi njegove bolje stabilizacije tijekom plovidbe bez tereta (39). Stoga su balastne vode prepoznate su kao vrlo bitan faktor u prijenosu organizama putem prirodnih prepreka, a njihov utjecaj na okoliš postaje sve značajniji povećanjem morskog transporta. Upravo ova saznanja dovela su do razvoja projekta ProtectAS koji ima za cilj stvoriti sustav kontrole ispuštanja balastnih voda te stvaranje sustava obrane morskih luka od unosa stranih invazivnih vrsta i infektivnih mikroorganizama koji bi trebao smanjiti zagađenje luke i obalnog područja. Istraživanje je provedeno u dvjema najprometnijim transportnim lukama u Hrvatskoj, u luci Rijeka i luci Ploče. U ovom radu opisan je antropološki utjecaj luke Rijeka na obalno područje riječkog zaljeva s naglaskom na klimatske promjene koje omogućuju lakše preživljavanje i lakšu prilagodbu unesenih štetnih organizama, čemu doprinosi i geografski položaj riječkog zaljeva.

Riječki zaljev smješten je na sjeveru Jadranskog mora (Slika 1.). Omeđen je otocima Cresom i Krkom, istočnom obalom Istre te obalom grada Rijeke i Kostrene. U njemu je smještena najveća pomorska luka u Hrvatskoj, luka Rijeka. Zaljev karakterizira krški reljef i brojni priobalni riječki izvori, a brojni ekološki čimbenici uključujući temperaturu, koncentraciju hranjivih tvari, morske struje i količinu svjetlosti oblikuju živi svijet u moru. Utjecajem podzemnih voda krškog područja zabilježeno je smanjenje saliniteta, koje u prosjeku Jadranskog mora iznosi 38 (54). Ovakvi zaljevi pružaju povoljne uvjete za preživljavanje i razvoj mladih stadija riba i školjkaša. Ono što je vremenom zabilježeno jest pad kvalitete morske vode u lukama. Jednim od većih problema smatra se ispuštanje već spomenutog balasta. Ovakav način transportiranja morske vode u druge luke omogućava lakše širenje invazivnih vrsta te infektivnih mikroorganizama između različitih mora.



Slika 1. Jadransko more - Kvarnerski zaljev (Google karte 2024.)

## 1.1 Balastne vode

Balastne vode su vode koje se koriste za stabilizaciju brodova tijekom plovidbe. One se pune u balastne spremnike kako bi se održala stabilnost broda te omogućilo sigurno manevriranje. Spremnici za balast nalaze se na dnu središta broda i na bočnim stranama broda. U prošlosti su se za balast koristili različiti materijali poput drva, pijeska i kamena, dok se voda počela koristiti tek krajem 19. stoljeća. Korištenje balasta ima nekoliko prednosti, smanjuje dinamičko i statičko opterećenje kada je brod prazan te smanjuje otpor tokom plovidbe. Balastom se smanjuje težište broda čime mu se povećava stabilnost.

Problem balastnih voda leži u tome što mogu sadržavati razne vrste organizama, uključujući i invazivne vrste. Kada se balastne vode ispuštaju u nove vode tijekom istovara tereta ili na drugim lokacijama, ti organizmi mogu biti oslobođeni u novo okruženje (4). Zbog toga se balastne vode smatraju vektorom vodenog sustava. Ovim načinom omogućava se prijenos vodenih organizama na nova područja, koja bi inače bila nedostupna. Procjenjuje se da se diljem svijeta svake godine preveze čak 10 milijardi tona vodenog balasta, prenoseći do 7.000 različitih vrsta vodenih organizama svakog dana (5). Iako neke od ovih vrsta ne mogu preživjeti u novom okolišu, koji se razlikuje od njihovog prirodnog staništa, neke od njih mogu pronaći slične okolišne uvjete, poput temperature ili saliniteta mora. Bez prirodnih predatora, te vrste se mogu brzo umnožiti, često uzrokujući štetne posljedice za nove ekosustave. Balastnim vodama se osim životinja i biljaka mogu prenijeti virusi, bakteriji, dinoflagelati,

protisti, zooplanktoni, bentičke ribe, ali i jajašca, spore, ciste i larve iz različitih vodenih organizama.

Upravo se obradom balastne vode može spriječiti prijenos stranih organizama. Obrada balastnih voda podrazumijeva mehaničku, fizičku te kemijsku obradu balastne vode. Najčešća od ovih triju je mehanička metoda, odnosno filtracija, kao najčešća metoda separacije koja uklanja talog i organizme na osnovu veličine i specifične težine. Što je manja propusnost filtera to je veća učinkovitost pročišćavanja. Bitno je spomenuti da filteri koji se koriste u ovu svrhu uklanjanju mikroorganizme veće od  $50\mu$ , te je potrebno povremeno čišćenje istih. Čišćenje filtera poznato je pod nazivom „black-flushing“. Druga u nizu je fizikalna metoda pročišćavanja. Fizikalna metoda provodi se na tri moguća načina, ultraljubičasto zračenje (UV zračenje), kavitacijom i ultrazvučnom metodom te toplinskom metodom. UV zrake su zrake koje uništavaju mikroorganizme. Na učinkovitosti UV zračenja utječu valna duljina, vrijeme izlaganja UV zrakama te zamućenost vode, stoga je vrlo bitno prethodno filtriranje vode kako bi se ova metoda pročišćavanja mogla provesti na što višoj razini učinkovitosti. Kavitacija i ultrazvučna metoda zahtijevaju uporabu visokih i niskih frekvencija, one izravno utječu na zooplanktone te mikroorganizme koji su veći od  $100\mu\text{m}$ . Također ovdje je potrebna prethodna obrada vode filtracijom, a za uspješnije pročišćavanje predlaže se dodatno pročišćavanje ozonizacijom, elektrokolorinacijom i deoksidacijom. Toplinska metoda pročišćavanja balastne vode iskorištava energiju dobivenu iz pogonskih strojeva broda. Sama obrada toplinskom metodom nije dovoljna te zahtjeva prethodno filtriranje i naknadnu obradu vode UV zračenjem. Zadnji stupanj u pročišćavanju balast je kemijska obrada. Ona obuhvaća korištenje organskih i anorganskih kemijskih sredstava za uništavanje mikroorganizama. Ovakvi sustavi danas su automatizirani jer ispuštaju točno određenu koncentraciju sredstva koja je potrebna za pročišćavanje vode. Ova metoda danas se koristi kod brodova kojemu balastna voda zauzima 10 % ukupne nosivosti broda. Kemijske metode pročišćavanja su ozonizacija, deoksidacija te korištenje klora, metoda elektrolize i elektroklorinacije. Ozonizacija je vrlo učinkovita no potrebno je ovaj način pročišćavanja kombinirati sa ranije spomenutim UV zračenjem i kavitacijom. Deoksidacija, kako joj sam naziv kaže, podrazumijeva uklanjanje kisika iz vode, to se postiže dodavanjem raznih kemikalija. Problem ove metode je što uništava samo aerobne mikroorganizme, te je njeno djelovanje izrazito sporo. Danas najpoznatija metoda dezinfekcije vode je s klorom. Klor uništava bakterije i viruse, ali ne omogućava uništenje cista. Najučinkovitije sredstvo na bazi klor je klor dioksid, koji stvara najmanje nusprodukata te uklanja ciste za 97 %. Metoda elektrolize podrazumijeva puštanje istosmjernje struje niskog

napona, a u kombinaciji sa kloriranjem, produkti slobodnog klora, natrijevog hipoklorita, hidroksilnih radikala stvaraju ozon i vodikov peroksid.

## 1.2 Zakonska regulativa

### 1.2.1 Konvencija o upravljanju vodama iz balastnih spremnika

Da bi se kontrolirao utjecaj balastnih voda na okoliš, Međunarodna pomorska organizacija (IMO) usvojila je prvi međunarodni pravni instrument – Konvenciju o upravljanju vodama iz balastnih spremnika (engl. Ballast Water Management Convention – BWMC), poznatiju kao Konvencija BWM (5). Cilj Konvencije BWM je nadzirati i upravljati balastnim brodskim vodama i talozima te smanjiti širenje invazivnih vrsta putem balastnih voda i zaštititi morski okoliš. Standardi D1 i D2 su dio BWM konvencije, ti standardi propisuju načine za obradu i ispuštanje balastnih voda. Ova standardi temelje se na dva načela, prvi u nizu je taj da organizmi iz obalnih područja ne preživljavaju u otvorenim morima/oceanima, te da će se manje organizama koji su uneseni u otvorenom oceanu (mikroorganizmi koji su patogeni za ljude) uspjeti prilagoditi na novo stanište do obalnih područja. Standard D1 propisuje da brodovi moraju izmjenjivati svoju balastnu vodu u otvorenim morima. Nalaže da brodovi moraju izmijeniti najmanje 95 % volumena balastne vode u otvorenim morima, kad god je moguće na više od 200 nautičkih milja od kopna (ili ako nije moguće poštovati ovo pravilo izmjena se može provesti na daljini 50 nautičkih milja) i u morskim dubinama najmanje od 200 metara, daleko od obale. Svrha ovog standarda je smanjiti broj živih organizama koji se prenose balastnom vodom. Ovi standardi se ne moraju poštovati ukoliko kapetan broda procjeni da to ugrožava sigurnost posade. S druge strane, standard D2 propisuje zahtjeve za sustave obrade balastnih voda prije njihovog ispuštanja uz dozvoljene maksimalne koncentracije organizama koje se smiju ispuštati putem balastnih voda (4). Maksimalno 10 živih mikroorganizama (planktona) veličine iznad 50  $\mu\text{m}$  u jednom metru kubnom balastne i maksimalno 10 živih organizama (planktona) u veličini od 10-50  $\mu\text{m}$  u jednom ml balastne vode. Obrada balastnih voda može se provesti pomoću UV svjetla, filtracijom ili kemijski. Ovi standardi imaju za cilj osigurati da balastne vode koje se ispuštaju u nove okolišne uvjete ne predstavljaju prijetnju lokalnim ekosustavima. Svi novi brodovi koji se izrađuju nakon 8. rujna 2017. godine moraju biti građeni pridržavajući se D2 standarda, a svi stari brodovi moraju prilagoditi svoje postrojenje ovome standardu do 8. rujna 2024.godine. D2 standard također propisuje standarde kvalitete ispuštene balastne vode. U Tablici 1 prikazane su maksimalno dozvoljene vrijednosti određenih bakterijskih vrsta u volumenu od 100 ml balastne vode.

Tablica 1. Prikaz dozvoljenog broja bakterija prema D2 standardu

Indikatorski mikroorganizmi	Dozvoljeni broj bakterija na 100 ml
<i>Escherichia coli</i>	<250
Enterokoki	<100
<i>Vibrio cholerae</i> (O1 i O139)	<1

Vrlo bitnu ulogu u procjeni stanja balastne vode ima mjerenje saliniteta. Njegova vrijednost ukazuje da li je voda izmijenjena u skladu sa BWM konvencijom. Brodovi koji provode izmjenu balastnih voda mogu ispustiti balastnu vodu čiji je salinitet >30 (>36 prema hrvatskom pravilniku). Ukoliko je zabilježen manji salinitet od propisanog, zahtijevaju se dodatne analize balastne vode pri čemu broj fitoplanktona ne smije prijeći  $10^5$  stanica u 1000 ml te ne smije sadržavati dinoflagelatne ciste (21). Implementacija Konvencije BMW i njezinih standarda D1 i D2 od velike je važnosti za očuvanje morskih ekosustava i smanjenje rizika od invazivnih vrsta koje se šire putem balastnih voda. Primjena odgovarajućih mjera upravljanja balastnim vodama na brodovima ključna je za zaštitu morskog okoliša širom svijeta.

#### 1.2.2 Pravilnik o upravljanju i nadzoru balastnih voda

Prema Pravilniku o upravljanju i nadzoru balastnih voda (NN 128/2012) svi inozemni brodovi koji dolaze u Hrvatske vode moraju nadležnoj lučkoj kapetaniji dostaviti prijavu balastnih voda i to 48 sati prije uplovljavanja u luku. Zapovjednik broda dužan je izbjegavati izmjenu balastnih voda u mjestima za koja zna da postoji mogućnost pojave štetnih mikroorganizama ili postoje sumnjivi tvornički ispusti, gdje su izrazite razlike između plime i oseke, u slučaju mriještenja riba te u slučaju izmjene morskih struja.

Brodovi koji koriste sustave za obradu balastnih voda moraju osigurati ispuštanje manje od 10 živih organizama veličine 50  $\mu\text{m}$  (ili veće) po mililitru, te manje od 10 živih organizama manjih od 50  $\mu\text{m}$  ili veće od 10  $\mu\text{m}$ . Osim toga, ispuštanje indikatorskih mikroorganizama ne smije premašiti propisane koncentracije: *Vibrio cholerae* (O1 i O139) s manje od 1 kolonije (CFU) na 100 ml ili manje od 1 kolonije (CFU) po 1 gramu (mokra težina) uzorka zooplanktona; *Escherichia coli*, manje od 250 kolonija (CFU) na 100 ml; crijevni enterokoki, manje od 100 kolonija (CFU) na 100 mililitara.

#### 1.2.3 Uredba o kakvoći mora za kupanje 73/08

Ova Uredba stupila je na snagu 20. lipnja 2008. godine, njome su propisane granične vrijednosti mikrobioloških parametara koje određuju kakvoću mora na morskim plažama. Cilj

Uredbe u prvom redu je zaštita ljudskog zdravlja s naglaskom na zaštitu, poboljšanje i očuvanje morskog okoliša. Ova uredba je postavila standarde na temelju dviju općih fekalnih indikatorskih bakterija *E. coli* i crijevnih enterokoka. Ove bakterije su pokazatelji fekalnog onečišćenja i moguće prisutnosti patogena. Utvrđivanje patogena u redovitoj procjeni mikrobnog onečišćenja je tehnički i financijski izazovno. U Tablici 2 prikazani su kriteriji ocjenjivanja kakvoće mora za kupanje nakon svakog ispitivanja.

Tablica 2. Opći parametri za ispitivanje mora nakon svakog ispitivanja (Izvor: Uredba – NN 73/2008 o kakvoći mora za kupanje)

Parametar	Izvrсна kakvoća	Dobra kakvoća	Zadovoljavajuća kakvoća	Referentne metode
Crijevni enterokoki (CFU/100 ml)	<60	61-100	101-200	HR EN ISO 7899-1 ili ISO 7899-2
<i>Escherichia coli</i> (CFU/100 ml)	<100	101-200	201-300	HRN EN ISO 9308-3 ili ISO 9308-1

Brojni stručnjaci predlažu povremeno uključivanje dodatnih pokazatelja i patogena, poput *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. i *Vibrio* spp. (6). Ova Uredba preporučuje da se i tijekom ispitivanja vode uzme u obzir i sediment, koji se smatra potencijalnim izvorom onečišćenja, što više smatra se rezervoarom mikroorganizama. Ukoliko se utvrde bilo kakve nepravilnosti poduzimaju se mjere upravljanja koje uključuju i obavještanje javnosti. U tom slučaju ukoliko je sezona kupanja u tijeku bitno je obavijestiti javnost o vremenu trajanja zabrane kupanja. Države članice moraju Komisiji dostaviti rezultate o ispravnosti i kakvoći vode za kupanje za svaku vodu za kupanje do kraja godine za prethodnu sezonu kupanja (7).

### 1.3 Bakteriološki pokazatelji kakvoće vode

#### 1.3.1 Broj kolonija pri 22°C i 37°C

Naziv heterotrofne bakterije ili UBB odnosi se na ukupni broj bakterija prisutnih u vodi koje metodama kultivacije mogu porasti na hranjivom agaru pri određenim uvjetima. UBB uključuje mikroorganizme koji su prirodno prisutni u mikrobnjoj populaciji, tzv. autohtone



vodene bakterije. Na hranjivom agaru uz njih rastu i druge bakterije koje mogu biti potencijalni izvor kontaminacije ljudskim i životinjskim fekalijama (alohtoni mikroorganizmi) što predstavlja rizik od onečišćenja i širenja zaraze. Heterotrofne bakterije razgrađuju organske tvari u vodenoj sredini te se koriste za procjenu stanja eutrofikacije (36). Uzorci slane vode inkubiraju se na Marine Agar, u različitim uvjetima. Jedan se uzorak podvrgava okolišnoj temperaturi od 22 °C/48 h, dok se paralelni uzorak podvrgava tjelesnoj temperaturi od 37 °C/48h, nakon čega se očitava porast.

### 1.3.2 Ukupne koliformne bakterije i *Escherichia coli*

Ukupni koliformi su bakterije fekalnog i nefekalnog podrijetla. Dio su normalne crijevne flore čovjeka i toplokrvnih životinja. Njihov porast u ispitivanom uzorku ukazuje na fekalnu kontaminaciju. Detekcijom u vodi za ljudsku potrošnju signaliziraju da je došlo do oštećenja vodoopskrbnog sustava te nam pružaju uvid da li je obrada distribuirane vode provedena ispravno. *Escherichia coli* (*E. coli*) gram je negativna bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*. *E. coli* indikator je fekalnog onečišćenja voda. Većina sojeva je neškodljiva i igra važnu ulogu u probavnom sustavu sisavaca, pomažući u razgradnji hrane i sintezi vitamina. Međutim, neki sojevi su patogeni i mogu uzrokovati različite bolesti, uključujući probavne infekcije, urinarne infekcije, pa čak i ozbiljne komplikacije kao što je sepsa. Najpoznatiji patogeni soj *E. coli* je O157:H7, koji može izazvati teške bolesti, uključujući krvavi proljev i hemolitičko-uremijski sindrom (15). Nedavna istraživanja su promijenila naše razumijevanje o sposobnosti preživljavanja *E. coli* izvan domaćina. Otkriveno je da ova bakterija može opstati i razmnožavati se u različitim okolišima, poput tla, pijeska i sedimenta, u područjima s tropskom, suptropskom i umjerenom klimom (37).

### 1.3.3 Crijevni enterokoki

*Enterococcus* je široko rasprostranjen rod gram-pozitivnih kuglastih bakterija. Dvije najznačajnije vrste za čovjeka su *E. faecalis* i *E. faecium*, koje su dio normalne mikrobiote crijeva, usne šupljine i ženskog spolovila. Enterokoki se općenito ne smatraju visoko virulentnim bakterijama (16). Ipak, poznato je da su izuzetno otporni na različite čimbenike iz okoline. Mogu preživjeti u mediju s visokom koncentracijom soli i pH, te su otporni na žučne soli, detergente, etanol i teške metale. Pokazuju termorezistenciju, što znači da mogu preživjeti na temperaturama od 60 °C čak 30 minuta, dok rastu u temperaturnom rasponu od 10 do 45 °C. Sve navedene karakteristike, uz prisutnost nekoliko važnih enzima i polisaharidne kapsule, omogućuju enterokokima preživljavanje u nepovoljnom okolišu kako izvan tako i unutar organizma domaćina, te pridonose njihovoj otpornosti na imunološki odgovor (17).

