

# Prisustvo Salmonella u moru za kupanje na užem području grada Rijeke

---

**Baričević, Lovro**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:359783>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-20**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Lovro Baričević

PRISUSTVO *SALMONELLA* U MORU ZA KUPANJE NA UŽEM PODRUČJU GRADA  
RIJEKE  
Završni rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Lovro Baričević  
PRISUSTVO *SALMONELLA* U MORU ZA KUPANJE NA UŽEM PODRUČJU GRADA  
RIJEKE  
Završni rad

Rijeka, 2024.

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

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad sadrži \_\_\_\_\_ stranica, \_\_\_\_\_ slika, \_\_\_\_\_ tablica,  
\_\_\_\_\_ literaturnih navoda.

## **Zahvala**

Zahvaljujem svim kolegama, nastavnom i nenastavnom osoblju koji su sudjelovali u ovom istraživanju.

Zahvaljujem se suradnicima s projekta EUROBATH (Ususret novoj direktivi Europske unije o upravljanju kvalitetom vode za kupanje, Hrvatska zaklada za znanost IP-2020-02-1880) i Institutu za oceanografiju i ribarstvo na omogućavanju korištenja podataka proizašlih iz ovog projekta.

Posebno zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Dariji Vukić Lušić na uloženom trudu i vremenu, strpljenju te na svim savjetima koji su omogućili pisanje ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na potpori tokom cijelog školovanja.

## SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	Klasifikacija mora za kupanje .....	2
1.2	Najvažniji bakterijski patogeni prisutni u morskoj vodi .....	3
1.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	3
1.2.2	Crijevni enterokoki .....	3
1.2.3	<i>Clostridium perfringens</i> .....	3
1.2.4	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
1.2.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	4
1.2.6	<i>Salmonella</i> spp. ....	4
1.2.7	Humani virusi i kolifagi .....	5
1.3	Zakonska legislativa i ostali relevantni dokumenti.....	6
1.4	Direktiva o upravljanju kvalitetom vode za kupanje (BWD, 2006/7/EC) .....	6
1.4.1	Uredba o kakvoći mora za kupanje (NN 73/2008) .....	6
1.4.2	Smjernice o kvaliteti rekreacijskih voda (SZO, 2021.) .....	7
1.4.3	SZO 018.....	7
<b>2</b>	<b>CILJ</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>METODE</b> .....	<b>9</b>
3.1	Materijali .....	9
3.2	Područje istraživanja .....	9
3.3	Uzorkovanje.....	12
3.4	Metode za mikrobiološke pokazatelje .....	12
3.4.1	Metoda ulijevanja.....	12
3.4.2	Membranska filtracija.....	13
3.4.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
3.5	Fizikalno-kemijski pokazatelji .....	15
3.6	Količina oborina i jakost Sunčevog zračenja (Državni hidrometeorološki zavod) .....	15
3.7	Statistička obrada rezultata.....	15
3.7.1	Korelacija .....	16
3.7.2	Hi kvadrat test .....	17
3.7.3	Mann-Whitney U test.....	17
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>18</b>
4.1	Udio <i>Salmonella</i> -pozitivnih uzoraka.....	18
4.1.1	Udio <i>Salmonella</i> -pozitivnih uzoraka po lokacijama.....	20
4.1.2	Udio <i>Salmonella</i> -pozitivnih uzoraka po godinama.....	20
4.1.3	Udio <i>Salmonella</i> -pozitivnih uzoraka po mjesecima .....	21
4.2	Ostali mikrobiološki pokazatelji .....	21
4.2.1	Ukupan broj bakterija pri 37 °C (UBB/37) .....	21
4.2.2	Ukupan broj bakterija pri 22 °C (UBB/22) .....	22
4.2.3	<i>Escherichia coli</i> .....	23
4.2.4	Crijevni enterokoki .....	24
4.2.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
4.2.6	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
4.2.7	<i>Clostridium perfringens</i> .....	28
4.3	Utjecaj okolišnih čimbenika na udio <i>Salmonella</i> -pozitivnih uzoraka .....	28
4.3.1	Temperatura zraka .....	28
4.3.2	Temperatura mora .....	29
4.3.3	Salinitet.....	30

4.3.4	Oborine.....	30
4.3.5	Jakost Sunčevog zračenja .....	31
4.4	Korelacija ispitanih pokazatelja .....	32
<b>5</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>40</b>

## SAŽETAK

Monitoring kakvoće mora za kupanje se u Republici Hrvatskoj provodi u cilju očuvanja zdravlja kupaca, a propisan je Uredbom o kakvoći mora za kupanje (NN 73/08). Mikrobiološki pokazatelji koji se određuju su crijevni enterokoki i *Escherichia coli*, kao pokazatelji fekalnog onečišćenja. Druge značajke kakvoće mora koje se prate su: temperatura mora i zraka, vjetar, kiša, salinitet i vidljivo onečišćenje. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati pojavnost *Salmonella* spp. u moru za kupanje na užem području grada Rijeke, u različitim okolišnim uvjetima. Dodatno, ispitana je povezanost pojavnosti *Salmonella* spp. s pokazateljima fekalnog onečišćenja te s dodatnim fekalnim (*C. perfringens*) i ne-fekalnim (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, UBB/37/22) pokazateljima mikrobiološkog opterećenja. Prisutnost *Salmonella* spp. povezana je s vodenim tokovima u koje se ispušta otpadna voda bez prethodne obrade. Za ovo istraživanje odabrane su četiri plaže u zapadnom dijelu grada Rijeke, koje imaju 6 lokacija uzorkovanja. U cilju postizanja gušće mreže lokacija uzorkovanja, istraživanje je provedeno na 6 dodatnih (profilnih) lokacija, što ukupno čini 12 lokacija. U okviru projekta EUROBATH uzorkovanje se na navedenim lokacijama provodilo tijekom tri sezone kupanja, jednom tjedno. *Salmonella* je dokazana u 41 uzorku (3,7%) od kojih je 28 označeno kao more pogodno za kupanje. Rezultati pokazuju da salinitet i Sunčevo zračenje značajno utječu na koncentraciju *Salmonella* u moru. Dotok slatke vode u more je izvor mikrobiološkog onečišćenja, a pojavnost *Salmonella* u moru uvelike ovisi o količini oborina. Dokazano je da praćenje samo rutinskih pokazatelja, *E. coli* i enterokoka ne isključuje mogućnost kontakta kupaca sa bakterijama vrste *Salmonella*.

Ključne riječi: kakvoća mora za kupanje, indikatori fekalnog onečišćenja, dodatni mikrobiološki pokazatelji, *Salmonella* spp., salinitet, oborine



## SUMMARY

The monitoring of sea water quality for swimming in the Republic of Croatia is carried out with the aim of preserving the health of swimmers and is regulated by the Regulation on the Quality of Sea Water for Swimming (NN 73/08). The microbiological indicators that are determined include intestinal enterococci and *Escherichia coli*, as indicators of fecal contamination. Other characteristics of sea water quality that are monitored include sea and air temperature, wind, rain, salinity, and visible pollution. The aim of this study was to investigate the occurrence of *Salmonella* spp. in swimming sea water in the narrower area of the city of Rijeka, under different environmental conditions. Additionally, the study examined the correlation between the occurrence of *Salmonella* spp. and indicators of fecal contamination, as well as additional fecal (*Clostridium perfringens*) and non-fecal (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, UBB/37/22) indicators of microbiological load. The presence of *Salmonella* spp. is associated with watercourses where wastewater is discharged without prior treatment. For this study, four beaches in the western part of the city of Rijeka were selected, having 6 sampling locations in total. To achieve a denser network of sampling locations, the study was conducted at an additional 6 (profile) locations, making a total of 12 locations. As part of the EUROBATH project, sampling at these locations was conducted during three swimming seasons, once a week. *Salmonella* was detected in 41 samples (3.7%), of which 28 were marked as suitable for swimming. The results show that salinity and solar radiation significantly affect the concentration of *Salmonella* in the sea water. The inflow of fresh water into the sea is a source of microbiological contamination, and the occurrence of *Salmonella* in the sea greatly depends on the amount of rainfall. It has been proven that monitoring only routine indicators, *E. coli* and enterococci, does not exclude the possibility of swimmers coming into contact with *Salmonella* bacteria.

Keywords: coastal bathing water quality, fecal pollution indicators, additional microbiological indicators, *Salmonella* spp., salinity, precipitation

## 1 UVOD

More za kupanje i plaže su najznačajniji elementi turizma priobalnih županija u Hrvatskoj. Iz tog razloga vrlo je važno provoditi monitoring kakvoće mora za kupanje. Monitoring se provodi u cilju očuvanja zdravlja kupaca, a propisan je Uredbom o kakvoći mora za kupanje (NN 73/08). Mjere upravljanja morem za kupanje koje propisuje Uredba jesu: uspostavljanje vremenskog rasporeda praćenja kakvoće mora, ocjenjivanje kakvoće mora za kupanje, određivanje uzroka onečišćenja te poduzimanje radnji u cilju smanjenja rizika od onečišćenja i sprječavanja izloženosti kupaca onečišćenju. Ovlaštenik koji provodi praćenje je nadležni Zavod za javno zdravstvo. Monitoring se provodi od sredine svibnja do kraja rujna. Uzorkovanje se prema Uredbi provodi svaka 2 tjedna (1).

Mikrobiološki pokazatelji koji se određuju su crijevni enterokoki i *Escherichia coli*, kao pokazatelji fekalnog onečišćenja. Druge značajke kakvoće mora koje se prate su: temperatura mora i zraka, vjetar, kiša (na dan uzorkovanja i prethodni dan), salinitet i vidljivo onečišćenje. Uzorci se uzimaju na dubini od najmanje jedan metar, 30 cm ispod površine. Također, na kamenim obalama uzorci se uzimaju na udaljenosti od najmanje jedan metar od obalne linije. Nakon uzorkovanja i obrade uzorka određuje se pojedinačna ocjena. Ovlaštenik u slučaju onečišćenja odmah obavještava nadležno upravno tijelo koje je dužno putem sredstava javnog priopćavanja informirati javnost. Ukoliko je potrebno, može se odrediti zabrana kupanja na plaži na kojoj je pronađeno onečišćenje. To se provodi postavljanjem barijera na kopnu i moru te označavanjem službenom oznakom zabrane kupanja (Slika 1). Na internetskoj stranici Zavoda za javno zdravstvo dostupni su podaci za sve plaže u Hrvatskoj, s pripadajućom ocjenom.



