

Pojavnost *P. aeruginosa* u moru za kupanje na području grada Rijeke

Huskić, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:586686>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Andrea Huskić

POJAVNOST *P. aeruginosa* U MORU ZA KUPANJE NA PODRUČJU GRADA RIJEKE

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Andrea Huskić

POJAVNOST *P. aeruginosa* U MORU ZA KUPANJE NA PODRUČJU GRADA RIJEKE

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

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

Diplomski rad obranjen je dana 20.09.2023. u/na

Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

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

Rad sadrži 56 stranica, 33 slike, 3 tablice, 41 literaturni navod.

ZAHVALA

Najveće hvala na prenesenom znanju, savjetima, izdvojenom vremenu i trudu pri pisanju ovog rada upućujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Dariji Vukić Lušić.

Zahvaljujem kolegi Bruni Kovaču na pomoći prilikom uzimanja uзорaka.

U konačnici, zahvaljujem svojoj majci i prijateljima na neizmjernoj podršci tijekom cijelog mog obrazovanja.

SADRŽAJ:

1	UVOD.....	1
1.1	Monitoring kakvoće mora za kupanje.....	1
1.1.1	Klasifikacija mora za kupanje	1
1.2	Fekalno onečišćenje.....	3
1.2.1	Indikatori fekalnog onečišćenja.....	4
1.2.1.1	Rutinski indikatori fekalnog onečišćenja	5
1.2.1.1.1	<i>Escherichia coli</i>	5
1.2.1.2	Kolifagi i humani virusi.....	7
1.2.1.3	Ostali mikrobiološki pokazatelji (<i>Clostridium perfringens</i>).....	8
1.2.2	Ostali mikrobiološki rizici	9
1.2.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.3	Zakonska legislativa i ostali relevantni dokumenti	11
1.3.1	EU Direktiva o vodi za kupanje (2006/7/EC) i nova u pripremi.....	11
1.3.2	Nacionalna Uredba o kakvoći mora za kupanje (NN 73/2008).....	13
1.3.3	WHO smjernice za kvalitetu rekreacijskih voda (2021.).....	15
1.3.4	WHO preporuke za vode za kupanje (2018.)	16
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	18
3	MATERIJALI I METODE.....	19
3.1	Područje istraživanja	19
3.2	Uzorkovanje	22
3.3	Fizikalno kemijski pokazatelji.....	23
3.4	Količina oborina i jakost Sunčevog zračenja (DHMZ)	24
3.5	Mikrobiološki pokazatelji	24
3.5.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3.5.2	Ostali mikrobiološki pokazatelji.....	26
3.5.2.1	Ukupni broj kolonija.....	26
3.5.2.2	Enterokoki	28
3.5.2.3	<i>Escherichia coli</i>	29
3.5.2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.5.2.5	<i>Clostridium perfringens</i>	31
3.6	Statistička obrada podataka	32
4	REZULTATI	33
4.1	Fizikalno-kemijski parametri.....	33
4.1.1	Temperatura morske vode	33
4.1.2	Salinitet.....	34
4.1.3	pH vrijednost	35
4.1.4	Mutnoća.....	36
4.2	Mikrobiološki pokazatelji.....	37
4.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
4.2.2	Ostali mikrobiološki pokazatelji.....	41
4.2.2.1	Broj kolonija pri 22 °C	41
4.2.2.2	<i>Escherichia coli</i>	42
4.2.2.3	Enterokoki	43
4.2.2.4	<i>Clostridium perfringens</i>	44
5	RASPRAVA.....	46
6	ZAKLJUČCI.....	50
7	LITERATURA.....	51

SAŽETAK

Monitoring kakvoće mora za kupanje provodi se prema Uredbi o kakvoći mora za kupanje (NN 73/08) a rutinski mikrobiološki parametri su indikatori fekalnog onečišćenja (*E. coli* i crijevni enterokoki). Fekalno onečišćenje nastaje kada u vodi dospiju mikroorganizmi koji uzrokuju bolesti, a čiji izvor su ljudski i životinjski izmet te izlučevine. Uz rutinske pokazatelje fekalne kontaminacije, prema preporuci Svjetske zdravstvene organizacije mogu se ispitivati i dodatni mikrobiološki pokazatelji, kao *Pseudomonas aeruginosa*. To je bakterija sveprisutna u okolišu, koja uzrokuje kožne osipe te infekcije oka i uha nakon izloženosti kontaminiranoj vodi ili moru. Cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje pojavnosti i koncentracije *P. aeruginosa* u moru za kupanje na području urbanih plaža zapadnog dijela grada Rijeke (Kantrida), u različitim okolišnim uvjetima. Uzorkovanje se provodilo na četiri plaže, i šest lokacija: 3. Maj, Kantrida istok i zapad, nogometno igralište, Ploče istok i zapad. Tijekom istraživanja provedena su dva uzorkovanja u razdoblju od 2.2.2023. do 27.02.2023. Prvo uzorkovanje bilo je tijekom sušnog razdoblja, a drugo tijekom kišnog. Dodatno, obrađeni su i podaci dodatnog intenzivnog istraživanja koje se provodilo u razdoblju od 2012. do 2014., godine na istim lokacijama. Za ispitivanje *P. aeruginosa* u uzorcima morske vode primijenjena je ISO norma HRN EN ISO 16266:2008. Rezultati istraživanja su pokazali da na pojavnost *P. aeruginosa* značajno utječu oborine i dotoci slatke vode, a da je more za kupanje na području grada Rijeke slabo je do srednje opterećeno s *P. aeruginosa*. Utvrđena je pozitivna korelacija između *P. aeruginosa* i ostalih fekalnih i ne-fekalnih mikrobioloških pokazatelja. Monitoring rutinskih pokazatelja (*E. coli* i enterokoki) ne isključuje u potpunosti mogućnost kontakta i zaraze kupaca sa bakterijama vrste *P. aeruginosa*. Javno zdravstveni rizik od infekcije *P. aeruginosa* raste, uslijed višestruka otpornost na lijekove ove bakterije te slabljenja imunološkog odgovora populacije.

Ključne riječi: *Pseudomonas aeruginosa*, kakvoća mora za kupanje, indikatori fekalnog onečišćenja, ne-fekalni mikrobiološki pokazatelji, dotoci slatke vode

SUMMARY

Monitoring of the quality of the bathing sea is carried out according to the Regulation on the quality of the bathing sea (NN 73/08), and routine microbiological parameters are indicators of fecal pollution (*E. coli* and intestinal enterococci). Fecal pollution occurs when microorganisms that cause diseases reach the water, and the source of which are human and animal feces and excreta. In addition to routine indicators of fecal contamination, additional microbiological contamination, additional microbiological indicators, such as *Pseudomonas aeruginosa*, can be tested according to the recommendation of the World Health Organization. It is a bacterium ubiquitous in the environment, which causes skin rashes and eye and ear infections after exposure to contaminated water or the sea. The aim of this research was to examine the occurrence and concentration of *P. aeruginosa* in the bathing sea in the area of urban beaches in the western part of the city of Rijeka (Kantrida), under different environmental conditions. Sampling was carried out on four beaches and six locations: 3. Maj, Kantrida east and west, Nogometno igralište, Ploče east and west. During the research, two samplings were carried out in the period from February 2, 2023. until 27.02.2023. The first occurrence was during the dry season, and the second during the rainy season. In addition, the data of the additional intensive research conducted in the period from 2012 to 2014, in the same locations, were also processed. The ISO norm HRN EN ISO 16266:2008 was applied for testing *P. aeruginosa* in seawater samples. The results of the research showed that the occurrence of *P. aeruginosa* is significantly influenced by precipitation and freshwater inflows, and that the bathing sea in the area of the city of Rijeka is slightly to moderately loaded with *P. aeruginosa*. Positive correlation was established between *P. aeruginosa* and other fecal and non-fecal microbiological indicators. Monitoring of routine indicators (*E. coli* and enterococci) does not completely exclude the possibility of contact and infection of bathers with *P. aeruginosa* bacteria. The public health risk of *P. aeruginosa* infection is increasing, due to the multiple drug resistance of this bacterium and the weakening of the populations immune response.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, bathing sea quality, fecal pollution indicators, non-fecal microbiological indicators, freshwater inflows

1 UVOD

1.1 Monitoring kakvoće mora za kupanje

Monitoring kakvoće mora za kupanje provodi se zbog procjene kakvoće mora za kupanje te utvrđivanja uzroka onečišćenja. Prate se mikrobiološki uzroci onečišćenja koji utječu na zdravlje kupaca koji su propisani Uredbom o kakvoći mora za kupanje (NN/73/08) te su najbolji pokazatelji fekalnog onečišćenja. U slučaju kada se ispitivanjem utvrdi pojava onečišćenja, poduzimaju se mjere koje imaju za cilj sprječavanje izlaganja kupaca onečišćenju. Za praćenje kakvoće mora za kupanje zaduženi su ovlaštenici, zavodi za javno zdravstvo po pojedinim priobalnim županijama. Ispitivanje kakvoće mora za kupanje provodi se od sredine svibnja do kraja rujna. Sezona kupanja traje u razdoblju od 1. lipnja do 15. rujna, osim ako županija ne odredi drugačije na temelju vremenskih prilika i mjesnih običaja. Učestalost uzimanja uzoraka morske vode namijenjene za kupanje je svakih 15 dana. Uzorci morske vode uzimaju se 30 cm ispod površine mora, u dubini od najmanje jednoga metra te na udaljenosti od najmanje jednoga metra od linije obale. Mikrobiološki pokazatelji koji se određuju u moru kao indikatori fekalnog onečišćenja su crijevni enterokoki te *Escherichia coli*. Uz mikrobiološke pokazatelje prate se i temperatura, salinitet te vizualno onečišćenje ako je prisutno. Kratkotrajno onečišćenje mora očituje se poznatim izvorom onečišćenja, gdje onečišćenje ne smije utjecati na kakvoću mora dulje od 72 sata. Kada kratkotrajno onečišćenje prestane, ovlaštena osoba provodi dodatno uzimanje uzoraka unutar sedam dana, zbog provjere prestanka navedenog onečišćenja. Podaci koji su dobiveni tijekom sedam dana upisuju se u bazu podataka o kakvoći mora za kupanje. More za kupanje se ocjenjuje ili razvrstava po propisanom broju podataka. Kada dođe do pojave kratkotrajnog onečišćenja, ovlaštena osoba obavještava županiju te javnost putem medija ili internetskih stranica. Informacije se moraju aktivno podijeliti i moraju biti dostupne tijekom cijele sezone kupanja na lako vidljivim mjestima. Javnost se informira o lokaciji vode za kupanje koja je izložena navedenom onečišćenju te o trajanju zabrane kupanja, ovisno o rezultatima ispitivanja. Trajno onečišćenje označava kakvoću mora na morskoj plaži nakon uklanjanja izvora onečišćenja, koja ne udovoljava graničnim vrijednostima mikrobioloških parametara. (1, 2)

1.1.1 Klasifikacija mora za kupanje

More za kupanje klasificira se u četiri kategorije kvalitete. „Izvršno“ se označava plavom bojom, „dobro“ zelenom bojom, „zadovoljavajuće“ žutom, a „nezadovoljavajuće“ crvenom. Navedene kategorije kvalitete prikazuju se na kartografskim prikazima i informativnim pločama morskih plaža, na kojima pojedina kategorija kvalitete ima obojani

kružni simbol. U tablici 1. prikazani su standardi za ocjenu kakvoće mora za kupanje nakon svakog ispitivanja gdje su prikazani mikrobiološki pokazatelji, kakvoća mora te metode ispitivanja. U tablici 2. prikazani su standardi za ocjenu kakvoće mora na kraju sezone kupanja te za prethodne tri sezone kupanja.

Tablica 1. Standardi za ocjenu kakvoće mora nakon svakog ispitivanja

Pokazatelj	Kakvoća mora			Metoda ispitivanja
	"izvrsno"	"dobro"	"zadovoljavajuće"	
crijevni enterokoki (CFU*/100 mL)	<60	61-100	101-200	HRN EN ISO 7899-1 ili HRN EN ISO 7899-2
<i>Escherichia coli</i> (CFU*/100 mL)	<100	101-200	201-300	HRN EN ISO 9308-1 ili HRN EN ISO 9308-3

*CFU – engl. „colony forming unit“, broj izraslih kolonija

Tablica 2. Standardi za ocjenu kakvoće mora na kraju sezone kupanja i za prethodne tri sezone kupanja

Pokazatelj	"Izvrsno"	"Dobro"	"Zadovoljavajuće"	"Nezadovoljavajuće"
crijevni enterokoki (CFU*/100 mL)	≤100*	≤200*	≤185**	>185**(2)
<i>Escherichia coli</i> (CFU*/100 mL)	≤150*	≤300*	≤300**	>300**(2)

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

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

⁽¹⁾ Temeljeno na log10 normalnoj raspodjeli koncentracija mikrobioloških pokazatelja, vrijednosti pojedinih percentila dobivaju se na sljedeći način:

- izračunavaju se logaritmi (log10) svih bakterijskih koncentracija (u slučaju nultih vrijednosti koncentracija uzimaju se logaritamske vrijednosti koncentracija koje predstavljaju graničnu vrijednost detekcije korištene analitičke metode)

- izračunava se aritmetička sredina logaritmiranih vrijednosti koncentracija (μ)

- izračunava se standardna devijacija logaritamskih vrijednosti (σ)

- 90-i i 95-i percentili izračunavaju se na sljedeći način:

90-i percentil = antilog ($\mu + 1.282 \sigma$)

95-i percentil = antilog ($\mu + 1.65 \sigma$)

⁽²⁾ Trenutačno djelovanje za pojedinačne uzorke, ukoliko broj crijevnih enterokoka prijeđe 300 bik/100 mL, *E. coli* 500 bik/100 mL

Sve vode koje su namijenjene za kupanje moraju biti barem „zadovoljavajuće“ kakvoće. Ako se voda za kupanje privremeno svrstava pod „nezadovoljavajuću“ kakvoću, poduzimaju se određene mjere. Mjere uključuju upravljanje plažom, zabranu kupanja te trajno upozorenje na kojem je označena zabrana kupanja, zbog sprečavanja izloženosti kupaca onečišćenju. U slučaju da se voda za kupanje svrstava pod „nezadovoljavajuću“ u trajanju od pet godina, tada se uvodi trajna zabrana kupanja. Ako se smatra da se ne može postići barem „zadovoljavajuća“

kvaliteta vode za kupanje, tada se zabrana kupanja može uvesti prije isteka navedenog razdoblja. Kada je more ocjenjeno kao „nezadovoljavajuće“, na plažu se postavljaju službene oznake i barijere. Odobrenje za uklanjanje navedenih oznaka i barijera izdaje inspektor zaštite okoliša, u slučaju kada su dva uzastopno analizirana uzorka ocjenjena kao zadovoljavajuća, dobra ili izvrsna. Na slici 1. prikazana je službena oznaka zabrane kupanja. (1, 2)



Slika 1. Službena oznaka zabrane kupanja
(Izvor: Uredba o kakvoći mora za kupanje NN 73/08)

Temeljem rezultata praćenja kakvoće mora za kupanje, lokacije se ocjenjuju s pojedinačnim, godišnjim te konačnim ocjenama, prema propisani graničnim vrijednostima mikrobioloških pokazatelja. Određivanje pojedinačne ocjene provodi se nakon svakog ispitivanja za vrijeme trajanja sezone kupanja. Određivanje godišnje ocjene provodi se nakon završetka sezone kupanja, a temelji se na skupu podataka o kakvoći mora za kupanje koji su dobiveni za tu sezonu. Određivanje konačne ocjene vrši se po završetku aktualne sezone kupanja te uključuje i tri prethodne sezone. Temelji se na skupu podataka, koji za svaku točku ispitivanja ima najmanje 28 uzoraka. (1)

1.2 Fekalno onečišćenje

Onečišćenje vode fekalnim sadržajem nastaje kada u vodu dospiju mikroorganizmi koji mogu izazvati različite bolesti. Izvor onečišćenja najčešće su otpadne vode iz sustava za odvodnju komunalnih otpadnih voda, izlučevine domaćih i divljih životinja, procjedne vode deponija komunalnog otpada, muljevi s uređaja za pročišćavanje otpadnih voda te poljoprivredne aktivnosti. Na onečišćenje priobalnog mora često utječu kratki obalni ispusti otpadnih voda te propusne septičke jame. Životinjske izlučevine predstavljaju manji rizik za zdravlje ljudi u odnosu na ljudske izlučevine. Galebovi te vodene ptice mogu znatno utjecati na povišenje indikatora fekalnog onečišćenja, koje služe kao pokazatelji mikrobiološke kvalitete vode. Onečišćenje voda životinjskim izlučevinama dovodi do opasnosti po ljudsko zdravlje zbog prisustva patogena poput *Cryptosporidium parvum*, *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*

(O157:H7). Navedeni patogeni uzrokuju bolesti koje se nazivaju zoonoze a prenose se sa životinje na čovjeka putem izmeta, posebice kada se stoka uzgaja u blizini vodotoka. Vjerojatnost da će patogen uzrokovati infekciju ili bolest ovisi o specifičnom soju uzročnika, infektivnoj dozi (za virusne i parazitske infekcije doza može biti vrlo mala), obliku u kojemu se uzročnik nalazi, uvjetima izloženosti te stanju imunološkog sustava.

Neobrađena otpadna voda može sadržavati različite vrste mikroorganizama koji mogu biti patogeni. Od virusa to su adenovirusi koji uzrokuje respiratorne probleme, astrovirusi koji uzrokuje gastrointestinalne probleme, zatim virus hepatitisa A, hepatitisa E te norovirus i rotavirus koji uzrokuju proljev i povraćanje. Enterovirus uzrokuje poliomijelitis i miokarditis te meningitis. Uz navedene viruse, postoje još i indikatorski virusi a to su F+ kolifagi te somatski kolifagi. Patogene bakterije koje možemo naći u otpadnoj vodi su *Campylobacter* spp. (gastrointestinalni problemi), *Escherichia coli* i crijevni enterokoki (indikatori fekalnog onečišćenja), *Salmonella* spp. (gastroenteritis), *Shigella* spp. (bacilarna dizenterija) i *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* (gastroenteritis). Protozoe koje se nalaze u kanalizaciji jesu *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis* (proljevi te amebna dizenterija). Od helminata mogu se naći *Ascaris* spp., *Ancylostoma* spp. i *Trichuris* spp. (3)

1.2.1 Indikatori fekalnog onečišćenja

Najčešće korišteni indikatori fekalnog onečišćenja (engl. Faecal Indicator Bacteria, FIBs) koji se koriste za procjenu kakvoće mora za kupanje su crijevni enterokoki i *E. coli*. Kada dođe do prekoračenja propisanih graničnih vrijednosti, a na mjestima gdje nema ispusta otpadnih voda, važno je utvrditi mogući izvor onečišćenja. Za njegovo otkrivanje postoje noviji alati, koji uključuje kemijske postupke i tehnike praćenja izvora mikroorganizama (engl. Microbial Source Tracking, MST). MST koristi genske markere, koji se nalaze u sastavu određenih fekalnih mikroba te su snažno povezani sa specifičnim domaćinom i različitim izlučevinama. Izlučevine mogu biti ljudske te životinjske (stoka, psi, vodene ptice). (3)

Također, razvijene su dodatne mikrobiološke metode, uključujući metode kvantitativne polimerazne lančane reakcije (eng. Real-Time Polymerase Chain Reaction, qPCR) . Epidemiološkim studijama procjenjuju se bolesti koje su uzrokovane izlaganjem onečišćenim rekreacijskim vodama, s povišenim koncentracijama crijevnih enterokoka te *E. coli*. Prema tim studijama, crijevni enterokoki trenutno su najbolji indikator fekalnog onečišćenja u moru iz ljudskog podrijetla (4). Prema nekim epidemiološkim istraživanjima (5), *E. coli* za morski okoliš nije optimalan indikator fekalnog onečišćenja, korisniji je kao pokazatelj koji ukazuje na pojavu gastrointestinalnih bolesti u slatkoj vodi. U epidemiološkim istraživanjima procjenjuje

se učestalost pojave bolesti kod plivača i neplivača te se istražuje povezanost učestalosti bolesti s obzirom na razine koncentracije indikatora fekalnog onečišćenja. Rezultati se izražavaju kao omjeri izgleda (engl. Odds Ratio, OR) ili druge vrste relativnog rizika (engl. Risk Ratio, RR) između skupina, uz 95%interval pouzdanosti. u istraživanjima se prate gastrointestinalne bolesti te respiratorne smetnje, kožne infekcije, bolesti očiju, uha i kože. Epibathe je bila velika europska studija, posebno osmišljena kako bi se ukazala na relativni nedostatak podataka unutar EU koji opisuju zdravstvene učinke kupanja u slatkim vodama EU i mediteranskim morskim vodama. (6) Istraživanje je uključivalo osam odvojenih nasumičnih kontrolnih ispitivanja, četiri na različitim slatkovodnim lokacijama u Mađarskoj i četiri na dvije različite morske plaže u Španjolskoj. Grupa volontera, podijeljena na kupaće i one koji se ne kupaju, intervjuirana je i potom pozvana na kupanje u odabranim vodenim tijelima. Nakon razdoblja izlaganja vodi, volonteri su intervjuirani, kako bi se utvrdila povezanost između kvalitete vode i pojave simptoma bolesti. Rezultati ispitivanja analizirani su odvojeno ili u kombinaciji s već postojećim prikupljenim podacima. Utvrđeno je da je rizik od gastrointestinalnih bolesti bio je veći kod kupaća (u usporedbi s povremenim kupaćima) u španjolskim i mađarskim studijama. Analizom kombiniranog skupa podataka utvrđeno je da su crijevni enterokoki najbolji indikator bolesti kod kupaća koji koriste morske vode, a da bi *E. coli* mogla biti bolji pokazatelj gastrointestinalnih smetnji kod kupaća koji koriste slatku vodu. Rezultati ispitivanja nisu bili statistički značajni, niti su pokazali povezanost između izloženosti i odgovora. (6)