#### 1.3.4 *Clostridium perfringens*

*C. perfringens* je gram pozitivna anaerobna sporogena bakterija. Ova bakterija znatno duže ostaje prisutna u morskom sedimentu nego *E. coli* i crijevni enterokoki (24). Najveće opterećenje *C. perfringens* zabilježeno je u blizini većih morskih luka u finijem tipu sedimenta koji sadrži veći udio organske tvari (25). Ovakav okoliš pruža dobre uvijete za preživljavanje ove bakterije (26). Smatra se kako je pokazatelj starije ili sporadične fekalne kontaminacije (27) te se smatra da je uz njega vrlo vjerojatna pojava protozoa i enteričnih virusa (28). Fekalne indikatorske baterije (FIB) proliferiraju u tropskim i subtropskim vodama pa je stoga i *C. perfringens* dio svakodnevne mikrobiološke analize morske vode u saveznoj američkoj državi Hawaii (granična vrijednost <5 CFU/100 ml) (29).

#### 1.3.5 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* je gram-negativna aerobna bakterija koja se široko distribuira u vodenim okruženjima. Ova bakterija je oportunistički patogen koji može preživjeti u nepovoljnim uvjetima, uključujući nedostatak hranjivih tvari. Prema važećim propisima, prisutnost *P. aeruginosa* nije dopuštena u vodi namijenjenoj za piće u objektima od javno zdravstvenog interesa, ili u vodi za kupanje i rekreaciju (22). Jedna od ključnih osobina bakterije *P. aeruginosa* je njezina sposobnost rasta u teškim uvjetima, uključujući niske razine hranjivih tvari, u usporedbi s ostalim gram-negativnim bakterijama, dobro se razmnožava u tlu, vodi, životinjama, u bolničkim uvjetima i sapunu. *P. aeruginosa* demonstrira sposobnost preživljavanja i rasta u destiliranoj te mineralnoj vodi s minimalnim sadržajem otopljenih tvari i organskih spojeva. Sve je veća pojavnost bakterija ne-enteričnog podrijetla na plažama stoga je veća i potreba za njihovim dokazivanjem, gdje upravo *P. aeruginosa* može ukazati na pojavu nekih ne-fekalnih patogena (30).

#### 1.3.6 *Salmonella* spp.

*Salmonella*, gram-negativna štapičasta bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*, obuhvaća više od 2300 serotipova koji uzrokuju bolesti kod ljudi i životinja. Ovaj rod sastoji se od dvije glavne vrste: *S. enterica*, koja je podijeljena u šest podvrsta te *S. bongori*. Većina kliničkih slučajeva povezanih s bakterijama rada *Salmonella* potječe od podvrste *S. enterica*, koja se uglavnom izolira iz toplokrvnih životinja i čini više od 99 % slučajeva. Ostale podvrste i *S. bongori* obično su izolirane iz hladnokrvnih životinja, što čini manje od 1 % slučajeva (18). Prisutne su i u vodenim sustavima. Može uzrokovati gastrointestinalne poremećaje kod 0,1 % populacije, najčešće putem kontaminirane hrane. Prijenos *Salmonelle Typhimurium* često je povezan s konzumacijom onečišćene podzemne i površinske vode. Iako je *Salmonella* spp.

relativno osjetljiva na dezinfekciju, i dalje predstavlja izazov u kontroli širenja vodenim sustavima (19).

#### 1.3.7 *Shigella* spp.

*Shigella* bakterija koja pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Vrste koje najčešće uzrokuju bolesti kod ljudi uključuju *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* i *S. sonnei*. *Shigella dysenteriae* poznata je kao uzročnik dizenterije, dok je *S. flexneri* najzastupljenija vrsta u zemljama u razvoju, čineći oko 60 % slučajeva. *S. sonnei* uzrokuje većinu bolesti u razvijenim zemljama (oko 77 %) i oko 15 % u zemljama u razvoju. Infekcija *Shigella* spp. obično se događa putem fekalno-oralnog prijenosa. Bakterije *Shigella* mogu preživjeti do dva tjedna na temperaturi od oko 20°C ako imaju dovoljno hranjivih tvari (20).

#### 1.3.8 *Vibrio cholerae*

*Vibrio cholerae* O1/O139 je gram-negativna, zakrivljena, štapičasta bakterija koja pripada rodu *Vibrio*. Ova bakterija uvećana pod mikroskopom ima oblik zarez, kompaktne je strukture i proizvodi toksin poznat kao kolera toksin. Glavni je uzročnik kolere, sa simptomima nekontroliranog izlučivanja elektrolita i vode u crijevima, dovodeći do teške dijareje i dehidracije (kolera gravis) (31). Prirodno je prisutna u slatkim vodama i morskim ekosustavima, osobito u toplim i tropskim područjima, često se pojavljuje u kontaminiranim vodenim izvorima poput rijeka, jezera i morske vode. Kolera se obično prenosi konzumacijom fekalno kontaminirane hrane ili vode, a može se širiti i fekalno-oralnim putem, osobito u uvjetima loše higijene.

Kolera predstavlja ozbiljnu prijetnju, posebno u lučkim područjima blizu ušća rijeka. U zemljama s lošim sanitarnim uvjetima i visokom razinom zagađenja vode neobrađenom otpadnom vodom. *V. cholerae* se često pričvršćuje na površine planktonskih organizama poput kopepoda i drugih zooplanktona, posebno u tropskim regijama, kao i na školjke i vodene biljke. Povezivanjem s mikroskopskim organizmima koji se prenose vodom, ove bakterije mogu ući u balastne vode i putovati u nova područja diljem svijeta. Ako se bakterije unesu u vodu za piće, posebno sojevi O1 i O139, mogu izazvati ozbiljne epidemije kolere među ljudima. Stoga je kontrola širenja kolere ključna za očuvanje javnog zdravlja, posebno u područjima s narušenim sanitarnim uvjetima.

Osim *Vibrio cholerae* i druge vrste roda *Vibrio* uzrokuju probleme kod ljudi. Tako je *V. metschnikovii* uzročnik gastrointestinalnih problema kod ljudi, a može uzrokovati infekcije rana, također je potencijalno patogen za ljude (32). Uzročnik krvavog proljeva koji je nalik

koleri je *V. fluvialis*, koji uzrokuje i infekcije rana s primarnom septikemijom (33). *V. alginolyticus* uzročnik je infekcije očiju, uha i rana (34). Od vrsta roda *Vibrio* važno je spomenuti *V. parahaemolyticus* koji je autohtona vrsta u estuarijima rijeka. Uzročnik je bolesti koje se prenose morskim plodovima, najčešće školjkašima. Glavni simptom uglavnom je gastroenteritis, no ukoliko se ne liječi na vrijeme može se pojaviti i septikemija. Ova bakterija voli toplije temperature mora te se smatra da bi se uslijed klimatskih promjena uskoro mogla proširiti i preživjeti u morima u kojima do sad nije bila detektirana (35).

#### 1.3.9 *Legionella* spp.

*Legionella* je gram negativan patogen kojemu su prirodno stanište vode, rijeke, jezera i vlažno tlo. Predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje kada se nastani u rashladnim sustavima, u sustavima vode za ljudsku potrošnju te rashladnim tornjevima, što je u povijesti izazvalo i manje epidemije. *Legionella* se prenosi udisanjem aerosola, stoga je vrlo bitno da u hotelskim sustavima i rashladnim tornjevima, kao i u ostalim sustavima kroz koje kruži voda, ne dolazi do nakupljanja biofilma. U biofilmovima se ona vrlo lako može nastaniti i preživjeti, a udisanjem kontaminiranog aerosola može izazvati atipičnu pneumoniju. Istraživanja pokazuju kako je i morska voda moguće stanište za opstanak i razmnožavanje *Legionella* spp., u kojoj dokazano preživljava više od 30 dana (39).

## **2 CILJ ISTRAŽIVANJA**

Ovo istraživanje provedeno je s ciljem procjene mikrobiološkog opterećenja morske vode u luci Rijeka temeljem rezultata dobivenih projektom ProtectAS. Uspoređena je razina mikrobiološkog onečišćenja u vodenom stupcu i sedimentu. Također, cilj je bio procijeniti mogući utjecaj luke Rijeka na mikrobiološko onečišćenje okolnog rekreacijskog područja.

### 3 MATERIJALI I METODE

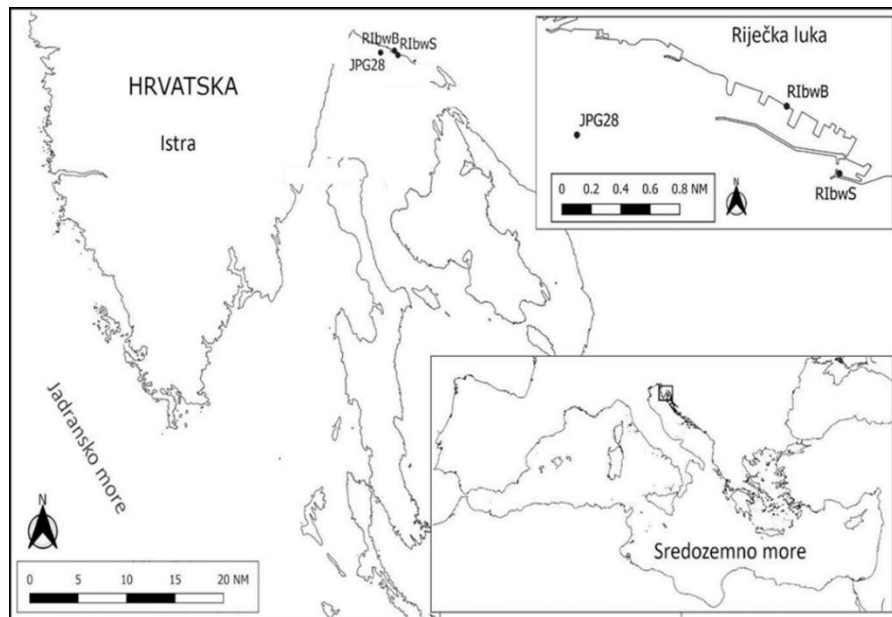
#### 3.1 Lokacija istraživanja

##### 3.1.1 Luka Rijeka

Istraživanje o potencijalnom utjecaju luke na okolna područja provedeno je u luci Rijeka. Ova luka smještena je u Primorsko-goranskoj županiji, na sjeveru kvarnerskog zaljeva. Riječki zaljev obuhvaća preko 500 km<sup>2</sup> i zauzima 27 km<sup>3</sup> dijela kvarnerskog zaljeva dok mu prosječna dubina podmorja doseže 60 metara (8). Nedaleko luke Rijeke, u riječki zaljev ulijeva se rijeka Rječina, najveća rijeka u ovom području, dužine 17 kilometara. Nedaleko ušća Rječine smjestio se uređaj za pročišćavanje otpadnih voda Delta. Ovaj uređaj za pročišćavanje vode sadrži podmorski difuzijski ispust, čime je ispuštanje pročišćene otpadne vode usmjereno na udaljenost 548 m od obale na dubini od 46 m, orijentacije jugozapad (8). Riječko područje karakteriziraju i velike oborine kojima doprinosi planinsko zaleđe. Važno je naglasiti da su u zimskim mjesecima zabilježene veće oborine u odnosu na ostale dijelove Jadrana (9). Kako su oborine česta pojava u ovom području, samim time je i prosječna vlažnost zraka (26 %) nešto povišena u odnosu na ostatak obale. Grad Rijeka godišnje ima 80 vedrih dana, što je ukupno 22 % (9). Navedene hidrografske i geografske prilike formirale su obalu luke Rijeke kao i sastav živog svijeta u moru i u sedimentu (10). U ovom području Jadrana izrazita je pojava bure, vjetra koji puše iz smjera sjeveroistoka. Pojavnost ovog vjetra je iznenadna, puše na udare, a češća je u zimskim mjesecima nego u ljetnom razdoblju. Razdoblja orkanskih udara bure zbog velike brzine puhanja nepovoljna su za plovidbu. Također je poznato kako u ovom dijelu Jadrana bura postiže i svoje najveće brzine pa su tako zabilježene i vrijednosti od 32 m/s (11). Bura u zimskim mjesecima puše i do 30 dana, dok u ljetnima svega 3 (12). Iz smjera juga i jugoistoka puše jugo, koje može dosegnuti brzinu od 18 m/s. Još jedan vjetar kojeg valja razmotriti jest lebić, vlažan i topao vjetar koji puše iz smjera jugozapada te okomito udara na obalu, stvarajući velike valove i uz podizanje razine mora, uslijed čega često poplave obalni dijelovi grada.

Istraživanje je provedeno na tri lokacije u luci Rijeka. Dvije lokacije su izabrane kao mjesta potencijalne kontaminacije, zbog utjecaja ispuštenih balastnih voda. Lokacija uzorkovanja označena s RI bwB nalazi se u žitnom terminalu u riječkom bazenu. Druga lokacija označena kao RI bwS je terminal za opće terete i drvo u sušačkom bazenu, koji je okružen lukobranom dužine 420 m. Nedaleko ove lokacije smjestio se ispust otpadnih voda Delta, kao i ušće Rječine. Ulazi u lučke terminale su orijentirani prema zapadu i kao takvi onemogućavaju izravnu izmjenu morske vode sa otvorenim dijelom mora. Treća lokacija, JPG 28, smještena je

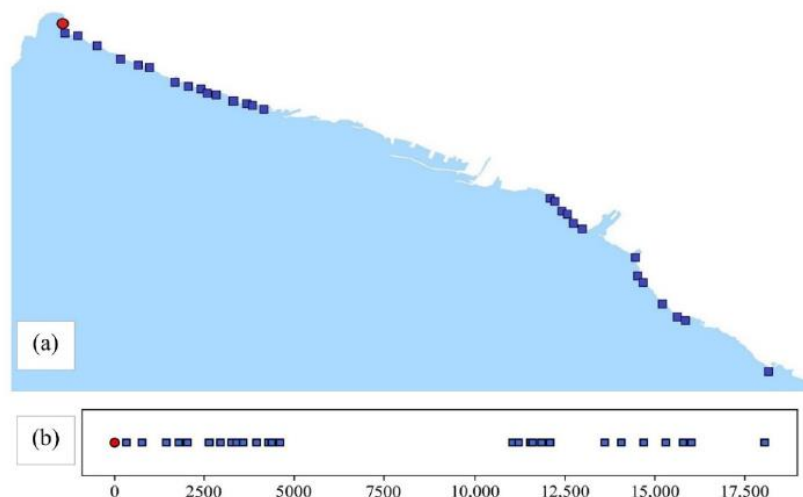
otvorenom dijelu mora, kao mjesto za koje se smatra da nije pod izravnim utjecajem balastnih voda.



Slika 2. Mapa prikazuje lokacije uzorkovanja (označene crnim krugovima; Izvor: ProtectAs)

### 3.1.2 Plaže u blizini luke Rijeka i u širem području

Plaže na kojima su se provodila dodatna ispitivanja *E. coli* i crijevnih enterokoka označena su plavom bojom na karti. Skupljeno je ukupno 294 uzorka sa 29 lokacija (16 istočno i 13 zapadno) od luke Rijeka. Crvenom točkom označena je nulta/početna točka uzorkovanja, a na udaljenosti od 7500 m smjestila se luka Rijeka.



Slika 3. (A) Plavom bojom su označene točke uzorkovanja istočno i zapadno od luke Rijeka; (B) prikaz udaljenost mjesta uzorkovanja od luke (6)

### 3.2 Uzorkovanje morske vode i sedimenta – Luka Rijeka

Tijekom uzorkovanja provedenog od 24.10.2020. do 8.9.2021. ukupno je uzeto 63 uzoraka, 51 uzorak morske vode i 12 uzoraka sedimenta.

Uzorkovanje morske vode provedeno je kroz sva godišnja doba. Uzorkovanje morske vode provodilo se iz plovila, na unaprijed definiranim lokacijama. Uzorci su prikupljeni ručnim uzorkivačem u staklene sterilne boce volumena 2 litre na 30 cm dubine. Uzorci sedimenta plićih područja sakupljeni su uz pomoć ronioca u staklene boce volumena 1 litre. Nakon provedenog uzorkovanja boce su spremljene u hladnjake na temperaturu od 4° C, nakon čega su u sigurnim uvjetima transportirane do laboratorija te su uzorci odmah po dolasku procesirani.

### 3.3 Mikrobiološko ispitivanje

#### 3.3.1 Uzorci morske vode

Prije postupka ispitivanja, bitno je sadržaj boce dobro homogenizirati, kako bi se postigla što bolja reprezentativnost uzorka. Homogeniziranje se provodi miješanjem sadržaja, okretanjem boce minimalno 3 puta. „Pour plate“ tehnika korištena je kod određivanja ukupnog broja bakterija na dvjema temperaturama inkubacije, 22 °C i 36 °C, dok se tehnika membranske filtracije koristila kod određivanja ostalih vrsta mikroorganizama.

#### 3.3.2 Uzorci sedimenta

Sedimentni uzorci su razrijeđeni fosfatnim puferom u omjeru 1:10, uz dodatak 0,5% Tween 80, koji se dodaje u cilju lakšeg odvajanja bakterija od zrnaca pijeska. Korišteno je 50 g sedimenta, 447,5 ml diluenta te 2,5 ml Tween 80. Uzorak dobro promiješao te se ostavio neko



vrijeme da se sedimentira. Nakon sedimentacije, uzorak se dekantirao te se određeni volumen uzorka filtrirao kroz sterilni filter. Za sve mikrobiološke pokazatelje korišten je volumen od 25 ml, osim za *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. i *Legionella* spp., za koje je korišten volumen od 100 ml te za broj kolonija volumen od 1 ml. Daljnji postupak isti je kao i kod uzoraka morske vode. Krajnji rezultat, broj kolonija poraslih na agaru, izražava se kao CFU/g sedimenta.