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

## 1.1 Klasifikacija mora za kupanje

Temeljem rezultata kakvoće mora za kupanje određuju se pojedinačna, godišnja i konačna ocjena za svaku točku. Pojedinačna ocjena dodjeljuje se nakon svakog ispitivanja. U Tablici 1 navedeni su kriteriji za ocjenu kakvoće mora nakon svakog ispitivanja. Godišnja ocjena dodjeljuje se po završetku sezone kupanja i obuhvaća rezultate cijele sezone (10 ispitivanja). Konačna ocjena dodjeljuje se po završetku sezone kupanja a obuhvaća i prethodne tri sezone (40 ispitivanja). U Tablici 2 navedeni su kriteriji za dodjeljivanje godišnje i konačne ocjene. Vode se kategoriziraju u četiri moguće kategorije kakvoće, koje se na kartografskim prikazima označavaju odgovarajućom bojom kojom. To su: izvrsna (plavo), dobra (zeleno), zadovoljavajuća (žuto) i nezadovoljavajuća (crveno) (1).

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

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 ( $\mu$ )

\* izračunava se standardna devijacija logaritamskih vrijednosti ( $\sigma$ )

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

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

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

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

## 1.2 Najvažniji bakterijski patogeni prisutni u morskoj vodi

### 1.2.1 *Escherichia coli*

*E. coli* je gram negativna, oksidaza negativna štapičasta bakterija iz porodice enterobakterija. Spada u skupinu fekalnih koliforma. Autohtona je bakterija probavnog sustava ljudi i životinja. U ljudskom izmetu se nalazi u broju  $10^6$  do  $10^7$  bakterija po gramu izmeta. *E. coli* se prenosi feko-oralnim putem, preko zagađene hrane i vode (2). Jedan je od dva glavna parametra u monitoringu kakvoće voda prema direktivi Europske unije ali i drugih zemalja u svijetu. Zajedno sa rodovima *Citrobacter*, *Klebsiella* i *Enterobacter* čini skupinu ukupnih koliforma. Ukupni koliformi se mogu koristiti kao pokazatelji fekalnog onečišćenja. Ipak, ova skupina uključuje i bakterijske vrste koje nisu fekalnog porijekla. Obzirom da *E. coli* u moru preživljava vrlo kratko, ukazuje na svježije onečišćenje fekalnog porijekla. Iako je većina sojeva *E. coli* bezopasna i sastavni su dio tipične mikrobiote ljudi i toplokrvnih životinja, postoje neki sojevi koji proizvode toksine koji se mogu prenijeti na ljude feko-oralno, uzrokujući gastrointestinalne bolesti. Stoga je važno znati koncentraciju ovih bakterija u moru za kupanje (3).

### 1.2.2 Crijevni enterokoki

Crijevni enterokoki su gram-pozitivni, katalaza-negativni koki. Izduženi su ili ovalni te najčešće dolaze u parovima ili kratkim lancima. Dio su normalne crijevne mikrobiote čovjeka. Mogu rasti uz visoke koncentracije žuči i natrijevog klorida. S obzirom da je njihova prisutnost najčešće porijeklom iz crijeva ljudi i životinja, njihovo prisustvo u moru ukazuje na fekalno onečišćenje. U kombinaciji s fekalnim koliformima mogu dati precizniju informaciju o izvoru zagađenja. Otporniji su na morsku vodu tako da u njoj preživljavaju duže u odnosu na ukupne koliforme. Zbog toga su bolji pokazatelji starijeg onečišćenja te mogu pružiti informaciju koliko je vremena prošlo od utjecaja otpadne vode (4).

### 1.2.3 *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* je gram pozitivni štapić. Anaerobna je sporogena bakterija. Raširen je u prirodi, a u čovjeka se može naći u probavnom sustavu ili u genitalnom sustavu 1-10 % zdravih žena. U otpadnim vodama fekalnog porijekla može se naći u visokim koncentracijama (2). Zbog mogućnosti stvaranja spora, otporniji je od standardnih indikatora fekalnog onečišćenja. Koncentracije *C. perfringens* pokazuju korelaciju s udaljenosti od mjesta ispusta otpadnih voda,

što ukazuje da bi se ova vrsta mogla koristiti kao indikator udaljenijeg izvora onečišćenja ili isprekidanog onečišćenja (4).

#### 1.2.4 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* je gram-pozitivni kok koji formira skupine slične grozdovima. Na krvnom agaru raste u obliku bjelkastih kolonija koje s vremenom mogu postati žute, i otuda naziv *aureus* (zlatni) (2). *S. aureus* je uglavnom povezan s infekcijama kože kod korisnika rekreacijskih voda (uglavnom bazena). Česte infekcije uključuju zaražene rane i ogrebotine, čireve, gnojnice, dermatitis i folikulitis. Iako *S. aureus* nije prirodni stanovnik okolišnih voda, pronađen je i u pijesku i vodi na morskim plažama te u slatkovodnim vodama. Glavni rezervoari za *S. aureus* su koža, nos, uši i sluznice toplokrvnih životinja. Korisnici rekreacijskih voda oslobađaju ove organizme u vodu (5). Njihova prisutnost u vodama za kupanje je nesumnjivo ljudskog porijekla, bilo da u vodu dospijevaju fekalnim onečišćenjem ili izravno s ljudi prilikom kupanja. Ova vrsta preporučuje se kao indikator u bazenima za kupanje. Rezistentniji je na klor od koliformnih bakterija, pa kloriranje vode u bazenima u potpunosti ne isključuje mogućnost infekcije (4).

#### 1.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* je aerobni, gram-negativni štapić. Ne stvara spore i katalaza su pozitivni (2). *P. aeruginosa* se u okolišu može se pronaći u fecesu, tlu, vodi i otpadnim vodama. Često je izoliran iz morske i slatke vode. *P. aeruginosa* je povezan s osipom kože (folikulitisom) te infekcijama oka i uha nakon izlaganja tijela kontaminiranoj rekreacijskoj vodi. Ne smatra se da je gutanje značajan način infekcije. *P. aeruginosa* također može uzrokovati infekcije pluća, mokraćnog sustava i gastrointestinalnog trakta. Iako je vodeći uzrok sepse, manje je vjerojatno da će do nje doći putem izlaganja tijekom rekreacije u vodi (5).

#### 1.2.6 *Salmonella* spp.

*Salmonella* je gram-negativni fakultativno anaerobni štapić. Uzročnik je tifusne i paratifusne groznice, trovanja hranom i gastroenteritisa. *Salmonella* se, kao i druge enterobakterije, širi fekalno-oralnim putem. Trenutno postoji više od 2.500 serotipova *Salmonella* u svijetu te se svake godine pojavljuju novi. Serotipizacija *Salmonella* je dugotrajan je i složen posao izuzetno važan za epidemiološka istraživanja. Pri serotipizaciji *Salmonella*, potrebno je identificirati s odgovarajućim protutijelima epitope lipopolisaharida u bakterijskoj membrani (O antigeni) i proteine flagela (H antigeni) (8). Probavni sustav ljudi i životinja predstavlja izvore *Salmonella*, a postoji mnogo potencijalnih puteva za prijenos izlučenih patogena. *Salmonella* pokazuje visok stupanj otpornosti na različite stresne faktore, što im pruža veću sposobnost opstanka u

promjenjivom okolišu (9). Može doći u more izravno s fekalijama zaraženih ljudi ili životinja ili neizravno, primjerice, putem otpadnih voda ili ispuštanja s poljoprivrednog zemljišta (6). Unatoč tome što bakterija *Salmonella* spp. nije uključena u međunarodnu legislativu kao rutinski pokazatelj kakvoće morske vode, prisutnost/odsutnost ove bakterije također je pokazatelj kvalitete morske vode. Prisutnost *Salmonella* spp. povezana je s vodenim tokovima u koje se ispušta otpadna voda bez prethodne obrade (7). Međutim, prisutnost bakterija iz roda *Salmonella* utvrđena je u tretiranim i netretiranim otpadnim vodama. Prema istraživanjima, čak i najefikasnija obrada otpadnih voda samo smanjuje njihov broj, ali ih ne uklanja u potpunosti. *Salmonella* u moru živi kratko, a infekcije su rijetke zbog visoke infektivne doze. Opasnost postoji kod konzumiranja školjkaša (4). Oni se hrane filtriranjem morske vode te se na taj način *Salmonella* u njima koncentrira. Iako pripadnici roda *Salmonella* nisu prirodni stanovnici vodenog okoliša, nekoliko serotipova *Salmonella* široko je rasprostranjeno u vodi (morskoj, estuarijskoj, riječnoj) i u različitoj morskoj hrani, s najvećom učestalošću upravo u školjkama, kozicama, dagnjama ali i različitim vrstama riba (10).

#### 1.2.7 Humani virusi i kolifagi

Virusi preživljavaju u morskom okolišu tijekom dužeg razdoblja, što može dovesti do povećanog rizika za zdravlje tijekom izloženosti ljudi. Vjeruje se da humani crijevni virusi uzrokuju većinu bolesti prenesenih vodom u svijetu. Ova skupina virusa ima značajan utjecaj na javno zdravlje. Ovi patogeni povezani su s različitim ljudskim bolestima, od očnih i respiratornih infekcija do gastroenteritisa i aseptičnog meningitisa. Infekcije uzrokovane humanim virusima prouzrokuju više od 2 milijuna smrtnih slučajeva svake godine, uglavnom u zemljama u razvoju (11). Rotavirus (RoV) i norovirus (NoV) su među najčešće prisutnim humanim crijevnim virusima u onečišćenim priobalnim vodama te su glavni uzročnici virusnog gastroenteritisa u svijetu. Zbog malog broja humanih virusa u prirodnim vodama teško ih se otkriva, a niska infektivna doza (ponekad samo 10 čestica) zahtjeva učinkovitu koncentraciju tijekom postupka određivanja (12).

Kolifagi su virusi koji su infektivni za *E. coli*. Nedavno su se počeli koristiti kao indikatori fekalnog onečišćenja, uz standardni pokazatelj, *E. coli*. Trenutni propisi za procjenu mikrobiološke kakvoće mora za kupanje uglavnom se oslanjaju na ispitivanje indikatorskih bakterija pokazatelja fekalne kontaminacije, poput *E. coli* i enterokoka, iako je prepoznato da je njihovo određivanje nedovoljno za predviđanje prisutnosti virusa. Sve više se prihvaća vrijednost kolifaga, posebice somatskih kolifaga, kao indikatora fekalne/virusne kontaminacije.