Uz navedene fekalne indikatore primjenjuju se, ali ne rutinskom ispitivanju, i kolifagi te *C. perfringens*, koji ukazuje na starije onečišćenje mora. (3) Bakteriofagi su predloženi indikatori fekalnog onečišćenja, a većina istraživanja provedena je na kolifagima (virusi koji inficiraju *E. coli*). Potrebno je istaknuti da je u Direktivi o vodama za kupanje Europske unije (2006/7/EC) navedeno da se *E. coli* i crijevni enterokoki ne smatraju idealnim indikatorima. Prema Direktivi (2006/7/EC), virusi se smatraju glavnim uzročnicima bolesti koje su stečene u vodi za kupanje kao posljedica fekalnog onečišćenja. To potvrđuju noviji podaci ispitivanja virusa u uzorcima iz okoliša, zahvaljujući napretku u metodologiji, uglavnom primjenom qPCR. Crijevni virusi, poput adenovirusa, enterovirusa ili norovirusa, također se mogu koristiti za procjenu kvalitete vode. (3-5, 7)

1.2.1.1 Rutinski indikatori fekalnog onečišćenja

1.2.1.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli je gram negativna štapićasta bakterija iz porodice enterobakterija. Spada u grupu termotolerantnih koliiformnih bakterija. (3) *E. coli* se nalazi u ljudskom i

životinjskom izmetu, a u svježim izlučevinama je prisutna u većem broju od crijevnih enterokoka. U ljudskom izmetu može se naći u broju 10^6 do 10^7 bakterija po gramu izmeta dok se crijevni enterokoki mogu naći u broju od 10^5 do 10^6 bakterija po gramu izmeta. (8) U gastrointestinalnom sustavu većinom se nalazi kao apatogena bakterija, dok neki sojevi mogu izazvati crijevne bolesti. (9) Prvi put je uvedena kao indikator fekalnog onečišćenja još 1893. godine, kada je izolirana iz tropskih vodenih sustava i otpadnih voda iz tvornica. Istraživanja pokazuju da postoje prirodne populacije *E. coli* koje mogu biti prisutne u tlu, pijesku i obalnom sedimentu te samim time ometaju procjenu relativnog rizika kupaća na morskim plažama (3) obzirom da se od indikatora fekalnog onečišćenja očekuje da nisu prirodno prisutni u moru. Također, postoje i sojevi koji su otporni na liječenje antibioticima te nalikuju na sojeve urinarno-patogene *E. coli*. (10)

E. coli se trenutno primjenjuje kao rutinski parametar, prema Direktivi Europske unije o vodama za kupanje (2006/7/EC) te nizu drugih propisa o rekreacijskim vodama i morskoj vodi, diljem svijeta. Navedena Direktiva zahtjeva mjerenje *E. coli* i crijevnih enterokoka na svim lokacijama uključenim u monitoring. Klasifikacija aktualne Direktive temelji se na mjerenju percentila te se navodi metoda izračuna istih. Mjerenje broja *E. coli* u morskoj vodi pruža informacije o nedavnom onečišćenju, a kontinuirano mjerenje omogućava analize vremenskih trendova. (3, 7)

Crijevni enterokoki su gram pozitivne bakterije raspoređene u parovima ili lancima iz roda *Enterococcus*. To su komenzalne bakterije koje se izlučuju putem izmeta ljudi i životinja u velikom broju (naprimjer 10^2 do 10^8 bakterija po gramu suhog izmeta). Lako ih je detektirati u kontaminiranoj vodi, a zbog dužeg preživljavanja u odnosu na *E. coli* ukazuju na starije onečišćenje. Kao indikatori fekalnog onečišćenja imaju potencijalne nedostatke prilikom praćenja kakvoće vode. Mogu se nalaziti u nizu ekoloških staništa koja im služe kao izvor. Neki sojevi enterokoka su osobito relevantni za plaže, gdje mogu biti endogeni u sedimentu i tlu. (11)

Crijevni enterokoki su jedini pokazatelj predložen prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije. (3) Također su rutinski parametar u Direktivi Europske unije o vodi za kupanje (2006/7/EC) te nizu drugih propisa diljem svijeta. (12) Kao što je već prethodno navedeno, qPCR je najčešće korištena molekularna metoda koja djeluje putem *in vitro* umnažanja, detekcije i kvantifikacije specifičnih segmenata genoma (DNA ili RNA) iz mikroorganizma. Postoje dvije qPCR metode za rekreacijske vode: metoda 1611 i metoda 1609. (13) Korištenje qPCR metode podupiru rezultati epidemioloških studija provedenih u SAD-u

(13) kod koji je praćen utjecaj otpadnih voda na plažama. Rezultati istraživanja ukazali su na najbolju povezanost između zdravlja kupaca i koncentracije enterobakterija prilikom primjene metode 1611. Bitni zahtjevi za analitičke metode prilikom određivanja referentnih metoda su osjetljivost (sposobnost otkrivanja malog broja ciljnog organizma), specifičnost (sposobnost otkrivanja samo ciljanog organizma) te ponovljivost između laboratorija. Američka agencija za zaštitu okoliša (engl. United States Environmental Protection Agency, USEPA) razvila je metode za brojanje enterokoka u rekreacijskim vodama uz pomoć qPCR-a (metoda 1611 i njezina modifikacija 1609). U metodi 1609, sekvence ciljne DNA enterokoka prisutne u uzorku otkrivaju se pomoću TaqMan. Ovakav sustav signalizira stvaranje PCR produkata procesom enzimatske hidrolize fluorogeniski obilježene oligonukleotidne probe. Prije primjene određene metode za obavješćavanje javnosti o kakvoći mora za kupanje, potrebno je provesti analizu učinka metode na pojedinoj lokaciji. Trenutno USEPA preporučuje primjenu metode 1609, umjesto metode 1611, obzirom da nije potrebno razrijediti uzorak te je točnost mjerenja veća. (13) Metode (ISO 7899-1 i 7899-2) omogućavaju izoliranje glavnih crijevnih enterokoka te određivanje soja. Povremeno se može otkriti i neka druga vrsta enterokoka, međutim njihova je prisutnost rijetka. Metoda ISO 7899-1 primjenjuje se na sve vrste površinskih i otpadnih voda, međutim ova metoda nije prikladna za lokacije gdje je očekivana koncentracija crijevnih enterokoka manja od 15 na 100 mL uzorka. Metoda ISO 7899-2 prikladna je za vodu za piće te vodu iz bazena (dezinficirane vode), ali može se primijeniti i na ostale vrste voda. (14)

1.2.1.2 Kolifagi i humani virusi

Kolifagi se dijele u dvije skupine: somatski kolifagi i F- specifični kolifagi. Somatski kolifagi inficiraju koliformne bakterije putem svojih somatskih receptora stanične stijenke. F- specifični kolifagi koji se još nazivaju i F+ inficiraju bakterije spolnim putem ili F-pilima. Postoje DNA i RNA F-specifični kolifagi. F-specifični RNA kolifagi morfološki su slični enterovirusima i norovirusima. Somatski kolifagi su raznolikiji nego F-specifični kolifagi te su općenito veći. Neki od somatskih kolifaga mogu biti slične veličine kao adenovirusi. Kolifagi su prisutni u komunalnim otpadnim vodama te životinjskim fekalnim izlučevinama. Izolirani su iz slatkih i morskih rekreacijskih voda, općenito u malom broju. Trenutno virusni pokazatelji nisu uključeni u glavne propise za rekreacijske vode, iako je USEPA nedavno dovršila istraživanje kolifaga te je u tijeku revidiranje kriterija kvalitete rekreacijskih voda. Kolifagi su u neobrađenoj otpadnoj vodi konstantno prisutni u visokim koncentracijama te mogu pružiti koristan indeks smanjenja koncentracije crijevnih virusa tijekom procesa obrade otpadnih voda. Nakon postupka dezinfekcije kolifagi gube infektivnost. (3, 9)

Humani adenovirus (AdV) je dvolančani DNA virus iz obitelji *Adenoviridae*. Virus je povezan s nizom respiratornih i gastrointestinalnih bolesti. U usporedbi s RNA virusima, ovaj virus je otporan na inaktivaciju iz okoliša i ultraljubičasto zračenje. AdV su rasprostranjeni po cijelom svijetu a rezervoar je zaraženi čovjek ili kliconoša. Utvrđeno je da su AdV odgovorni za pojavu većeg broja rekreacijskih bolesti koje se prenose putem vode, a većinom su bolešću zahvaćeni kupaći u bazenima. (3)

Enterovirusi (EV) su jednolančani RNA virusi iz obitelji *Picornaviridae*. EV koji se prenose vodom kod ljudi podijeljeni su u četiri vrste : EV-A, -B, -C, i -D. Mogu uzrokovati očne, respiratorne i gastrointestinalne bolesti ali i meningitis, paralize i miokarditis. Virus se izlučuje iz gastrointestinalnog trakta te gornjih dišnih puteva. (15) Od 55 virusnih epidemija koje su bile povezane s rekreacijskim vodama za kupanje, EV su bili uzrokom njih deset. (7) Dvije epidemije bile su povezane s jezerima, jedna s morskom vodom, četiri s rijekama a ostale epidemije bile povezane s bazenima.

Norovirusi (NoV) su jednolančani RNA virusi bez ovojnice iz obitelji *Caliciviridae*. Najčešći su uzročnici virusnog gastroenteritisa kod ljudi. Od epidemija u rekreacijskim vodama čiji su uzročnici virusi, 25 epidemija izazvano je NoV. (7)

Epidemiološka studija provedena je u SAD-u 2010. godine (16) a ispitani su uzorci slatke vode zbog prijave kupaća o pojavi gastrointestinalnih smetnji. Tehnikom qPCR-om analizirana su 23 uzorka na četiri ljudska virusa (AdV, EV, NoV GI, NoV GII) te četiri bakterijska markera. Dobiveni rezultati povezani su s podacima o izloženosti ljudi, u istraživanju u kojem je sudjelovalo 600 kupaća. Najčešće identificirani virus u ovom istraživanju je bio AdV, zabilježen u 35% uzoraka. Niti jedno podatak qPCR analize nije pokazao značajnu povezanost s pojavom bolesti, u modelima pojedinačnih mikroorganizama korištenjem univarijatne ili multivarijatne logističke regresije. Kada su uključene koncentracije *E. coli* tada dolazi do povezanosti s AdV-a te do pojave proljeva i gastrointestinalnih bolesti. Navedeno istraživanje ukazuje na potencijal primjene multimikrobnog pristupa za procjenu rizika od bolesti koje se prenose rekreacijskim vodama, putem virusa i bakterija.

1.2.1.3 Ostali mikrobiološki pokazatelji (*Clostridium perfringens*)

Clostridium perfringens (CP) je gram pozitivna sporogena anaerobna bakterija, široko rasprostranjena u prirodi. Nalazi se u gastrointestinalnom sustavu ljudi i životinja. (17) Koristi se kao sekundarni pokazatelj fekalne kontaminacije. (18) EU Direktiva o vodama za kupanje (2006/7/EC), koja je trenutno na snazi, definira kategorije kvalitete vode za kupanje na temelju

koncentracije *E. coli* i crijevnih enterokoka. Kako bi se poboljšala procjena mikrobne kontaminacije, predlaže se povremeno uključivanje dodatnih indikatora, poput *C. perfringens*. Prisutnost CP ukazuje na starije onečišćenje mora i voda, nastalog najčešće zbog utjecaja sustava za odvodnju otpadnih voda. U brojnim je istraživanjima mikrobiološko onečišćenje mora uslijed utjecaja ispusta otpadnih voda praćeno određivanjem prisutnosti i broja CP. (19) *C. perfringens*, u odnosu na rutinske FIBs, ima bolju sposobnost preživljavanja u nepovoljnim uvjetima. Morski sediment jače je opterećen CP, u odnosu na stupac vode. U američkoj saveznoj državi Havaji CP se koristi kao rutinski dodatni pokazatelj fekalne kontaminacije u tropskim i suptropskim vodama i sedimentima. Rutinski se koristi zbog toga što je teško utvrditi izvor onečišćenja uz pomoć rutinskih parametara (*E. coli* i crijevni enterokoki) u tropskim morskim vodama. Enterokoki se koriste kao indikatori ljudskog izmeta dok su u tropskim vodama prirodno prisutni iz tla zbog viših temperatura u tropskom području. Stoga, prikupljene informacije o povišenim vrijednostima enterokoka u uzrocima mogu biti pogrešne. Država Havaji je prikupila više od 29 000 uzoraka tijekom 27 godina kako bi se CP mogao uvesti kao parametar za otkrivanje fekalnog onečišćenja. Trenutno se ispituje opasnost CP-a na zdravlje kupaca kako bi se u tropskim morskim vodama mogao uvesti kao primarni indikator fekalnog onečišćenja. (18)

1.2.2 Ostali mikrobiološki rizici

Osim mikroorganizama koji se u rekreacijske vode uneseni putem fekalnih otpadnih voda i izlučevinama ljudi i životinja, prisutni su i drugi mikroorganizmi koji nisu fekalnog podrijetla. Takvi mikroorganizmi u određenim područjima mogu biti autohtoni. Nakon što dospiju u vode, nastanjuju se te se u okolišu te održavaju putem životinja (domaćina). Brojne navedene vrste mikroorganizama povezuju se s ljudskim infekcijama u rekreacijskim vodama. Prilikom izlaganja kupaca ovakvim vrstama mikroorganizama, postoji veliki rizik od antimikrobne rezistencije. Opasnosti mogu biti povezane s cijanobakterijama i algama te patogenima koji se nalaze u pijesku na plaži, poput helminta koji se prenose putem tla. Bakterije *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae* O1/O139, *V. parahaemolyticus* te *V. vulnificus* mogu se naći u moru te izazivati infekcije uha, upalu pluća te gastroenteritise. U moru se još može nalaziti i *Aeromonas spp.* koji može izazvati upalu pluća te *Staphylococcus aureus* (unesen s kože kupaca) koji uzrokuje infekcije kože. *Pseudomonas aeruginosa* (PA) također predstavlja rizik za zdravlje i uzrokuje infekcije kože, oči i uha. PA je bakterija koja je sveprisutna u vodama i okolišu. Na njezinu prisutnost utječu lokalni čimbenici kao što su temperatura i salinitet. Ne-fekalni je patogen u vodi i moru te može biti potencijalna opasnost za kupce. (3)

1.2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa (PA) je sveprisutna bakterija iz okoliša koja se može naći gotovo svugdje. (20) Gram negativna je bakterija, koja može izazvati i teške infekcije kod ljudi. Zbog prirodne otpornosti na antibiotike i sposobnosti stvaranja biofilma infekcija, ovom bakterijom predstavlja ozbiljan terapijski problem. (21) Često se može izolirati iz morske i slatke vode, a u istraživanjima u različitim zemljama izolirana je iz morskog pijeska. (22) PA nije indikator fekalnog onečišćenja ali može biti korisna bakterija prilikom definiranja kakvoće mora za kupanje. (23) U studiji iz 2014. godine (23) provodilo se uzorkovanje morske vode i sedimenta u međuplinnoj zoni duž Perzijskog zaljeva. Uzorci morske vode prikupljeni su s dubine od 30 cm ispod površine kako bi se izbjegao izravan učinak sunčevog ultraljubičastog zračenja na površinski sloj vode. Također, prikupljeni su sedimenti s različitih dubina. Analize su odrađene na mikrobiološke pokazatelje: ukupni koliform, fekalni koliform te *P. aeruginosa* standardnim metodama. PA je nađena u obalnom području Shoghab Parka u najvećem broju od 10 CFU/100 mL. Područje Shoghab Parka je suočeno s raznim antropogenim utjecajima kao što su izmet kupaca, bacanje otpada, ispuštanje otpadnih komunalnih (fekalnih) voda u more. Također, navedeno područje često se koristi za rekreacijske potrebe kao što su plivanje, ribolov te rekreacijska vožnja čamcem. Rezultati prikazuju i fizikalno kemijske karakteristike uzoraka morske vode. Srednje vrijednosti temperature u uzorcima morske vode bile su u rasponu od 31,5-32,5 °C a pH je iznosio 8,16-8,41. Salinitet u uzorcima morske vode bio je u rasponu između 27,7 i 37 ‰. Pearsonova analiza pokazala je značajnu inverznu korelaciju između razina koncentracija ukupnih koliforma, fekalnih koliforma, *P. aeruginosa* i saliniteta. Podaci su pokazali da smanjenjem saliniteta dolazi do povećanja vrijednosti indikatorskih bakterija u uzorcima morske vode. Studija iz 2012. godine (24) pokazuje da *P. aeruginosa* ima bolju sposobnost preživljavanja u pijesku na plaži nego u morskoj vodi. Fekalni indikatori onečišćenja koji su rutinski parametri u procjeni kakvoće mora ne isključuju mogućnost zaraze ne-crijevnim patogenima kao što je *P. aeruginosa* s kojim se povezuju bolesti kože, gornjeg dišnog sustava, oka, uha, nosa i grla. Većina prijavljenih slučajeva zaraznih bolesti koje su povezane s plivanjem u prirodnim rekreacijskim vodama, zapravo su bili ne-fekalnog podrijetla. Zbog mogućnosti zaraze ne-fekalnim mikroorganizmima, stvara se potreba za uvođenjem ne-fekalnih indikatorskih organizama. *P. aeruginosa* je bakterija koja može poslužiti kao dodatni indikatorski organizam zbog toga što je u morskoj vodi utvrđena pozitivna korelacija između infekcije kože i prisutne razine PA. (25) Navedena studija (24) istražuje utjecaj okolišnih faktora na ne-fekalne indikatore u suptropskom morskom okruženju. Visoke temperature u tropskim područjima olakšavaju povećanje fekalnih indikatorskih bakterija stoga

se trenutni parametri (*E. coli* i crijevni enterokoki) mogu smatrati neprikladnima za tropska i suptropska područja. Studija predlaže uvođenje dodatnih parametara kao što su *P. aeruginosa* i *C. perfringens*. Studija iz 2019. godine (26) dokazuje da je PA nakon prirodnog isparavanja morske vode ostaje zarobljen u kristalima morske soli formiranim u laboratoriju te godinama opstaje u njima. Ima izuzetnu fiziološku sposobnost prilagodbe na rast pri visokim koncentracijama soli. PA je trenutno intenzivno istraživana bakterija, zbog istaknute uloge u razvoju bolesti. Zbog relativno velikog genoma i fleksibilnih metaboličkih sposobnosti, ova bakterija iskorištava brojne ekološke niše. (21) PA je pokazatelj razine organskih tvari te opterećenja u morskom okolišu, zbog vrlo velikog porasta pri temperaturama inkubacije 22 °C i 37°C. (27)

Nakon izloženosti kontaminiranoj vodi, PA uzrokuje kožne osipe te infekcije oka i uha. Bakterija se može unijeti u organizam ingestijom. Također, može izazvati upale pluća, urinarnog i gastrointestinalnog trakta. (22) Uzrokuje probleme kod imunokompromitiranih osoba a smrtnost od ove bakterije najočitija je kod pacijenata s cističnom fibrozom. Veliki problem predstavlja u slučaju kada kupaći imaju opekline na koži i kronične rane. Kada se infekcija ovom bakterijom utvrdi, predstavlja problem za liječenje, upravo zbog otpornosti na antibiotike. Genom bakterije kodira mnoštvo gena otpornosti te enzime koji su otporni na beta-laktamske i aminoglikozidne antibiotike. Terapija protiv PA je izazovna zbog nedostatka novih antimikrobnih terapeutika. Stvaranje biofilma poboljšava sposobnost uzrokovanja infekcije štiteći bakteriju od terapije lijekovima. (21)

1.3 Zakonska legislativa i ostali relevantni dokumenti

1.3.1 EU Direktiva o vodi za kupanje (2006/7/EC) i nova u pripremi

Direktiva 2006/7/EZ od 15. veljače 2006. godine o upravljanju kvalitetom vode za kupanje stavlja izvan snage Direktivu 76/160/EZ iz 1976. godine. Direktiva je uspostavljena Europskim parlamentom i Vijećem Europske unije, uzimajući u obzir ugovor o uspostavi Europske zajednice, prijedlog komisije te mišljenje Europskog, gospodarskog i socijalnog odbora. Mišljenje je uzeto i od Povjerenstva Regije a odobrenje je dao Odbor 8. prosinca 2005. godine. Cilj direktive je upravljanje kakvoćom vode te zaštita i poboljšanje kvalitete okoliša i zaštita zdravlja ljudi, nadopunjavanjem Direktive 2000/60/EZ. Direktiva se razvijala na temelju tadašnjih znanstvenih dokaza. Direktiva koristi pouzdane indikatorske parametre koji predviđaju mikrobiološki rizik (rizik za zdravlje kupaća), čime se postiže visoka razina zaštite. Ova Direktiva utvrđuje odredbe za praćenje i klasifikaciju voda za kupanje, kvalitetu voda za kupanje, upravljanje kakvoćom vode za kupanje te informiranje javnosti o kvaliteti vode.