### 3.4 Mikrobiološki parametri

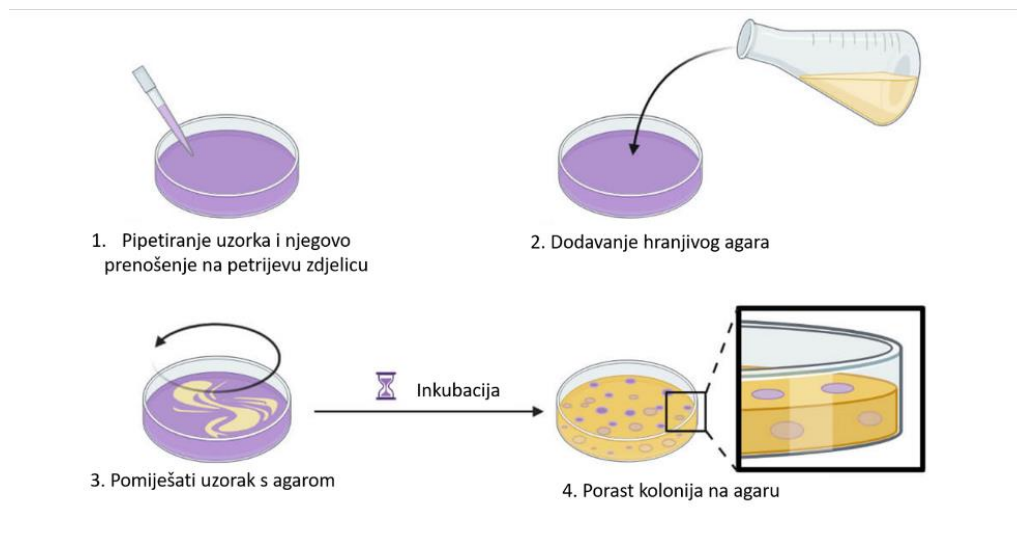
Uzorci morske vode ispitani su na slijedeće mikrobiološke pokazatelje: broj kolonija te prisutnost i broj ukupnih koliformnih bakterija, *Escherichia coli*, crijevnih enterokoka, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp. i *Legionella* spp. U Tablici 3 prikazan je popis metoda koje su korištene za ispitivanje mikrobioloških pokazatelja.

Tablica 3. Popis standardnih ISO normi primijenjenih za ispitivanje mikrobioloških pokazatelja morske vode

PARAMETRI	NORMA
Broj kolonija pri 22°C i 37°C	HRN EN ISO 6222:2000
Ukupni koliformi i <i>Escherichia coli</i>	HRN EN ISO 9308-1:2014/A1:2017
Crijevni enterokoki	HRN EN ISO 7899-2:2000
<i>Clostridium perfringens</i>	HRN EN ISO 14189:2016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HRN EN ISO 16266:2008
<i>Salmonella</i> spp./ <i>Shigella</i> spp.	HRN EN ISO 19250:2013
<i>Vibrio</i> spp.	HRN EN ISO 21872-1
<i>Legionella</i> spp.	HRN EN ISO 11731:2017

#### 3.4.1 „Pour plate“ tehnika

Tehnika „pour plate“ korištena je pri određivanju ukupnog broja bakterija, pri temperaturama inkubacije od 22°C i 36 °C.



Slika 4. Jednostavni prikaz "pour plate" metode (Izvor: <https://microbenotes.com/pour-plate-technique-procedure-significance-advantages-limitations/>)

#### 3.4.1.1 Broj kolonija pri 22°C i 37°C

Norma HRN EN ISO 6222:2000 koristi se za određivanje aerobnih mezofilnih bakterija. Za ovo istraživanje, postupak opisna u normi je modificiran, na način da se umjesto YEA agar (engl. Yeast Extract Agar) koristio agar sastavom prikladniji za analizu morske vode, Marin agar. Prvi korak prije nasađivanja je spaljivanje grla boce, radi sterilizacije. Uzorak treba dobro homogenizirati nakon čega se 1 ml uzorka otpipetira u sterilnu Petrijevu zdjelicu te se zalije s 10-15 ml rastopljenog i temperiranog Marin agara. Petrijeve zdjelice se zatim stavljaju na inkubaciju pri 36°/48 h i pri 22°C/72 h. Nakon inkubacije broje se porasle kolonije te se izražavaju kao CFU/ml.

#### 3.4.2 Tehnika membranske filtracije

Ostale bakterijske vrste određivane su metodom membranske filtracije. Ova tehnika zahtjeva korištenje rampe koja sadrži metalne lijevke koji prije korištenja prolaze postupak sterilizacije. Postupak sterilizacije provodi se autoklaviranjem pri temperaturama od 121°C kroz 15 minuta. Vakuum se postiže korištenjem protočne pumpe koja ima svrhu povlačenja uzorka kroz jednokratne sterilne filtere. Volumen svakog pojedinog uzorka ovog istraživanja iznosio je 100 ml ili 1000 ml, koji su filtrirani kroz bijele sterilne filtere različitih dimenzija pora te različitog kemijskog sastava. Većinski su korišteni celulozni membranski filteri, promjera 47 mm te veličine pora 0,45 µm. Za detekciju bakterije roda *Legionella* korišteni su polietersulfonski filteri pora 0,22 µm. Nakon provedenog postupka filtracije, filter papir se sterilnom pincetom prenosi na selektivne podloge ili u hranjivi bujon. Nakon toga slijedi

inkubacija na određenoj temperaturi i određeno vrijeme, ovisno o bakterijskoj vrsti, što je definirano standardnim metodama koje su se promijenile. Također, u istim postupcima opisani su i ostali uvjeti koje je potrebno osigurati za rast bakterija, poput vlažnosti te koncentracije kisika (anaerobni ili mikroaerofilni uvjeti). Kolonije porasle na filter papiru izražavaju se kao CFU/ ml, 100 mL ili 1000 mL uzorka, ovisno o početnom volumenu uzorka. Bakterijske vrste koje se umnažaju na hranjivom bujonu, *Salmonella* spp. i *Vibrio* spp. nije moguće kvantificirati, već se rezultat izražava kao „prisutne/ne prisutne“.

#### 3.4.2.1 Ukupne koliformne bakterije

Pri određivanju ukupnih koliforma koristi se LES Endo agar, hranjiva podloga prema akreditiranoj standardnoj američkoj metodi (American Public Health Association – APHA) Standard Methods, 23<sup>rd</sup> Edition 2017, SM 9222 B. Nakon nasađenog uzorka i inkubacije 36°C/24h, koliformi rastu kao crveno zlatne kolonije sa metalno zlatnog sjaja na površini. Ukoliko se uoče kolonije bez sjaja, sluzave i tamno crvene boje riječ je o atipičnim koliformnim bakterijama. Konačna detekcija koliformnih bakterija očituje se u produkciji aldehida tijekom procesa fermentacije laktoze. Kao potvrдна metoda koristi se test fermentacije laktoze koji se sastoji od pikiranja te nasađivanja porasle kolonije u lauril triptoza bujon koji se potom inkubira pri 35°C/48h. Ukoliko dođe do razvijanja plina unutar ovog vremenskog perioda isti ukazuje na postojanje koliformnih bakterija. Pošto su koliformne bakterije citokrom oksidaza negativne i β-galaktozidaza pozitivne, dodatno se može provesti Rapid test.

#### 3.4.2.2 *Escherichia coli*

Akreditirana temperaturno modificirana standardna metoda HRN EN ISO 93081:2014/A1:2017 koristi se za dokazivanje bakterija *Escherichia coli*. Ova metoda zahtjeva kultivaciju filtriranog uzorka na hranjivoj podlozi, kromogenom CCA agaru (engl. Chromogenic Coliform Agar). Ploče se inkubiraju 4-5 sati pri temperaturi od 36°C te tijekom 19-20 sati pri 44°C. Većina sojeva *E. coli* sadrži enzime β-D-galaktozidazu i β-D-glukuronidazu. Enzimi reagiraju sa kromogenim supstratom u podlozi što posljedično stvara plavo-ljubičaste kolonije.

#### 3.4.2.3 Crijevni enterokoki

Akreditirana standardna metoda HRN EN ISO 7899-2:2000 primjenjuje se za određivanje crijevnih enterokoka. Dokazivanje enterokoka se odvija prenošenjem filter papira na SBA agar (engl. Slanetz-Bartley Agar) koji se potom, inkubira pri temperaturi od 36°C tijekom 48 h. Pozitivni porast karakterizira se pojavom tamno crvenih do smeđih kolonija. Filter papir s poraslim kolonijama premješta se na drugu hranjivu podlogu, žučni eskulin azid agar,

BAA agar (Bile Aesculin Agar), koji se inkubira na 44°C tijekom 2 h. Kako enterokoki imaju sposobnost hidrolize eskulina, nastaje crni haloo (crni krug) oko svake kolonije.

#### 3.4.2.4 *Clostridium perfringens*

Akreditiranom standardnom metodom HRN EN ISO 14189:2016 određuje se prisutnost i broj bakterije *Clostridium perfringens* TSC agar (engl. Tryptose-sulfite-cycloserine) je selektivna hranjiva podloga za određivanje ove bakterije. Filter prenesemo na ovu podlogu te je inkubiramo u anaerobnim uvjetima 44°C/24 h. Pozitivni porast okarakterizirat će pojava crnih ili sivih do žuto-smeđih kolonija, proces koji se odvija je redukcija sulfita u sulfide jer su u hranjivom agaru sadržane željezne soli s kojima bakterija reagira. Za potvrdni test kolonije se prenesu na krvni agar (36 °C/48 h). U slučaju porasta sumnjivih kolonija, one se ezom prenesu i razmažu na filter papiru te se na njih nakapa 2-3 kapi reagensa kisele fosfataze. Pozitivna reakcija očitovat će se pojavom ljubičaste boje.

#### 3.4.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* je bakterija koja se određuje standardnom akreditiranom metodom HRN EN ISO 16266:2008. Kao selektivna hranjiva podloga koristi se CN agar (engl. Centramid agar). Na nju se prenese filter papir te se ploča stavi na inkubaciju 36 °C tijekom 24 h. Kolonije koje porastu plavo-zelene, koje stvaraju pigment pijocijanin, su pozitivne. Ostale kolonije provjeravaju se pod UV lampom. Kolonije koje fluoresciraju pod UV lampom potrebno je pikirati i potvrditi dokaznim testom. Potvrdni test uključuje nasađivanje na nutrijent agar, NA agar, koji se inkubira na 36 °C tijekom 24 h, potom u acetamid bujon, AB bujon, pri 36 °C tijekom 24 h. U bujon se zatim doda Esslerov reagens, koji stvara narančasti talog zbog produkcije amonijaka, što potvrđuje prisutnost *P. aeruginosa*. Kolonije koje nisu fluorescirale potvrđuju se oksidaza testom (*P. aeruginosa* je oksidaza pozitivan), testom produkcije amonijaka upotrebom acetamid bujona te pojavom fluorescencije na King's B mediju.

#### 3.4.2.6 *Salmonella* spp./*Shigella* spp.

Određivanje bakterija *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. opisano je u normi HRN EN ISO 19250:2013. Uzorak morske vode koji se filtrira iznosi 1000 ml, a u slučaju sedimenta filtrira se volumen od 100 ml. Nakon filtracije uzorka, filter papir se uz pomoć sterilne pincete prenosi u 50 ml hranjive puferirane peptonske vode (PPV) te se inkubira na 36 °C tijekom 24 h. Zatim se 1 ml PPVa premješta u MKTTn bujom (engl. Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin broth) te u Selenit cistein bujon (za određivanje *Shigella* spp.), dok se 0,1 ml premješta u EVS bujon (engl. Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone broth) i XLD agar (engl. Xylose Lysine Deoxycholate agar). Inkubacija agara se provodi pri temperaturi od 36 °C tijekom 24 h. Porasle

kolonije crnog centra suspektne su *Salmonella* spp., dok su one bez crnog centra kolonije *Shigella* spp. Potvrđni testovi koji se provode su VITEK<sup>®</sup>2, pomoću automatiziranog sustava za identifikaciju bakterijskih vrsta biokemijskim reakcijama, masena spektrometrija s desorpcijom uz pomoć matrice (MALDI-TOF MS, engl. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time-Of-Flight) te aglutinacija.

#### 3.4.2.7 *Vibrio* spp.

Za dokazivanje *Vibrio* spp., korištena je norma HRN EN ISO 21872-1, tehnika membranske filtracije i umnažanja u hranjivom bujonu. Prvo se volumen od 100 mL uzorka filtrira uzorka kroz sterilni filter od miješanih celuloznih estera, koji se zatim prenese na selektivnu ploču TCBS (Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar), koja se inkubira na 37°C tijekom 24 h. Paralelno, drugi filter se inkubira 41±0,5 °C 24 h u hranjivom bujonu ASPW (Alkaline Saline Peptone Water), u kojem se *Vibrio* spp. umnaža. Nakon inkubacije, uzme se alikvot uzorka s površine bujona te se prenese na selektivnu hranjivu podlogu TCBS. Porasle kolonije s karakterističnim morfološkim osobinama dalje su identificirane pomoću tehnike MALDI-ToF.

#### 3.4.2.8 *Legionella* spp.

Određivanje bakterije *Legionella* spp. propisano je normom HRN EN ISO 11731:2017. Za ukoncentriravanje uzoraka 1000 ml uzorka mora (ili 100 ml suspenzije sedimenta) filtrirano je kroz polietersulfonski filter. Filter papir se položio na GVPC (engl. Glycine Vancomycin PolymyxinB, Cycloheximide). U plastičnu epruvetu dodalo se 10 ml fiziološke otopine te se nju prenosio filter papir, koji se zatim izreže sterilnim škarama, nakon čega se epruveta zatvori sa čepom. Epruveta se zatim postavlja na ultrazvučnu kupelj na 2 min, radi ispiranja bakterija s filter papira. Nakon toga epruveta se izlaže temperaturnom tretmanu na 50°C/30 minuta. Nakon miješanja epruvete u vorteksu, 100 µl uzorka inokulirano je na visoko selektivne podloge GVPC te je razmazano sterilnim štapićem. Selektivna hranjiva podloga s inokuliranim uzorkom inkubirana su pri 36 °C do 10 dana, u atmosferi s 2,5 % CO<sub>2</sub> u vlažnim uvjetima. Porasle kolonije s karakterističnim morfološkim osobinama presađene su na podlogu za rast *Legionella* spp., BYCE (Buffered Charcoal Yeats Extract agar medium) te na krvni agar na kojem *Legionella* spp. ne rastu. Kolonije koje su porasle na BCYE agaru, a nisu na krvnom agaru, potvrđene su testovima aglutinacije pomoću lateks kita ili pomoću MALDI-TOF MS instrumenta.

### 3.5 Statistička obrada podataka

Ovisno o veličini uzorka, homogenosti varijance i distribuciji podataka pri obradi statističkih podataka mogu se koristiti parametrijski i neparametrijski testovi. Podaci dobiveni ovim istraživanjem nisu imali normalnu distribuciju ni za jedan od ispitivanih parametara, što je dokazano primjenom Shapiro-Wilkovog W-testa. Spearmanovi korelacijski koeficijenti su izračunati kako bi se procijenile povezanosti između različitih mikrobioloških pokazatelja. Procjena razlike u mikrobiološkom opterećenju na različitim lokacijama uzorkovanja provedena je uz pomoć Kruskal-Wallis testa i višestruke usporedbe srednjih rangova na razini značajnosti  $p < 0,05$ .

## 4 REZULTATI

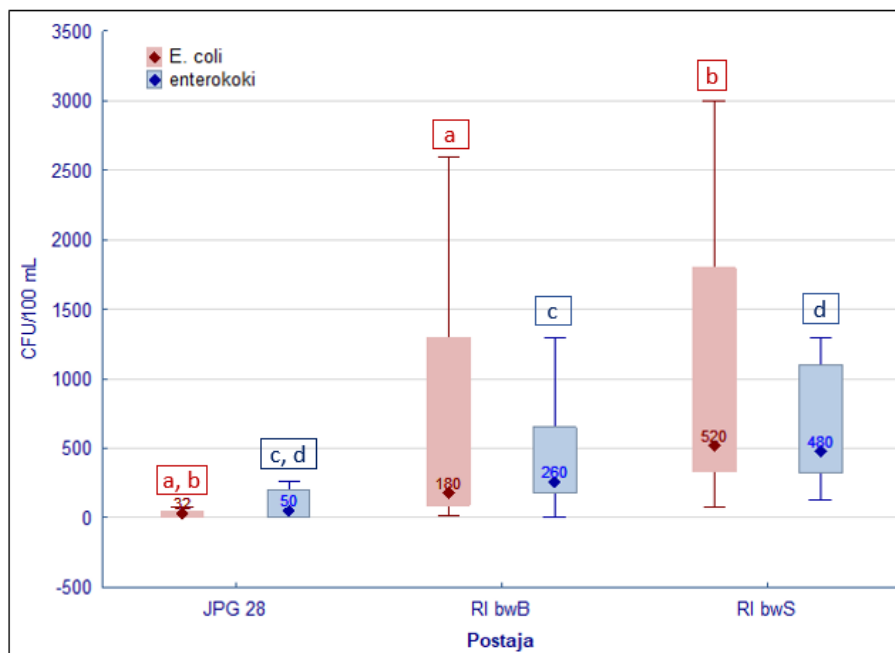
U razdoblju od 24. listopada 2020. godine do 8. rujna 2021. godine na 3 odabrana lokaliteta unutar riječkog zaljeva prikupljena su 63 uzorka, od čega 51 uzorak morske vode i 12 uzoraka sedimenta. Rezultati dobiveni od uzoraka morske vode izraženi su u jedinici CFU/100 ml (engl. CFU – colony forming units) - broj poraslih kolonija. Rezultati *Salmonella* spp. i *Shigela* spp. izraženi su kvalitativno (prisutno/nepisutno). Uzorci sedimenta obrađeni su, a rezultati su izraženi u jedinici CFU/100 g. Radi lakše usporedbe rezultata sedimenta i rezultata morske vode sve jedinice preračunate su u CFU/100 ml.