Stoga se uključuju u brojne smjernice i propise o kakvoći voda, što omogućava sveobuhvatniju procjenu mikrobiološkog rizika (13).

### 1.3 Zakonska legislativa i ostali relevantni dokumenti

#### 1.4 Direktiva o upravljanju kvalitetom vode za kupanje (BWD, 2006/7/EC)

Direktiva o upravljanju kvalitetom vode za kupanje (Directive concerning the management of bathing water quality, Bathing Water Directive, BWD 2006/7/EC) je direktiva Europske unije koja regulira kakvoću voda za kupanje s ciljem zaštite zdravlja ljudi koji se kupaju u prirodnim vodama. Ova direktiva postavlja standarde i zahtjeve za praćenje kakvoće voda za kupanje te pruža smjernice za poboljšanje i održavanje kakvoće voda. Svaka članica EU-a, uključujući Hrvatsku, dužna je primjenjivati odredbe ove Direktive. Direktiva utvrđuje parametre i mikrobiološke pokazatelje kakvoće voda za kupanje, kao što su koncentracije bakterija poput *E. coli* i enterokoka. Članice EU-a obavezne su redovito pratiti kakvoću voda za kupanje tijekom sezone kupanja. Informacije o kakvoći voda za kupanje moraju biti javno dostupne, pružajući građanima informacije o sigurnosti kupanja. Ako rezultati ispitivanja pokažu nezadovoljavajuću kakvoću voda, članice su obavezne poduzeti mjere kako bi zaštitile zdravlje javnosti, uključujući i zabranu ili ograničenje kupanja na određenim lokacijama. U Hrvatskoj primjena Direktive provodi se kako bi se osigurala sigurnost i kvaliteta voda za kupanje na obalama mora, rijeka i jezera, prateći postupke i standarde propisane u okviru Europske unije (14).

##### 1.4.1 Uredba o kakvoći mora za kupanje (NN 73/2008)

Uredba o kakvoći mora za kupanje (NN 73/2008) je Uredba prema kojoj se u Republici Hrvatskoj kontrolira kakvoća mora na lokacijama namijenjenim kupanju. Temelj za pripremu ove Uredbe bila je EU BWD. U skladu s Uredbom, određeni su parametri kakvoće mora, uključujući fizikalno-kemijske i mikrobiološke parametre. To uključuje praćenje koncentracije bakterija poput *Escherichia coli* i crijevnih enterokoka. Praćenje uključuje uzimanje uzoraka mora i laboratorijska ispitivanja kako bi se osiguralo da su rezultati u skladu s propisanim standardima. Rezultati ispitivanja kakvoće mora moraju biti dostupni javnosti. Informacije se obično objavljuju na vidljivim mjestima na lokacijama za kupanje ili putem internetskih stranica. U slučaju nezadovoljavajuće kakvoće mora, Uredba propisuje mjere koje treba poduzeti kako bi se zaštitilo zdravlje kupaca. To može uključivati postavljanje upozorenja, privremenu zabranu kupanja ili druge preventivne mjere. Uredba o kakvoći mora za kupanje osigurava da se standardi kakvoće mora prate i održavaju na visokoj razini kako bi se osigurala sigurnost svih koji koriste more za kupanje u Republici Hrvatskoj (1).

#### 1.4.2 Smjernice o kvaliteti rekreacijskih voda (SZO, 2021.)

Smjernice Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) o kvaliteti rekreacijskih voda imaju za cilj zaštititi javno zdravlje osiguravanjem sigurnog upravljanja kvalitetom rekreacijskih voda. Ove smjernice ažuriraju značajan sadržaj iz Smjernica WHO iz 2003. godine. SZO smjernice nisu obavezujuće, već su preporuka i pomoć nacionalnim i lokalnim vlastima, kao i drugim subjektima koji imaju obvezu poduzimanja odgovarajućih mjera u vezi s sigurnošću rekreacijskih voda. Mogu se primjenjivati zajedno s obavezujućim mjerama za zaštitu okoliša na lokacijama koje su određene za kupanje. Smjernice opisuju trenutačno stanje znanja o mogućim negativnim zdravstvenim utjecajima rekreacijskog korištenja obalnih i slatkovodnih okoliša. Smjernice pružaju preporuke za postavljanje nacionalnih ciljeva unaprjeđenja zaštite zdravlja, provođenje procjena rizika te uspostavu upravljanja vodama u cilju identifikacije, praćenja i kontrole tih opasnosti, uz pripadajuće praćenje javnog zdravlja i komunikaciju (5).

#### 1.4.3 SZO 018.

Trenutna EU BWD je u postupku revizije od strane Europske komisije a jedna od podloga za taj postupak je dokument Preporuke SZO objavljen 2018. godine. Ovaj dokument daje pregled trenutnog znanja i novije znanstvene literature o postojećim pokazateljima u EU BWD (intestinalni enterokoki i *E. coli*). Također, u dokumentu se razmatra mogućnost uključivanja dodatnih pokazatelja u rutinski monitoring (virusni indikatori i štetni cvatovi algi) te se sagledavaju problemi vezani za nove pokazatelje. Ukratko, ovaj dokument preporučuje da se u EU BWD kao obavezni pokazatelji zadrže samo dva pokazatelja koji se trenutno ispituju (crijevni enterokoki i *E. coli*), kao i četiri kategorije kvalitete (izvrsno, dobro, zadovoljavajuće i nezadovoljavajuće), umjesto predložene tri kategorije (izvrsno, dobro i nezadovoljavajuće). Predložene promjene uključuju povećanje godišnjeg minimalnog broja uzoraka s četiri na dvadeset, te korištenje vrijednosti 95. percentila za svaku kategoriju klasifikacijskog sustava, umjesto kriterija temeljenog na kombinaciji 95. i 90. percentil (15).

Također, SZO Preporuke bave se pitanjem prostorno-vremenskih varijacija u kvalitete vode za kupanje, što svakako treba uzeti u obzir prilikom određivanja broja lokacija na kojima će se pratiti kakvoća mora na pojedinoj plaži, kao i učestalost te doba dana uzimanja uzoraka. Na kakvoću mora u obalnom pojasu utjecat će brojni čimbenici, poput vrste fekalnog onečišćenja, vremenskih uvjeta, posebno jakost Sunčevog zračenja i oborina, zatim vjetra, morskih struja i mijena, gustoće kupača (Enns, 2012). Ukoliko se opisane varijacije ne uzmu u obzir, kvaliteta vode može utjecati na povećani rizik od bolesti povezanih s kupanjem, a da pri tome nezadovoljavajuća kakvoća mora za kupanje ostane nezabilježena.



## 2 CILJ

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati pojavnost *Salmonella* spp. u moru za kupanje na užem području grada Rijeke, u različitim okolišnim uvjetima (oborine, jakost Sunčevog zračenja, temperatura mora, salinitet). Također, ispitane su prostorne i vremenske varijacije u pojavnosti *Salmonella* spp., uz navođenje detektiranih vrsta salmonele.

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

Procijenjeno je može li se praćenjem rutinskih pokazatelja fekalnog onečišćenja (*E. coli* i crijevnih enterokoka), isključiti mogućnost kontakta kupaca s bakterijama *Salmonella* spp.

## 3 METODE

### 3.1 Materijali

Istraživanje je provedeno u okviru projekta „Ususret novoj direktivi Europske unije o upravljanju kvalitetom vode za kupanje“ (EUROBATH) (16), financiranim od Hrvatske zaklade za znanost (HZZ), u razdoblju od 17. svibnja 2021. do 25. rujna 2023. godine. Cilj ovog projekta bio je unaprjeđenje postojećeg monitoringa te definiranje smjernica za reviziju aktualne hrvatske regulative vezane za problematiku upravljanja kakvoćom mora za kupanje, u cilju postizanja bolje zaštite zdravlja ljudi. Projektne aktivnosti bile su usmjerene na istraživanje čimbenika koji utječu na prostorno-vremenske varijacije u kvaliteti obalnog mora.

### 3.2 Područje istraživanja

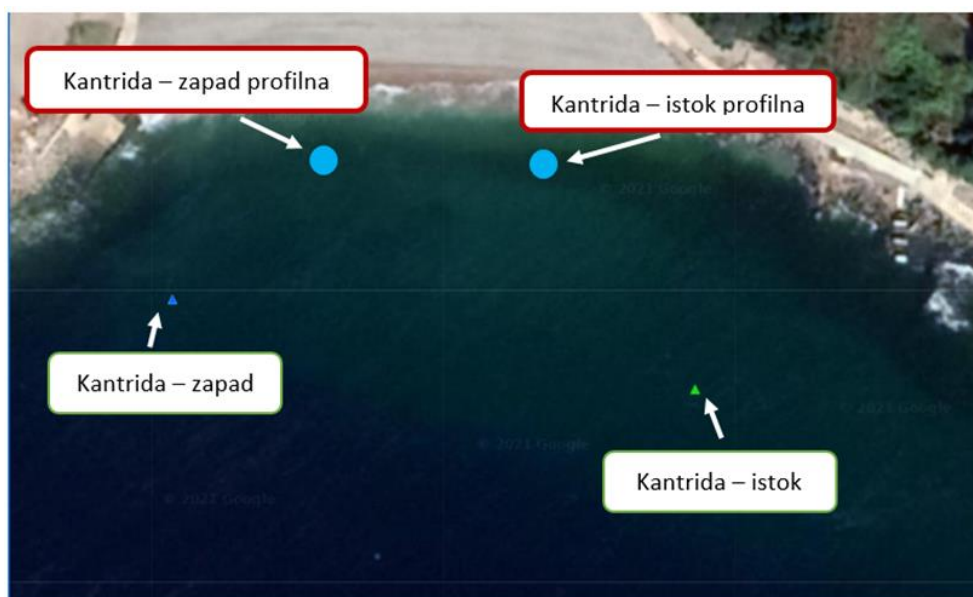
Za ovo istraživanje odabrane su četiri plaže u zapadnom dijelu grada Rijeke, koje imaju 6 lokacija uzorkovanja. U cilju postizanja gušće mreže lokacija uzorkovanja, istraživanje je provedeno na 6 dodatnih (profilnih) lokacija, što ukupno čini 12 lokacija (Tablica 3). Lokacije uzorkovanja izabrane su na temelju podataka iz prethodnih godina, te zbog karakteristika, kao što su udaljenost od izvora zagađenja i prisutnosti izvora slatke vode (priobalnih izvora) na plaži. Plaže se prostiru od lokacije 3. maj, koja se nalazi nedaleko brodogradilišta 3. maj, zapadno do plaže Ploče. Raspon svih lokacija uzorkovanja iznosi 1.4 km.