Direktiva se primjenjuje na bilo koju površinsku vodu gdje nadležno tijelo očekuje veliki broj kupaca. Ne primjenjuje se na bazene i spa bazene, zatvorene vode koje se tretiraju ili koriste za terapijske svrhe te umjetno napravljene zatvorene vode odvojene od površinskih voda. U tablici 3. prikazani su parametri za priobalne i prijelazne vode uz navedene referentne metode. (12)

Tablica 3. Parametri za priobalne i prijelazne vode

Parametar	Izvrсна kakvoća	Dobra kakvoća	Zadovoljavajuća kakvoća	Referentne metode
Crijevni enterokok (cfu/100 mL)	100	200	185	ISO 7899-1 ili ISO 7899-2
<i>Escherichia coli</i> (cfu/100 mL)	250	500	500	ISO 9308-3 ili ISO 9308-1

Nova Direktiva koja je u pripremi, ukazuje na problematiku praćenja mikrobioloških pokazatelja, pri čemu se predlaže nekoliko promjena. Dva glavna nedostatka aktualne Direktive (2006/7/EC) jesu broj uzoraka koji se prikuplja za praćenje indikatora fekalnog onečišćenja te okvir praćenja i upravljanja cijanobakterijama. Direktiva o vodama za kupanje (BWD) zahtjeva najmanje četiri uzorka po sezoni kupanja, uključujući jedan uzorak koji se uzima neposredno prije početka sezone kupanja. Nedostatak je to što se na ovaj način uzima jedan uzorak mjesečno tijekom sezone kupanja. WHO je 2018. godine preporučila povećanje minimalnog godišnjeg broja uzoraka na 20 uzoraka po sezoni kupanja. Procjenjuje se da je, s ovakvom učestalosti mjesečnog uzorkovanja, 15-20 % kupališta potencijalno pogrešno ocijenjeno, pri čemu je zdravlje kupaca ugroženo.(28) Brojne države članice EU već provode češći monitoring na različitim lokacijama, uključujući lokacije izložene kratkotrajnom onečišćenju i one s lošom kvalitetom vode. Europski mikrobiološki stručnjaci okupljeni u Europskoj mikrobiološkoj ekspertnoj grupi (engl. European Microbiology Expert Group, EMEG) predlažu da se u novu BWD uvode učestalije praćenje kakvoće mora. umjesto definiranja minimalnog broja uzoraka po sezoni kupanja, obzirom da trajanje sezone kupanja varira između država. Prema WHO smjernicama iz 2021. o kvaliteti vode za rekreaciju, uveden je koncept planova sigurnosti vode, kao alata za procjenu i upravljanje rizicima. Uz indikatore fekalnog onečišćenja koji su obuhvaćene Direktivom 2000/60/EZ , WHO je identificirao i druge rizične mikrobiološke pokazatelje. Za europske vode su to uglavnom *Shistosoma* i *Vibrio*. WHO smatra da je pijesak na plaži značajna niša, obzirom da može sadržavati brojne mikroorganizme koji predstavljaju

izravan rizik za ljudsko zdravlje. Stoga se preporučuje da se prilikom upravljanja kvalitetom vode na plaži, pijesak na plaži također treba uzeti u obzir. (29)

1.3.2 Nacionalna Uredba o kakvoći mora za kupanje (NN 73/2008)

„Na temelju članka 54. stavka 1. Zakona o zaštiti okoliša (»Narodne novine«, broj 110/2007), Vlada Republike Hrvatske je na sjednici održanoj 20. lipnja 2008. godine donijela Uredbu o kakvoći mora za kupanje“. U navedenoj Uredbi propisuju se standardi kvalitete mora za kupanje na morskim plažama. Određuju se mikrobiološki pokazatelji te su propisane granične vrijednosti. Cilj uredbe jest postizanje propisanih standarda kvalitete mora za kupanje te provođenje mjera upravljanja. Mjere upravljanja sastoje se od uspostavljanja vremenskog kalendara praćenja, monitoring kvalitete mora za kupanje te ocjenjivanje kvalitete mora za kupanje. Također, određuje se i procjenjuje uzrok onečišćenja koji može utjecati na kvalitetu mora za kupanje te rizik za zdravlje kupaca. Ovom uredbom poduzimaju se mjere kojima se sprječava izloženost kupaca onečišćenju. Uspostavljaju se i održavaju profili mora za kupanje, koji kao alat pomaže točnijoj procjeni rizika od onečišćenja plaže. Mjere iz uredbe provodi županija a Ministarstvo koordinira navedene mjere. Prije početka svake sezone kupanja potrebno je izraditi kartografski prikaz morske plaže i profil mora za kupanje. „Poslove praćenja kakvoće mora za kupanje obavlja pravna osoba ovlaštena za poslove praćenja stanja iz područja zaštite okoliša prema Zakonu o zaštiti okoliša i Zakonu o vodama (ovlaštenik)“. Monitoring uključuje uzorkovanje, laboratorijske analize uzoraka, ocjene rezultata koji su dobivenih analizom uzoraka, izradu izvješća te profila mora za kupanje. „Sredstva za praćenje kakvoće mora na morskoj plaži, izradu kartografskih prikaza morskih plaža, te izradu i obnavljanje profila mora za kupanje prema odredbama ove Uredbe osigurava županija“. Prilikom uzimanja uzoraka mora za kupanje, podaci se unose u obrazac uzorkovanja mora za kupanje (UMK). Na slici 2. prikazan je obrazac UMK. Na slici 3. prikazan je profil mora za kupanje (PMK). Na slici 4. prikazano je obnavljanje profila mora za kupanje. (1)

Uzorak	Datum	Sat	Vjetar			KPU O/U/J	KDU O/U/J	Vrijeme S/O	Slanost	Temp. zraka (°C)	Temp. mora (°C)	Vidljivo onečišćenje	CEu 100 ml	E. coli u 100 ml
			P/O	Jačina J/U	Smjer N/S/E/W									

Slika 2. Obrazac UMK
(Izvor: Uredba o kakvoći mora za kupanje NN 73/08)

„Opažanja ili mjerenja na dan uzorkovanja: Vjetar: - prisutan (P) ili odsutan (O); - jačina: jak (J) ili umjeren (U); - smjer: sjeverni (N), južni (S), istočni (E), zapadni (W); kiša dan prije uzorkovanja (KPU) i na dan uzorkovanja (KDU): odsutna (O), umjerena (U), jaka (J); vrijeme: sunčano (S), oblačno (O); vidljivo onečišćenje: navesti vrstu i razmjor; mikrobiološki parametri: crijevni enterokoki (CE) i *Escherichia coli* (*E. coli*)“.

Naziv plaže:
Lokacija: Točke uzorkovanja:
Geografske koordinate točke uzorkovanja: (° ‘ ’’) λ (° ‘ ’’)
ne ≤ da ≤ ne Prirodna plaža: ≤ da ≤ Uređena plaža:
Tip plaže: s vegetacijom ≤ šljunčana ≤ stjenovita ≤ pješčana ≤
Prosječna temperatura mora (za vrijeme sezone):
Slanost mora (za vrijeme sezone) min./max.
Prevladavajući vjetar (N/S/E/W):
Amplitude plime i oseke:
Klasifikacija nezadovoljavajuće ≤ zadovoljavajuće ≤ dobro ≤ izvrsno ≤ mora na plaži:
da Tip Količina ≤ Prisustvo makroalgi/cvatnji fitoplanktona: ne ≤
Potencijalni izvori onečišćenja:
rijeka, ≤ otpadne vode ≤ drugi izvori ≤ rječica ili potok
Procjena stupnja rizika onečišćenja:
vrlo visok ≤ visok ≤ umjeren ≤ nizak ≤ vrlo nizak ≤
Vidljivo ne ≤ da .. Specificiraj tip nečistoće ≤ onečišćenje plaže:
Učestalost i trajanje očekivanog onečišćenja
Postoji li na plaži sustav informiranja o ne ≤ da ≤ kakvoći plaže?
Postoje li metode upozoravanja u slučaju opasnosti ne ≤ da ≤ na plaži?
Koncesionar ili jedinica lokalne samouprave:
Kontakt-osoba u slučaju iznenadnog onečišćenja:
Telefon: Mobilni tel.: Fax: e-mail:
Adresa:
Laboratorij u kojem se obavlja analiza:

Slika 3. Profil mora za kupanje (PMK)
(Izvor: Uredba o kakvoći mora za kupanje NN 73/08)

Razvrstavanje mora za kupanje	Učestalost obnavljanja profila mora za kupanje (prema Prilogu I. tablici 2)
nezadovoljavajuće	svake dvije (2) godine
zadovoljavajuće	svake tri (3) godine
dobro	svake četiri (4) godine
izvrsno	samo u slučaju ako se razvrstano mora promijeni u »dobro«, »zadovoljavajuće« ili »nezadovoljavajuće«

Slika 4. Obnavljanje profila mora za kupanje
(Izvor: Uredba o kakvoći mora za kupanje NN 73/08)

1.3.3 WHO smjernice za kvalitetu rekreacijskih voda (2021.)

Cilj Smjernica Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) o kvaliteti rekreacijske vode (3) je zaštita zdravlja i osiguravanje adekvatnog upravljanja kvalitetom rekreacijskih voda. Smjernice su ažurirane u odnosu na sadržaj smjernica WHO-a iz 2003. godine za sigurnost rekreacijskih voda. Ključne promjene odnose se na stavljanje naglaska na preventivno upravljanje rizikom, uz pomoć planova za sigurnost voda za rekreaciju. Opasnosti koje se ne odnose na kvalitetu vode (utapanje, izlaganje suncu, toplini i hladnoći te opasni vodeni organizmi) su izvan opsega ovih smjernica.

Smjernice su usredotočene na upravljanje kvalitetom obalnih i slatkovodnih voda. Lokacije s vodama za rekreaciju su ekosustavi koji se sastoje od niza vodenih organizama, uključujući ribe, školjke, kukce i ptice. Navedeni organizmi mogu biti smetnja tijekom kupanja u rekreacijskim vodama te mogu uzrokovati opasnost za ljudsko zdravlje. Smjernice pokušavaju uravnotežiti zaštitu ljudskog zdravlja s ciljevima zaštite okoliša, obalnih i vodenih ekosustava. Smjernice su namijenjene državnim i lokalnim vlastima te ostalim subjektima koji imaju obvezu provoditi mjere za osiguranje sigurnih rekreacijskih voda, a mogu se implementirati zajedno s mjerama zaštite okoliša. U slučaju ako nije drugačije navedeno, smjernice se odnose na opću populaciju koja boravi u svim vrstama rekreacijskih voda, koje uključuju izravan kontakt s vodom, udisanje morske vode i boravak na plaži. Prijedlog je da imunokompromitirane osobe potraže liječnički savjet o individualnoj toleranciji prema izloženosti površinskim rekreacijskim vodama. Smjernice uključuju opis trenutnog stanja o mogućim štetnim učincima na ljudsko zdravlje prilikom korištenja rekreacijskih voda za kupanje. Donose se preporuke za nacionalne ciljeve, koji se temelje na zdravstvenom nadzoru, procjeni rizika, praćenju kvalitete vode, kontroli opasnosti povezanih s ljudskim zdravljem te komunikaciji s javnošću. Osnovne preporuke za provođenje mjera od strane nacionalnih tijela i osoba koje su odgovorne za provedbu planova sigurnosti vode za rekreaciju (engl.

Recreational Water Safety Plan, RWSP) sažeti su u smjernicama. Također, smjernice uključuju i savjete za svaku vrstu rizika, uključujući one za pokazatelje, informacije o procjeni stanja ekosustava, monitoringu i upravljanju komunikacijom relevantnom za RWSP. (3)

1.3.4 WHO preporuke za vode za kupanje (2018.)

Preporuke WHO-a objavljene 2018. godine, razmatraju znanstveni, analitički i epidemiološki razvoj, relevantan za parametre kvalitete vode za kupanje u Direktivi o vodama za kupanje (2006/7/EZ). Glavni cilj Direktive 2006/7/EZ Europskog parlamenta i Vijeća o upravljanju kvalitetom vode za kupanje je zaštita javnog zdravlja. Kako bi se ovaj cilj ostvario, važno je preispitivati parametre i metodologiju koja se koristi za određivanje kvalitete vode za kupanje. Istraživanja na vodama za kupanje nastavljena su nakon objavljivanja Smjernica WHO-a 2003. godine i trenutne Direktive o vodama za kupanje (2006/7/EC). Ovaj dokument sadrži najnoviju znanstvenu literaturu o postojećim parametrima Direktive o vodama za kupanje (crijevni enterokoki i *E. coli*). Također, dokument preispituje realne mogućnosti primjene dodatnih parametara, poput virusnih indikatora, kao i štetno cvjetanje algi. Uz literaturu i pregled trenutnog načina klasifikacije, uključuje i doprinose predstavnika članica kroz ispunjavanje upitnika o vodama za kupanje, sastanke skupina stručnjaka i sudionika te primljene povratne informacije o osnovnim dokumentima. Dokument predstavlja preporuke WHO-a o ažuriranju Aneksa i Direktive o vodi za kupanje. Preporuke su da se unutar Direktive o vodama za kupanje zadrže dva trenutno korištena pokazatelja (crijevni enterokoki i *E. coli*) kao i četiri razine unutar aktualnog sustava klasifikacije (izvrsno, dobro, dovoljno i loše). Predložene izmjene uključuju povećanje minimalnog godišnjeg broja uzoraka s četiri na dvadeset, kao i korištenje 95-percintilne vrijednosti za svaku kategoriju sustava klasifikacije, umjesto trenutnog korištenja i 95- i 90-percentilnih vrijednosti. Kako bi se smanjila pogrešna klasifikacija lokacija na kojima podaci ne prate normalnu distribuciju (koristeći Shapiro-Wilksov test), preporučuje se korištenje Hazenove metode. (7)

Nadalje, ISO metoda (9308-1) za analizu *E. coli* više se ne preporučuje, jer je nakon revidiranog izdanja primjena ove metode prikladna za vode s očekivanim niskim brojem bakterija te kao takva nije primjenjiva na vode za kupanje. U raspravi o mogućnosti primjene dodatnih pokazatelja, zaključeno je da se u ovom trenutku ne podržava uključivanje virusnog indikatora ili patogena kao rutinskog pokazatelja. Istovremeno, utvrđeno je da trenutni sustav za morski fitoplankton (promatranje kao dio profila vode za kupanje) odgovara svrsi. Preporuka je da se na lokacijama s rizikom od cvjetanja slatkovodnih cijanobakterija primjeni novi sustav klasifikacije te upravljanja, temeljem smjernica koje trenutno razvija WHO. Državama

članicama EU potrebno je omogućiti da odaberu koje će parametre pratiti (biovolumen, klorofil-a, fikocijanin, prozirnost, koncentracija toksina). Prijedlog je da se putem profila za kupanje, za lokacije na kojima se kod kupaca pojavljuje svrbež ili infekcije rana, a koje su dokazano uzrokovane npr. *Vibrio* spp., javnosti pruže informacije i savjeti vezani za higijenske mjere. Antimikrobnu otpornost je u fazi istraživanja, stoga su podaci još nedostatni te nisu spremna za redovnu uporabu. Za problem mikroplastike u vodenim okolišima, koja spada u područje primjene okvirne direktive o morskoj strategiji, trebalo bi se kroz određeno razdoblje vidjeti je li relevantan za Direktivu o vodi za kupanje. U budućnosti bi se trebala razmotriti primjena Direktive o vodi za kupanje, a koja je trenutno ograničena na kupce, i na druge rekreacijske aktivnosti, čiji je intenzitet u porastu. Zaključeno je da se velik broj rekreacijskih aktivnosti na vodi može odvijati na lokacijama u vodi za kupanje, ali bi se te aktivnosti trebale posebno uzeti obzir. U tom bi slučaju bilo potrebno uvesti dodatne lokacije uzorkovanja, produljiti vremensko razdoblje uzorkovanja, zbog toga što se neke rekreacijske aktivnosti odvijaju izvan sezone kupanja te također zonirati kupališta. (7)

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati pojavnost i koncentraciju mikrobiološkog pokazatelja *P. aeruginosa* u moru za kupanje na području urbanih plaža zapadnog dijela grada Rijeke (Kantrida), u različitim okolišnim uvjetima.

Također, ispitana je povezanost pokazatelja *P. aeruginosa* s pokazateljima fekalnog onečišćenja koji se rutinski određuju prema Uredbi (NN 73/08) (*E. coli* i crijevni enterokoki), kao i s dodatnim fekalnim (*C. perfringens*) i ne-fekalnim (*S. aureus*, UBB/37/22) indikatorima mikrobiološkog opterećenja.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Područje istraživanja

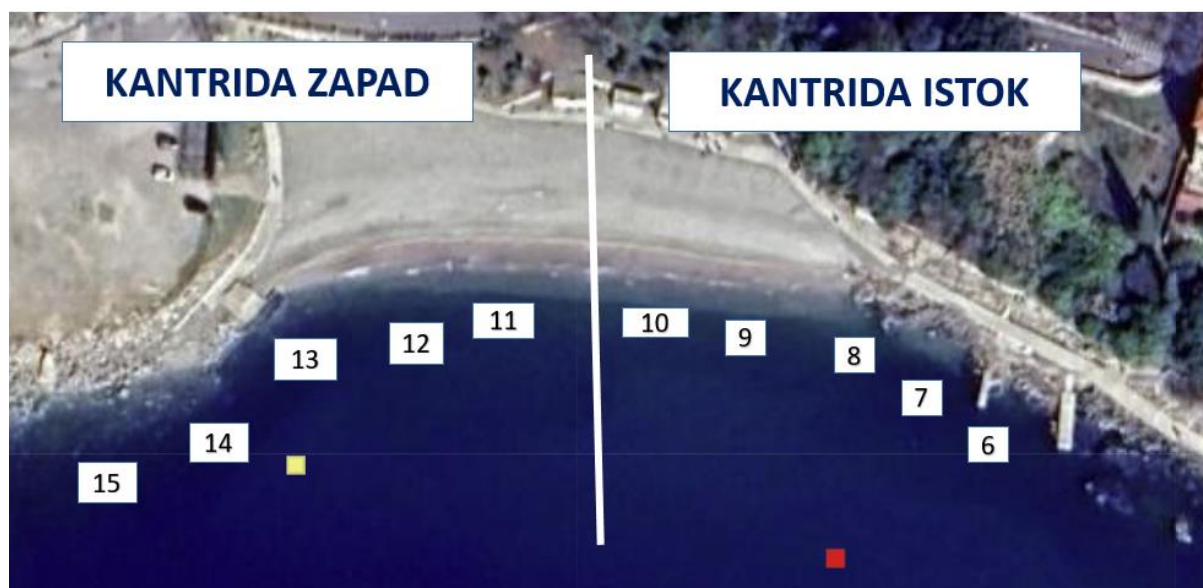
Istraživano područje uključuje četiri plaže na području Kantride, u zapadnom dijelu grada Rijeke. Lokacije uzorkovanja izabrane su temeljem povijesnih podataka, koji su ukazivali na pojačano mikrobiološko opterećenje. Navedeno područje bilo je predmetom intenzivnog uzorkovanja i ispitivanja (27) u vremenskom periodu od 2012. do 2014. godine. Na tim je plažama šest lokacija na kojima se redovno kontrolira kakvoća mora za kupanje: 3. Maj, Kantrida istok i zapad, Nogometno igralište, Ploče istok i zapad. Zbog bolje procjene mikrobiološkog opterećenja, istraživano područje pokriveno je s gustom mrežom lokacija te je uzorkovanje provedeno na ukupno 30 lokacija. Na slici 5. prikazan je satelitski prikaz svih lokacija a na slici 6. prikazan je satelitski prikaz plaže 3. Maj s oznakama mjesta uzorkovanja. Na slici 7. prikazan je satelitski prikaz plaže Kantrida zapad i Kantrida istok s mjestima uzorkovanja. Na slici 8. prikazan je satelitski prikaz plaže Nogometno igralište s prikazanim mjestima uzorkovanja a na slici 9. prikazan je satelitski prikaz plaža Ploče zapad i Ploče istok s prikazanim mjestima uzorkovanja.