### 4.1 Luka Rijeka – rutinski mikrobiološki pokazatelji

#### 4.1.1 Vodeni stupac

##### 4.1.1.1 Postaja

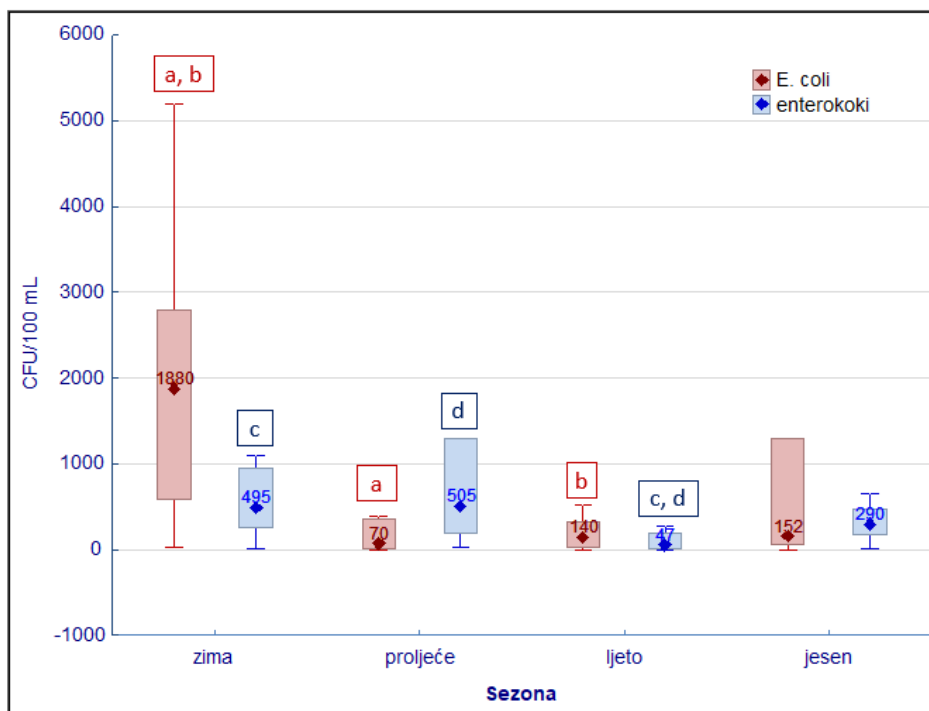
Prikazane su srednje vrijednosti koncentracije *E. coli* i crijevnih enterokoka u uzorcima morske vode prikupljenim na 3 različite lokacije. Zabilježena je statistički značajna razlika u prisutnosti bakterija na različitim lokacijama ( $p < 0,05$ ). Najveće opterećenje bakterijama *E. coli* i crijevnim enterokokima zabilježeno je na lokaciji RI bwS. Vrijednosti *E. coli* zabilježene na ovoj lokaciji su u rasponu od 80 do 7560 CFU/100 ml, medijan iznosi 520 CFU/100 ml. Minimalna zabilježena razina crijevnih enterokoka na ovoj lokaciji iznosi 130 CFU/100 ml, dok je maksimalna izmjerena razina 4300 CFU/100 ml.



Slika 5. Koncentracija *Escherichia coli* i crijevnih enterokoka prema lokacijama s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema (⌈). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.1.2 Sezona

Značajna prisutnost indikatora fekalnog onečišćenja, *E. coli* i enterokoka, zabilježena je u zimskim mjesecima. Najveće opterećenje *E. coli* zabilježeno je u rasponu 35 do 5200 CFU/100 ml. Medijan iznosi 1880 CFU/100 ml. Veliko opterećenje enterokokima zabilježeno je zimi u rasponu od 20 do 2800 CFU/100 ml, dok je najviša razina dosegnuta u proljeće te ona iznosi 4300 CFU/100 ml. Najmanje opterećenje *E. coli* zabilježeno je ljeti kad je nekoliko mjerenja pokazalo 1 CFU/100 ml, a neka su dosegnula i maksimum od 520 CFU/100 ml. Također zabilježena je i smanjena koncentracija crijevnih enterokoka u ljetnom razdoblju, njihova minimalna zabilježena koncentracija iznosila je 0 CFU/100 ml, dok je maksimalna zabilježena iznosila 560 CFU/100 ml. Vidljivo je kako se u jesen ponovo povećala koncentracija *E. coli* koja je dosegnula koncentraciju od 1300 CFU/100 ml.



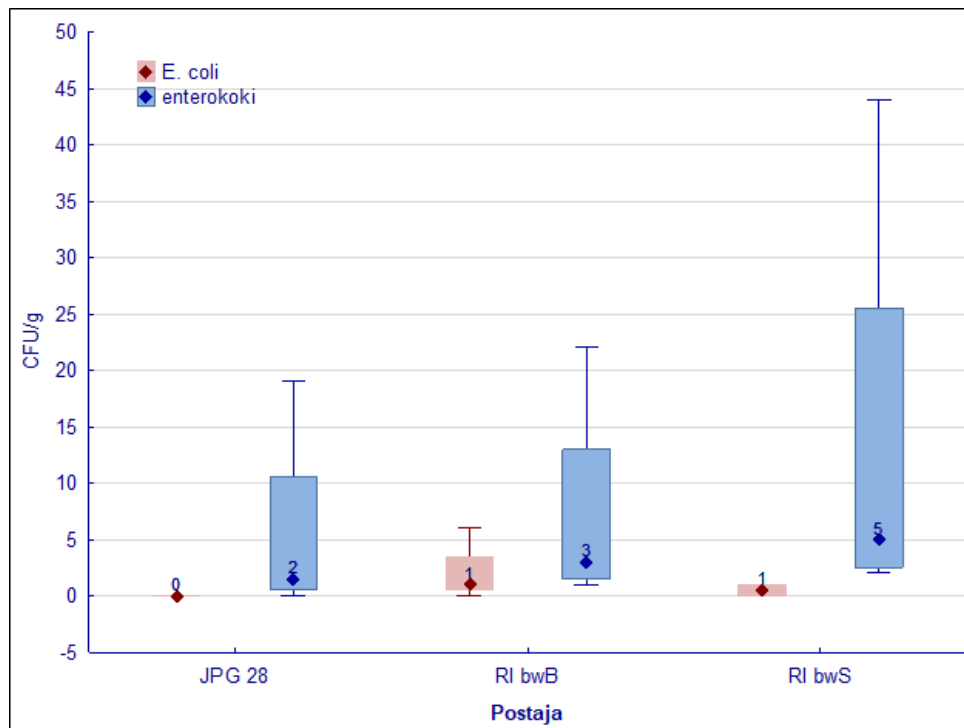
Slika 6. Koncentracija *Escherichia coli* i crijevnih enterokoka ovisno o sezoni s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema ( $\top$ ). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).



## 4.1.2 Sediment

### 4.1.2.1 Postaja

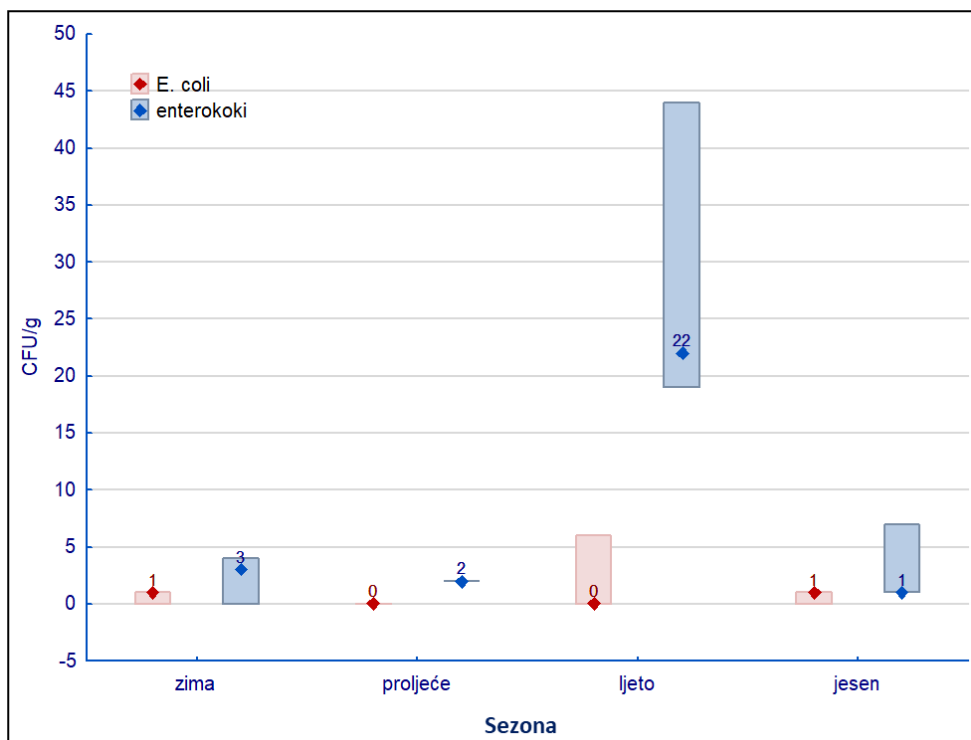
Analizirani uzorci sedimenta pokazuju da nije zabilježen porast bakterija *E. coli* na mjernoj postaji JPG 28, dok je medijan za uzorke prikupljene na lokaciji RI bwS iznosio 1 CFU/g. Nešto veći porast zabilježen je na lokaciji RI bwB, no nije statistički značajan u odnosu na prethodna dva, maksimalna razina *E. coli* pronađena na ovoj lokaciji iznosi 6 CFU/g. Najveće opterećenje enterokokima zabilježeno na lokaciji RI bwS, u rasponu od 2 CFU/g do 44 CFU/g. Najmanje opterećenje crijevnim enterokokima zabilježeno je na lokaciji JPG 28. Najniža zabilježena koncentracija crijevnih enterokoka na ovoj lokaciji iznosi 0 CFU/g, dok maksimalna iznosi 19 CFU/g. Ne postoji statistički značajna razlika između uzoraka sedimenta uzetih na različitim lokacijama ( $p > 0,05$ ).



Slika 7. Razina *E. coli* i crijevnih enterokoka analiziranih u uzorku sedimenta ovisno o mjestu uzorkovanja s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema (⌈). Lokacije se statistički značajno ne razlikuju ( $p > 0,05$ ).

#### 4.1.2.2 Sezona

Povećana pojavnost crijevnih enterokoka u uzorcima sedimenta zabilježena je u ljetnom razdoblju. Koncentracija crijevnih enterokoka dosegla je razinu od 44 CFU/g, podatak se statistički značajno razlikuje ( $p < 0,05$ ) od podataka prikupljenih u drugim razdobljima godine. Najmanje opterećenje morskog sedimenta crijevnim enterokokima zabilježeno je u proljeće. Zabilježena je koncentracija od 2 CFU/g. Niske razine *E. coli* u morskome sedimentu bilježe se u svim periodima godine. Najveća pojavnost *E. coli* zabilježena je tokom ljeta i iznosila je 6 CFU/g. Dok u ostalim periodima godine nije zabilježena njena pojava ili je zabilježen porast od 1 CFU/g.

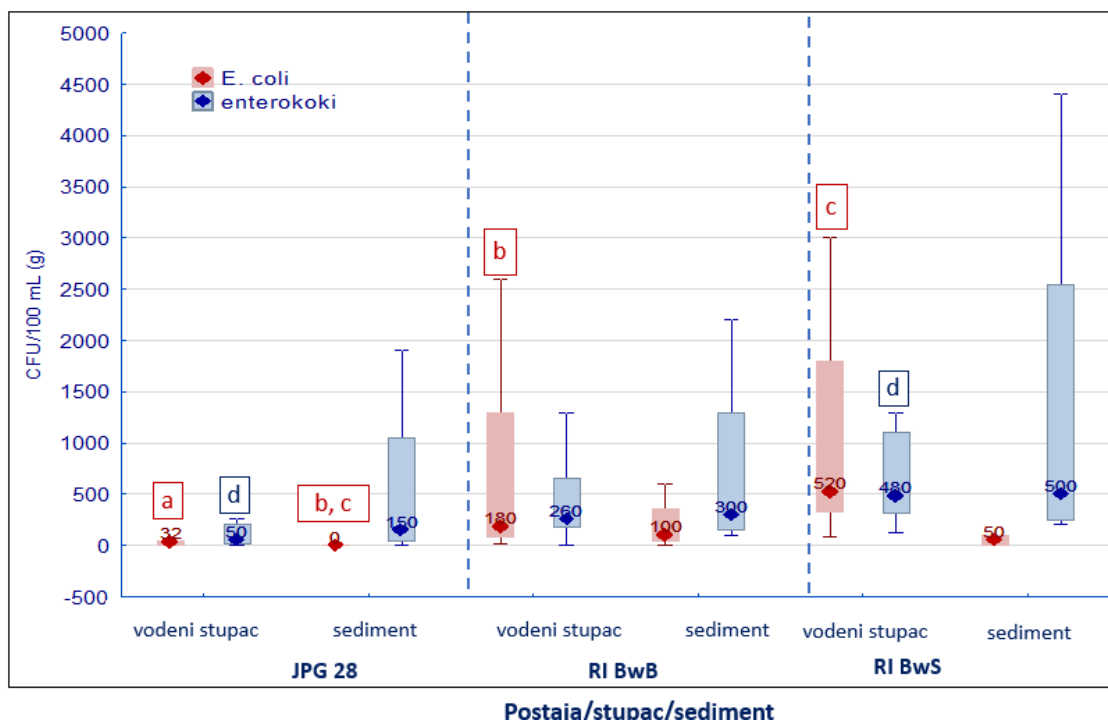


Slika 8. Razina *E. coli* i crijevnih enterokoka analiziranih u uzorku sedimenta u ovisnosti o sezoni s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema (⊔).

### 4.1.3 Vodeni stupac vs sediment

#### 4.1.3.1 Postaja

Radi lakše usporedbe svi podaci su preračunati u mjernu jedinicu CFU/100 ml. Uspoređujući dobivene parametre, može se uvidjeti kako je koncentracija *E. coli* veća u uzorcima morske vode nego u sedimentu. Najveće opterećenje *E. coli* zabilježeno je na mjernoj postaji RI BwS gdje njena koncentracija doseže razinu od 7560 CFU/100 ml, medijan 520 CFU/100 ml, dok koncentracija u sedimentu iznosi 100 CFU/100 ml, medijan 50 CFU/100 ml. Pojavnost enterokoka na istoj lokaciji nešto je drugačija u odnosu na *E. coli*, naime veće opterećenje zabilježeno je u sedimentu i iznosi 4400 CFU/100 ml, medijan 500 CFU/100 ml, dok u uzorku morske vode iznosi 4300 CFU/100 ml, medijan 480 CFU/100 ml. Usporedba vodenog stupca i sedimenta na mjernoj postaji RI BwB pokazuje kako je koncentracija *E. coli* veća u vodenom stupcu, njen izmjeren maksimum iznosi 2600 CFU/100 ml, medijan 180 CFU/100 ml, dok izmjeren maksimum u sedimentu iznosi 600 CFU/100 ml, medijan 100 CFU/100 ml. U uzorcima prikupljenim na mjernoj postaji JPG 28 nije zabilježen rast *E. coli* u sedimentu, dok u vodenom stupcu izmjereni maksimum *E. coli* iznosi 1936 CFU/100 ml, medijan 32 CFU/100 ml. Koncentracija enterokoka zabilježenih u sedimentu iznosi 1900 CFU/100 ml, medijan 150 CFU/100 ml.

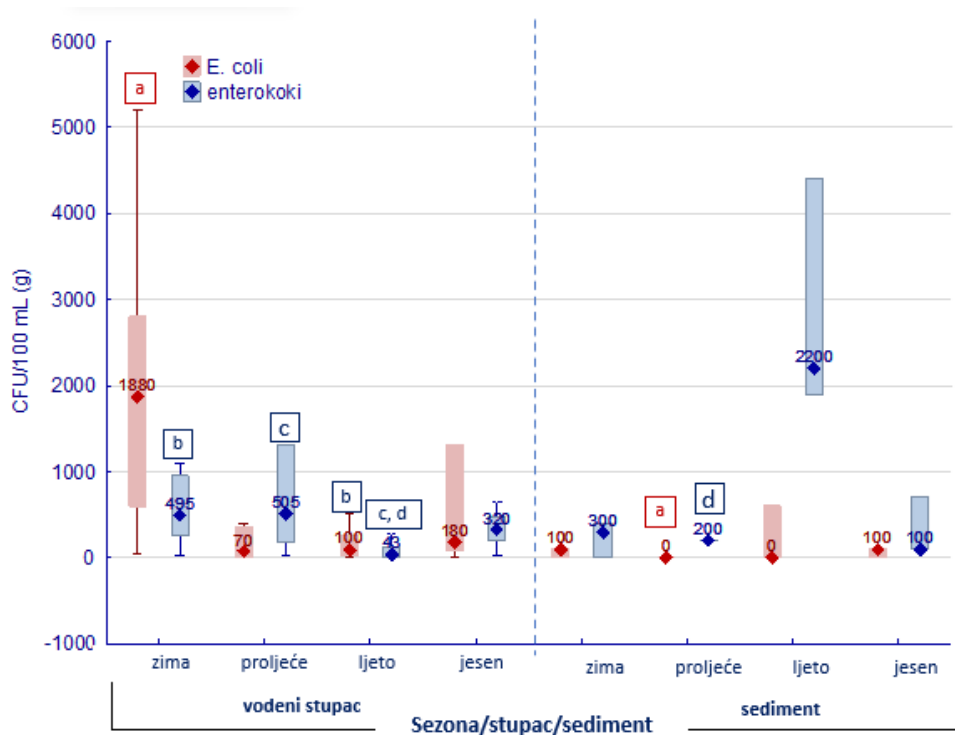


Slika 9. Usporedba koncentracija Escherichia coli i crijevnih enterokoka u morskoj vodi i sedimentu prema lokacijama s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema (T). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3.2 Sezona

Prikazani su rezultati indikatora fekalnog onečišćenja, *E. coli* i enterokoka, u uzorku morske vode i uzorku sedimenta u razdoblju promatranom kroz četiri godišnja doba. Promatramo li zimu možemo vidjeti kako je koncentracija *E. coli* znatno viša u uzorcima morske vode (s izmjerenim maksimumom od 5200 CFU/100 ml i medijanom 1880 CFU/ 100 ml) u odnosu na sediment (izmjereni maksimum 100 CFU/100 ml, medijan 100 CFU/100 ml). Razina enterokoka je podjednaka u oba uzorka, medijan u uzorku morske vode iznosi 495 CFU/100 ml, dok u uzorku sedimenta iznosi 300 CFU/100 ml. Već u proljeće zabilježene su razlike u uzorcima kako vode tako i sedimenta. U vodenom stupcu medijan *E. coli* iznosi 70 CFU/100 ml, dok u sedimentu iznosi 0 CFU/100 ml.

Maksimalni broj enterokoka u vodenom stupcu zabilježena u proljeće iznosi 4300 CFU/100 ml, s medijanom 505 CFU/100 ml. U sedimentu su zabilježene značajno manje vrijednosti enterokoka, maksimalna izmjerena vrijednost iznosila je 200 CFU/100 ml, medijan 200 CFU/100 ml. U ljetnim mjesecima vrijednosti *E. coli* ne razlikuju se značajno između ova dva uzorka, maksimum *E. coli* izmjeren u vodenom stupcu iznosi 520 CFU/100 ml, medijan 100 CFU/100 ml, dok izmjereni maksimum u sedimentu iznosi 600 CFU/100 ml, medijan 0 CFU/100 ml. Značajna razlika zabilježena je između uzoraka vode i sedimenta u slučaju prisutnosti enterokoka, zabilježene vrijednosti enterokoka u vodenom stupcu kretale su se između 0 i 560 CFU/100 ml (medijan 43 CFU/100 ml), dok su se vrijednosti u sedimentu kretale između 1900 i 4400 CFU/100ml (medijan 2200 CFU/100 ml). Promatranjem podataka može se iščitati kako je u jesenskom razdoblju došlo do povećanja koncentracije *E. coli* s izmjerenom maksimalnom vrijednosti od 1300 CFU/100 ml, dok je koncentracija u sedimentu iznosila 100 CFU/100 ml. Zabilježena maksimalna koncentracija enterokoka u sedimentu iznosi 700 CFU/100 ml, sa srednjom vrijednošću od 300 CFU/100 ml, dok je u vodenom stupcu zabilježen maksimum od 1300 CFU/100 ml, srednje vrijednosti 403 CFU/100 ml.