Tablica 3: Popis rutinskih i dodatnih (profilnih) lokacija istraživanja

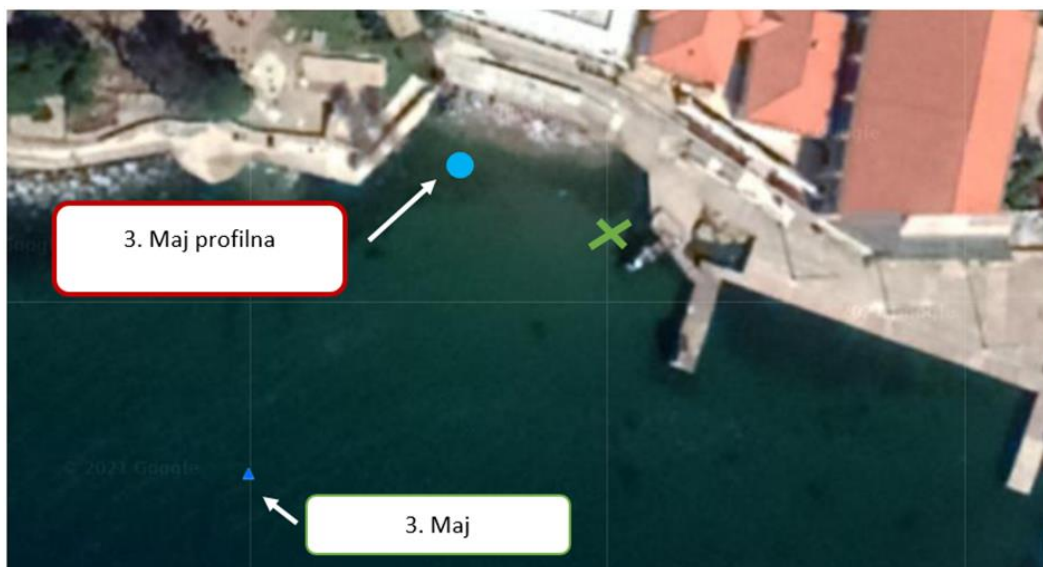
RB	Lokacija	ID	Eurobath oznaka
1.	Kantrida – istok	6054	VR1-1
2.	Kantrida – istok profilna*		VR1-2
3.	Kantrida – zapad profilna*		VR1-3
4.	Kantrida – zapad	6053	VR1-4
5.	Kantrida - RC 3. Maj	6052	VR2-1
6.	Kantrida - RC 3. Maj profilna*		VR2-2
7.	Nogometno igralište profilna*		VR3-1
8.	Nogometno igralište	6317	VR3-2
9.	Ploče – istok profilna*		VR4-1
10.	Ploče – istok	6057	VR4-2
11.	Ploče – zapad profilna*		VR4-3
12.	Ploče – zapad	6267	VR4-4

\*sivo su označene dodatne (profilne) lokacije

Plaže i točke uzorkovanja prikazane su na Slikama 2-5.



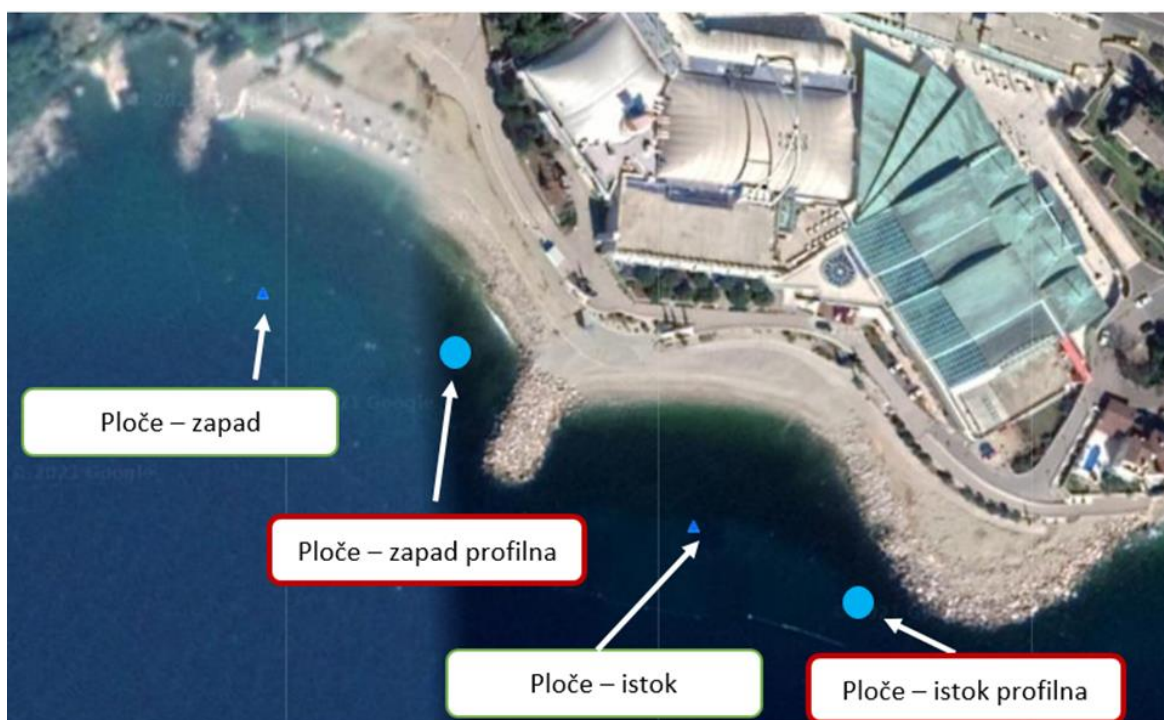
Slika 2: Satelitski prikaz plaže Kantrida sa točkama uzorkovanja. Crveno su označene dodatne (profilne lokacije). Izvor: <https://vrtlac.izor.hr/static/plaze/>



Slika 3: Satelitski prikaz plaže 3. maj sa točkama uzorkovanja. Crveno je označene dodatne (profilne lokacije). Izvor: <https://vrtlac.izor.hr/static/plaze/>



Slika 4: Satelitski prikaz plaže Nogometno igralište sa točkama uzorkovanja. Crveno je označene dodatne (profilne lokacije). Izvor: <https://vrtlac.izor.hr/static/plaze/>



Slika 5: Satelitski prikaz plaže Ploče sa točkama uzorkovanja. Crveno su označene dodatne (profilne lokacije). Izvor: <https://vrtlac.izor.hr/static/plaze/>

### 3.3 Uzorkovanje

U okviru projekta EUROBATH uzorkovanje se na navedenim lokacijama provodilo tijekom tri sezone kupanja, jednom tjedno, većom frekvencijom u odnosu na rutinski monitoring u kojem se uzorkuje jedanput u dva tjedna, u cilju procjene učinka učestalosti uzorkovanja na rezultate ispitivanja kakvoće mora za kupanje. Jedanput u dva tjedna uzorkovanje se provodilo dva puta tijekom jednog dana, u prijedodnevnom i popodnevnim satima, u cilju procjene učinka doba dana na rezultate ispitivanja. Dakle, uzorkovanje se naizmjenično po tjednima provodilo u jutarnjem terminu, odnosno u jutarnjem i popodnevnom. U tjednu kada se uzorkovalo samo u jutarnjem terminu uzimali su se samo uzorci rutinskih točaka, a u tjednu kada se uzorkovalo u dva termina uzimali su se uzorci rutinskih i profilnih točaka.

Uzorkovanje je provedeno u skladu s Uredbom o kakvoći mora za kupanje (NN 73/08). Korištene su boce kapaciteta 2 L litara, od čega 1 L za pokazatelj *Salmonella* spp., a 1 L za ostale mikrobiološke pokazatelje. Na svakoj boci je nazačeno ime točke i redni broj uzorka. Uz uzorkovanje je vođen zapisnik, a u formular je upisivano: datum i vrijeme uzorkovanja, temperatura mora i zraka, vjetar, oborine, vremenske prilike i salinitet. Uzorci su po završetku uzorkovanja u što kraćem roku dostavljeni u laboratorij za mikrobiologiju voda Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije. Tijekom tri sezone kupanja ukupno je prikupljeno 1119 uzoraka.

### 3.4 Metode za mikrobiološke pokazatelje

#### 3.4.1 Metoda ulijevanja

Kultivacija i brojanje heterotrofnih bakterija provela se metodom ulijevanja (engl. pour plate) prema normi HRN EN ISO 6222. Uzorak se dobro homogenizira i spali se grlo boce. Odabere se razrjeđenje uzorka tako da je ukupni broj kolonija koji se broji između 30 i 300. Uzorak ili razrjeđenje dodaje se u praznu sterilnu Petrijevu zdjelicu u koju se dodaje 10 ml rastaljenog i temperiranog agara Marine agara (BD Difco). To je hranjiva podloga namijenjena kultivaciji heterotrofnih bakterija iz uzoraka mora. Hranjivi medij znatno je bogatiji mineralima u odnosu na standardni YEA (eng. Yeasr Extract Agar).

Vrijeme između dodatka uzorka i temperiranog agara ne bi smjelo biti duže od 15 min. Petrijeve ploče puste se na ravnoj površini oko 10 minuta kako bi se agar skrutio. Za svaku temperaturu potrebno je nacijepiti jednu ploču. Petrijeve ploče se preokrenu te se inkubiraju pri  $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  /  $(44 \pm 4)$  h te na  $(22 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  /  $(68 \pm 4)$  h (Slika 16). Na svakoj ploči izbroje se sve porasle kolonije, aerobne mezofilne bakterije, kvasci, plijesni, a rezultat se izražava kao CFU/mL pri temperaturi inkubacije ( $36^{\circ}\text{C}$  ili  $22^{\circ}\text{C}$ ).

Ukoliko je u Petrijevoj pločici koja je nacjepljena s najvećim korištenim razrjeđenjem izraslo više od 300 kolonija, rezultat se izražava kao " $> 300$ ".