Slika 5. Satelitski prikaz svih lokacija
(Izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)



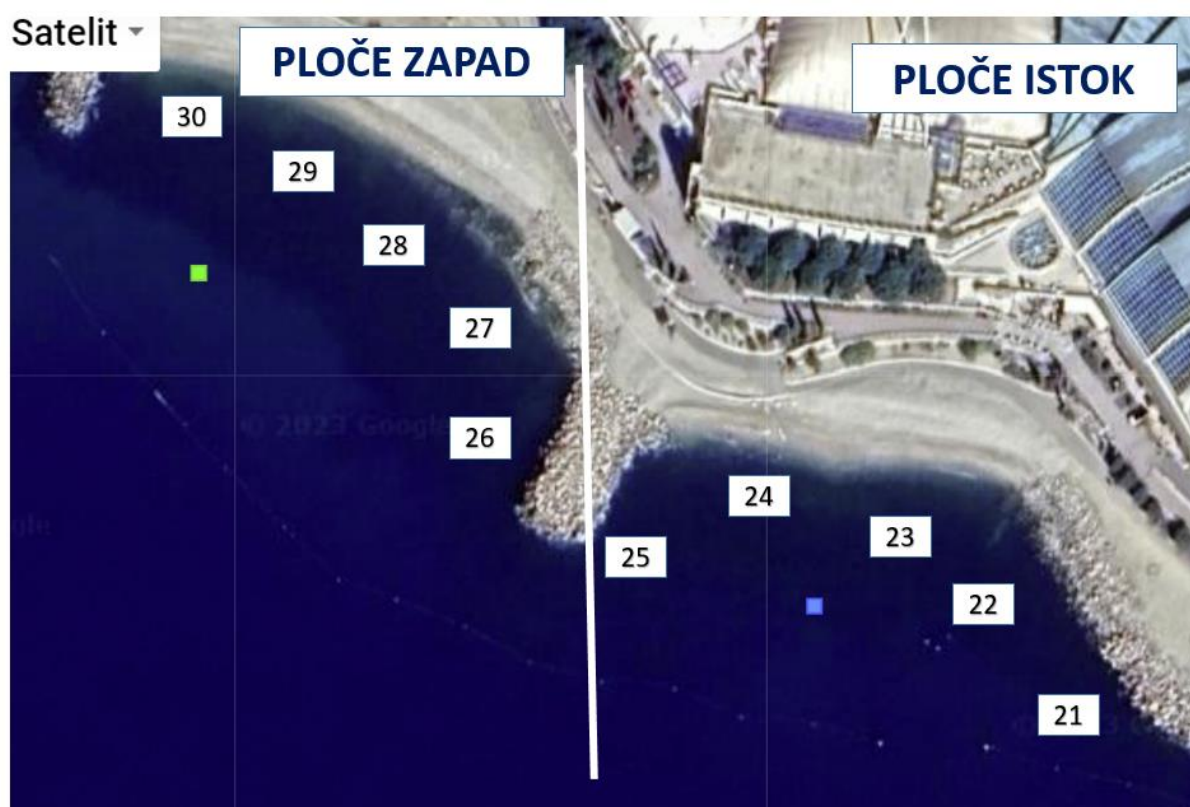
Slika 6. Satelitski prikaz plaže 3. Maj s oznakama mjesta uzorkovanja
(Izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)



Slika 7. Satelitski prikaz plaže Kantrida zapad i Kantrida istok s mjestima uzorkovanja
(Izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)



Slika 8. Satelitski prikaz plaže Nogometno igralište s prikazanim mjestima uzorkovanja
(Izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)



Slika 9. Satelitski prikaz plaža Ploče zapad i Ploče istok s prikazanim mjestima uzorkovanja
(Izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

3.2 Uzorkovanje

Uzorkovanje se provodilo pomoću ručnog uzorkivača u koji se umetne sterilna boca od 250 mL ili 500 mL. Uzorak za mjerenje saliniteta i temperature mora uzimao se je pomoću teleskopskog štapa s ugaonom čašom od polipropilena. Uzorci su uzeti s obale, u moru dubine najmanje jedan metar te najmanje jedan metar od obalne linije, 20-30 cm ispod površine mora. Nakon svakog uzetog uzorka, alkoholnim termometrom mjerila se temperatura mora. Sterilne staklene boce morale su biti označene s obzirom na lokaciju uzorkovanja te je svaka boca nosila svoju oznaku. Nakon toga uzorci su spremljeni u hladnjake te transportirani u Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, laboratorij za mikrobiologiju voda, gdje su u što kraćem vremenu analitički obrađeni.

Prilikom uzimanja uzoraka, koristio se obrazac UMK (obrazac uzorkovanja mora za kupanje) u kojem je potrebno naznačiti sat uzorkovanja, jačinu, smjer i prisutnost vjetera, kišu na dan uzorkovanja i kišu dan prije uzorkovanja, vrijeme (sunčano, oblačno, poluoblačno), temperaturu zraka, temperaturu mora te komentar (ukoliko postoje u moru životinje ili bilo kakav otpad koji bi mogao utjecati na rezultate).

Za potrebe ovog istraživanja u 2023. godini uzeto je 30 uzoraka mora tijekom sušnog razdoblja te 30 uzoraka mora nakon kišnog razdoblja. U 2023. godini prikupljeno je 60 uzoraka.

Također, korišteni su podaci za 965 uzoraka, proistekli iz istraživanja provedenog na istim lokacijama, 2012. – 2014. godine.

Ukupan broj analiziranih uzoraka iznosio je 1025.

Na slici 10. prikazan je ručni uzorkivač a na slici 11. sterilne boce (500 mL i 250 mL)



Slika 10. Ručni uzorkivač
(Izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)



Slika 11 . Sterilne boce (500 mL i 250 mL)
(Izvor: autor)

3.3 Fizikalno kemijski pokazatelji

Od fizikalno- kemijskih pokazatelja mjerena je temperatura zraka, temperatura mora, salinitet, pH te mutnoća. Salinitet mora određivao se je *in situ* terenskom sondom (YSI Model 30). Temperatura mora i zraka mjerila se alkoholnim termometrom, s podjelom ljestvice 10/1 °C. Mutnoća i pH mjerili su se u Odsjeku za vode i otpad, u Nastavnom zavodu za javno

zdravstvo Primorsko-goranske županije, turbidimetrom (uređaj za mjerenje mutnoće) te pH metrom.

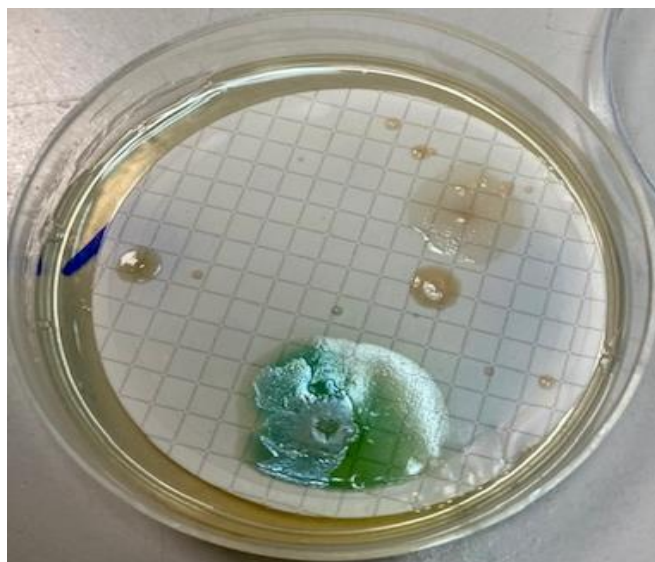
3.4 Količina oborina i jakost Sunčevog zračenja (DHMZ)

Podaci o količini oborina i jakosti Sunčevog zračenja zatraženi su od Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHMZ). Podaci su zatraženi uz pomoć zahtjeva za dnevne količine oborina i temperature zraka te zahtjeva za podatke globalnog zračenja.

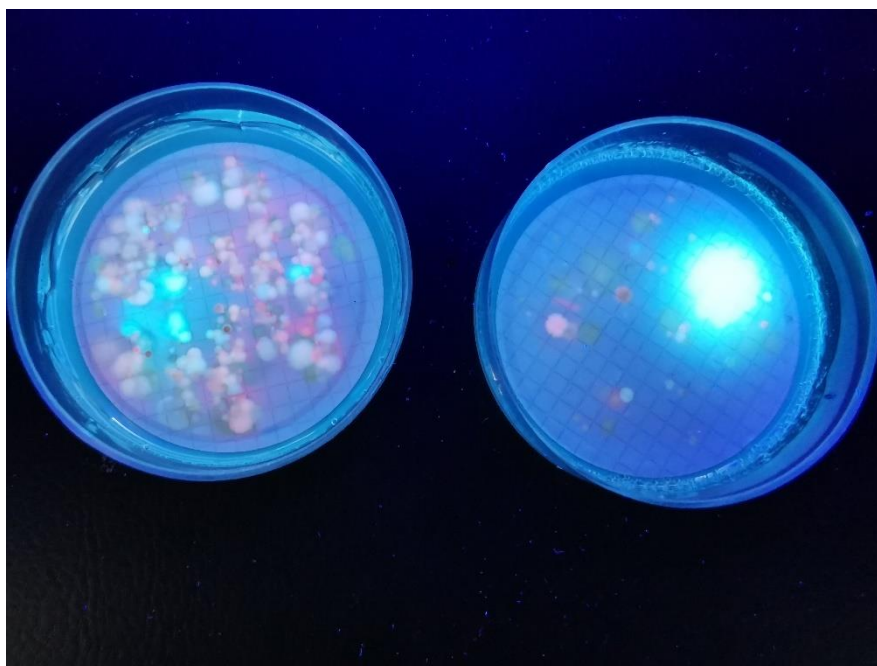
3.5 Mikrobiološki pokazatelji

3.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Broj *P. aeruginosa* određivao se je metodom HRN EN ISO 16266:2008. Nakon filtracije 100 mL uzorka mora filteri su se prenijeli na selektivni medij *Pseudomonas* Agar Base/CN-agar na (36 ± 2) °C kroz (44 ± 4) h. Karakteristične kolonije koje produciraju plavo-zelenu boju (piocijanin) dokaz su *P. aeruginosa*. Membranski filter dodatno je potrebno ispitati pod UV lampom pri čemu treba izbjegavati duže vrijeme izlaganja UV svjetlu, kako se ne bi oštetile bakterijske stanice. Suspektne kolonije, koje fluoresciraju a ne produciraju piocijanin kao i crvenkasto-smeđe kolonije s CN-agara se presađuju se na Nutrijent agar te inkubiraju pri (36 ± 2) °C tijekom (22 ± 2) h Kolonije koje fluoresciraju a ne produciraju piocijanin (nisu plave/zelene) brojale su se kao sumnjive na *P. aeruginosa*, a za daljnju identifikaciju korist se potvrdnim testom produkcije amonijaka upotrebom acetamid brotha. Kolonije porasle na Nutrijent agaru prenijele su se u epruvete s acetamid brothom, a epruvete su se inkubirale pri (36 ± 2) °C tijekom (22 ± 2) h. Nakom inkubacije, u epruvete se doda 1-2 kapi Nesslerovog reagensa te se prati pojava amonijaka, odnosno žuto do ciglasto-crveno obojenje, što je dokaz *P. aeruginosa*. Kolonije crvenkasto-smeđe boje, koje ne fluoresciraju broje se kao sumnjive na *P. aeruginosa*. Dalje se potvrđuju slijedećim testovima: oksidaza testom, produkcijom amonijaka upotrebom acetamid brotha i pojavom fluorescencije na King's B mediju. Na slici 12. prikazan je karakterističan porast *P. aeruginosa* (zelene boje) na CN agaru. Na slici 13. prikazana je detekcija *P. aeruginosa* UV lampom.



Slika 12. Karakteristični porast *P. aeruginosa* (zelene boje) na Pseudomonas Agar Base/CN-agar (CN agar)
(Izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)



Slika 13. Detekcija *P. aeruginosa* UV lampom
(Izvor: autor)

Uzorci su analizirani na sljedeće mikrobiološke pokazatelje:

- ukupan broj bakterija pri 37°C (UBB/37)
- ukupan broj bakterija pri 22°C (UBB/22)
- crijevni enterokoki
- *E. coli*
- *P. aeruginosa*
- *S. aureus*
- *C. perfringens*.

Uzorci su se obrađivali tehnikom membranske filtracije za sve navedene pokazatelje, osim za UBB/37 i UBB/22.

3.5.2 Ostali mikrobiološki pokazatelji

3.5.2.1 Ukupni broj kolonija

Uzorci za pokazatelj ukupni broj kolonija obrađeni su „pour plate“ tehnikom, odnosno tehnikom ulijevanja temperiranog hranjivog agara, prema modificiranoj normi HRN EN ISO 6222:2000. Metoda je modificirana na način da se umjesto kvašćevog agara koristio Marine agar, po sastavu bogatiji solima te stoga pogodniji za kultivaciju bakterija iz morskog okruženja. U sterilnu Petrijevu ploču prenese se 1 mL uzorka morske vode (ili adekvatno razrjeđenje) koji se prelije s 10-15 mL rastopljenog i temperiranog Marine agara. Nakon dodavanja Marine agara, Petrijeva ploča se 'miješala' kružnim pokretima po stolu kako bi došlo do homogenizacije uzorka mora i hranjivog agara. Petrijeve ploče se preokrenu te se inkubiraju pri 37° C tijekom 48 sati te pri 22 °C tijekom 72 sata. Broje se sve porasle kolonije, a rezultat se izražava kao CFU/mL. Na slici broj 14. prikazan je porast na Marine agaru (UBB/37) a na slici 15. prikazan je porast na Marine agaru (UBB/22).



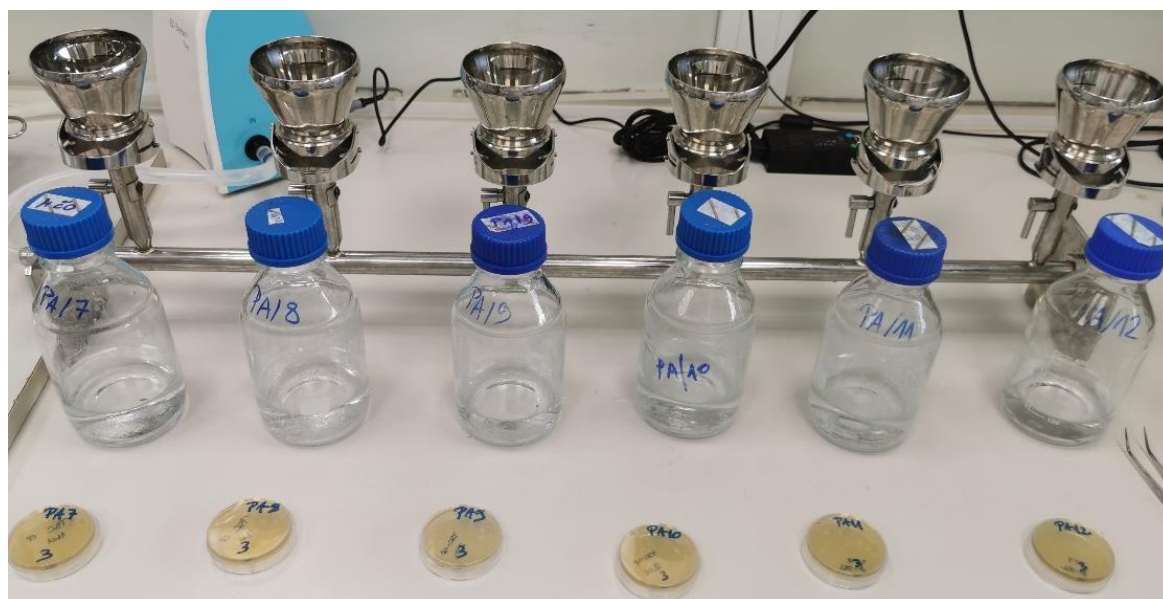
Slika 14. Mikrobiološki pokazatelj ukupni broj kolonija na temperaturi 37°C (UBB/37), porast na Marine agaru
(Izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)



Slika 15. Mikrobiološki pokazatelj ukupni broj kolonija na temperaturi 22°C (UBB/22), porast na Marine agaru
(Izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

Kod tehnike membranske filtracije mikroorganizmi iz uzorka morske vode zadržavaju se na membranskom filteru, obzirom da su pore filtera ($0,45\ \mu\text{m}$) manje od prosječnog promjera bakterijske stanice ($\sim 1\ \mu\text{m}$). Nakon filtracije 100 mL uzorka (ili manjeg volumena ili adekvatnog razrjeđenja), filter se prenosi na određenu vrstu selektivne hranjive podloge, ovisno

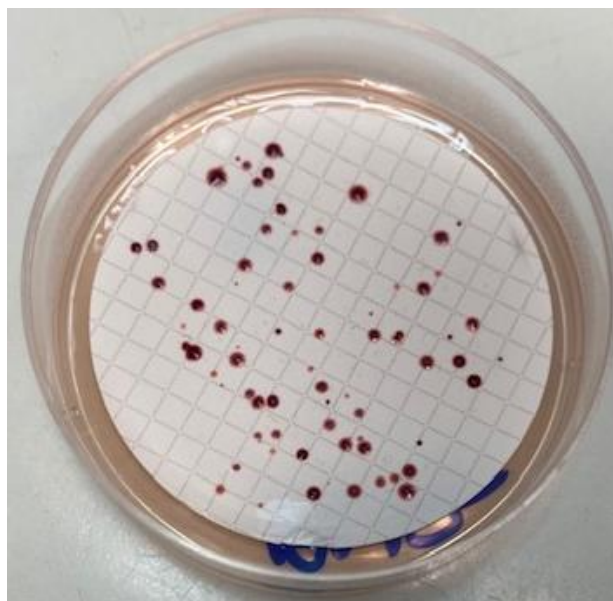
o mikroorganizmu koji se ispituje. Vrsta hranjive podloge te uvjeti inkubacije (vrijeme i temperatura), propisani su u pripadajućim ISO normama (ISO – engl. International Organization for Standardization, Međunarodna organizacija za normizaciju), za svaki pokazatelj. Nakon inkubacije hranjive podloge, na hranjivom agaru broje se kolonija karakterističnih morfoloških osobina te se po potrebi rade dokazni testovi. Na slici 16. prikazan je set za membransku filtraciju.



Slika 16. Set za membransku filtraciju
(Izvor: autor)

3.5.2.2 Enterokoki

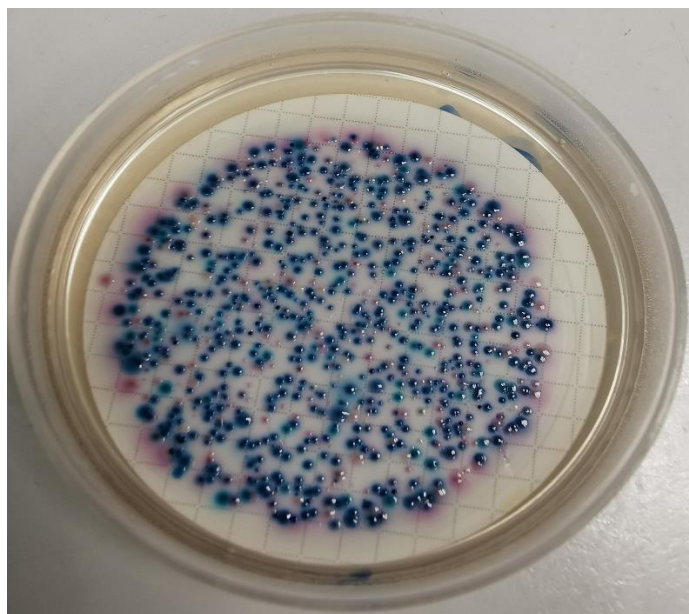
Prisustvo i broj crijevnih enterokoka određivano je prema HRN EN ISO 78992:2000. Volumen od 100 mL uzorka morske vode profiltrirao se je preko membranskog filtera koji se prenio na selektivnu SBA hranjivu podlogu (Slanetz i Bartley agar). Inkubacija se odvijala pri temperaturi od 37°C tijekom 24 - 48 sata. Medij sadrži inhibitor rasta Gram-negativnih bakterija, natrij azid (NaN_3) te 2,3,5-trifeniltetrazolium klorid (TTC otopina), koji služi kao indikator koji crijevni enterokoki reduciraju u crveni formazan. Inkubacija se vrši na 36 ± 2 °C tijekom 44 ± 4 h. Kolonije tipične morfologije su uzdignute, crvene, smeđe do ljubičaste boje (boje kestena). Ukoliko na SBA agaru porastu tipične kolonije, potrebno je provesti dokazni test. Filter se prenese na BAA agar (engl. Bile Aesculin Agar, žučni eskulin azid agar) koji se inkubira 2 sata na 44 °C. Crijevni enterokoki hidroliziraju eskulin u sastavu podloge do krajnjeg produkta 6,7-dihidroksikumarina koji s Fe^{3+} daje tamno do crno obojenu tvar koja difundira u medij (oko kolonija se stvara crni halo). Crni halo je dokaz crijevnih enterokoka. Na slici 15. prikazani su crijevni enterokoki na SBA agaru.



Slika 17. Crijevni enterokoki na SBA agaru (Slanetz i Bartley agar)
(Izvor: Odsjek za sanitarnu mikrobiologiju i biologiju okoliša NZZJZ PGŽ)

3.5.2.3 *Escherichia coli*

E. coli određivana je temperaturno modificiranom metodom HRN EN ISO 9308-1:2014/A1:2017, filtriranjem 100 mL uzorka mora kroz sterilni filter, veličine pora 0,45 μm . Nakon filtracije, membranski filter je prenesen na kromogenu selektivnu CCA hranjivu podlogu (engl. Chromogenic Coliform Agar). Petrijeve ploče inkubirane su pri $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 21 ± 3 sata, nakon čega se broje porasle kolonije. Kolonije roze do crvene boje dokaz su prisutnosti koliformnih bakterija (β -D-galaktozidaza pozitivna reakcija), a kolonije plave boje dokaz su *E. coli* (β -D-galaktozidaza i β -D-glukuronidaza pozitivna reakcija). Na slici 18. prikazan je karakterističan porast *E. coli* na CCA agaru.