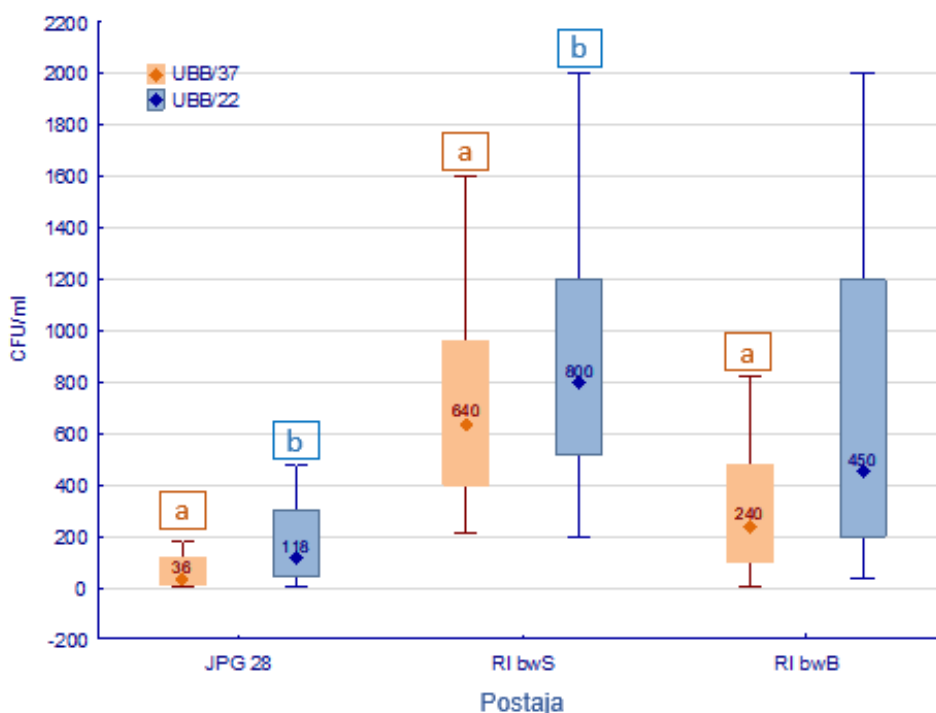
Slika 10. Usporedba koncentracija Escherichia coli i crijevnih enterokoka u morskoj vodi i sedimentu u ovisnosti o sezoni s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema (⌈). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 Luka Rijeka – dodatni mikrobiološki pokazatelji

### 4.2.1 UBB/37/22, koliformne bakterije, *C. perfringens*, *P. aeruginosa*

#### 4.2.1.1 Vodeni stupac

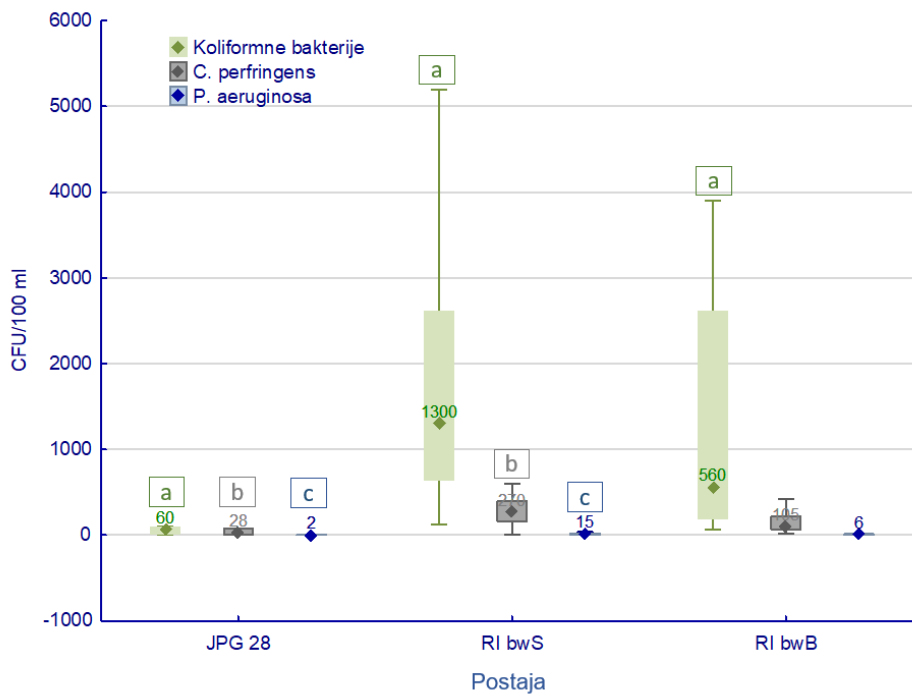
Na svim je mjernim postajama vrijednost UBB/22 veća u odnosu na UBB/37. Najniže vrijednosti UBB u vodenom stupcu zabilježene su na lokaciji JPG 28, s maksimalnim vrijednostima od 960 CFU/ml i medijanom 36 CFU/ml (37 °C) te 2000 CFU/ml i 118 CFU/ml (22 °C). (Slika 11.). Statistički značajno veće vrijednosti UBB/37/22 zabilježene su na RI bwS, a na RI bwB za UBB/37. Na najopterećenijoj RI bwS koncentracija za UBB/37 doseže 2600 CFU/ml, s medijanom od 640 CFU/ml, a za UBB/22 maksimalna vrijednost bila je 4000 CFU/ml, s medijanom 800 CFU/ml.



Slika 11. Usporedba koncentracija UBB pri 37°C i 22°C u vodenom stupcu ovisno o mjestu uzorkovanja s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema(⊢). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ )

Slika 12. prikazuje usporedbu koncentracija koliformnih bakterija, *C. perfringens* i *P. aeruginosa* izmjerenih u vodenom stupcu na različitim postajama. Na slici je vidljivo najmanje opterećenje ovim pokazateljima na JPG 28 (medijan za koliforme 60 CFU/100 ml, *C. perfringens* 28 CFU/100 ml, *C. perfringens* 2 CFU/100 ml). Na lokaciji RI bwS izmjerene su statistički veće koncentracije za sva tri pokazatelja, a na RI bwB samo za *P. aeruginosa*. Na

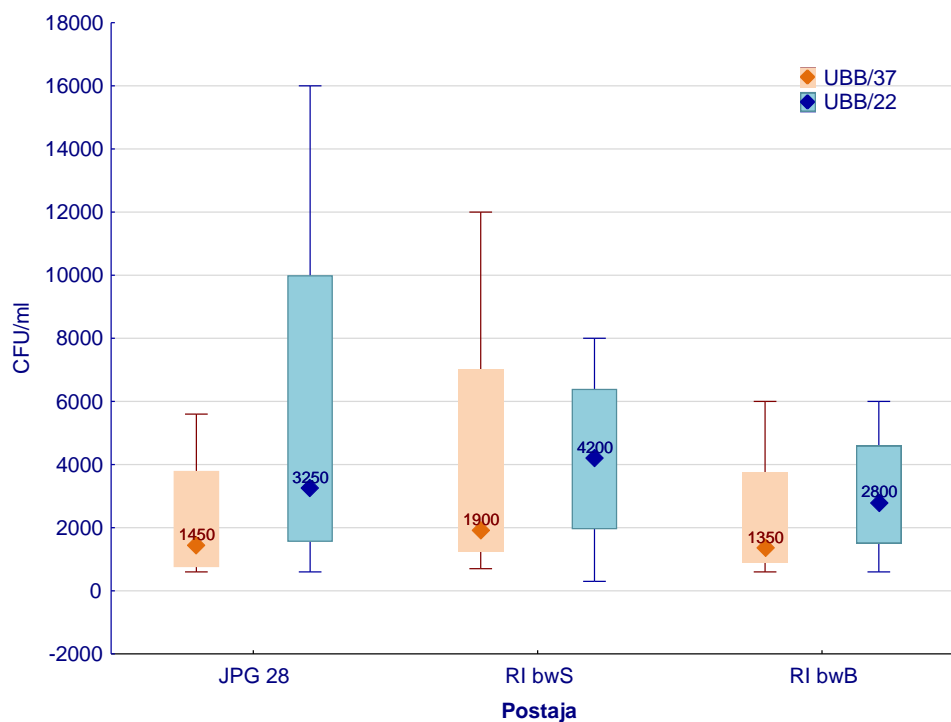
mikrobiološki najopterećenijoj RI bwS medijan za koliforme iznosio je 1300 CFU/100 ml, *C. perfringens* 270 CFU/100 ml, *C. perfringens* 15 CFU/100 ml.



Slika 12. Usporedba koncentracija koliformnih bakterija, *C. perfringens* i *P. aeruginosa* u vodenom stupcu ovisno o postaji s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema ( $\top$ ). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.2 Sediment

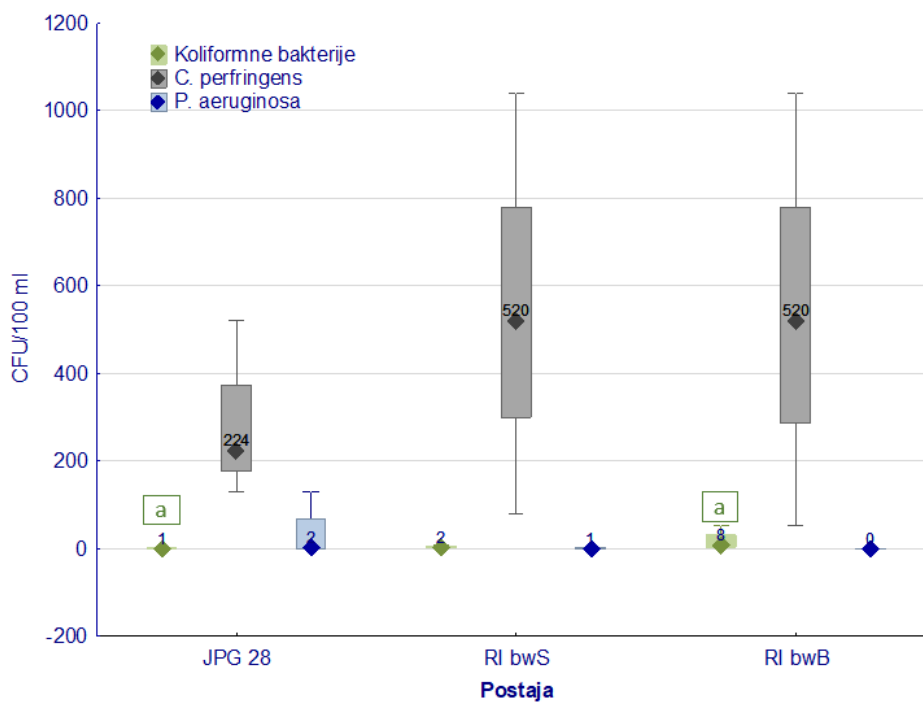
Na istraživanim lokacijama u uzorcima sedimenta nije utvrđena statistički značajna razlika UBB pri 37 °C i 22 °C (Slika 13.). Najveći medijan za UBB/37 od 1900 CFU/ml utvrđen je na mjernejoj postaji RI bwS, a za UBB/22 u vrijednosti od 3250 na JPG 28 CFU/100 ml.



Slika 13. Usporedba koncentracija UBB pri 37 °C i 22 °C u uzorcima sedimenta u ovisnosti o postajama s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema ( $\top$ ). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).



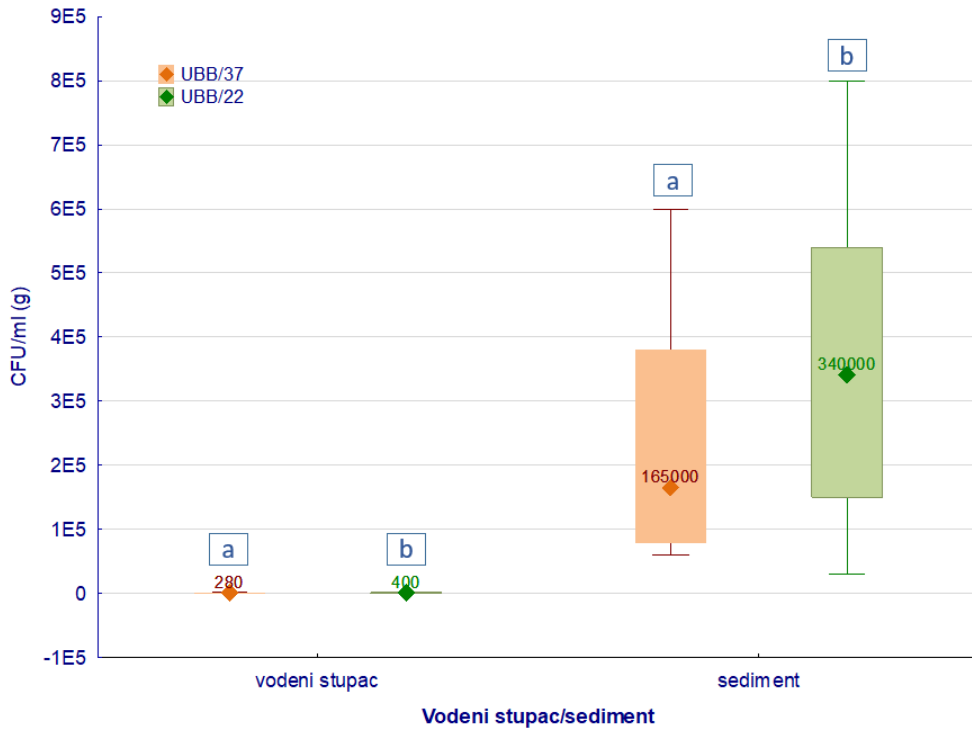
U uzorcima sedimenta na sve tri ispitane mjerne postaje zabilježene su niske koncentracije koliformnih bakterija, s vrijednostima medijana 1 CFU/100 ml (JPG 28), 2 CFU/100 ml (RI bwS) te 8 CFU/100 ml (RI bwB). Koncentracija koliformnih bakterija na lokaciji RI bwB statistički se značajno razlikovala od JPG 28. Iz grafa je vidljivo kako su zabilježene koncentracije *C. perfringens* dosta veće u odnosu na koncentracije koliforma i *P. aeruginosa*. Na mjernoj postaji JPG 28 koncentracije *C. perfringens* kreću se od 130 CFU/100 ml do 520 CFU/100 ml, uz medijan 224 CFU/100 ml. Na lokacijama RI bwS i RI bwS koncentracije *C. perfringens* bile su veće, s medijanom od 520 CFU/100 ml i rasponom vrijednosti 52 CFU/100 ml i 1040 CFU/100 ml. Nešto veći porast bakterije *P. aeruginosa* zabilježen je na mjernoj postaji JPG 28, s medijanom od 2 CFU/100 ml te maksimalnom vrijednosti od 130 CFU/100 ml, dok je na ostalim lokacijama zabilježen minimalni porast (1-2 kolonije po uzorku).



Slika 14. Usporedba koncentracija koliformnih bakterija, *C. perfringens* i *P. aeruginosa* u vodenom stupcu ovisno o postaji s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema ( $\top$ ). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

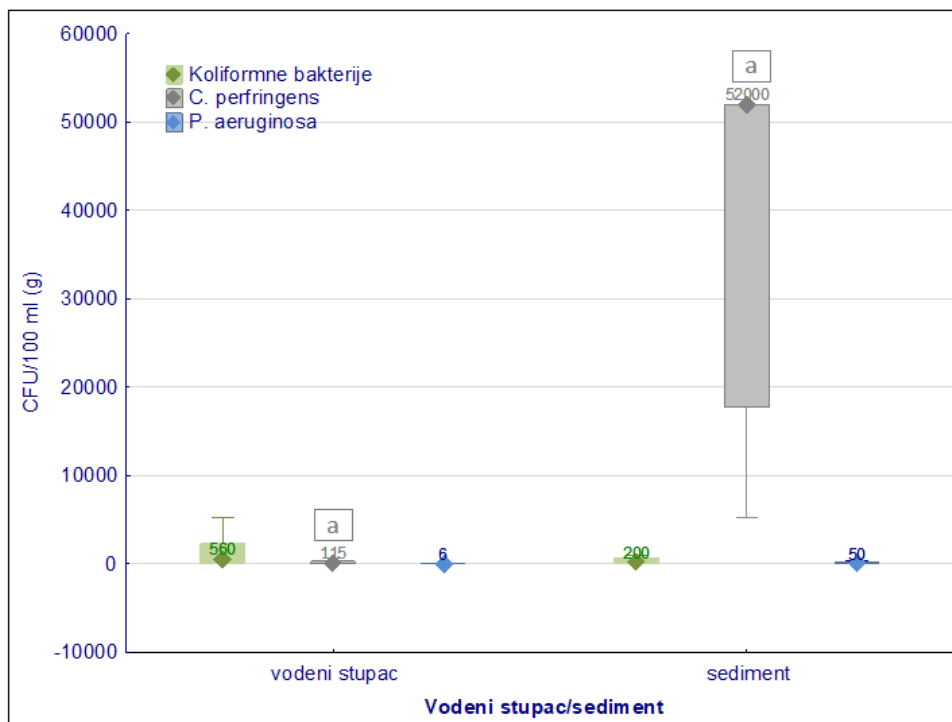
#### 4.2.1.3 Vodeni stupac vs sediment

Slika 15. prikazuje statistički značajno veće vrijednosti UBB pri temperaturi 37 °C i 22°C u uzorcima sedimenta u odnosu na stupac morske vode. Medijan UBB/37 u sedimentu iznosio je 165.000 CFU/ml dok je u morskoj vodi iznosio 280 CFU/ml. Vrijednost medijana za UBB/22 u sedimentu je iznosio 340.000 CFU/ml, a u vodenom stupcu 400 CFU/ml.