### 3.4.2 Membranska filtracija

Za određivanje mikroorganizama primijenjena je tehnika membranske filtracije. Prije obrade, uzorak se homogenizira miješanjem sadržaja okretanjem boce nekoliko puta. Membranska filtracija provodi se pomoću rampe s metalnim lijevcima koji su prošli postupak sterilizacije autoklaviranjem ( $121^{\circ}\text{C}/15$  min). Protočnom pumpom stvara se vakuum koji provlači uzorak kroz jednokratne sterilne filtere. Nakon postupka filtracije, filteri se sterilnom pincetom polažu na selektivne hranjive podloge te inkubiraju na temperaturama definiranim u standardnim metodama, ovisno o traženoj bakterijskoj vrsti. Duljina trajanja inkubacije također je određena standardnom metodom kao i eventualni posebni uvjeti za rast bakterija poput vlažnosti, dostupnost kisika (aerobi, anaerobi, mikroaerofili). Broj poraslih kolonija na filteru izražava se kao CFU/100 mL uzorka (ili nekom drugom propisanom volumenu, npr. 1000 mL). Bakterijskim vrstama, koje nakon membranske filtracije prolaze postupak umnožavanja u hranjivom bujonu (*Salmonella* spp.), nije moguće odrediti broj, u tom se slučaju rezultat izražava kao „prisutna“ ili „odsutna“.

#### 3.4.2.1 Crijevni enterokoki

Za određivanje crijevnih enterokoka primijenjena je akreditirana standardna metoda HRN EN ISO 7899-2:2000. Hranjiva podloga SBA (engl. Slanetz-Bartley Agar) na koju je prenesen filter, inkubirana je tijekom 48 h pri  $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Porast tamno crvenih do smečkastih kolonija smatra se pozitivnim nakon provedbe potvrdnog testa. Premještanjem filtera s poraslim kolonijama na BAA podlogu (žučni eskulin azid agar, engl. Bile-Aesculine Agar) te inkubacijom tijekom 2 h pri  $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , oko pozitivnih kolonija stvara se crna halo zona, zbog mogućnosti enterokoka da hidroliziraju eskulin do 6,7-dihidroksikumarina koji s  $\text{Fe}^{3+}$  stvara obojenu tvar koja difundira u medij.(17)

#### 3.4.2.2 *Escherichia coli*

Za određivanje vrste *E. coli* primijenjena je akreditirana temperaturno modificirana standardna metoda HRN EN ISO 9308-1:2014/A1:2017, prilagođena za uzorke morske vode. Metoda se temelji na kultivaciji profiltriranog uzorka na kromogenoj CCA (engl. Chromogenic Coliform Agar) hranjivoj podlozi tijekom 4-5 h pri  $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$  te tijekom 19-20 h pri  $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Većina *E. coli* (94-97%) sadrži enzime  $\beta$ -D-galaktozidaza i  $\beta$ -D-glukuronidaza. Reakcija oba enzima istovremeno sa kromogenim supstratom podloge omogućuje nastanak plavo-ljubičastih kolonija koje se broje kao *E. coli*.(18)

#### 3.4.2.3 *Clostridium perfringens*

Za određivanje vrste *C. perfringens* primijenjena je akreditirana standardna metoda HRN EN ISO 14189:2016. Selektivna hranjiva podloga TSC (engl. Tryptose Sulfite Cycloserine agar) na koju je prenesen filter, inkubirana je u anaerobnim uvjetima pri  $44\pm 1$  °C tijekom  $21\pm 3$  h. *C. perfringens* obično stvara crne ili sive do žuto-smeđe kolonije, kao rezultat redukcije sulfita u sulfide, koji reagira sa željeznim solima sadržanim u hranjivom mediju. Potvrdni test provodi se s prethodno kultiviranim kolonijama na krvnom agaru (pri  $36\pm 1$  °C tijekom 24 h) na način da se sumnjive kolonije razmažu po filter papiru te se na njih nanese 2-3 kapi reagensa kisele fosfataze. Pojava ljubičaste boje u roku od 3-4 min smatra se pozitivnom reakcijom.(19)

#### 3.4.2.4 *Staphylococcus aureus*

Za određivanje vrste *S. aureus* u vodama nije publicirana standardna ISO metoda. U te je svrhe korištena metoda opisana u Standard methods 22 st. Ed 2017. 9213 B. Hranjiva podloga Baird Parker + Egg Yolk inkubira se na 37 °C i ispituje nakon 24 h i 48 h. Tipične kolonije *S. aureus* su crne do sive boje, svjetlucave, konveksne (promjera 1-1,5 mm nakon 24 h inkubacije; 1,5-2,5 mm nakon 48 h inkubacije), okružene čistom zonom. Nakon najmanje 24 h može se pojaviti unutar bistre zone opalescentni prsten u neposrednom kontaktu s kolonijom. Atipične kolonije mogu se pojaviti kao sjajne crne kolonije s ili bez uskog ruba; bistra zona je odsutna ili rijetko vidljiva i opalescentni prsten je odsutan ili teško vidljiv ili kao sive kolonije bez bistre zone. Potrebno koristiti 0,22- $\mu$ m membranske filtere zbog mogućnosti skupljanja stanica pod utjecajem većih koncentracija klora i gubljenja *S. aureus* uporabom 0,45- $\mu$ m filtera. Suspektne kolonije potvrđuju se dokaznim testovima: mikroskopskim preparatom, koagulaza i katalaza testom

#### 3.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Za određivanje vrste *P. aeruginosa* primijenjena je akreditirana standardna metoda HRN EN ISO 16266:2008. Selektivna hranjiva podloga CN agar (Cetrimid agar) s prenesenim filterom inkubirana je tijekom 48 h pri  $41\pm 2$ °C. Porasle plavo-zelene kolonije koje stvaraju pigment piocijanin identificiraju se kao pozitivne. Ostale porasle kolonije promatraju se pod UV lampom. Fluorescirajuće kolonije dalje se identificiraju potvrdnim testom. Nasađuju se na hranjivi nutrijent agar (NA agar), inkubiraju tijekom 24 h pri  $36\pm 2$ °C, a potom u acetamid bujon (AB bujon) tijekom 24h pri  $36\pm 2$ °C. U bujon se dodaje Nesslerov reagens, koji zbog produkcije amonijaka stvara narančasti talog, što potvrđuje prisustvo vrste *P. aeruginosa*. Crvenkasto-smeđe kolonije koje ne floresciraju broje se kao sumnjive na *P. aeruginosa* te se potvrđuju slijedećim testovima: oksidaza testom (pozitivna reakcija), testom produkcije amonijaka upotrebom acetamid bujona, pojavom fluorescencije na King's B mediju (21).

#### 3.4.3.1 *Salmonella* spp.

*Salmonella* spp. su određivane prema normi HRN EN ISO 19250:2013. Za identifikaciju u morskoj vodi filtriran je uzorak vode od 1000 mL. Filter kroz koji je profiltriran uzorak prenesen je u 50 ml hranjive puferirane peptonske vode (PPV) na te je inkubiran pri 36°C tijekom 24 h. Nakon inkubacije, po 1 mL PPV prenesen je u MKTTn bujon (engl. Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin broth) te u Selenit cistein bujon (za *Shigella* spp.), a 0,1 mL u RVS bujon (engl. Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone broth). Nakon inkubacije tijekom 24 h, MKTTn i Selenit cistein bujona pri 36±2°C te RVS bujona pri 41±1°C, suspenzija se ezom prenese na selektivne hranjive podloge SS agar (engl. Salmonella Shigella agar) i XLD agar (engl. Xylose Lysine Deoxycholate agar). Nakon inkubacije tijekom 24 h pri 36±2°C, porasle bakterije nježnog rasta s pojavom crnog centra suspektne su kao *Salmonella* spp. Potvrdni testovi proveli su se pomoću automatiziranog sustava za identifikaciju bakterijskih vrsta prema biokemijskim reakcijama (VITEK®2) i masenom spektrometrijom s laserskom desorpcijom uz pomoć matrice (MALDI-TOF MS, engl. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time-Of-Flight) te aglutinacijom.(22)

### 3.5 Fizikalno-kemijski pokazatelji

Fizikalno-kemijski pokazatelji koji su mjereni su: temperatura zraka, temperatura mora i salinitet. Salinitet mora određivao se terenskom sondom (YSI Model 30). Temperatura mora mjerila se alkoholnim termometrom, s podjelom ljestvice 10/1 °C. Podaci za temperaturu zraka su dobiveni od Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHMZ).

### 3.6 Količina oborina i jakost Sunčevog zračenja (Državni hidrometeorološki zavod)

Podaci o količini oborina i jakosti Sunčevog zračenja osigurao je DHMZ.

### 3.7 Statistička obrada rezultata

Rezultati su prikazani pomoću deskriptivne statistike: relativna frekvencija, aritmetička sredina i medijan, standardna devijacija (SD), interkvartilni raspon (IQR) i raspon podataka kao mjere disperzije podataka, kao i grafički. Normalnost distribucije podataka testirana je pomoću Kolmogorov-Smirnovljevog testa. S obzirom na to da distribucija podataka nije slijedila normalnu razdiobu, korelacijska analiza provedena je primjenom Spearmanovog koeficijenta korelacije, a za testiranje statističke značajnosti razlika između pojedinih skupina podataka primijenjeni su Mann-Whitney U. Hi kvadrat ( $\chi^2$ ) test koristio se za utvrđivanje je li dobivena (opažena) frekvencija odstupala od frekvencija koje bismo očekivali pod određenom hipotezom. Statistička analiza provedena je pomoću programskog paketa TIBCO Statistica v. 14.0.1.25 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, SAD), na razini značajnosti  $p < 0,05$ .



### 3.7.1 Korelacija

Korelacija je jedan od najčešćih statističkih postupaka kojim se izračunava povezanost dvaju varijabli, no ne i jačina povezanosti te njihova uzročno – posljedična veza [40]. Njena vrijednost se brojčano iskazuje Pearsonovim ili Spearmanovim koeficijentom korelacije koji ukazuje na povezanost promjena vrijednosti jedne varijable s promjenama vrijednosti druge varijable. Koeficijent korelacije može imati pozitivan (+) ili negativan (-) predznak, a on govori o smjeru povezanosti. Značajnost koeficijenta korelacije se iskazuje P vrijednošću.