Slika 18. Karakterističan porast *E. coli* na CCA agaru
(Izvor: autor)

3.5.2.4 *Staphylococcus aureus*

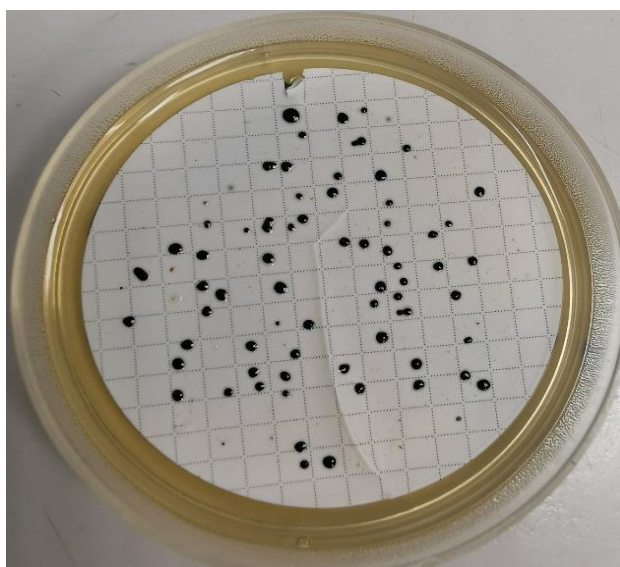
Obzirom da za dokazivanje i brojanje *S. aureus* u vodi nije dostupna ISO norma, korištena je modificirana metoda Američkog javno zdravstvenog udruženja (eng. American Public Health Association – APHA) u dijelu 9312 B Standardnih metoda (22 st. Ed 2017.). Modifikacija se odnosila na primjenu CHROMagar™ Staph aureus hranjive podloge, umjesto Baird Parker + Egg Yolk hranjivog agara. Nakon filtracije uzorka volumena 100 mL, filter se prenese na CHROMagar™ Staph aureus ploču, koja se inkubira na 37 °C tijekom 18 – 24 h. Na kromogenom hranjivom agaru se tijekom inkubacije formiraju se karakteristične kolonije izrazite svijetlo ljubičaste boje, dok je porast kolonija ostalih bakterija inhibiran, ili su bezbojne ili plave boje. Na slici 19. prikazan je porast *S. aureus* na CHROM agaru.



Slika 19. Porast *S. aureus* na CHROMagar™ Staph aureus hranjivoj podlozi (karakteristične kolonije ružičaste boje)
(Izvor: autor)

3.5.2.5 *Clostridium perfringens*

Za dokazivanje i brojenje *C. perfringens* primijenjena je metoda HRN EN ISO 14189:2016. Nakon filtracije 100 mL uzorka morske vode, filter je prenesen na selektivnu hranjivu TSC podlogu (engl. Tryptose Sulfite Cycloserine Agar). Nakon inkubacije pri 44° C tijekom 24 sata u anaerobnim uvjetima broje se karakteristične kolonije na hranjivom agaru. Suspektne kolonije su crne ili sive do žuto-smeđe boje. Kao potvrdni test koristi se kisela fosfataza, pri čemu se javlja ljubičasto obojenje kolonije. Na slici 20. prikazan je porast *C. perfringens* na TSC agaru.



Slika 20. Porast *C. perfringens* na Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (TSC agaru)
(Izvor: autor)

3.6 Statistička obrada podataka

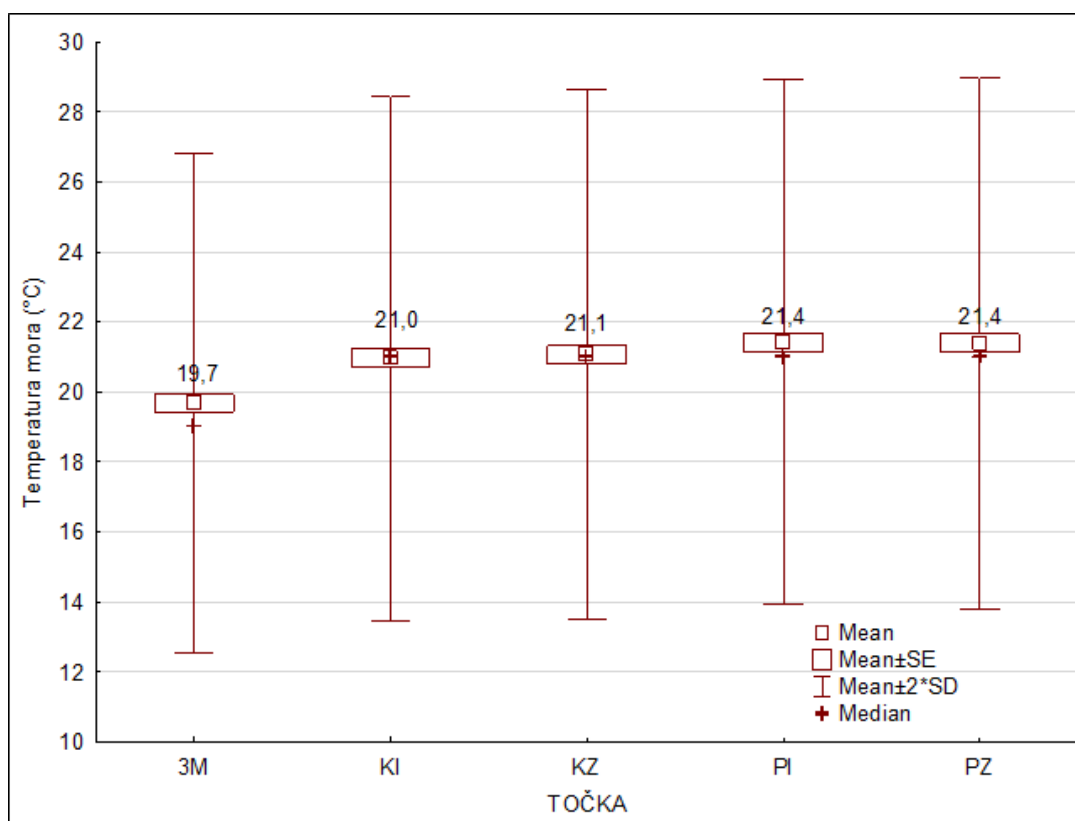
Statistička obrada podataka provedena je pomoću TIBCO Statistica v. 14.0.1.25 programskog paketa (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, SAD). Za prikaz rezultata korištena je deskriptivna statistika (Medijan). Kolmogorov-Smirnovljev testom ispitana je distribucija podataka. Kako dobiveni podaci nisu pokazali normalnu razdiobu, za korelacijsku analizu korišten je Spearmanov koeficijent korelacije. Mann-Whitney U i Kruskal-Wallis H testovima provjerena je značajnost razlike između pojedinih skupina podataka. Svi testovi korišteni su na intervalu pouzdanosti od 95 % te p vrijednosti $<0,05$.

4 REZULTATI

4.1 Fizikalno-kemijski parametri

4.1.1 Temperatura morske vode

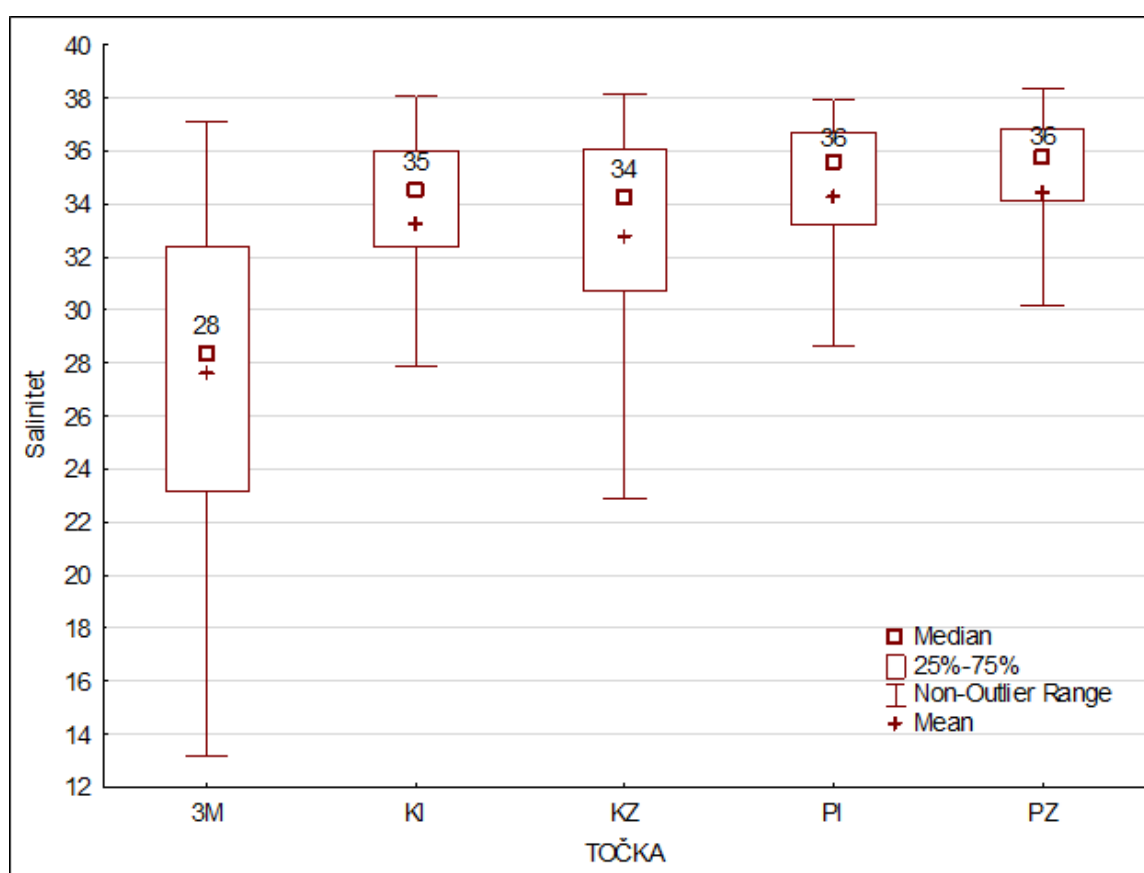
Vrijednosti temperature morske vode na istraživanim lokacijama kretale su se u rasponu od 12,0 – 28,0 °C, sa srednjom vrijednosti (sr. vr.) $20,9 \pm 3,8$ °C; medijanom 21,0 °C (interkvartilni raspon – IKR 18,5 – 24,0 °C). Najniže temperatura morske vode mjerene su na lokaciji 3. Maj, u rasponu od 12,0 – 27,0 °C, sr. vr. $19,7 \pm 3,6$ °C; medijan 19,0 °C (IKR 17,5 – 22,0 °C). Kruskal-Wallis testom je utvrđeno da se medijan temperature vode lokacije 3. Maj statistički značajno razlikuje od svih ostalih ispitanih lokacija ($N=1009$, $H=34,71$, $p<0,0001$), dok između ostalih lokacija nije bilo statistički značajne razlike, Slika 21. prikazuje srednju vrijednost temperature morske vode po točkama (lokacijama) 3. Maj, Kantrida istok, Kantrida zapad, Ploče istok te ploče zapad.



Slika 21. Srednja vrijednost temperature morske vode po točkama (lokacijama) 3. Maj (3M), Kantrida istok (KI), Kantrida zapad (KZ), Ploče istok (PI) te ploče zapad (PZ), „Boxplotovi“ pokazuju: srednja vrijednost ($\square$), Srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška ("box"), Srednja vrijednost $\pm 2 \times$ Standardna devijacija (brkovi, "whisker")

4.1.2 Salinitet

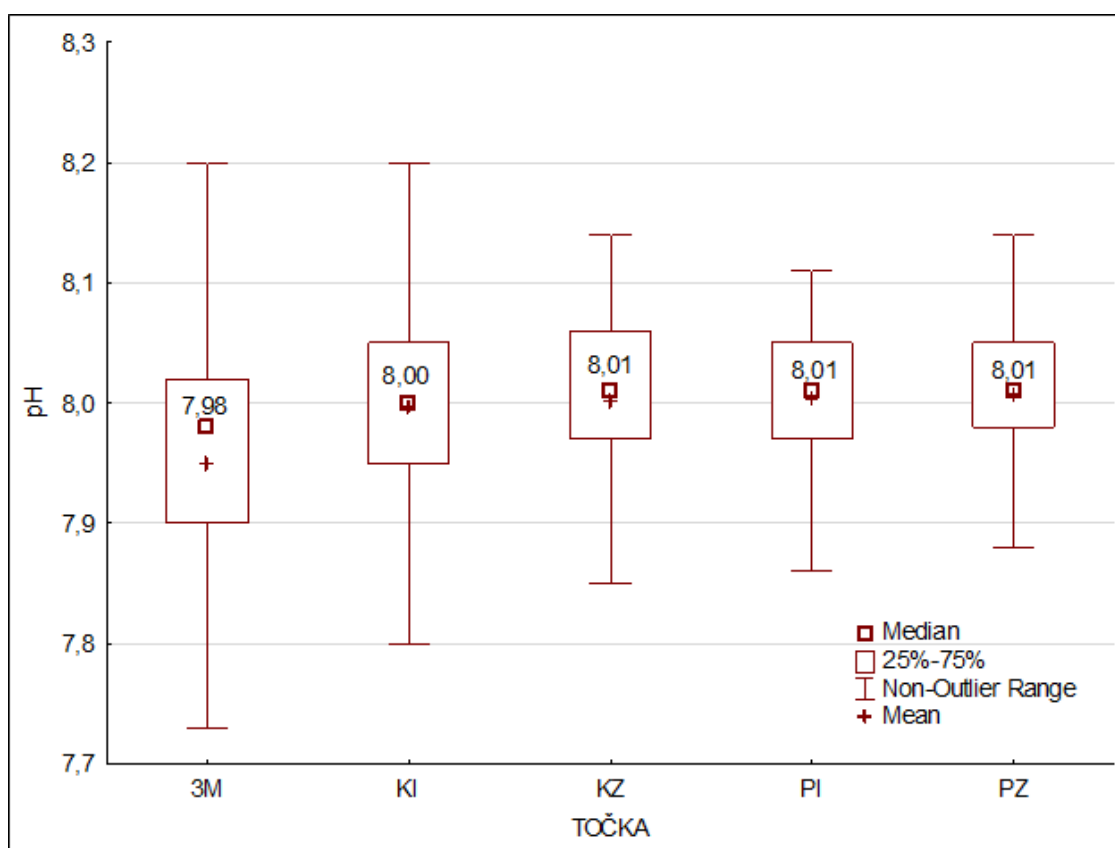
Vrijednosti saliniteta na istraživanim lokacijama kretale su se u rasponu od 0,8 – 38,3, sr. vr. $32,5 \pm 5,3$; medijan 34,5 (IKR 30,4 – 36,3). Najniže vrijednosti saliniteta mjerene su na lokaciji 3. Maj, u rasponu od 0,8 – 37,1, sr. vr. $27,6 \pm 6,2$; medijan 28,3 (IKR 23,1 – 32,4). Kruskal-Wallis testom je utvrđeno da se medijan saliniteta lokacije 3. Maj statistički značajno razlikuje od ostalih ispitanih lokacija ($N=1007$, $H=224,96$, $p<0,0001$), Slika 22. Između ostalih lokacija također postoji statistički značajna razlika u vrijednosti medijana saliniteta, izuzev između lokacija koje pripadaju istoj plaži, Kantride istok i zapad te Ploča istok i zapad. Slika 22. prikazuje medijan saliniteta po točkama (lokacijama) 3. Maj, Kantrida istok, Kantrida zapad, Ploče istok te ploče zapad.



Slika 22. Medijan saliniteta po točkama (lokacijama) 3. Maj (3M), Kantrida istok (KI), Kantrida zapad (KZ), Ploče istok (PI) te ploče zapad (PZ), s prvim (25%) i trećim kvartilom (75%) i whisker = non-outlier range („brkovi“ – označavaju najveću i najmanju vrijednost koje nisu stršeće vrijednosti odnosno outlieri).

4.1.3 pH vrijednost

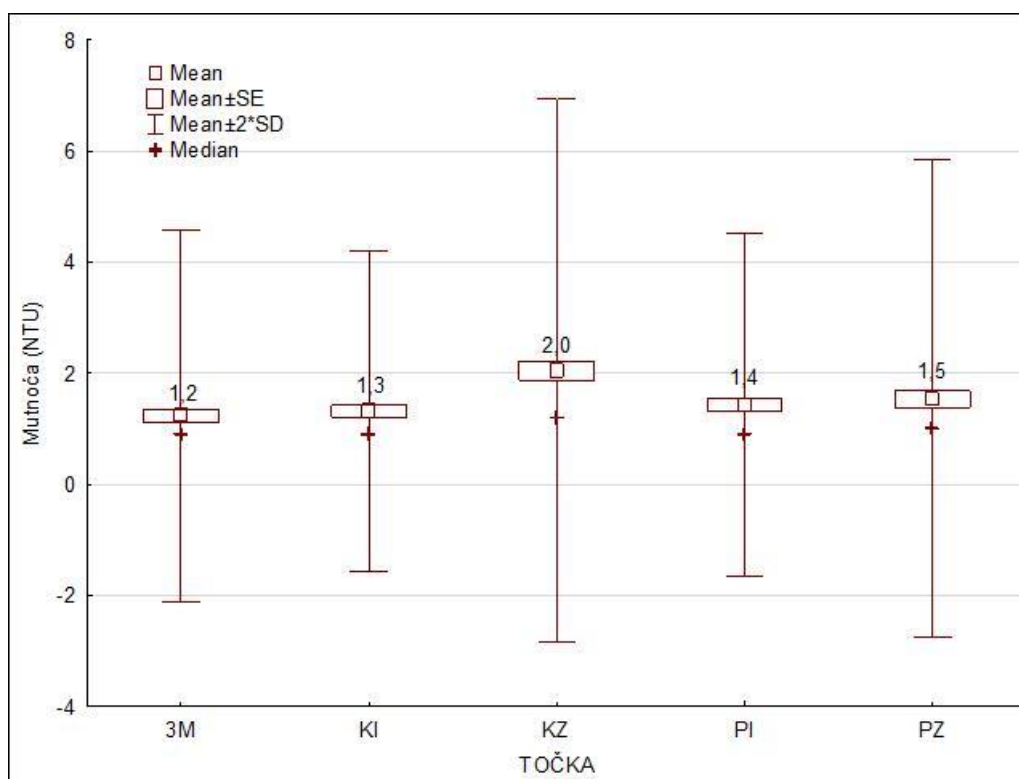
Vrijednosti pH na istraživanim lokacijama kretale su se u rasponu od 7,51 – 8,30, sr. vr. $7,99 \pm 0,09$; medijan 8,01 (IKR 7,95 – 8,05). Najniže pH vrijednosti mjerene su na lokaciji 3. Maj, u rasponu od 7,51 – 8,20, sr. vr. $7,95 \pm 0,12$; medijan 7,98 (IKR 7,90 – 8,02). Kruskal-Wallis testom je utvrđeno da se medijan pH vrijednosti lokacije 3. Maj statistički značajno razlikuje od ostalih ispitanih lokacija ($N=1007$, $H=41,17$, $p<0,0001$), dok između ostalih lokacija nije bilo statistički značajne razlike, Slika 23. prikazuje medijan pH vrijednosti po točkama (lokacijama) 3. Maj, Kantrida istok, Kantrida zapad, Ploče istok te ploče zapad.



Slika 23. Medijan pH vrijednosti po točkama (lokacijama) 3. Maj (3M), Kantrida istok (KI), Kantrida zapad (KZ), Ploče istok (PI) te ploče zapad (PZ), s prvim (25%) i trećim kvartilom (75%) i whisker = non-outlier range („brkovi“ – označavaju najveću i najmanju vrijednost koje nisu stršeće vrijednosti odnosno outlieri).

4.1.4 Mutnoća

Vrijednosti mutnoće na istraživanim lokacijama kretale su se u rasponu od 0,2 – 18,1 NTU, sr. vr. $1,5 \pm 1,9$ NTU; medijan 1,0 NTU (IKR 0,7 – 1,5 NTU). Najviše vrijednosti mutnoće mora mjerene su na lokaciji Kantrida zapad, u rasponu od 0,2 – 15,8 NTU, sr. vr. $2,0 \pm 2,5$ NTU; medijan 1,2 NTU (IKR 0,8 – 2,2 NTU). Kruskal-Wallis testom je utvrđeno da se medijan vrijednosti mutnoće za lokaciju Kantrida zapad statistički značajno razlikuje od ostalih ispitanih lokacija ($N=1007$, $H=37,81$, $p<0,0001$), dok između ostalih lokacija nije bilo statistički značajne razlike. Slika 24. prikazuje srednju vrijednost mutnoće po točkama (lokacijama) 3. Maj, Kantrida istok, Kantrida zapad, Ploče istok te ploče zapad.