Slika 15. Usporedba koncentracija UBB pri 37 °C i 22 °C u vodenom stupcu i sedimentu s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema ( $\top$ ). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

Na Slici 16. vidljivo je da su u sedimentu koncentracije *C. perfringens* bile statistički značajno veće u sedimentu u odnosu na vodeni stupac, dok za koliformne bakterije i *P. aeruginosa* razlika nije utvrđena. U ispitanim uzorcima sedimenta medijan za *C. perfringens* iznosi 52.000 CFU/100 ml, a u vodenom stupcu 115 CFU/100 ml. Koncentracije *P. aeruginosa* također su više u sedimentu u odnosu na morsku vodu (medijan 50 vs 6 CFU/100 ml), dok su koliformne bakterije bile brojnije u vodenom stupcu (medijan 200 vs 560 CFU/100 ml).



Slika 16. Usporedba koncentracija koliformnih bakterija, *C. perfringens* i *P. aeruginosa* u vodenom stupcu ovisno o postaji s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema ( $\top$ ). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Legionella* spp.

Bakterije iz roda *Legionella* ispitana je kvantitativnom metodom, a *Vibrio*, *Salmonella*, *Shigella* kvalitativnom metodom. Prisutnost *Shigella* spp. te *Legionella* spp. nije dokazana niti u jednom uzorku.

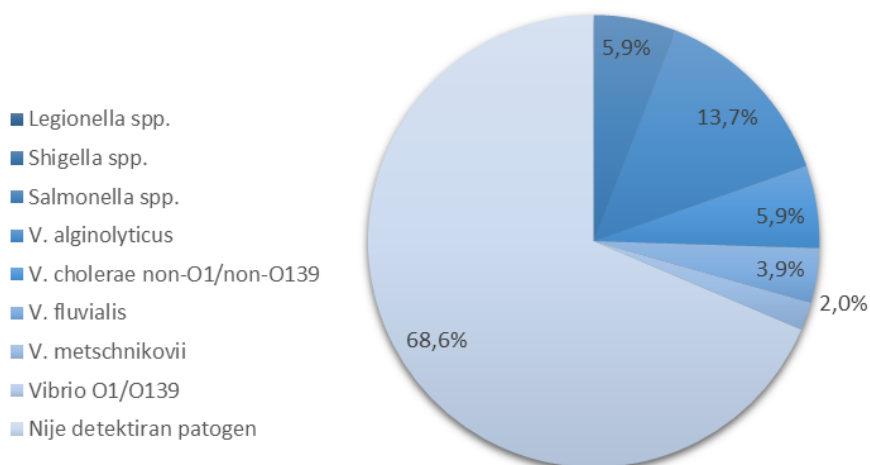
Vrste iz roda *Vibrio* dokazane su u 25,5 % uzoraka (13/51), i to isključivo u uzorcima morske vode, dok u sedimentu porast nije zabilježen.

*V. cholerae* O1 i O139, koji se prema Pravilniku o upravljanju i nadzoru balastnih voda (NN 128/2012) ne smije biti dokazan, nije detektiran niti u jednom od ispitivanih uzoraka. U tri navrata zabilježena je prisutnost *V. cholerae* non-O1/non-O139 (5,9 %, 3/51), na lokacijama Ri BwS (dva puta) i Ri bwB (jedan put), i to u zimskim mjesecima, dva puta u 11. mjesecu bez prisustva oborina i u 1. mjesecu uz vrlo male oborine (1,4 mm).

*V. alginolyticus* je potvrđen u 13,7 % uzoraka (7/51), dominantno na lokacijama RI bwB i RI bwS te u jednom uzorkovanju i na lokaciji JPG 28. Pojavnost *V. alginolyticus* zabilježena je u 10. mjesecu u vrijeme većih oborina (69,9 mm), te u 11. i 9. mjesecu bez prisustva oborina.

*V. fluvialis* potvrđen je u 3,9 % (2/51), a *V. metschnikovii* u 2,0 % (1/51).

Bakterije iz roda *Salmonella* detektirane su u 3 navrata (5,9 %, 3/51). Dva puta su detektirane u 2. mjesecu, na lokacijama RI bwB i JPG 28 (*Salmonella* spp. i *S. arizona*) te jednom u 4. mjesecu na lokaciji RI bwS (*Salmonella* spp.). Sva tri uzorka u kojima je dokazana prisutnost *Salmonella*, uzeta su u kišnim uvjetima (3,5 mm, 27,4 mm i 70,3 mm). Slika 17. prikazuje udjele pojedinih patogena zabilježenih u ukupnom broju uzoraka morske vode.

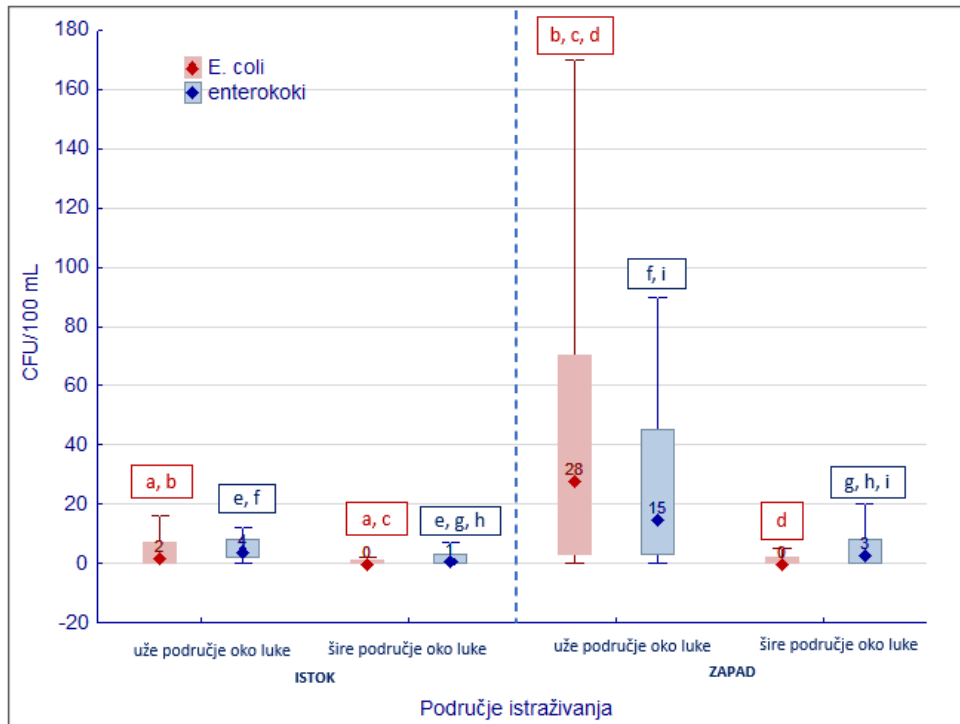


Slika 17. Prikaz udjela patogena u odnosu na ukupni ispitani broj uzoraka

## 4.3 Kakvoća mora na okolnim plažama

### 4.3.1 Mikrobiološki pokazatelji

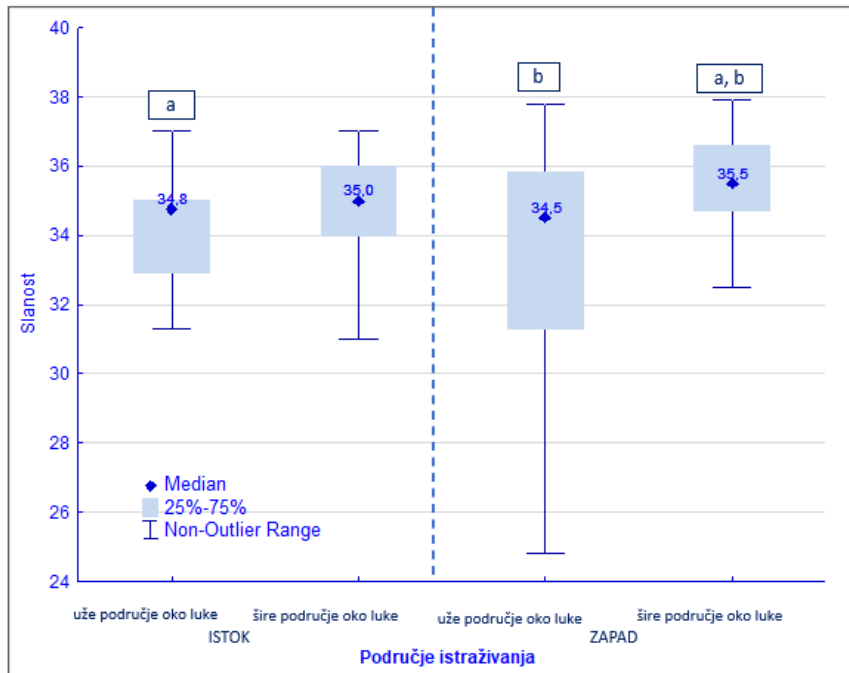
Uspoređeni su podaci koji su dobiveni analizom bakterija *E. coli* i crijevnih enterokoka na užem i širem obalnom području od luke Rijeka (Slika 18.). Zabilježeno je značajno veće opterećenje *E. coli* i enterokokima na zapadnoj obali užeg područja oko luke Rijeka ( $p < 0.05$ ). Utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji enterokoka u širem istočnom i zapadnom području oko luke Rijeka, dok za *E. coli* razlike nije bilo.



Slika 18. Usporedba koncentracija *Escherichia coli* i crijevnih enterokoka u morskoj vodi u užem i širem području oko luke Rijeka, s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema (⌈). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju. ( $p < 0.05$ ).

### 4.3.2 Salinitet

Statistički značajna razlika u salinitetu utvrđena je u zapadnom dijelu oko luke Rijeka između užeg (medijan 34,5) i šireg dijela (medijan 35,5). Razlike su također utvrđene između užeg istočnog (medijan 34,8) i šireg zapadnog područja (medijan 35,5). Na užem istočnom i zapadnom dijelu obale nije zabilježena statistički značajna razlika u vrijednosti saliniteta.



Slika 19. Usporedba koncentracije saliniteta u morskoj vodi u užem i širem području oko luke Rijeka, s prikazom medijana (♦), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema(⌋). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju. ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4 Korelacijska analiza

Korelacijska analiza provedena je u cilju utvrđivanja međusobne povezanosti ispitanih mikrobioloških pokazatelja. U Tablici 4. navedeni su korelacijski faktori ( $r_s$ ) uz razinu značajnosti od 0,05. Primjenom Spearmanove korelacijske analize u morskoj je vodi i sedimentu utvrđena značajna pozitivna korelacija UBB/37 s UBB/22 ( $r_s=0,69$ ,  $r_s=0,50$ ) i *C. perfringens* ( $r_s=0,28$ ,  $r_s=0,50$ ), *P. aeruginosa* s indikatorima fekalnog onečišćenja ( $r_s=0,42$  –  $0,77$ ,  $r_s=0,50$ ) i jednodnevnih oborina ( $r_s=0,25$ ,  $r_s=0,50$ ) te između svih indikatora fekalnog onečišćenja ( $r_s=0,60$  –  $0,92$ ,  $r_s=0,50$ ).

Tablica 4. Spearmanova korelacija ispitanih pokazatelja u vodi

	UBB/37	UBB/22	koliformne bakterije	<i>E. coli</i>	crijevni enterokoki	<i>C. perfringens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Oborine 1 dan
UBB/37	–	<b>0,69</b>	0,08	0,05	0,10	<b>0,28</b>	<b>0,11</b>	-0,13
UBB/22	<b>0,69</b>	–	0,08	0,05	0,07	0,21	<b>0,13</b>	0,02
koliformne bakterije	0,08	0,08	–	<b>0,92</b>	0,83	<b>0,69</b>	0,63	0,18
<i>E. coli</i>	0,05	0,05	<b>0,92</b>	–	0,71	<b>0,60</b>	0,59	0,15
crijevni enterokoki	0,10	0,08	<b>0,83</b>	<b>0,71</b>	–	<b>0,64</b>	0,77	0,07
<i>C. perfringens</i>	<b>0,28</b>	0,21	<b>0,69</b>	<b>0,60</b>	0,65	–	0,42	<b>0,26</b>
<i>P. aeruginosa</i>	0,12	0,13	<b>0,62</b>	<b>0,59</b>	0,77	<b>0,42</b>	–	0,09
Oborine 1 dan	0,00	0,24	0,13	0,05	0,10	0,16	0,25	–

\* tamnije otisnuti rs koeficijenti znak su statistički značajne korelacije

## 5 RASPRAVA

Danas velik javnozdravstveni problem predstavlja onečišćenje morskog okoliša. Stoga je praćenje kvalitete morske vode od velike važnosti za morski okoliš, ali i za ljudsko zdravlje. U ovom radu ispitano je mikrobiološko stanje morske vode i sedimenta u razdoblju od 10. mjeseca 2020. do 9. mjeseca 2021. godine. Ispitivanje je provedeno u najvećoj pomorskoj luci u Hrvatskoj, luci Rijeka. Cilj rada bio je utvrditi mikrobiološko opterećenje luke te potencijalni utjecaj na okolno rekreativno područje, istočno i zapadno od luke.

Uredba o kakvoći mora za kupanje 73/08 definira kvalitetu morske vode mjereći dva fekalna indikatorska mikroorganizma, *E. coli* te crijevne enterokoke. Osim što su ove bakterije pokazatelji fekalnog onečišćenja one ukazuju i na moguće prisustvo patogenih mikroorganizama. Tijekom ovog istraživanja najveće opterećenje bakterijama *E. coli* i crijevnim enterokokima zabilježeno je na lokaciji RI bwS. Maksimalna vrijednost *E. coli* zabilježena na ovoj lokaciji iznosila je 7560 CFU/100 ml, dok je maksimalna zabilježena koncentracija crijevnih enterokoka iznosila 4300 CFU/100ml. Mogući uzroci tome su: neposredna blizina ispusta Delta pročišćivača, ispusti nepročišćenih otpadnih voda koji su još uvijek aktivni na to dijelu obale te utjecaj balastnih voda koje ispuštaju brodovi koji uplovljavaju u riječku luku. Najmanje opterećena bila je lokacija JPG 28, koja je zbog veće udaljenosti lokacije od obale izloženija morskim strujama. Različita istraživanja su pokazala da na mjernim postajama udaljenima od luke nije zabilježen značajan porast fekalnih bakterija, dok je u mjernim područjima smještenima u blizini luke i gradskog naselja zabilježen značajan porast fekalnih bakterija, ponajviše *E. coli* te crijevnih enterokoka (41,42,43,52).

Obzirom na sezonsku distribuciju, najveće mikrobiološko opterećenje *E. coli* u luci Rijeka zabilježeno je u zimskom razdoblju (maksimalna koncentracija 5200 CFU/100ml), dok je maksimum crijevnih enterokoka u proljeće (4300 CFU/100 ml). Minimalne vrijednosti oba mjerena parametra zabilježene su u ljetnim mjesecima (maksimum *E. coli* 520 CFU/100 ml i crijevnih enterokoka 560 CFU/100 ml). Smatra se da je razlog smanjenoj koncentraciji u ljetnom razdoblju velik utjecaj UV zračenja. Naime zimski mjeseci su popraćeni učestalim padalinama i oblačnim danima, koji onemogućuju prolazak UV zrakama. Istraživanja ukazuju da UV zračenje značajno utječe na koncentracije *E. coli* u morskoj vodi, s najvećim baktericidnim djelovanjem je pri valnim duljinama od 320-360 nm (53). Također, u istraživanju Šolić i Krstulović utvrđeno je da se povećanjem intenziteta sunčevog zračenja smanjuje prisutnost fekalnih koliforma za čak 40 % (54). Tome u prilog ide i istraživanje koje dokazuje



kako *E. coli* u mraku preživljava 26 sati, dok u prisutnosti sunčevog zračenja preživljava svega 4 sata (55).

Iako se koncentracije mjerenih indikatora fekalnog onečišćenja u sedimenta na pojedinim postajama nisu se statistički značajno razlikovali, najveće opterećenje zabilježeno je na mjernoj postaji RI bwS. U ovisnosti o sezoni rezultati prikazuju najveće opterećenje sedimenta u ljetnom razdoblju gdje maksimalne koncentracije *E. coli* iznose 6 CFU/g dok koncentracija crijevnih enterokoka doseže koncentracije od 44 CFU/g. Zabilježene su više razine crijevnih enterokoka u odnosu na *E. coli*. Pokazalo se da u određenoj mjeri fekalne bakterije preživljavaju i rastu u sedimentima. Duže preživljavanje fekalnih bakterija u sedimentu prepisuje se većem sadržaju organske tvari u sedimentu nego u vodenom stupcu (57,58). Istraživanje provedeno u Iranu na obali Bushehra ukazuje da sediment predstavlja rezervoar indikatorskih bakterija te da koncentracija FIB opada s dubinom sedimenta (59). Hassard navodi da se bakterije vežu na površinu sedimenta jer im to pruža zaštitu od biotičkog i abiotičkog stresa (44) te u odnosu na morsku vodu omogućava lakše stvaranje biofilma (46).

Usporedbom dobivenih vrijednosti fekalnih indikatora u vodenom stupcu i sedimentu uočava se da srednja vrijednost *E. coli* u vodenom stupcu iznosi  $844,7 \pm 1476,0$  CFU/100 ml, a u sedimentu  $83,3 \pm 169,7$  CFU/100 g. Prema tome, broj *E. coli* je u vodenom stupcu za 10 puta veći u odnosu na sediment. Suprotno, koncentracija crijevnih enterokoka 1,5 puta je veća u sedimentu (sr. vr.  $891,7 \pm 1319,4$  CFU/100 ml) u odnosu na vodeni stupac (sr. vr.  $599,1 \pm 923,0$  CFU/100 ml). Brojne studije pokazuju veću postojanost FIB i patogena u sedimentu nego u vodenom stupcu (56). Istraživanje iz 1999. godine objašnjava da je razlog veće koncentracije fekalnih bakterija u sedimentu u odnosu na vodeni stupac posljedica manje propusnosti UV zraka do morskog dna (45). Djelovanjem valova i vjetrova omogućava se prijenos onečišćenja u šire područje oko luke (49). Dosadašnja istraživanja (43,47) naglašavaju potrebu za sustavnim analizama sedimenta jer su javnozdravstveni propisi usmjereni isključivo na analizu morske vode. Međutim, pod utjecajem morskih struja i vjetrova sediment postaje potencijalnim izvorom onečišćenja za ostala obalna područja u blizini luke.

Obradom rezultata ukupnog broja bakterija u vodenom stupcu zabilježeno je da su vrijednosti UBB/22 na svim mjernim postajama veće u odnosu na UBB/37. Najveće opterećenje zabilježeno je na lokaciji RI bwS gdje UBB/22 doseže 4000 CFU/ml, a UBB/37 doseže koncentraciju od 2600 CFU/ml. Od ostalih ispitanih mikrobioloških pokazatelja (koliformne bakterije, *C. perfringens*, *P. aeruginosa*) u vodenom stupcu, najveće opterećenje je zabilježeno na mjernoj postaji RI bwS. Moguć razlog povećanoj koncentraciji ispitanih

mikroorganizama na ovoj postaji je izravni utjecaj balastnih voda koje brodovi ispuštaju u more tokom istovara tereta. Ne treba isključiti niti mogućnost kontaminacije iz ispusta Delta, utjecaj dotoka slatke vode (Rječine) koja je mikrobiološki opterećena zbog potencijalnog utjecaja propusnih septičkih jama i ilegalnih ispusta te ispiranja tla.