Pearsonov koeficijent korelacije se koristi za brojčane podatke u linearnom odnosu, odnosno za varijable koje se mogu očitati na omjernoj ili intervalnoj ljestvici. Označava se slovom  $r$  ili  $r_p$  i može poprimiti pozitivne (od 0 do 1) i negativne (od 0 do -1) vrijednosti. Pozitivna vrijednost označava istovremeni rast vrijednosti obje varijable, dok negativna ukazuje na porast jedne, a pad druge varijable. Pearsonov koeficijent se izračunava ukoliko postoji normalna raspodjela podataka, ako podaci obje varijable slijede omjernu ili intervalnu ljestvicu, ukoliko se iz točkastog grafikona vidi da je zadovoljen uvjet linearne povezanosti te ako je ispitivanje provedeno na velikom broju uzoraka ( $N > 35$ ).

Spearmanov koeficijent korelacije se još naziva i korelacija ranga i označava se slovima  $\rho$  ili  $r_s$ . Izračunava se u slučaju raspodjele podataka koji značajno odstupaju od normalne raspodjele te za podatke koji slijede ordinalnu ljestvicu. Tijekom njegovog izračunavanja podaci ne moraju biti linearno povezani kao kod Pearsonovog koeficijenta te nema brojčanog ograničenja podataka, što znači da se može koristiti za manje broj uzoraka ( $N < 35$ ). Ukoliko  $r_s$  iznosi nula, ne postoji povezanost između varijabli.

Za tumačenje rezultata dobivenih korelacijom navode se koeficijent korelacije  $r$  i značajnost koeficijenta korelacije  $P$ . Koeficijent korelacije se označava brojem s 2 decimalna mjesta, a  $P$  s tri decimalna mjesta. Ukoliko je  $r$  značajan na standardnu granicu značajnosti  $P < 0,05$ , koeficijent korelacije se smije tumačiti. Ovisno o vrijednostima koeficijenta korelacije, određuje se povezanost dviju varijabli:

- Nema povezanosti – od 0 do 0,25 ili od 0 do -0,25
- Slaba povezanost – od 0,25 do 0,50 ili od -0,25 do -0,50
- Umjerena do dobra povezanost – od 0,50 do 0,75 ili -0,50 do -0,75
- Vrlo dobra do izvrsna povezanost – od 0,75 do 1 ili -0,75 do -1

Dva se koeficijenta korelacije ne smiju izravno uspoređivati. Međutim, moguće je ispitati postoji li značajna razlika između korelacija dvaju podataka.

### 3.7.2 Hi kvadrat test

Hi-kvadrat test se upotrebljava u većini slučajeva ako se radi o kvalitativnim podacima ili ako tim podacima distribucija značajno odstupa od normalne. Treba naglasiti da se hi-kvadrat test računa samo s frekvencijama pa u račun nije dopušteno unositi nikakve mjerne jedinice. Osnovni podaci istraživanja mogu biti i mjerne vrijednosti, ali u hi-kvadrat unose se samo njihove frekvencije.

### 3.7.3 Mann-Whitney U test

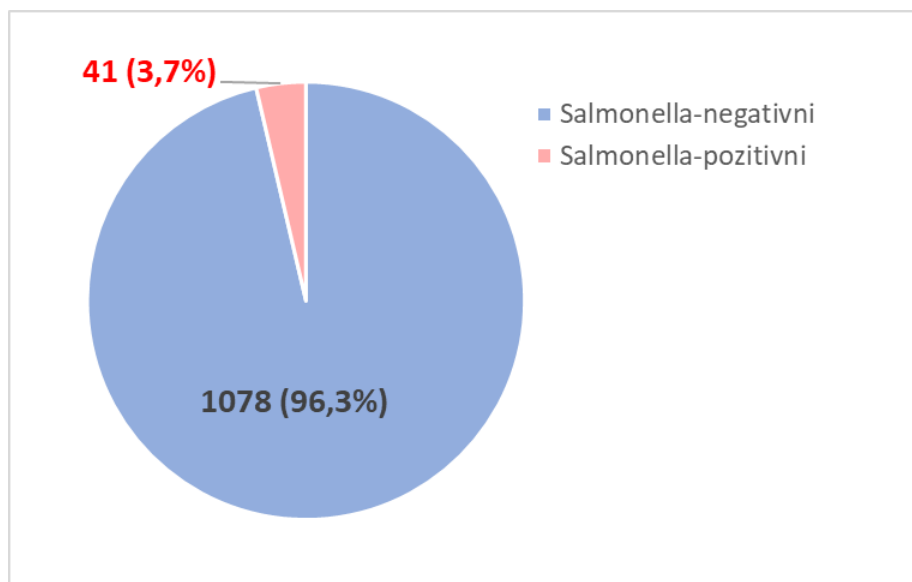
Mann-Whitney U test je neparametrijski test statističke obrade podataka. Njegova parametrijska inačica jest t-test nezavisnih uzoraka. Da bi se Mann-Whitney U test primijenio, vrijednosti podataka moraju biti usporedive veličine mjerljive na ordinarnoj skali. Njime se ispituje nulta hipoteza, odnosno razlike između dvije skupine nezavisnih podataka na način da se uspoređuju vrijednosti njihovih medijana. Medijan ili centralna vrijednost ( $X$ ) je numerička varijabla koja označava sredinu distribucije gdje je 50 % podataka manje ili jednako, a ostalih 50 % veće ili jednako toj vrijednosti. Za razliku od aritmetičke sredine, manje je osjetljiv na ekstremne vrijednosti, čime se smatra izrazito pogodnim za primjenu prilikom nepravilne distribucije podataka.

Naime, prilikom izračuna se sve vrijednosti obje skupine podataka svrstavaju u zajednički niz, poredani od najmanjeg do najvećeg, te im se pridodaje odgovarajući rang. Najmanjoj se vrijednosti pridružuje prvi rang, dok se najvećoj pridružuje maksimalan. Ukoliko se pojavi više jednakih podataka, svakome od njih se pridodaju podijeljeni rangovi dobiveni aritmetičkom sredinom. Nakon toga se zasebno zbrajaju rangovi dobiveni u jednoj i u drugoj grupi. Nadalje, prema formuli Mann-Whitney testa izračunava se z-vrijednost. Prilikom izračuna uzimaju se vrijednosti jedne skupine podataka (ishod je isti bez obzira na skupinu), odnosno njihova suma rangova. Suma rangova označava broj podataka unutar skupine te broj ukupnih podataka. Ukoliko je z-vrijednost veća od 1,96 na razini statističke značajnosti od 5 %, dvije se ispitivane skupine statistički značajno razlikuju.

## 4 REZULTATI

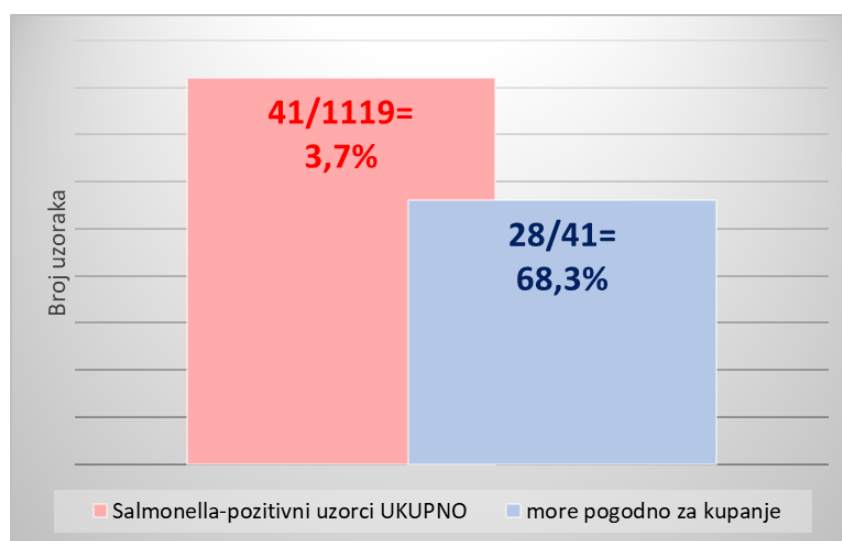
### 4.1 Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka

Na slici 6 prikazan je udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka (3,7%) u ukupnom broju ispitanih uzoraka (1119).



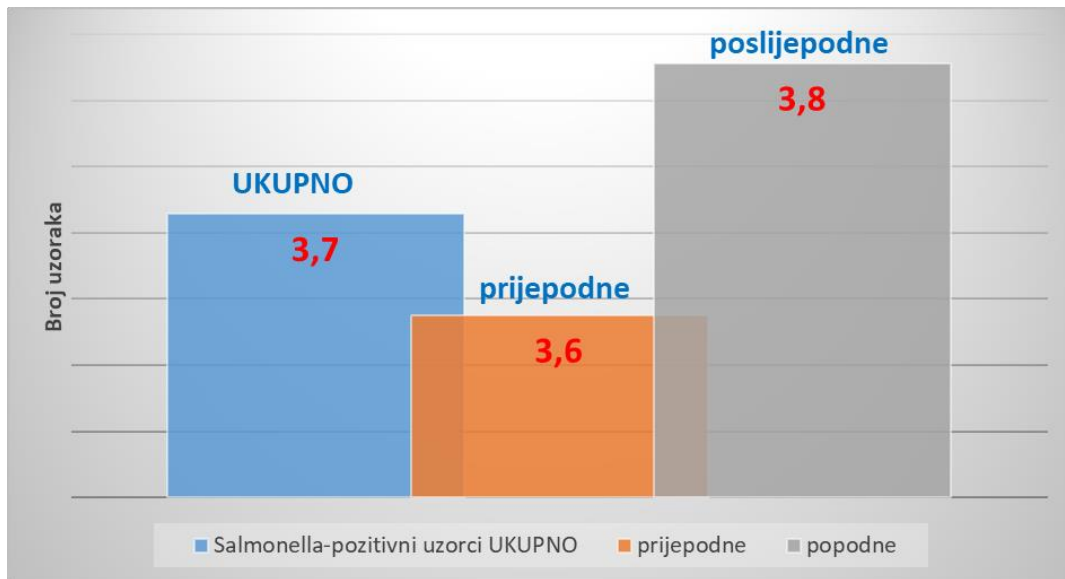
Slika 6. Udio *Salmonella*-pozitivnih i negativnih uzoraka.

Slika 7 prikazuje udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka koji je ocijenjen zadovoljavajućom ocjenom (more pogodno za kupanje), prema kriterijima iz Uredbe (NN 73/08).