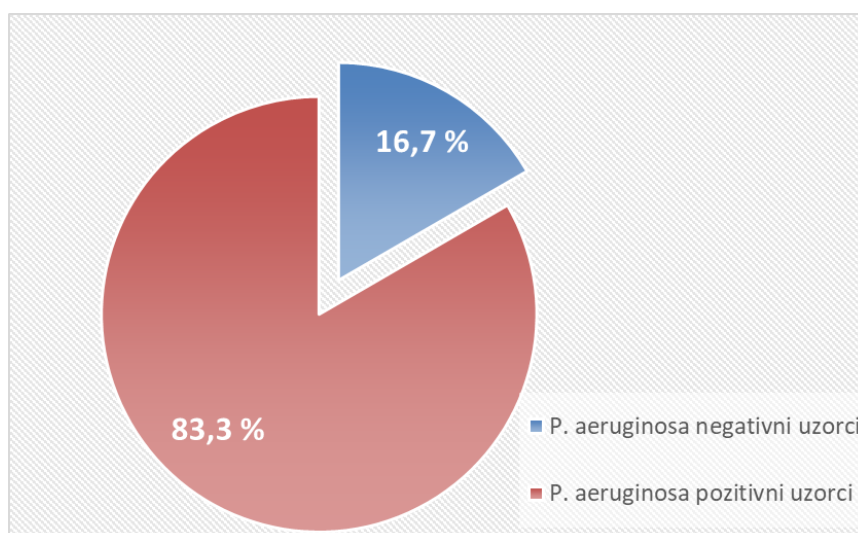
Slika 24. Srednja vrijednost mutnoće po točkama (lokacijama) 3. Maj (3M), Kantrida istok (KI), Kantrida zapad (KZ), Ploče istok (PI) te ploče zapad (PZ), „Boxplotovi“ pokazuju: srednja vrijednost ($\square$), Srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška ("box"), Srednja vrijednost $\pm 2 \times$ Standardna devijacija (brkovi, "whisker")

4.2 Mikrobiološki pokazatelji

4.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

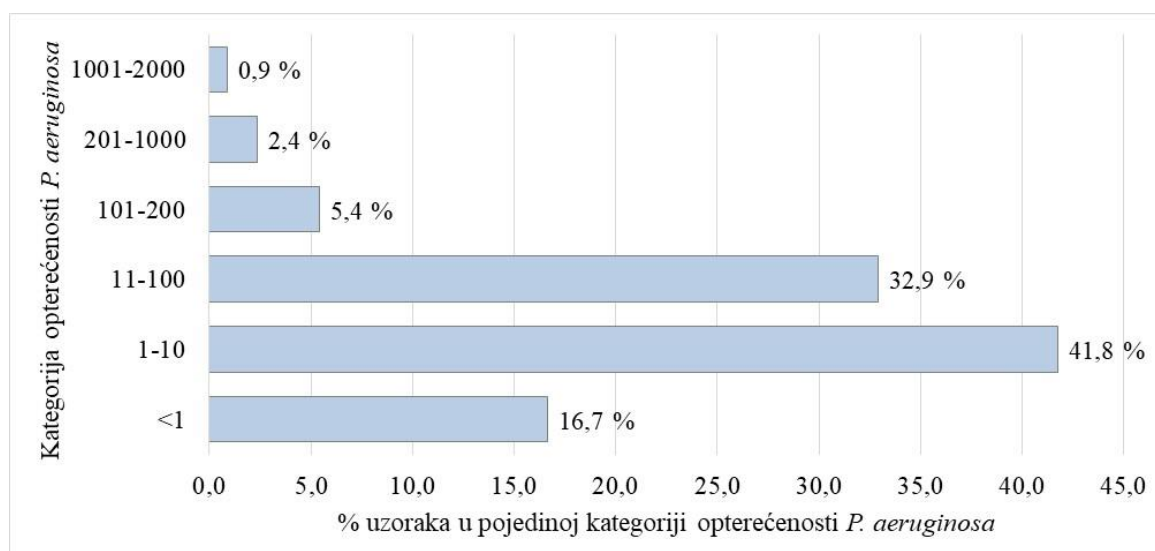
Na pokazatelj *P. aeruginosa* ispitano je 1015 uzoraka. Od toga, u 169 uzoraka (16,7 %) *P. aeruginosa* nije dokazan, dok je u najvećem udjelu uzoraka, 83,3% dokazan (846/1015).

Slika 25. prikazuje udio *P. aeruginosa* pozitivnih i negativnih uzoraka.



Slika 25. Udio *P. aeruginosa* pozitivnih i negativnih uzoraka (ukupno ispitano 1015 uzoraka)

P. aeruginosa uzorci podijeljeni u šest kategorija opterećenosti: <1, 1-10, 11-100, 101-200, 201-1000, 1001-2000. Na Slici 26. se može vidjeti da je najveći udio uzoraka u kategoriji manjeg (1-10, 41,8 %) i srednjeg opterećenja (11-100, 32,9 %), međutim, u 8,7 % uzoraka (88/1015) broj kolonija je bio veći od 100 CFU/100 mL, a u 0,9 % uzoraka veći od 1000 CFU/100 mL, Slika 26 prikazuje udio uzoraka u pojedinoj kategoriji opterećenosti *P. aeruginosa*.

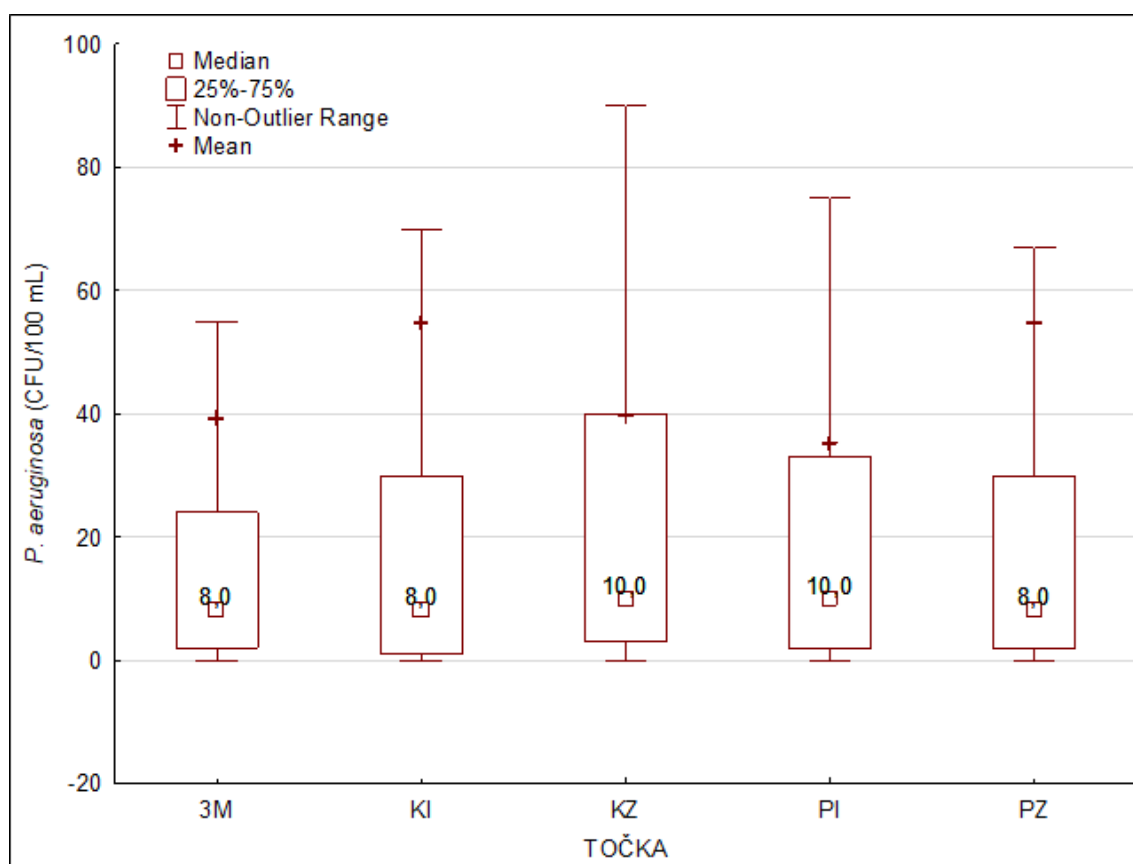


Slika 26. Udio uzoraka u pojedinoj kategoriji opterećenosti *P. aeruginosa* (ukupno ispitano 1015 uzoraka)

Od 88 uzoraka s koncentracijom *P. aeruginosa* >100 CFU/100 mL, kod njih 27 (vrijednosti *E. coli* bile su iznad dozvoljene granične vrijednosti od 300 CFU/100 mL, a kod 19 uzoraka vrijednosti enterokoka bile su iznad dozvoljene granične vrijednosti za enterokoke od 200 CFU/100 mL, prema Uredbi (NN 73/2008).

Vrijednosti broja *P. aeruginosa* na istraživanim lokacijama kretale su se u rasponu od 0,0 – 1950,0 CFU/100 mL, sa srednjom vrijednosti (sr. vr.) $44,6 \pm 154,2$ CFU/100 mL; medijanom 8,0 CFU/100 mL (interkvartilni raspon – IKR 2,0 – 30,0 CFU/100 mL). Između ispitanih lokacija Kruskal-Wallis testom nije utvrđena statistički značajna razlika.

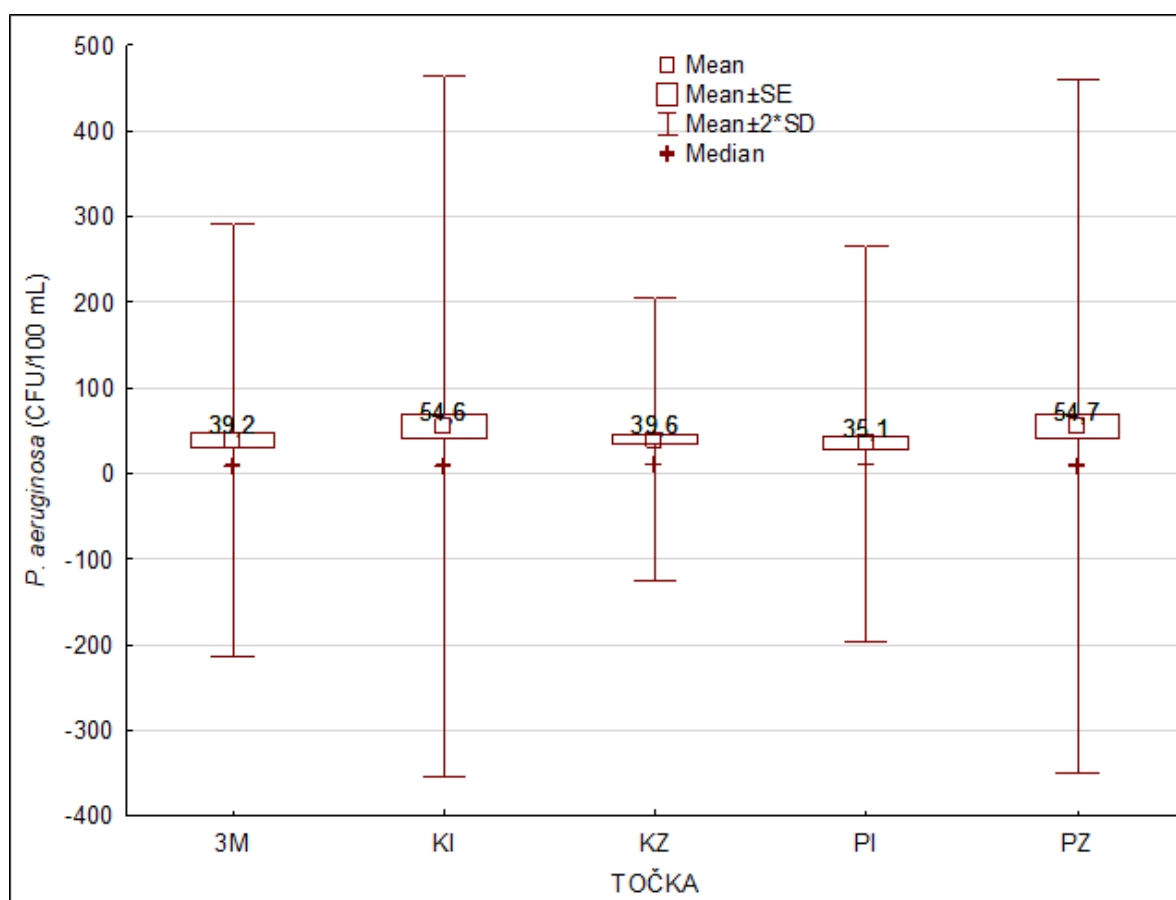
Najveće vrijednosti medijana broja *P. aeruginosa* mjerene su na lokaciji Kantrida zapad (raspon 0,0 – 780,0 CFU/100 mL, medijan 10 CFU/100 mL, IKR 3,0 – 40,0 CFU/100 mL) i Ploče istok (raspon 0,0 – 1560,0 CFU/100 mL, medijan 8 CFU/100 mL, IKR 2,0 – 33,0 CFU/100 mL), Slika 27. prikazuje medijan vrijednosti *P. aeruginosa* po točkama (lokacijama) 3. Maj, Kantrida istok, Kantrida zapad, Ploče istok te ploče zapad.



Slika 27. Medijan vrijednosti *P. aeruginosa* po točkama (lokacijama) 3. Maj (3M), Kantrida istok (KI), Kantrida zapad (KZ), Ploče istok (PI) te ploče zapad (PZ), s prvim (25%) i trećim kvartilom

(75%) i whisker = non-outlier range („brkovi“ – označavaju najveću i najmanju vrijednost koje nisu stršeće vrijednosti odnosno outlieri).

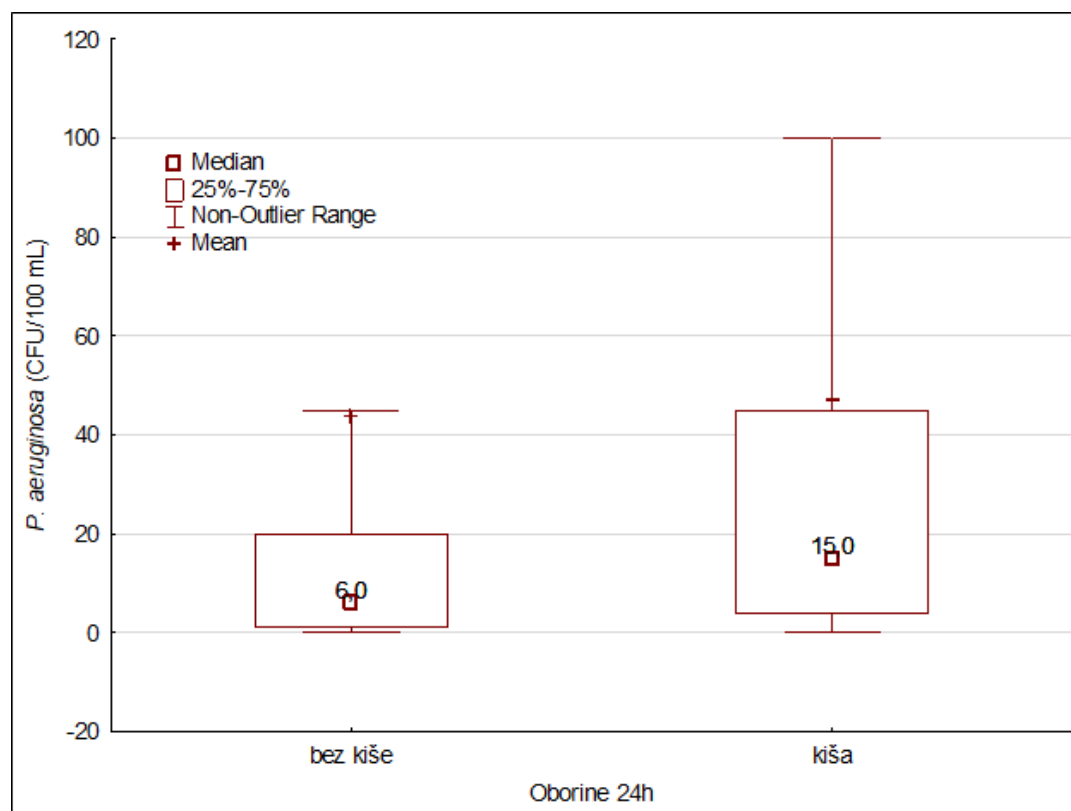
Najveće srednje vrijednosti broja *P. aeruginosa* mjerene su na lokaciji Ploče zapad (raspon 0,0 – 1950,0 CFU/100 mL, sr. vr. 54,7±202,3 CFU/100 mL) i Kantrida istok (raspon 0,0 – 1600,0 CFU/100 mL, sr. vr. 54,6±204,8 CFU/100 mL), Slika 28. prikazuje srednju vrijednost broja *P. aeruginosa* po točkama (lokacijama) 3. Maj, Kantrida istok, Kantrida zapad, Ploče istok te ploče zapad.



Slika 28. Srednja vrijednost broja *P. aeruginosa* po točkama (lokacijama) 3. Maj (3M), Kantrida istok (KI), Kantrida zapad (KZ), Ploče istok (PI) te ploče zapad (PZ), „Boxplotovi“ pokazuju: srednja vrijednost (□), Srednja vrijednost±standardna pogreška ("box"), Srednja vrijednost±2xStandardna devijacija (brkovi, "whisker")

Na Slici 29. prikazan je medijan vrijednosti broja *P. aeruginosa* u razdoblju bez kiše (N=398 uzoraka) i u razdoblju s kišom (u obzir su uzeta 24 h prije uzorkovanja, dani s oborinama >0,1 mm; N=617 uzoraka). Mann-Whitney U testom utvrđena je statistički značajna razlika u vrijednosti medijana broja *P. aeruginosa* između navedena dva promatrana razdoblja (M-W test, Z=-8,04, p<0,0001). U razdoblju kiše medijan broja *P. aeruginosa* iznosio je 14,5

CFU/100 mL (raspon 0,0 – 1500,0 CFU/100 mL, sr. vr. $46,4 \pm 110,8$ CFU/100 mL, IKR 4,0 – 45,0 CFU/100 mL), a bez kiše 6,0 (raspon 0,0 – 1950,0 CFU/100 mL, sr. vr. $43,5 \pm 175,5$ CFU/100 mL, IKR 1,0 – 20,0 CFU/100 mL).



Slika 29. Medijan vrijednosti *P. aeruginosa* u razdoblju bez kiše i s kišom (>0,1 mm), s prvim (25%) i trećim kvartilom (75%) i whisker = non-outlier range („brkovi“ – označavaju najveću i najmanju vrijednost koje nisu stršće vrijednosti odnosno outlieri).