Od svih ispitanih mikrobioloških pokazatelja, na svim lokacijama u sedimentu dominira prisutnost *C. perfringens*. Ova anaerobna bakterija pokazatelj je starije kontaminacije u morskom okolišu, a može ukazivati na prisutnost protozoa i enteričnih virusa (73). Dosadašnja istraživanja ukazuju pojavu *C. perfringens* u većim koncentracijama u uzorcima sedimenta iz neposredne blizine većih pomorskih luka (25). Država Hawaii uvrstila je *C. perfringens* u rutinsku analizu rekreacijskih voda, obzirom da tradicionalni FIB u tropskim područjima proliferiraju u okolišu (74).

Najveće vrijednosti UBB/37 zabilježene su na mjernoj postaji RI bwS, a UBB/22 na lokaciji JPG 28. Na lokaciji JPG 28 također je utvrđena najveća koncentracija *P. aeruginosa*, što je u skladu s činjenicom da je ona jedna od vrsta koje se često kultiviraju u skupini „UBB“. Potrebno je naglasiti da UBB i *Pseudomonas* nisu pokazatelji fekalnog zagađenja, ali ukazuju na ukupno mikrobiološko opterećenje lokacije. Istraživanja su pokazala da *Pseudomonas* bolje preživljava u pijesku na plaži nego u vodenom stupcu (26) te prema istraživanju provedenom 2019. ostaje zarobljen u kristalima soli nakon isparavanja morske vode, a kao takav ima i veliku sposobnost preživljavanja u soli (65). Rezultati našeg istraživanja to potvrđuju, obzirom da je u sedimentu medijan *P. aeruginosa* bilo 50 CFU/ml, a u vodenom stupcu 6 CFU/100 ml. Prema rezultatima različitih istraživanja, bilo dobro uvrstiti mikrobiološki pokazatelj *Pseudomonas* u ispitivanje kakvoće morske vode, obzirom na povezanost s infekcijama kože (64).

Bakterija roda *Vibrio* vrlo su rasprostranjena u morskom okolišu te su povezane s zdravstvenim tegobama ukoliko dođe do konzumacije kontaminirane hrane. U provedenom ispitivanju u 25,5 % (13/51) uzoraka detektirane su bakterije roda *Vibrio*, i to isključivo u uzorcima morske vode. *V. cholerae* non-O1/non-O139 dokazani su u 5,9 % uzoraka, *V. alginolyticus* u 13,7 % uzoraka, *V. fluvialis* u 3,9 %, *V. metschnikovii* u 2,0 % uzoraka. Ispitivanjem u Italiji 2019. godine (66) potvrđena je široka rasprostranjenost *Vibrio* u obalnim vodama Italije. Zabilježilo je slijedećih 9 vrsta iz roda *Vibrio*: *V. harveyi* (najčešće otkriven čak u 13/20 uzoraka), *V. cholerae* (druga najčešće detektirana vrsta), *V. parahaemolyticus* (treća najčešće detektirana vrsta), *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. diabolicus*, *V. owensii/hyugaensis*, i *V. rotiferanius*. Vrste koje su u ovom istraživanju najčešće detektirane uglavnom uzrokuju rane na koži te gastroenteritis. U ovom istraživanju *V. alginolyticus* raste u

mediju s većim koncentracijama soli, stoga je normalan stanovnik estuarija. Prijenos balastnim vodama je jedan od načina transporta bakterija roda *Vibrio* lako u druge luke. U balastnim vodama prisutni su brojni zooplanktoni od koji neki mogu biti prijenosnici *V. cholerae* i *V. alginolyticus* (67, 68). U istraživanju provedenom u zaljevu Chesapeake u Sjedinjenim Američkim državama (69) ispitani su spremnici balastnih voda brodova koji plove u različitim dijelovima svijeta. Analizom uzoraka vode, sedimenta i biofilma utvrđena je visoka koncentracija mikroorganizama u balastnim vodama i sedimentu. Temeljem podataka o broju mikroorganizama u uzorcima balastne vode i moru u koje se balast ispustio, procijenjeno je da su mikroorganizmi preživjeli u udjelu od čak 56 %. Pojavnost *V. fluvialis* povezuje se s područjima izloženim jačoj fekalnoj kontaminaciji. Tako su češće zaraze ovim sojem karakteristične za zemlje niskog životnog standarda i loših sanitarnih uvjeta (70).

Vrste roda *Vibrio*, *V. cholerae* O1 i O139 u ovom istraživanju nisu dokazani. Naime ove vrste izazivaju epidemijske kolere kod ljudi (akutni vodenasti proljev), a nerijetko dovode i do smrti (75, 76). Radi sve veće rasprostranjenosti ove vrste i radi lakog načina prenošenja putem balasta, ovaj se mikrobiološki pokazatelj uvrstio kao obvezan kod provjere sukladnosti s D2 standardom (BWM konvencija).

Bakterije *Salmonella* spp. otkrivene su u 5,9 % ispitanih uzoraka, i to isključivo u uzorcima morske vode te uz pojavu kiše tijekom uzorkovanja. Mogući izvor bakterija roda *Salmonella* su otpadne vode, koje u more dospijevaju iz različitih kopnenih ispusta, kao i utjecaj ušća Rječine. U literaturi su istraživanja koja uključuju *Salmonella* spp. relativno rijetka i s različitom pojavnošću ovih bakterija. Tako su prema rezultatima istraživanja provedenog u Malagi, od listopada 1988. do svibnja 1990. (71), patogeni mikroorganizmi, među kojima je i *Salmonella*, duže preživjeli u morskom sedimentu u odnosu na vodeni stupac. U istraživanju provedenom na 26 lokacija u pomorskoj luci u Napulju, Italiji, 2019. godine, ispitana je mikrobiološka kontaminacija, a *Salmonella* nije potvrđena niti u jednom uzorku (72).

Ispitivanjem kakvoće mora za kupanje na 29 plaža, istočno i zapadno od luke Rijeka (uže područje oko luke), dobiven je uvid da je zapadno područje oko luke Rijeka statistički značajno opterećenije *E. coli* i crijevnim enterokokima u odnosu na istočno područje. Kao jedan od mogućih razloga povećanog mikrobiološkog opterećenja na zapadnom području grada Rijeke, osim utjecaja balastnih voda, prisutnost je brojnih priobalnih izvora na tom dijelu obalnog pojasa. Također mogući razlozi povećanog mikrobiološkog opterećenja su nepriključenost pojedinih objekata u blizini obale na sustav javne odvodnje otpadnih voda, mogući ilegalni kanalizacijski ispusti, kao i neadekvatna odvodnja oborinskih voda. Prethodna istraživanja

pokazuju kako je upravo na plaži Kantrida smještenoj u užem zapadnom području luke Rijeka, zabilježena visoka koncentracija fekalnih bakterija. Ova plaža u tijekom više sezona kupanja ocjenjena je nezadovoljavajućom ocjenom. Generalno gledajući, nakon izgradnje kanalizacijskog sustava 2002. godine, onečišćenje Kantride je značajno smanjeno u odnosu na prethodna desetljeća. Međutim, prema recentnim rezultatima, problem ipak nije u potpunosti riješen (60).

Podaci saliniteta zabilježeni u ovom istraživanju pokazuju statistički značajne razlike između užeg i šireg zapadnog dijela oko luke Rijeka. Medijan vrijednosti saliniteta užeg zapadnog riječkog područja je niži (medijan 34,5) u odnosu na šire zapadno područje (medijan 35,5). Statistički značajna razlika zabilježena je i između užeg istočnog (medijan 34,8) i šireg zapadnog (medijan 35,5) obalnog područja. Razlog nižeg saliniteta na užem zapadnom području oko luke Rijeka su brojni izori te vrulje u blizini plaže Kantrida. Potencijalni uzrok smanjenja saliniteta u širem istočnom području luke Rijeka je utjecaj slatkovodnih dotoka na ušću Rječine, koja su često mikrobiološki opterećena. Salinitet se može ukazati na moguće onečišćenje obalnog mora, jer je njegovo sniženje povezano s utjecajem slatkih voda koje nerijetko pronose mikrobiološko opterećenje. U brojnim istraživanjima je potvrđeno da su niže vrijednosti saliniteta povezane s povišenim koncentracijama mikroorganizama te se upravo stoga salinitet, uz indikatore fekalnog onečišćenja, rutinski mjeri tijekom monitoringa kakvoće mora za kupanje (61, 62, 63). Okolišni čimbenici koji utječu na smanjenje broja mikroorganizama u morskoj vodi su sunčeva svjetlost, povećana slanost, niske koncentracije hranjivih tvari, predatorstvo i parazitizam. Upravo se kombinacijom navedenih čimbenika razine fekalnih bakterija brzo reduciraju. Jozić i sur. (54) tako navode da salinitet nema statistički značajan utjecaj na *E. coli*, ali se kombinacijom utjecaja sunčeve svjetlosti i povećanjem saliniteta bilježi smanjenje broja fekalnih bakterija.

Rezultati ovog istraživanja pružaju nam uvid u razinu mikrobiološkog opterećenja u riječkoj luci. Pri tome svakako treba istaknuti jače mikrobiološko opterećenje prisutno u morskom sedimentu. Redovita analiza sedimenta, uz veći broj ispitanih parametara doprinijela bi sveobuhvatnijem praćenju kvalitete morske vode. Na taj način imali bi više informacija o stanju morske vode i sedimenta u pomorskim lukama, o njihovom utjecaju na okolna obalna područja te u konačnici na zdravlje ljudi.

## 6 ZAKLJUČAK

- U luci Rijeka najveće opterećenje vodenog stupca bakterijama *E. coli* i crijevnim enterokokima zabilježeno je na mjernoj postaji RI bwS
- U vodenom stupcu minimalne koncentracije *E. coli* i crijevnih enterokoka zabilježene su u ljetnom razdoblju
- Sediment je najopterećeniji *E. coli* i crijevnim enterokokima na lokaciji RI bwS
- Sediment je najopterećeniji *E. coli* i crijevnim enterokokima u ljetnom razdoblju
- Postaja najopterećenija s UBB/37 i UBB/22 je RI bwS
- Vodeni stupac na postaji RI bwS najopterećeniji je koliformnim bakterijama, *C. perfringens* i *P. aeruginosa*
- Sediment je najopterećeniji UBB/37 na mjernoj postaji RI bwS, dok je s UBB/22 najopterećeniji na mjernoj postaji JPG 28
- Sediment je najopterećeniji bakterijom *C. perfringens* na svim mjernim postajama, dok se najveće opterećenje s bakterijom *P. aeruginosa* bilježi na lokaciji JPG 28
- Sediment je opterećeniji UBB, *C. perfringens* i *P. aeruginosa*, dok je vodeni stupac opterećeniji koliformnim bakterijama
- Koncentracije *E. coli* 10 puta je veće u vodenom stupcu, u odnosu na sediment, a koncentracija crijevnih enterokoka je 1,5 puta veća u sedimentu u odnosu na vodeni stupac
- Vrste roda *Vibrio* dokazane su u 25,5 % uzoraka, isključivo u uzorcima morske vode, *V. cholerae* non-O1/non-O139 dokazani su u 5,9 % uzoraka, *V. alginolyticus* u 13,7 % uzoraka, *V. fluvialis* 3,9 % te *V. metschnikovii* u 2,0 % ispitanih uzoraka
- *V. cholerae* O1 i O139 nisu dokazani u ni jednom ispitanom uzorku
- *Salmonella* spp. dokazana je u 5,9 % ispitanih uzoraka
- Najveće opterećenje *E. coli* i crijevnim enterokokima bilježi se na zapadnoj obali užeg područja oko luke Rijeka
- Statistički značajna razlika u salinitetu utvrđena je između užeg i šireg zapadnog dijela oko luke Rijeka, te između užeg istočnog i šireg zapadnog područja oko luke Rijeka
- Korelacijskom analizom utvrđena je značajna pozitivna korelacija UBB/37 s UBB/22 i *C. perfringens*, *P. aeruginosa* s indikatorima fekalnog onečišćenja i jednodnevnih oborina te između svih ispitanih indikatora fekalnog onečišćenja.

## 7 LITERATURA

1. Milošević Pujo B., Radovan, H.: Sprječavanje onečišćenja mora po MARPOL konvenciji, *Naše more*, 52 (5-6), br. 231-234, 2005.
2. Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja: Staništa i ekosustavi, URL: <http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-iocuvanje/stanista-iekosustavi/more> (pristupljeno 27.03.2024.)
3. International maritime organization. Implementing the Ballast Water Management Convention [Internet]. 2017. Available from: <https://www.imo.org/en/MediaCentre/HotTopics/Pages/Implementing-the-BWM-Convention.aspx>
4. Lončarić G. Brodske balastne vode i njihov utjecaj na morski okoliš (Završni rad) [Internet] p.2,13-19. Available from: [file:///C:/Users/Korisnik/Downloads/goran\\_loncaric\\_zavrсни\\_rad.pdf](file:///C:/Users/Korisnik/Downloads/goran_loncaric_zavrсни_rad.pdf)
5. The GloBallast Story: Reflections from a Global Family. GloBallast Monograph Series No.25. 2017. p.12,20,58. Available from: [https://wwwcdn.imo.org/localresources/en/MediaCentre/HotTopics/Documents/Monograph%2025\\_The%20GloBallast%20Story\\_LR%20-%20rev%201.pdf](https://wwwcdn.imo.org/localresources/en/MediaCentre/HotTopics/Documents/Monograph%2025_The%20GloBallast%20Story_LR%20-%20rev%201.pdf)
6. Kraus, R.; Baljak, V.; Vukić Lušić, D.; Krančević, L.; Cenov, A.; Glad, M.; Kauzlarić, V.; Lušić, D.; Grbčić, L.; Alvir, M.; et al. Impacts of Atmospheric and Anthropogenic Factors on Microbiological Pollution of the Recreational Coastal Beaches Neighboring Shipping Ports. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, 19, 8552. <https://doi.org/10.3390/ijerph19148552>
7. Workshop on the Review of the Bathing Water Directive (2006/7/EC)
8. Mrša Haber I. Simuliranje širenja onečišćenja mora kvarnerskog zaljeva iz priobalnih ispusta (Doktorska disertacija) [Internet]. 2006. p. 6-12 Available from : <https://dr.nsk.hr/en/islandora/object/riteh%3A229/datastream/PDF/view>
9. Zaninović, K., Gajić-Čapka, M., Perčec Tadić, M. et al, 2008: Klimatski atlas Hrvatske / Climate atlas of Croatia 1961–1990., 1971–2000. Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb, 200 str.
10. Arko Pijevac M. (2008) Biološka i geološka valorizacija kvarnerskog područja (sjeverni jadransko more-hrvatsko blago, 862-875. Raspoloživo na: <https://morehrvatskoblagofiles.wordpress.com/2016/03/69-m-a-pijevac.pdf>

11. Marelić, T. (2016). 'Utjecaj vjetra na organizaciju jedrenjačke plovidbe na hrvatskom dijelu Jadrana', *Geoadria*, 21(2), str. 211-236. <https://doi.org/10.15291/geoadria.21>
12. Kozličić, M., i Uglešić, S. (2013). 'Senj u peljarima jadrana od kraja 18. do kraja 19. Stoljeća', *Senjski zbornik*, 40(1), str. 547-582. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/129812> (Datum pristupa: 31.03.2024.)
13. Ćorić, F. (2022). 'Usporedba mikrobioloških i fizikalno-kemijskih parametara kvalitete bazenske vode: bazeni punjeni slatkom vodom vs morskom vodom', Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, citirano: 01.04.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:103668>
14. Kolarić, D. (2019). 'Utjecaj escherichia coli na preživljavanje i razmnožavanje francisella novicida u vodi', Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, citirano: 01.04.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:464285>
15. Adamović, A. (2010). 'Preživljavanje bakterija Escherichia coli i Acinetobacter junii pri različitim koncentracijama natrijevog klorida', Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, citirano: 01.04.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:053200>
16. Repac Antić, D., et al. (2018). 'Fenotipska karakterizacija i antimikrobni profil uropatogenih enterokoka', *Medicina Fluminensis*, 54(3), str. 304-311. [https://doi.org/10.21860/medflum2018\\_203561](https://doi.org/10.21860/medflum2018_203561)
17. Ptiček Siročić, A., et al. (2021). 'Analiza kakvoće vode u javnim i lokalnim vodoopskrbnim sustavima', *Hrvatske vode*, 29(117), str. 169-174. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/271251> (Datum pristupa: 01.04.2024.)
18. Radojković, D. (2021). 'Preživljavanje bakterije salmonella enteritidis u kokošjim jajima iz slobodnog uzgoja', Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, citirano: 01.04.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:741828>
19. Pejić, S. (2014). 'Prisutnost i uklanjanje mikroorganizama u vodama različitog podrijetla: završni rad', Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, citirano: 21.03.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:732821>
20. Djurdjević, I. (2014). 'Bakterije porodice Enterobacteriaceae : završni rad', Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, citirano: 01.04.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:788398>
21. Pravilnik o upravljanju i nadzoru balastnih voda (NN 128/2012). Dostupno na: [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012\\_11\\_128\\_2733.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_11_128_2733.html)