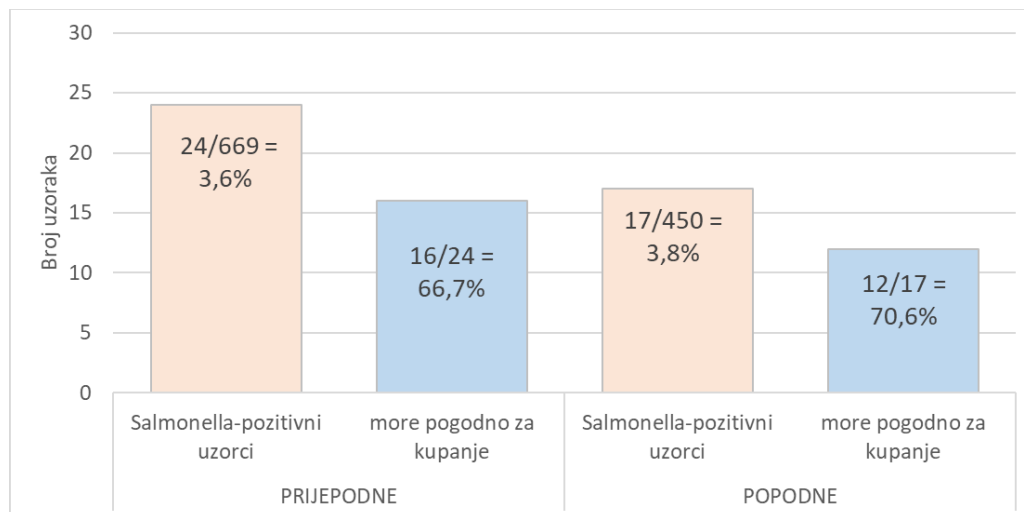
Slika 7. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka s udjelom uzoraka pogodnih za kupanje.

Na slici 8 prikazan je udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka u uzorcima prikupljenim tijekom prijepodneva i popodneva.



Slika 8. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka tijekom prijepodneva i popodneva

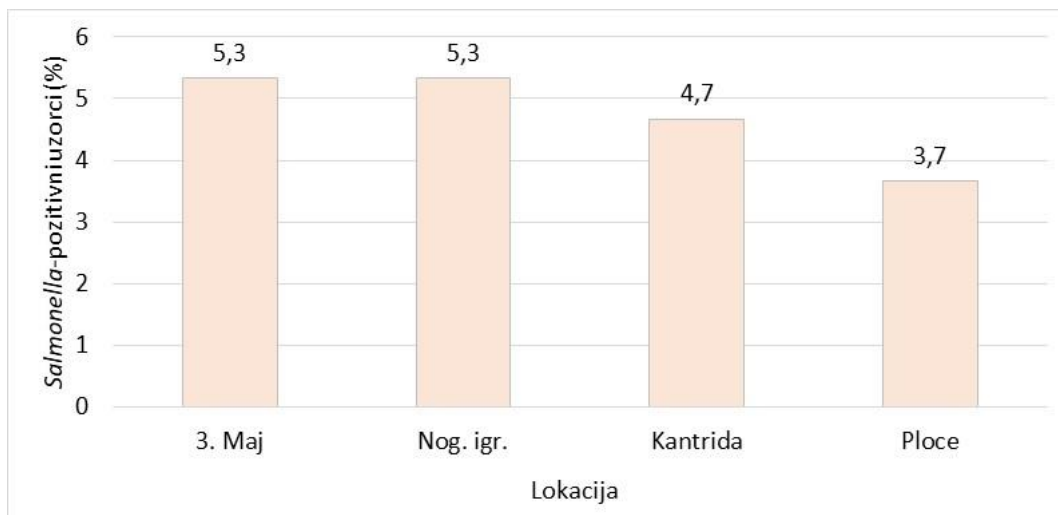
Slika 9 prikazuje udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka s udjelom uzoraka ocjenjenih kao more pogodno za kupanje, tijekom prijepodneva i popodneva.



Slika 9. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka s udjelom uzoraka pogodnih za kupanje tijekom prijepodneva i popodneva

#### 4.1.1 Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po lokacijama

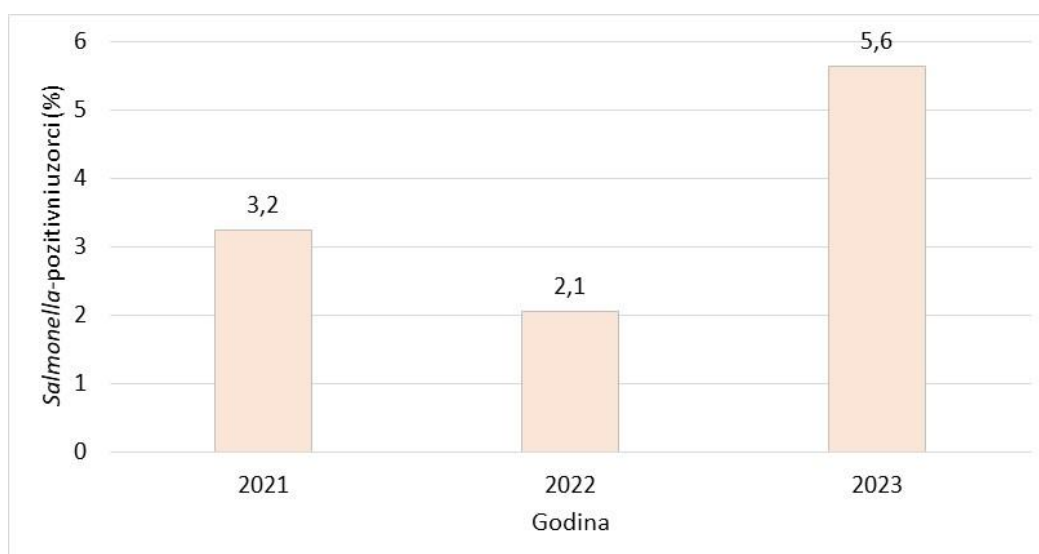
Slika 10 prikazuje udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj plaži. Najveći udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka (5,3 %) zabilježen je na dvije plaže (3. Maj i Nogometno igralište), a najmanji na plaži Ploče (3,7 %).



Slika 10. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj plaži

#### 4.1.2 Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po godinama

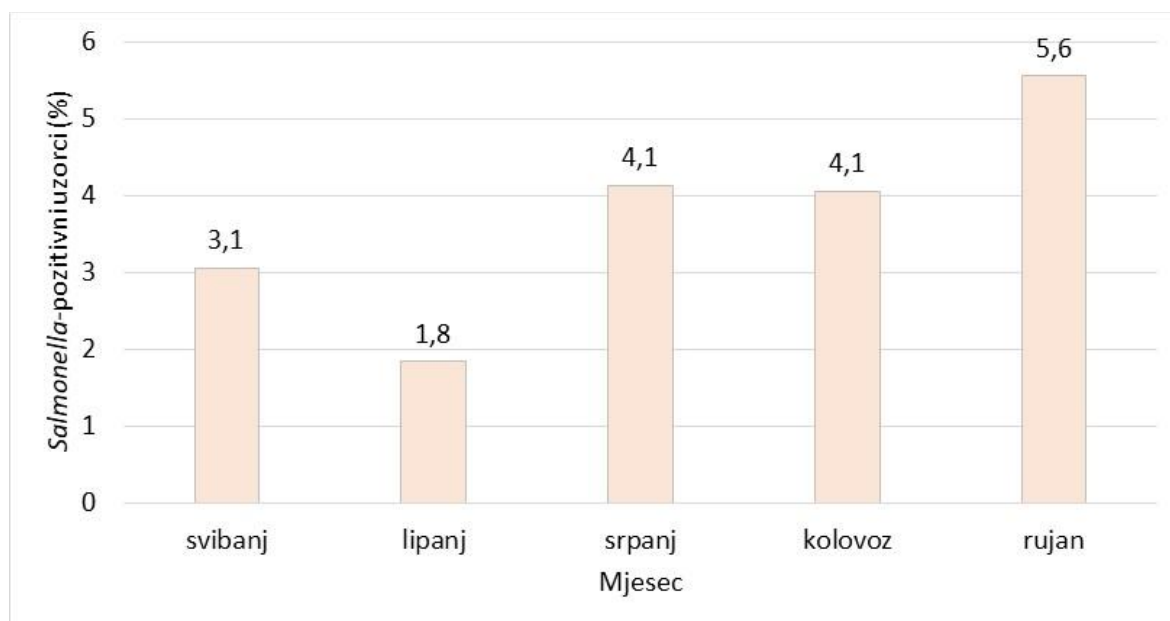
Uspoređujući rezultate tri sezone kupanja uočene su razlike u broju *Salmonella*-pozitivnih uzoraka. Na slici 11 prikazan je udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj godini ispitivanja u razdoblju od 2021. – 2023. godine. Najveći udio zabilježen je u 2023. godini (5,6 %), a najmanji u 2022. (2,1 %), a Hi kvadrat testom utvrđena je statistički značajna razlika između navedenih godina ( $\chi^2 = (1, N=780), p=0,0091$ ).



Slika 11. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj godini ispitivanja (2021. – 2023.)

#### 4.1.3 Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po mjesecima

Na slici 12 prikazan je udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinom mjesecu ispitivanja (svibanj – rujan), u istraživanom razdoblju od 2021. – 2023. godine. Najveći udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka zabilježen je u rujnu, a najmanji u lipnju. Između ta dva mjeseca uočena je statistički značajna razlika ( $\chi^2 = (1, N=450), p=0,047$ ).