Spearmanovom korelacijskom analizom utvrđena je značajna negativna korelacija između *P. aeruginosa* i temperaturom vode ($r_s = -0,194$; $p < 0,05$) te saliniteta ($r_s = -0,100$; $p < 0,05$). Značajne pozitivne povezanosti uočena su između *P. aeruginosa* i pH ($r_s = 0,080$; $p < 0,05$) te mutnoće ($r_s = 0,083$; $p < 0,05$). Sa svim ispitanim mikrobiološkim pokazateljima, izuzev sa UBB/37 i *C. perfringens*, *P. aeruginosa* je bio u pozitivnoj korelaciji, i to prema jačini korelacije slijedećim redom: *S. aureus* ($r_s = 0,280$; $p < 0,05$), *E. coli* ($r_s = 0,268$; $p < 0,05$), enterokoki ($r_s = 0,220$; $p < 0,05$) i UBB/22 ($r_s = 0,063$; $p < 0,05$), Tablica 4. prikazuje Spearmanove korelacije ispitanih pokazatelja

Tablica 4. Prikaz Spearmanove korelacije ispitanih pokazatelja

	Tv	Sal	pH	Mut	UBB/37	UBB/22	EC	ENT	SA	CP
<i>P. aeruginosa</i>	-0,194	-0,100	0,080	0,083	0,013	0,063	0,268	0,220	0,280	0,010

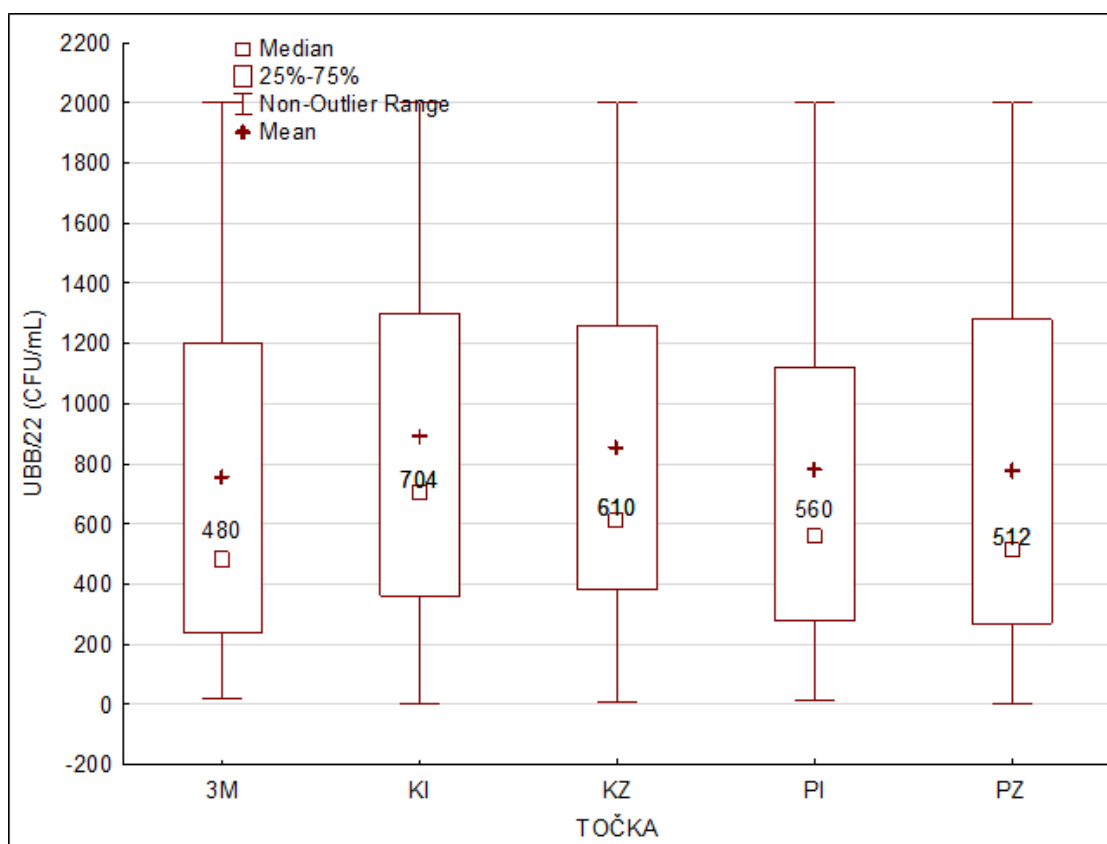
Tv – Temperatura vode; Sal – Salinitet; Mut – Mutnoća; EC – *E. coli*; ENT – enterokoki; SA – *S. aureus*; CP – *C. perfringens*

* Podebljane vrijednosti ukazuju na statistički značajnu korelaciju

4.2.2 Ostali mikrobiološki pokazatelji

4.2.2.1 Broj kolonija pri 22 °C

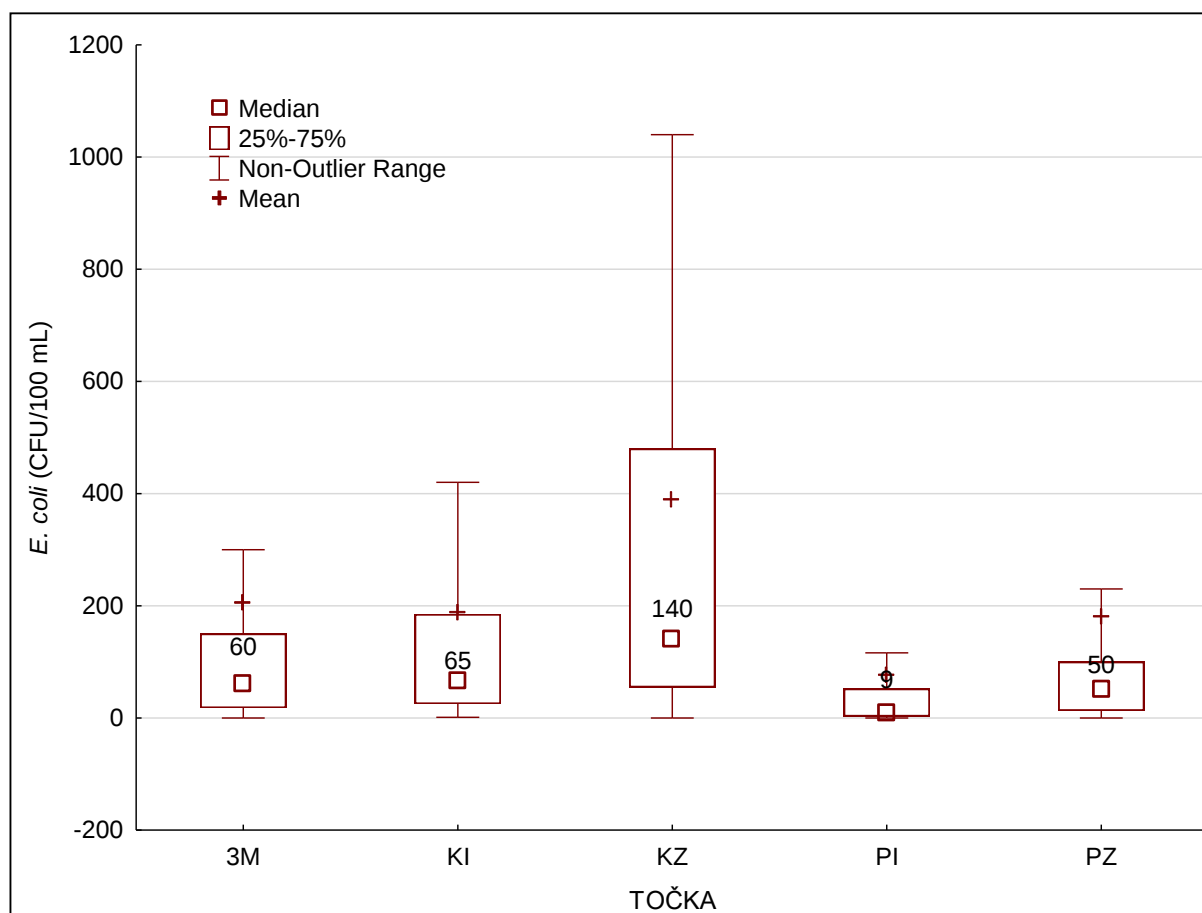
Vrijednosti ukupnog broja kolonija pri 22 °C (UBB/22) na istraživanim lokacijama kretale su se u rasponu od 0,0 – 2001,0 CFU/mL, sr. vr. 810,2±652,0 CFU/mL; medijan 560,0 CFU/mL (IKR 300,0 – 1200,0 CFU/mL). Najviše vrijednosti UBB/22 mjerene su na lokaciji Kantrida istok, u rasponu od 4,0 – 2001,0 CFU/mL, sr. vr. 888,7±662,6 CFU/mL; medijan 704,0 CFU/mL (IKR 360,0 – 1300,0 CFU/mL). Kruskal-Wallis testom je utvrđeno da se medijan vrijednosti UBB/22 za lokaciju Kantrida istok statistički značajno razlikuje samo od lokacije 3. Maj (N=1015, H=12,54, p=0,0137), dok između ostalih lokacija nije bilo statistički značajne razlike, Slika 30. prikazuje medijan ukupnog broja kolonija pri 22 °C, po točkama (lokacijama) 3. Maj, Kantrida istok, Kantrida zapad, Ploče istok te ploče zapad.



Slika 30. Medijan ukupnog broja kolonija pri 22 °C, po točkama (lokacijama) 3. Maj (3M), Kantrida istok (KI), Kantrida zapad (KZ), Ploče istok (PI) te ploče zapad (PZ), s prvim (25%) i trećim kvartilom (75%) i whisker = non-outlier range („brkovi“ – označavaju najveću i najmanju vrijednost koje nisu stršeće vrijednosti odnosno outlieri).

4.2.2.2 *Escherichia coli*

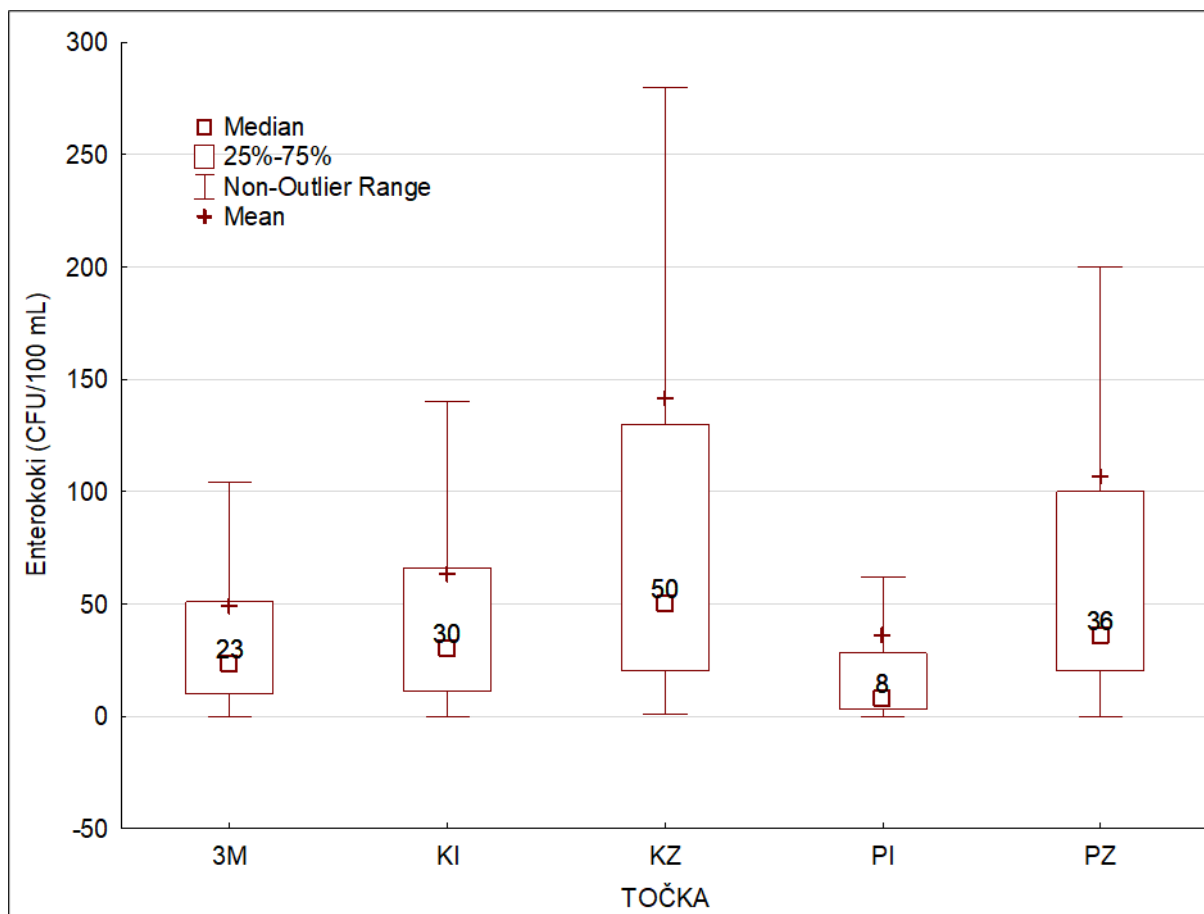
Vrijednosti broja *E. coli* na istraživanim lokacijama kretale su se u rasponu od 0,0 – 3500,0 CFU/100 mL, sr. vr. 207,5±414,1 CFU/100 mL; medijan 59,0 CFU/100 mL (IKR 12,0 – 180,0 CFU/100 mL). Najveći brojevi *E. coli* mjereni su na lokaciji Kantrida zapad, u rasponu od 0,0 – 3500,0 CFU/100 mL, sr. vr. 389,0±573,9 CFU/100 mL; medijan 140,0 CFU/100 mL (IKR 55,0 – 480,0 CFU/100 mL). Kruskal-Wallis testom je utvrđeno da se medijan broja *E. coli* za lokaciju Kantrida zapad statistički značajno razlikuje od svih ostalih lokacija (N=1015, H=168,63, p<0,0001), Slika 31. prikazuje medijan vrijednosti *E. coli* po točkama (lokacijama). Statistički značajna razlika u vrijednosti medijana broja *E. coli* također je utvrđena između lokacija 3. Maj s Kantridom zapad i Ploče istok; između Kantride istok s Kantridom zapad i Ploče istok; između Ploče zapad s Kantrida zapad i Ploče istok. Lokacija Ploče istok imala je najniže vrijednosti broja *E. coli* te se statistički značajno razlikovala od svih lokacija (raspon vrijednosti 0,0 – 2000,0 CFU/100 mL, sr. vr. 75,9±206,5 CFU/100 mL, medijan 9,0 CFU/100 mL, IKR 3,0-52,0 CFU/100 mL)



Slika 31. Medijan vrijednosti *E. coli*, po točkama (lokacijama) 3. Maj (3M), Kantrida istok (KI), Kantrida zapad (KZ), Ploče istok (PI) te ploče zapad (PZ), s prvim (25%) i trećim kvartilom (75%) i whisker = non-outlier range („brkovi“ – označavaju najveću i najmanju vrijednost koje nisu stršeće vrijednosti odnosno outlieri).

4.2.2.3 Enterokoki

Vrijednosti broja enterokoka na istraživanim lokacijama kretale su se u rasponu od 0,0 – 3000,0 CFU/100 mL, sr. vr. $78,9 \pm 185,2$ CFU/100 mL; medijan 26,0 CFU/100 mL (IKR 10,0 – 68,0 CFU/100 mL). Najveći brojevi enterokoka mjereni su na lokaciji Kantrida zapad, u rasponu od 1,0 – 3000,0 CFU/100 mL, sr. vr. $141,1 \pm 296,8$ CFU/100 mL; medijan 50,0 CFU/100 mL (IKR 20,0 – 130,0 CFU/100 mL). Kruskal-Wallis testom je utvrđeno da se medijan broja enterokoka za lokaciju Kantrida zapad statistički značajno razlikuje od svih ostalih lokacija ($N=1015$, $H=145,24$, $p<0,0001$), izuzev lokacije Ploče zapad, Slika 32. prikazuje medijan vrijednosti enterokoka po točkama (lokacijama). Statistički značajna razlika u vrijednosti medijana broja enterokoka također je utvrđena između lokacija 3. Maj s Kantridom zapad i Ploče istok i zapad; između Kantride istok s Kantridom zapad i Ploče istok; između Ploče zapad s 3. Maj i Ploče istok. Lokacija Ploče istok imala je najniže vrijednosti broja enterokoka te se statistički značajno razlikovala od svih lokacija (raspon vrijednosti 0,0 – 700,0 CFU/100 mL, sr. vr. $35,5 \pm 84,9$ CFU/100 mL, medijan 8,0 CFU/100 mL CFU/100 mL, IKR 3,0-28,0 CFU/100 mL).

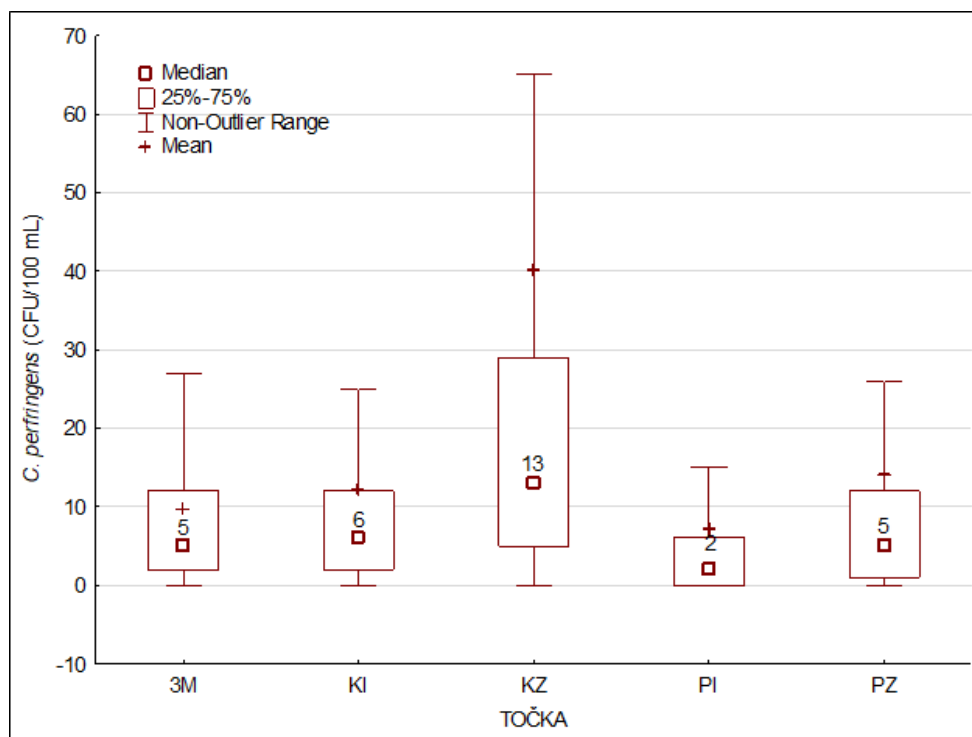


Slika 32. Medijan vrijednosti enterokoka po točkama (lokacijama) 3. Maj (3M), Kantrida istok (KI), Kantrida zapad (KZ), Ploče istok (PI) te ploče zapad (PZ), s prvim (25%) i trećim kvartilom (75%) i whisker = non-outlier range („brkovi“ – označavaju najveću i najmanju vrijednost koje nisu stršeće vrijednosti odnosno outlieri).

4.2.2.4 *Clostridium perfringens*

Vrijednosti broja *C. perfringens* na istraživanim lokacijama kretale su se u rasponu od 0,0 – 1500,0 CFU/100 mL, sr. vr. $16,6 \pm 61,3$ CFU/100 mL; medijan 5,0 CFU/100 mL (IKR 2,0 – 14,0 CFU/100 mL). Najveći brojevi *C. perfringens* mjereni su na lokaciji Kantrida zapad, u rasponu od 0,0 – 1500,0 CFU/100 mL, sr. vr. $40,1 \pm 127,5$ CFU/100 mL; medijan 13,0 CFU/100 mL (IKR 5,0 – 29,0 CFU/100 mL). Kruskal-Wallis testom je utvrđeno da se medijan broja *C. perfringens* za lokaciju Kantrida zapad statistički značajno razlikuje od svih ostalih lokacija ($N=1015$, $H=145,24$, $p<0,0001$), Slika 33. prikazuje medijan vrijednosti *C. perfringens* po točkama (lokacijama). Statistički značajna razlika u vrijednosti medijana broja *C. perfringens* također je utvrđena između lokacija 3. Maj s Kantridom zapad i Ploče istok; između Kantride istok s Kantridom zapad i Ploče istok; između Ploče zapad s Kantrida zapad i Ploče istok. Lokacija Ploče istok imala je najniže vrijednosti broja *C. perfringens* te se statistički značajno

razlikovala od svih lokacija (raspon vrijednosti 0,0 – 80,0 CFU/100 mL, sr. vr. $7,1 \pm 14,1$ CFU/100 mL, medijan 2,0, IKR 0,0-6,0 CFU/100 mL).



Slika 33. Medijan vrijednosti *C. perfringens* po točkama (lokacijama) 3. Maj (3M), Kantrida istok (KI), Kantrida zapad (KZ), Ploče istok (PI) te ploče zapad (PZ), s prvim (25%) i trećim kvartilom (75%) i whisker = non-outlier range („brkovi“ – označavaju najveću i najmanju vrijednost koje nisu stršeće vrijednosti odnosno outlieri).

5 RASPRAVA

Prosječni salinitet Jadranskog mora iznosi 38 ‰, međutim može značajno varirati u priobalju, ovisno o količini dotoka slatke vode u more. Tako lokacije promatrane u ovom istraživanju pokazuju niži salinitet od navedenog. Posebno je to izraženo na lokaciji 3. Maj, na kojoj je mjerena najniža temperatura mora, salinitet i pH, što ukazuje da su na toj lokaciji dotoci slatke vode najveći. Međutim, iako se izvori slatke vode na plažama smatraju značajnim čimbenikom rizika zbog moguće opterećenosti i transporta fekalnog materijala, na navedenoj lokaciji vrijednosti koncentracije indikatora fekalnog onečišćenja nisu bile najviše (27). Prema dobivenim vrijednostima, unatoč najjačim dotocima slatke vode, lokacija 3. Maj nije i mikrobiološki najopterećenija, već je to susjedna plaža, Kantrida, posebno njen zapadni dio, na kojoj nisu zabilježeni tako niski saliniteti. Navedeno ukazuje da dotok slatke vode u more predstavlja rizik od onečišćenja obalne zone i rekreativnog dijela, međutim slatka voda ne mora nužno biti onečišćena. Salinitet plaže 3. Maj kreće se u rasponu od 0,8 do 37,1 ‰, s medijanom 28,3, što ukazuje na brojne dotoke slatkih voda u more na samim mjestima uzorkovanja. To prati i niža temperatura i pH u odnosu na morsku vodu, obzirom da slatka voda dolazi iz podzemlja a samim time ima nižu temperaturu i niži pH u odnosu na morsku vodu. Salinitet mora je prema Uredbi o kakvoći mora za kupanje jedini rutinski parametar koji se prati uz mikrobiološke parametre (*E. coli* i crijevni enterokoki), ali ne utječe na ocjenu mora (1). Osim rutinskih pokazatelja kakvoće mora za kupanje u ovom istraživanju ispitivani su i dodatni mikrobiološki pokazatelji: *S. aureus*, *C. perfringens*, UBB/37 i UBB/22. *P. aeruginosa* ima optimalnu vrijednost rasta pri temperaturi od 37 °C, ali može preživjeti pri temperaturama u širokom rasponu od 4°C do 42°C. (30) Istraživanje iz 2010. godine (31) prikazuje veći porast *P. aeruginosa* u moru pri višim pH vrijednostima i višem salinitetu. U temperaturnom rasponu između 20 i 37°C, što je temperatura niža to je veći porast *P. aeruginosa* (32). To je u skladu s našim rezultatima, obzirom da je korelacijska analiza ukazala na negativnu povezanost između koncentracije *P. aeruginosa* i temperature mora.