22. Huskić, A. (2023). 'Pojavnost *P. aeruginosa* u moru za kupanje na području grada Rijeke', Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, citirano: 01.04.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:586686>
23. Kovačić, A., et al. (2018). 'Preživljavanje bakterije *Pseudomonas aeruginosa* u destiliranoj vodi', *Hrvatske vode*, 26(105), str. 181-186. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/205803> (Datum pristupa: 01.04.2024.)
24. Skanavis C., Yanko W.A., *Clostridium perfringens* as a potential indicator for the presence of sewage solids in marine sediments, Volume 42, Issue 1, January 2001, Pages 31-35
25. Chiaretti G, Onorati F, Borrello P, Orasi A, Mugnai C. Coastal microbial quality of surface sediments in different environments along the Italian coast. *Environ Sci Process Impacts*. 2014 Sep 20;16(9):2165-71. doi: 10.1039/c4em00225c. Epub 2014 Jun 30. PMID: 24977391.
26. Mohammed R.L., Echeverry A., Stinson C.M., Green M., Bonilla T.D., Hartz A., McCorquodale D.S., Rogerson A., Esiobu N., Survival trends of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Clostridium perfringens* in a sandy South Florida beach, Volume 64, Issue 6, June 2012, Pages 1201-1209
27. Curiel-Ayala F., Quiñones-Ramírez E.I., Pless R.C., González-Jasso E., Comparative studies on *Enterococcus*, *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* as quality indicators in tropical seawater at a Pacific Mexican beach resort, Volume 64, Issue 10, October 2012, Pages 2193-2198
28. Hussain I., Aravamudan V.M., Khan S.R., *Clostridium difficile* Infection in Liver Cirrhosis Carries a Higher Risk of Mortality: A Comprehensive Literature Review, Volume 11, Issue 8
29. Fujioka R.S., Solo-Gabriele H.M., Byappanahalli M.N., Kirs M., U.S. Recreational Water Quality Criteria: A Vision for the Future, Volume 12, 2015, Pages 7752-7776
30. Ashbolt N.J., Schoen M.E., Soller J.A., Roser D.J., Predicting pathogen risks to aid beach management: The real value of quantitative microbial risk assessment (QMRA), Volume 44, Issue 16, September 2010, Pages 4692-4703
31. Kokashvili T. i sur. Occurrence and Diversity of Clinically Important *Vibrio* Species in the Aquatic Environment of Georgia. Volume 3, Article 232, November 2015..
32. Håkonsholm F., Lunestad B.T., Aguirre Sánchez J.R., Martinez-Urtaza J., Prakash Marathe N., Smith Svanevik C., *Vibrios* from the Norwegian marine environment:



Characterization of associated antibiotic resistance and virulence genes, Volume 9, Issue 9

33. Osunla CA, Okoh AI, Vibrio Pathogens: A Public Health Concern in Rural Water Resources in Sub-Saharan Africa., 2017. Volume 14, Pages 1188
34. Bonadonna L., Briancesco R., Suffredini E., Coccia A., Della Libera S., Carducci A., Verani M., Federigi I., Iaconelli M., Bonanno Ferraro G., Mancini P., Veneri C., Ferretti E., Lucentini L., Gramaccioni L., La Rosa G., Enteric viruses, somatic coliphages and Vibrio species in marine bathing and non-bathing waters in Italy, Marine Pollution Bulletin, Volume 149, 2019.
35. Davis B. J. K., Jacobs J. M., Zaitchik B., DePaola A., Curriero F. C., Vibrio parahaemolyticus in the Chesapeake Bay: Operational In Situ Prediction and Forecast Models Can Benefit from Inclusion of Lagged Water Quality Measurements, 2019, Vol. 85, No. 17
36. D. Kapetanović i sur.: Određivanje heterotrofnih bakterija u uzgajalištima, Croatian Journal of Fisheries, 70, 2012, Supplement 1, S29-S37.
37. Jang, J. et. al. (2015) Dynamic changes in the population structure of Escherichia coli in the Yeongsan River basin of South Korea. FEMS Microbiol Ecol, 91
38. Tomić Linšak, D., Gašaj, A., i Gobin, I. (2021). 'Preživljavanje legionela u morskoj vodi', Hrvatske vode, 29(116), str. 75-82. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/261220> (Datum pristupa: 02.05.2024.)
39. Gian Marco Luna, i sur., Status of faecal pollution in ports: A basin-wide investigation in the Adriatic Sea, Marine Pollution Bulletin, Volume 147, 2019, Pages 219-228, ISSN 0025-326X, Preuzeto s: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.050>.
40. Chiaretti, G., Onorati, F., Borrello, P., Orasi, A., Mugnai, C., 2014. Coastal microbial quality of surface sediments in different environments along the Italian coast. Environ. Sci.: Processes Impacts 16, 2165–2171.
41. Quero, G.M., Fasolato, L., Vignaroli, C., Luna, G.M., 2015. Understanding the association of Escherichia coli with diverse macroalgae in the lagoon of Venice. Sci. Rep. 5, 10969.
42. Perini, L., Quero, G.M., García, E.S., Luna, G.M., 2015. Distribution of Escherichia coli in a coastal lagoon (Venice, Italy): temporal patterns, genetic diversity and the role of tidal forcing. Water Res. 87, 155–165.
43. Luna GM, Vignaroli C, Rinaldi C, Pusceddu A, Nicoletti L, Gabellini M, Danovaro R, Biavasco F. Extraintestinal Escherichia coli carrying virulence genes in coastal marine

- sediments. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Sep;76(17):5659-68. doi: 10.1128/AEM.03138-09. Epub 2010 Jul 2. PMID: 20601507; PMCID: PMC2935034.
44. Hassard, F., Gwyther, C.L., Farkas, K., Andrews, A., Jones, V., Cox, B., Brett, H., Jones, D.L., McDonald, J.E., Malham, S.K., 2016. Abundance and distribution of enteric bacteria and viruses in coastal and estuarine sediments – a review. *Front. Microbiol.* 7, 1692.
45. Lester W. Sinton, Rochelle K. Finlay, and Philippa A. Lynch, Sunlight Inactivation of Fecal Bacteriophages and Bacteria in Sewage-Polluted Seawater, October 1999., Christchurch Science Centre, Institute of Environmental Science and Research Ltd.
46. Decho AW.. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. July 2000., *Cont Shelf Res* 20: 1257-1273
47. Lee CM, Lin TY, Lin CC, Kohbodi GA, Bhatt A, Lee R, Jay JA. Persistence of fecal indicator bacteria in Santa Monica Bay beach sediments. *Water Res.* 2006 Aug;40(14):2593-602. doi: 10.1016/j.watres.2006.04.032. Epub 2006 Jun 21. PMID: 16793111.
48. Karbasdehi VN, Dobaradaran S, Nabipour I, Ostovar A, Arfaeina H, Vazirizadeh A, Mirahmadi R, Keshtkar M, Ghasemi FF, Khalifei F. Indicator bacteria community in seawater and coastal sediment: the Persian Gulf as a case. *J Environ Health Sci Eng.* 2017 Mar 10;15:6. doi: 10.1186/s40201-017-0266-2. PMID: 28293427; PMCID: PMC5345169.
49. Youn-Joo An, Donald H Kampbell, G Peter Breidenbach, *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas, *Environmental Pollution*, Volume 120, Issue 3, 2002, Pages 771-778, ISSN 0269-7491, [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00173-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00173-2).
50. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol.* 2017 Sep;123(3):570-581. doi: 10.1111/jam.13468. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28383815.
51. R.T Noble, D.F Moore, M.K Leecaster, C.D McGee, S.B Weisberg, Comparison of total coliform, fecal coliform, and enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing, *Water Research*, Volume 37, Issue 7, 2003, Pages 1637-1643, ISSN 0043-1354, [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00496-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00496-7)
52. Dheenan PS, Jha DK, Das AK, Vinithkumar NV, Devi MP, Kirubakaran R. Geographic information systems and multivariate analysis to evaluate fecal bacterial pollution in

- coastal waters of Andaman, India. *Environ Pollut.* 2016 Jul;214:45-53. doi: 10.1016/j.envpol.2016.03.065. Epub 2016 Apr 8. PMID: 27061474.
53. Jozić, Slaven & Morović, Mira & Solic, Mladen & Krstulovic, Nada & Ordulj, Marin. (2014). Effect of solar radiation, temperature and salinity on the survival of two different strains of *Escherichia coli*. *Fresenius Environmental Bulletin.* 23. 1852-1859.
54. Šolić, Mladen & Krstulović, Nada. (1992). Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity, and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Marine Pollution Bulletin.* 24. 411-416. 10.1016/0025-326X(92)90503-X.
55. Chandran, Abhirosh & Abdulla, Mohamed Hatha. (2003). Survival of *Escherichia coli* in a tropical estuary. *The South Pacific Journal of Natural Science.* 21. 10.1071/SP03008.
56. Cheung, Pui Kwan & Yuen, Ka & Li, Ping Fai & Lau, Wai & Chiu, Chung & Yuen, Suet & Baker, David. (2015). To swim or not to swim? A disagreement between microbial indicators on beach water quality assessment in Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin.* 101. 10.1016/j.marpolbul.2015.11.029.
57. Gerba, C. P., and J. S. McLeod. 1976. Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:114–120.
58. Davies CM, Long JA, Donald M, Ashbolt NJ. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol.* 1995 May;61(5):1888-96. doi: 10.1128/aem.61.5.1888-1896.1995. PMID: 7646026; PMCID: PMC167451.
59. Karbasdehi VN, Dobaradaran S, Nabipour I, Ostovar A, Arfaeina H, Vazirizadeh A, Mirahmadi R, Keshtkar M, Ghasemi FF, Khalifei F. Indicator bacteria community in seawater and coastal sediment: the Persian Gulf as a case. *J Environ Health Sci Eng.* 2017 Mar 10;15:6. doi: 10.1186/s40201-017-0266-2. PMID: 28293427; PMCID: PMC5345169.
60. Topić, N. (2016). 'Kakvoća mora za kupanje na plaži Kantrida u Rijeci 1998.-2015.', Završni rad, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, citirano: 08.05.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:548964>
61. Ortega C, Solo-Gabriele HM, Abdelzaher A, Wright M, Deng Y, Stark LM. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical Estuary. *Mar Pollut Bull.* 2009;58(9):1374-1381
62. Bordalo AA, Onrassami R, Dechsakulwatana C. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand). *J Appl Microbiol.* 2002;93(5):864-71. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01760.x. PMID: 12392534.

63. Gerba C.P., Goyal S.M., LaBelle R.L., Cech I., Bodgan G.F. 1979. Failure of Indicator Bacteria to Reflect the Occurrence of Enteroviruses in Marine Waters. *AJPH*. 69, 11, 1116-1119.
64. Esiobu N, Mohammed R, Echeverry A, Green M, Bonilla T, Hartz A, McCorquodale D, Rogerson A. The application of peptide nucleic acid probes for rapid detection and enumeration of eubacteria, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in recreational beaches of S. Florida. *J Microbiol Methods*. 2004 May;57(2):157-62. doi: 10.1016/j.mimet.2003.12.005. PMID: 15063055.
65. Elabed H, González-Tortuero E, Ibacache-Quiroga C, Bakhrouf A, Johnston P, Gaddour K, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. Seawater salt-trapped *Pseudomonas aeruginosa* survives for years and gets primed for salinity tolerance. *BMC Microbiol*. 2019 Jun 24;19(1):142. doi: 10.1186/s12866-019-1499-2. PMID: 31234794; PMCID: PMC6591848.
66. Bonadonna L, Briancesco R, Suffredini E, Coccia A, Della Libera S, Carducci A, Verani M, Federigi I, Iaconelli M, Bonanno Ferraro G, Mancini P, Veneri C, Ferretti E, Lucentini L, Gramaccioni L, La Rosa G. Enteric viruses, somatic coliphages and *Vibrio* species in marine bathing and non-bathing waters in Italy. *Mar Pollut Bull*. 2019 Dec;149:110570. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.110570. Epub 2019 Sep 8. PMID: 31542593.
67. Pećarević, Marijana & Mikuš, Josip & Bratoš Cetinić, Ana & Marčelja, E. & Bonacic, Krno & Brailo, Marina & Lovrić, J.. (2012). Effect of the ballast water treatment system on survival of natural zooplankton communities onboard the vessel Naše more. *Nase More*. 59. 243-253.
68. Di Renzo L, Di Francesco G, Profico C, Di Francesco CE, Ferri N, Averaimo D, Di Guardo G. *Vibrio parahaemolyticus*- and *V. alginolyticus*-associated meningo-encephalitis in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the Adriatic coast of Italy. *Res Vet Sci*. 2017 Dec;115:363-365. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.06.023. Epub 2017 Jul 1. PMID: 28709108.
69. Lisa A. Drake, Martina A. Doblin, Fred C. Dobbs, Potential microbial bioinvasions via ships' ballast water, sediment, and biofilm, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 55, Issues 7–9, 2007, Pages 333-341, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.11.007>.

70. Igbiosa EO, Okoh AI. *Vibrio fluvialis*: an unusual enteric pathogen of increasing public health concern. *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Oct;7(10):3628-43. doi: 10.3390/ijerph7103628. Epub 2010 Oct 12. PMID: 21139853; PMCID: PMC2996184.
71. Martinez-Manzanares, E., Moriñigo, M. A., Castro, D., Balebona, M. C., Sanchez, J. M. & Borrego, J. J. 1992. Influence of the faecal pollution of marine sediments on the microbial content of shellfish. *Marine Pollution Bulletin*, 24, 342-349.
72. Sciarrillo, Rosaria & Zuzolo, Daniela & Cicchella, Domenico & Iannone, Francesco & Cammino, Gennaro & Guarino, Carmine. (2019). Contamination and ecological risk assessment of the seaport of Naples (Italy): Insights from marine sediments. *Journal of Geochemical Exploration*. 210. 106449. 10.1016/j.gexplo.2019.106449.
73. Qazi A. Hussain, Chapter 10 - Bacteria: the natural indicator of environmental pollution, Editor(s): Suhaib A. Bandh, Sana Shafi, Nowsheen Shameem, *Freshwater Microbiology*, Academic Press, 2019, Pages 393-420, ISBN 9780128174951, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00010-4>
74. Dale W. Griffin, Erin K. Lipp, Molly R. McLaughlin, Joan B. Rose, *Marine Recreation and Public Health Microbiology: Quest for the Ideal Indicator*: This article addresses the historic, recent, and future directions in microbiological water quality indicator research, *BioScience*, Volume 51, Issue 10, October 2001, Pages 817–825, [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0817:MRAPHM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0817:MRAPHM]2.0.CO;2)
75. Schets, Franciska. (2011). The microbiological safety of bathing water – Waterborne pathogens beyond bathing water legislation.
76. Bonadonna L, Briancesco R, Suffredini E, Coccia A, Della Libera S, Carducci A, Verani M, Federigi I, Iaconelli M, Bonanno Ferraro G, Mancini P, Veneri C, Ferretti E, Lucentini L, Gramaccioni L, La Rosa G. Enteric viruses, somatic coliphages and *Vibrio* species in marine bathing and non-bathing waters in Italy. *Mar Pollut Bull*. 2019 Dec;149:110570. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.110570. Epub 2019 Sep 8. PMID: 31542593.

## 8 POPIS SLIKA

Slika 1. Jadransko more - Kvarnerski zaljev (Google karte 2024.) .....	2
Slika 2. Mapa prikazuje lokacije uzorkovanja (označene crnim krugovima) .....	13
Slika 3. (A) Plavom bojom su označene točke uzorkovanja istočno i zapadno od luke Rijeka; (B) prikaz udaljenost mjesta uzorkovanja od luke (6) .....	14
Slika 4. Jednostavni prikaz "pour plate" metode (Izvor: <a href="https://microbenotes.com/pour-plate-technique-procedure-significance-advantages-limitations/">https://microbenotes.com/pour-plate-technique-procedure-significance-advantages-limitations/</a> ) .....	16
Slika 5. Koncentracija Escherichia coli i crijevnih enterokoka prema lokacijama s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema( $\top$ ). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ). .....	21
Slika 6. Koncentracija Escherichia coli i crijevnih enterokoka ovisno o sezoni s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema( $\top$ ). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ). .....	22
Slika 7. Razina E. coli i crijevnih enterokoka analiziranih u uzorku sedimenta ovisno o mjestu uzorkovanja s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema( $\top$ ). Lokacije se statistički značajno ne razlikuju ( $p > 0,05$ ). .....	23
Slika 8. Razina E. coli i crijevnih enterokoka analiziranih u uzorku sedimenta u ovisnosti o sezoni s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema( $\top$ ). .....	24
Slika 9. Usporedba koncentracija Escherichia coli i crijevnih enterokoka u morskoj vodi i sedimentu prema lokacijama s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema( $\top$ ). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ). .....	25
Slika 10. Usporedba koncentracija Escherichia coli i crijevnih enterokoka u morskoj vodi i sedimentu u ovisnosti o sezoni s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema( $\top$ ). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ). .....	27
Slika 11. Usporedba koncentracija UBB pri 37°C i 22°C u vodenom stupcu ovisno o mjestu uzorkovanja s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona rezultata bez ekstrema( $\top$ ). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ) .....	28
Slika 12. Usporedba koncentracija koliformnih bakterija, C. perfringens i P. aeruginosa u vodenom stupcu ovisno o postaji s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25 % - 75 % percentila ( $\square$ ) i raspona	

rezultata bez ekstrema(⊥). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju (p<0,05). .....	29
Slika 13. Usporedba koncentracija UBB pri 37 °C i 22 °C u uzorcima sedimenta u ovisnosti o postajama s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema(⊥). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju (p<0,05). ....	30
Slika 14. Usporedba koncentracija koliformnih bakterija, <i>C. perfringens</i> i <i>P. aeruginosa</i> u vodenom stupcu ovisno o postaji s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema(⊥). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju (p<0,05). .....	31
Slika 15. Usporedba koncentracija UBB pri 37 °C i 22 °C u vodenom stupcu i sedimentu s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema(⊥). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju (p<0,05). .....	32
Slika 16. Usporedba koncentracija koliformnih bakterija, <i>C. perfringensa</i> i <i>P. aeruginosa</i> u vodenom stupcu ovisno o postaji s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema(⊥). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju (p<0,05). .....	33
Slika 17. Prikaz udjela patogena u odnosu na ukupni ispitani broj uzoraka.....	34
Slika 18. Usporedba koncentracija <i>Escherichia coli</i> i crijevnih enterokoka u morskoj vodi u užem i širem području oko luke Rijeka, s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema(⊥). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju. (p<0.05). .....	35
Slika 19. Usporedba koncentracije saliniteta u morskoj vodi u užem i širem području oko luke Rijeka, s prikazom medijana (◇), 25 % - 75 % percentila (□) i raspona rezultata bez ekstrema(⊥). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju. (p<0.05). ...	36

## **ŽIVOTOPIS**

Evita-Lara Brkić rođena je 24.12.1998. godine u Zgrebu. Osnovnu školu Braće Seljan pohađala je i završila u Karlovcu u razdoblju od 2005.-2013., paralelno je završila i osnovnu glazbenu školu. Nakon završena dva razreda matematičke gimnazije u Karlovcu prebacuje se na opći smjer koji završava 2017. godine. Redoviti studij Sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci upisuje 2018. godine. Od 6. godine bavila se kickboxingom, u kojem joj je najveće dostignuće bila bronca na Svjetskom prvenstvu 2014. Redoviti je darivatelj krvi od 2021.godine, a uz studij povremeno je radila na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo u Primorsko-goranskoj županiji te je sudjelovala u organizacijskom odboru studentskog kongresa Sanitas. Preddiplomski studij Sanitarnog inženjerstva završava 2022. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, nakon čega nastavlja svoje obrazovanje na diplomskom studiju.