U ovom istraživanju lokacija Kantrida zapad najviše je opterećena s pokazateljima fekalnog onečišćenja: *E. coli*, crijevnim enterokokima te *C. perfringens*. Osim značajno većeg mikrobiološkog opterećenja, ova lokacija ima najveće vrijednosti mutnoće, u usporedbi s ostalim lokacijama. Prema rezultatima iz rutinskog uzorkovanja, slika je drugačija. Naime, mikrobiološki najopterećenija lokacija u rutinskom monitoringu je Kantridu istok. Na razliku u navedenim rezultatima moguće utječe razdoblje dana u kojem je uzorkovanje provedeno kao i učestalost uzorkovanja. Također je moguće da lokacija Kantrida zapad ima isprekidane dotoke

onečišćenih voda, koji su u dodatnom istraživanju evidentirani, dok ih u rutinskom monitoringu nismo uspjeli detektirati.

Prema koncentraciji *P. aeruginosa*, lokacije 3.Maj, Kantrida istok, Kantrida Zapad, Ploče istok te Ploče zapad statistički se značajno ne razlikuju. Najviši medijan vrijednosti *P. aeruginosa* zabilježen je kod lokacija Kantrida zapad i Ploče istok (10 CFU/100 mL), s nešto većim interkvartalnim rasponom kod Kantride zapad. Kantrida zapad ima najviše vrijednosti medijana i kod svih ostalih ispitanih mikrobioloških pokazateljem. Za razliku od medijana, najveća srednja vrijednost *P. aeruginosa* zabilježena je kod lokacije Ploče zapad ($54,7 \pm 202,3$ CFU/100 mL).

U kišnom razdoblju mjerene su više vrijednosti *P. aeruginosa* u odnosu na period bez kiše. U razdoblju kiše medijan broja *P. aeruginosa* iznosio je 14,5 CFU/100 mL, dok je u razdoblju bez kiše iznosio 6,0 CFU/100 mL. U istraživanju iz 2015. godine (33) koje je provedeno na plažama za kupanje u Kini, veće mikrobiološko opterećenje vode, i to *E. coli* i crijevnih enterokoka dobiveno je u kišnom razdoblju, u usporedbi sa suhim razdobljem. Do značajnog povećanja fekalnih indikatora došlo je zbog utjecaja većih količina otpadnih voda, a čiji volumen znatno raste pod utjecajem oborina. Otjecanje oborinskih voda iz slivova u kišnom razdoblju značajno utječe na kvalitetu morske vode na plažama tijekom prvih 24-48 sati nakon kiše. Velika količina oborinskih voda koje se ispuštaju u obalno more uzrok su visokih koncentracija indikatora fekalnog onečišćenja u priobalnom području. (34) Istraživanje iz 2017. godine (35) prikazuje povećanje koncentracije fekalnih indikatorskih bakterija u moru na urbanim plažama. U tom istraživanju pratila se razlika u učestalosti akutnog oboljenja nakon izlaganja kupaca morskoj vodi tijekom kišnog razdoblja i u razdoblju bez kiše. Izloženost kupaca tijekom kišnog razdoblja dodatno povećava učestalost infekcije, što je praćeno s povećanjem koncentracije indikatora fekalnih onečišćenja u moru. S obzirom da istraživane lokacije u našoj studiji karakterizira veći broj priobalnih izvora i da su vrijednosti mikrobioloških pokazatelja veće u kišnom razdoblju, onečišćenje se može povezati s utjecajem slivnog područja te neadekvatnim tehničkim rješenjima postojećih sustava za odvodnju otpadnih voda (kombinirani fekalni i oborinski sustavi). Rezultati statističke analize ukazuju da s porastom koncentracije indikatora fekalnih onečišćenja (*E. coli* i crijevni enterokoki) raste i broj *P. aeruginosa*, stoga se može povezati da porastom mikrobiološkog onečišćenja fekalnim indikatorima za vrijeme kiše raste i koncentracija *P. aeruginosa*.

Spearmanovom korelacijom utvrđena je negativna korelacija između *P. aeruginosa*, temperature vode i saliniteta. Dakle, što su temperatura vode i salinitet niži, to je koncentracija

koncentracija *P. aeruginosa* viša. Dotoci slatke vode snižavaju temperaturu priobalnog mora i salinitet, što je praćeno s većim donosom različitih vrsta bakterija, pa tako i *P. aeruginosa*. Pozitivna korelacija utvrđena je između *P. aeruginosa* i mutnoće, odnosno veći i turbulentniji donos slatke vode praćen je s većim koncentracijama *P. aeruginosa*. *Pseudomonas* je pozitivno koreliran s pH. Optimalni pH za rast *P. aeruginosa* je kreće se u rasponu od 6,8 - 7,0 (36). Obzirom da je pH morske vode veći od 7, a najčešće je iznad 8, *P. aeruginosa* pokazuje dobru sposobnost preživljavanja u neoptimalnim uvjetima.

Od mikrobioloških pokazatelja, najveća pozitivna korelacija utvrđena je između *P. aeruginosa* i *S. aureus*, ukazujući na to da su obje vrste bakterija pokazatelji nefekalnog onečišćenja. Postoji mogućnost da obje vrste bakterija u more dospijevaju ispiranjem s kože kupaca. Studija iz 2012. godine (24) utvrdila je pozitivnu korelaciju između infekcije kože te prisutne razine *P. aeruginosa* i *S. aureus*. Također, pozitivna korelacija je utvrđena i između *P. aeruginosa* te *E. coli*, crijevnih enterokoka i UBB/22. Što je veće opterećenje indikatorima fekalnog onečišćenja (*E. coli* i crijevni enterokoki), to je veće opterećenje i s *P. aeruginosa*. To ukazuje na mogućnost istovremenog utjecaja više različitih izvora onečišćenja. *E. coli* i crijevni enterokoki u more dospijevaju prvenstveno iz izmeta divljih i domaćih životinja, a putem kombiniranih sustava za prikupljanje, pročišćavanje i odvodnju otpadnih voda, septičkih jama, životinjskih farmi. Rasprostranjenost i brojnost indikatora fekalnih onečišćenja (*E. coli* i enterokoki) u rekreacijskim vodama ovisi o okolišnim uvjetima s jedne strane te sposobnosti prilagodbe bakterijskih stanica s druge strane (37). Istraživanje provedeno u 2015. godini (38) pokazalo je veći porast *Pseudomonas* spp. na hranjivom agaru (Yeast extract agar) pri nižoj temperaturi inkubacije od 22 °C. U našem istraživanju pozitivna korelacija između *P. aeruginosa* i UBB/22, u skladu je s rezultatima prethodno opisanog istraživanja.

Promatrajući ispitane uzorke morske vode prema opterećenosti bakterijom *P. aeruginosa*, nivo opterećenja podijeljen je na četiri razine: vrlo jako opterećenje (>1000 CFU/100 mL), jako opterećenje (100-1000 CFU/100 mL), srednje opterećenje (10-100 CFU/100 mL) te slabo opterećenje (1-10 CFU/100 mL). Najveći udio uzoraka svrstan je u slabo (41,8%) i srednje opterećene uzorke (32,9 %), što ukazuje da je ispitivano područje Kantride slabo do srednje opterećeno bakterijom *P. aeruginosa*. Međutim, od ukupno 88 uzoraka s koncentracijom *P. aeruginosa* većom od 100 CFU/100 mL, kod njih 30,7 % vrijednosti *E. coli* bile su iznad dozvoljene granične vrijednosti od 300 CFU/100 mL, a kod 21,6 % uzoraka vrijednosti crijevnih enterokoka bile su iznad dozvoljene granične vrijednosti za crijevne enterokoke od 200 CFU/100 mL, definirano prema Uredbi (NN 73/2008). Dakle, najveći broj uzoraka s

koncentracijom *P. aeruginosa* preko 100 CFU/100 mL, prema koncentraciji rutinskih pokazatelja (*E. coli* i crijevni enterokoki) zadovoljava kriterije Uredbe (NN 73/2008) te je more ocjenjeno kao pogodno za kupanje. Obzirom da se razine rutinskih pokazatelja značajno razlikuju od onih bakterije *P. aeruginosa* koja je ne-fekalni indikator onečišćenja, praćenje *E. coli* i enterokoka ne isključuje mogućnost zaraze kupaća bakterijom *P. aeruginosa*, pri navedenim graničnim vrijednostima. Prema nekim autorima, infektivna doza za ovu bakteriju je vrlo visoka (10^8 do 10^9 CFU) (39), što uvjetuje visoku koncentraciju ove bakterije u vodi da bi došlo do prijenosa infekcije. To oboljenja zdravih osoba čini iznimno rijetkim (WHO, 2011). Drugi izvori smatraju da je infektivna doza za *P. aeruginosa* nepoznata, obzirom da je riječ o oportunističkom patogenu koji može kolonizirati zdrave domaćine, bez pojave simptoma bolesti (40,). U svakom slučaju, infektivna doza je smanjena kod osoba s oslabljenim imunološkim sustavom te pacijenata koji uzimaju antibiotsku terapiju. Također, sporno je i razdoblje inkubacije, jer se infekcija može manifestirati različite načine, ovisno o mjestu infekcije. Patogeneza pseudomonasa je višestruka i složena jer su vrste *Pseudomonas* i invazivne i toksigene. Tri faze infekcije su: (1) bakterijsko vezivanje i kolonizacija, (2) lokalna infekcija i (3) širenje krvotokom i sistemska bolest. Višestruka otpornost na lijekove ove bakterije te slabljenje imunološkog odgovora, posebno kod sve većeg broja starijih ljudi, dovodi do povećanja osjetljivosti populacije na ovu bakteriju te rizika za javno zdravlje. (41)

6 ZAKLJUČCI

- More za kupanje na području grada Rijeke je slabo je do srednje opterećeno s *P. aeruginosa* (1-100 CFU/100 mL)
- Na pojavnost *P. aeruginosa* značajno utječu oborine
- *P. aeruginosa* u pozitivnoj je korelaciji s mutnoćom vode (turbulentni dotoci slatke vode), pH (preživljavanje na višim pH morske vode), te u negativnoj korelaciji s temperaturom vode i salinitetom (utjecaj slatke vode koja pronosi mikrobiološko onečišćenje)
- Utjecaj slatke vode na obalnu zonu nosi rizik od mikrobiološkog onečišćenja, međutim, ne nužno i u svim situacijama
- Na rezultate ispitivanja kakvoće mora za kupanje utječe doba dana kada se uzorkovanje provodi kao i frekvencija uzorkovanja
- *P. aeruginosa* je u pozitivnoj korelaciji s ostalim fekalnim i ne-fekalnim mikrobiološkim parametrima (UBB/22, *E. coli*, crijevni enterokoki, *S. aureus*), što ukazuje na mogućnost istovremenog utjecaja različitih izvora onečišćenja
- Praćenje rutinskih pokazatelja (*E. coli* i enterokoki) ne isključuje u potpunosti mogućnost kontakta i zaraze kupaca s bakterijama vrste *P. aeruginosa*

7 LITERATURA

1. NN 73/08 Uredba o kakvoći mora za kupanje, Vlada Republike Hrvatske, 20. lipnja 2008. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_06_73_2426.html
2. DIREKTIVA 2006/7/EZ EUROPSKOGA PARLAMENTA I VIJEĆA o upravljanju kakvoćom vode za kupanje, a kojom se ukida Direktiva 76/160/EEZ, 2006. Dostupno na: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfindmkaj/https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0007&from=SV>
3. WHO 2021 Guidelines on recreational water quality: Volume 1 coastal and fresh waters. Dostupno na: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240031302>
4. Schoen ME, Soller JA, Ashbolt NJ. Evaluating the importance of faecal sources in human-impacted waters. *Water Res.* 2011;45(8):2670-80. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21429551/>
5. Bonilla TD, Nowosielski K, Cuvelier M, Hartz A, Green M, Esiobu N, et al. Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. *Mar Pollut Bull.* 2007;54(9):1472-82. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17610908/>
6. David Kay, University of Wales Aberystwyth: Accessible report to commission staff responsible for reporting to the parliament and to the council under article 14 of the bathing water directive of 15th february 2006; EPIBATHE, project reference 022618, May 2009. Dostupno na: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfindmkaj/https://circabc.europa.eu/sd/a/4e37751a-1df4-4177-b5aa-b853c8b2fc57/Accessible%20report%20Epibathe%2012_05_09.pdf
7. WHO 2018 Recommendations on EC BWD. Dostupno na: [https://www.who.int/publications/m/item/who-recommendations-on-scientific-analytical-and-epidemiological-developments-relevant-to-the-parameters-for-bathing-water-quality-in-the-bathing-water-directive-\(2006-7-ec\)](https://www.who.int/publications/m/item/who-recommendations-on-scientific-analytical-and-epidemiological-developments-relevant-to-the-parameters-for-bathing-water-quality-in-the-bathing-water-directive-(2006-7-ec))
8. Lunestad BT, Frantzen S, Svanevik CS, Roiha IS, Duinker A. Time trends in the prevalence of *Escherichia coli* and enterococci in bivalves harvested in Norway during 2007–2012. *Food Control.* 2016;60:289-95. Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/281137471_Time_trends_in_the_prevalence_of_Escherichia_coli_and_enterococci_in_bivalves_harvested_in_Norway_during_2007-2012
9. Wiedenmann A, Kruger P, Dietz K, Lopez-Pila JM, Szewzyk R, Botzenhart K. A randomized controlled trial assessing infectious disease risks from bathing in fresh recreational waters in relation to the concentration of *Escherichia coli*, intestinal enterococci, *Clostridium perfringens*, and somatic coliphages. *Environ Health Perspect.* 2006;114(2):228-36. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16451859/>
10. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):822-80. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24092857/>
11. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76(4):685-706. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3510518/>
12. DIRECTIVE 2006/7/EC Bathing water quality. Dostupno na: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfindmkaj/https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:064:0037:0051:EN:PDF>
13. Haugland RA, Siefring S, Varma M, Oshima KH, Sivaganesan M, Cao Y, et al. Multi-laboratory survey of qPCR enterococci analysis method performance in U.S. coastal and inland surface waters. *J Microbiol Methods.* 2016;123:114-25. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26844886/>

14. Tiwari A, Hokajarvi AM, Santo Domingo JW, Kauppinen A, Elk M, Ryu H, et al. Categorical performance characteristics of method ISO 7899-2 and indicator value of intestinal enterococci for bathing water quality monitoring. *J Water Health*. 2018;16(5):711-23. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30285953/>
15. Hayes A, Nguyen D, Andersson M, Anton A, Bailly JL, Beard S, et al. A European multicentre evaluation of detection and typing methods for human enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *J Med Virol*. 2020;92(8):1065-74. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31883139/>
16. Marion JW, Lee J, Lemeshow S, Buckley TJ. Association of gastrointestinal illness and recreational water exposure at an inland U.S. beach. *Water Res*. 2010;44(16):4796-804. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20723965/>
17. Ohtani K, Shimizu T. Regulation of Toxin Production in *Clostridium perfringens*. *Toxins (Basel)*. 2016;8(7). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4963840/>
18. Miller-Pierce MR, Rhoads NA. *Clostridium perfringens* testing improves the reliability of detecting non-point source sewage contamination in Hawaiian coastal waters compared to using *Enterococci* alone. *Mar Pollut Bull*. 2019;144:36-47. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31180005/>
19. Edwards DD, McFeters GA, Venkatesan MI. Distribution of *Clostridium perfringens* and fecal sterols in a benthic coastal marine environment influenced by the sewage outfall from McMurdo Station, Antarctica. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(7):2596-600. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9647835/>
20. Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol*. 2014;68(1):1-12. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24096885/>
21. Mielko KA, Jablonski SJ, Milczewska J, Sands D, Lukaszewicz M, Mlynarz P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019;35(11):178.
22. WHO 2021: GUIDELINES ON RECREATIONAL WATER QUALITY: Volume 1 Coastal and Fresh Waters.
23. Karbasdehi VN, Dobaradaran S, Nabipour I, Ostovar A, Arfaeinia H, Vazirizadeh A, et al. Indicator bacteria community in seawater and coastal sediment: the Persian Gulf as a case. *J Environ Health Sci Eng*. 2017;15:6. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28293427/>
24. Mohammed RL, Echeverry A, Stinson CM, Green M, Bonilla TD, Hartz A, et al. Survival trends of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Clostridium perfringens* in a sandy South Florida beach. *Mar Pollut Bull*. 2012;64(6):1201-9. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22516512/>
25. Esiobu N, Mohammed R, Echeverry A, Green M, Bonilla T, Hartz A, et al. 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;57(2):157-62. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15063055/>
26. Elabed H, Gonzalez-Tortuero E, Ibacache-Quiroga C, Bakhrouf A, Johnston P, Gaddour K, et al. Seawater salt-trapped *Pseudomonas aeruginosa* survives for years and gets primed for salinity tolerance. *BMC Microbiol*. 2019;19(1):142. Dostupno na: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-019-1499-2>
27. Lusic DV, Kranjcevic L, Macesic S, Lusic D, Jozic S, Linsak Z, et al. Temporal variations analyses and predictive modeling of microbiological seawater quality. *Water Res*. 2017;119:160-70. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28456079/>
28. Workshop on the Review of the Bathing Water Directive (2006/7/EC) - Impact Assessment 28-29 April 2022; Session 1 - Current challenges with monitoring of parameters.
29. Workshop on the Review of the Bathing Water Directive (2006/7/EC) - Impact Assessment 28-29 April 2022; Session 2 - Risk-based approach and additional parameters.
30. LaBauve AE, Wargo MJ. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protoc Microbiol*. 2012;Chapter 6:Unit 6E 1.

31. Khan NH, Ahsan M, Taylor WD, Kogure K. Culturability and survival of marine, freshwater and clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Environ.* 2010;25(4):266-74. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21576881/>
32. Kim S, Li XH, Hwang HJ, Lee JH. Thermoregulation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol.* 2020;86(22). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7642082/>
33. Fan J, Ming H, Li L, Su J. Evaluating spatial-temporal variations and correlation between fecal indicator bacteria (FIB) in marine bathing beaches. *J Water Health.* 2015;13(4):1029-38. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26608764/>
34. He LM, He ZL. Water quality prediction of marine recreational beaches receiving watershed baseflow and stormwater runoff in southern California, USA. *Water Res.* 2008;42(10-11):2563-73. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18242661/>
35. Arnold BF, Schiff KC, Ercumen A, Benjamin-Chung J, Steele JA, Griffith JF, et al. Acute Illness Among Surfers After Exposure to Seawater in Dry- and Wet-Weather Conditions. *Am J Epidemiol.* 2017;186(7):866-75. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28498895/>
36. Chen SY, Wei YH, Chang JS. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;76(1):67-74. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17457541/>
37. Sagarduy M, Courtois S, Del Campo A, Garmendia JM, Petrau A. Differential decay and prediction of persistence of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* culturable cells and molecular markers in freshwater and seawater environments. *Int J Hyg Environ Health.* 2019;222(4):695-704. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31097324/>
38. Gensberger ET, Gossel EM, Antonielli L, Sessitsch A, Kostic T. Effect of different heterotrophic plate count methods on the estimation of the composition of the culturable microbial community. *PeerJ.* 2015;3:e862. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4389272/>
39. Jankie S, Jenelle J, Suepaul R, Pereira L, Akpaka P, Adebayo A, et al. Determination of the Infective Dose of *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) When Injected Intraperitoneally in Sprague Dawley Rats. *British Journal of Pharmaceutical Research.* 2016;14(1):1-11. Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/311482625_Determination_of_the_Infective_Dose_of_Staphylococcus_aureus_ATCC_29213_and_Pseudomonas_aeruginosa_ATCC_27853_When_Injected_Intraperitoneally_in_Sprague_Dawley_Rats
40. *Pseudomonas aeruginosa* infection. Dostupno na: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_aeruginosa_infection#Infectious_dose,_incubation,_and_colonization
41. Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances – *Pseudomonas* spp. Dostupno na: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/pseudomonas.html>

ŽIVOTOPIS

Ime/Prezime **Andrea Huskić**
Datum rođenja 18. 06. 1997.
Spol Žensko
E-mail huskicandrea@gmail.com

Obrazovanje

2021. – Danas **Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci**
Sveučilišni diplomski studij Sanitarno inženjerstvo
Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka, Hrvatska

2016. – 2021.. **Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci**
Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo
Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka, Hrvatska

2012. – 2016. **Medicinska škola u rijeci**
Sanitarni tehničar

2008. – 2012. **Osnovna škola Bakar**

Osobne vještine i kompetencije

<i>Materinski jezik</i>	Hrvatski
<i>Ostali jezici (Samoprocjena)</i>	
Engleski	Iskusna korisnica
Organizacijske vještine	- Dobra organiziranost - 2023. - Članica organizacijskog odbora 6. studentskog kongresa zaštite zdravlja „Sanitas 2023.”
Sudjelovanje na kongresima	- 2023. „Sanitas 2023.” (Rijeka) – aktivna sudionica
Računalne vještine i sposobnosti	- Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)
Vozačka dozvola	- B kategorija