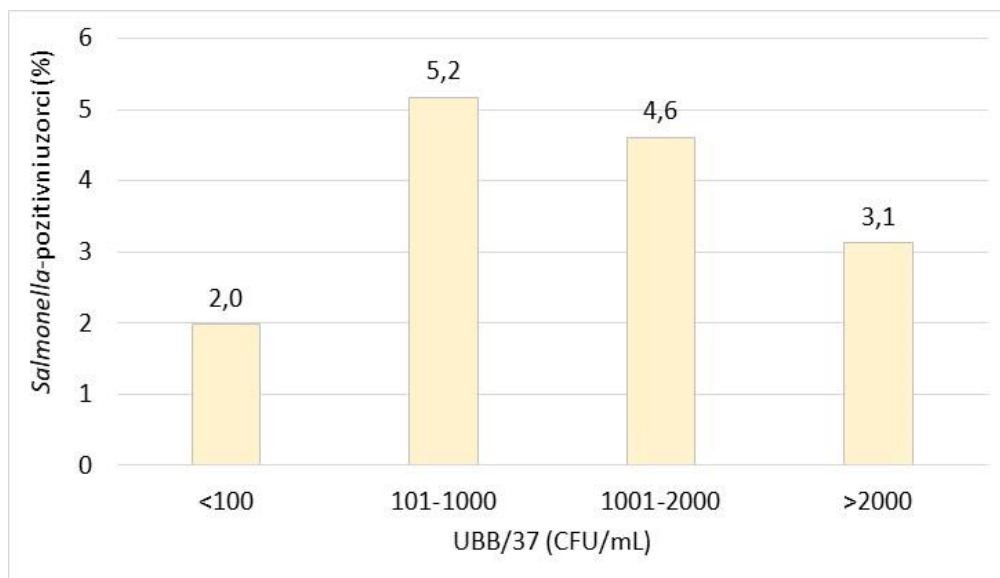


Slika 12. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinom mjesecu ispitivanja (svibanj – rujan)

## 4.2 Ostali mikrobiološki pokazatelji

### 4.2.1 Ukupan broj bakterija pri 37 °C (UBB/37)

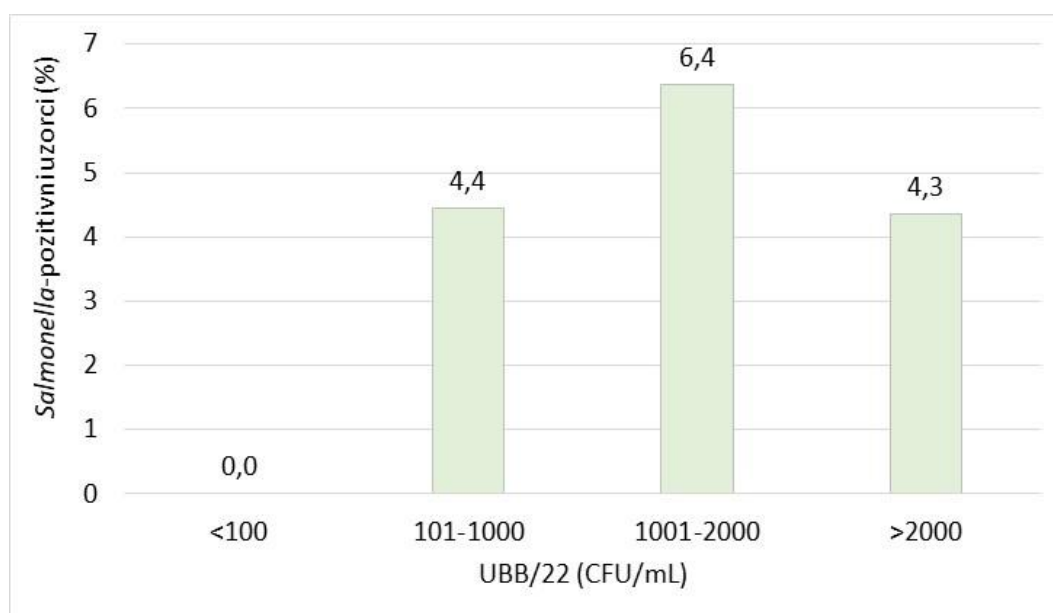
Na slici 13 prikazan je udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja ukupnim brojem bakterija pri 37 °C (UBB/37). Uzorci su prema opterećenju ukupnim brojem bakterija podijeljeni u četiri kategorije opterećenja: nisko <100, srednje 101-1000, visoko 1001-2000, vrlo visoko >2000 CFU/mL. Najveći udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka (5,2 %) zabilježen je u kategoriji srednjeg opterećenja (101-1000 CFU/mL) s UBB/37.



Slika 13. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja ukupnim brojem bakterija pri 37 °C (UBB/37)

#### 4.2.2 Ukupan broj bakterija pri 22 °C (UBB/22)

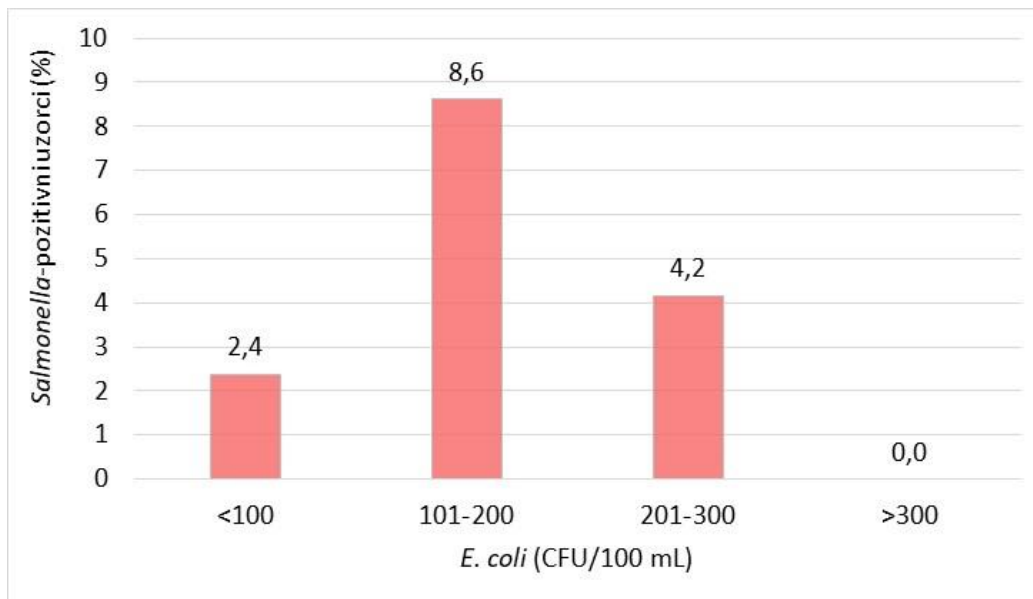
Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja ukupnim brojem bakterija pri 22 °C (UBB/22) prikazan je na slici 14. Uzorci su prema opterećenju ukupnim brojem bakterija podijeljeni u četiri kategorije opterećenja: nisko <100, srednje 101-1000, visoko 1001-2000, vrlo visoko >2000 CFU/mL. Najveći udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka (5,2 %) zabilježen je u kategoriji visokog opterećenja (1001-2000 CFU/mL) s UBB/22.



Slika 14. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja ukupnim brojem bakterija pri 22 °C (UBB/22)

#### 4.2.3 *Escherichia coli*

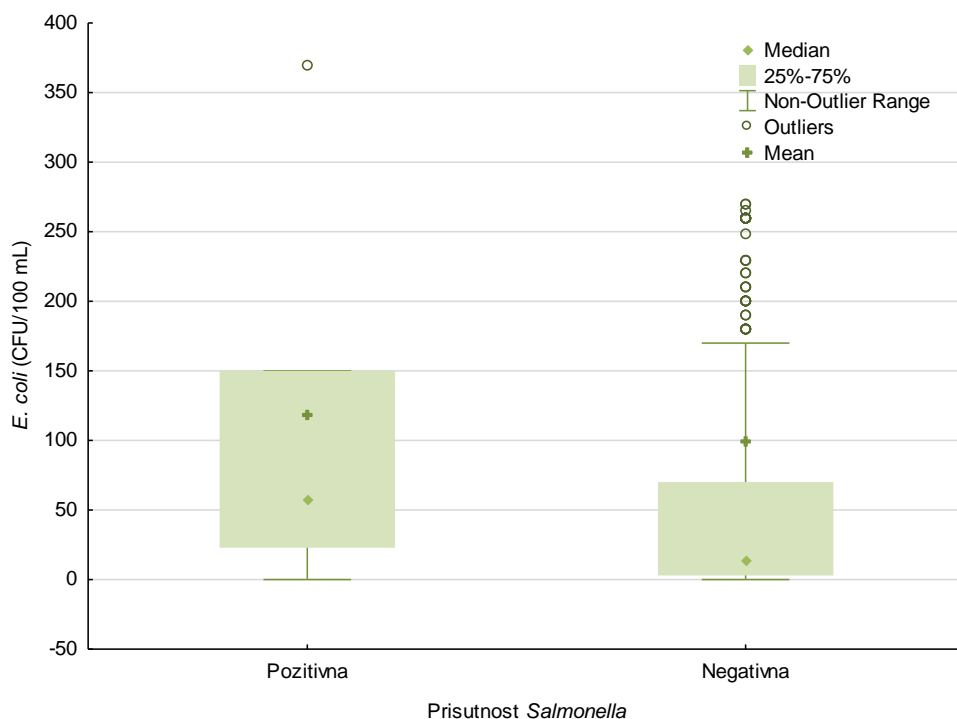
Slika 15 prikazuje udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja *E. coli*. Uzorci su podijeljeni u četiri kategorije opterećenja bakterijom *E. coli*: nisko <100, srednje 101-200, visoko 201-300, vrlo visoko >300 CFU/100 mL. Najveći udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka potvrđen je u kategoriji srednjeg opterećenja vode s *E. coli* (101-200 CFU/100 mL), a zanimljivo je da se u uzorcima vrlo visokog opterećenja (>300 CFU/100 mL) *Salmonella* nije dokazana. Statistički značajna razlika u pojavnosti *Salmonella* utvrđena je između uzoraka niskog i srednjeg opterećenja *E. coli* ( $\chi^2 = (1, N=965), p=0,003$ ).



Slika 15. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja *E. coli*

Na Slici 16. prikazan je medijan vrijednosti broja *E. coli* u *Salmonella*-pozitivnim i negativnim uzorcima. Mann-Whitney U testom utvrđena je statistički značajna razlika u vrijednosti medijana broja *E. coli* pozitivnih i negativnih uzoraka (M-W test,  $Z=2,24, p=0,025$ ). U *Salmonella*-pozitivnim uzorcima medijan broja *E. coli* iznosio je 110,0 CFU/100 mL (raspon 0,0 – 2000,0 CFU/100 mL, sr. vr.  $241,2 \pm 383,1$  CFU/100 mL, IKR 33,0 – 260,0 CFU/100 mL), a u *Salmonella*-negativnim uzorcima 14,0 (raspon 0,0 – 5000,0 CFU/100 mL, sr. vr.  $99,9 \pm 300,9$  CFU/100 mL, IKR 3,0 – 70,0 CFU/100 mL).



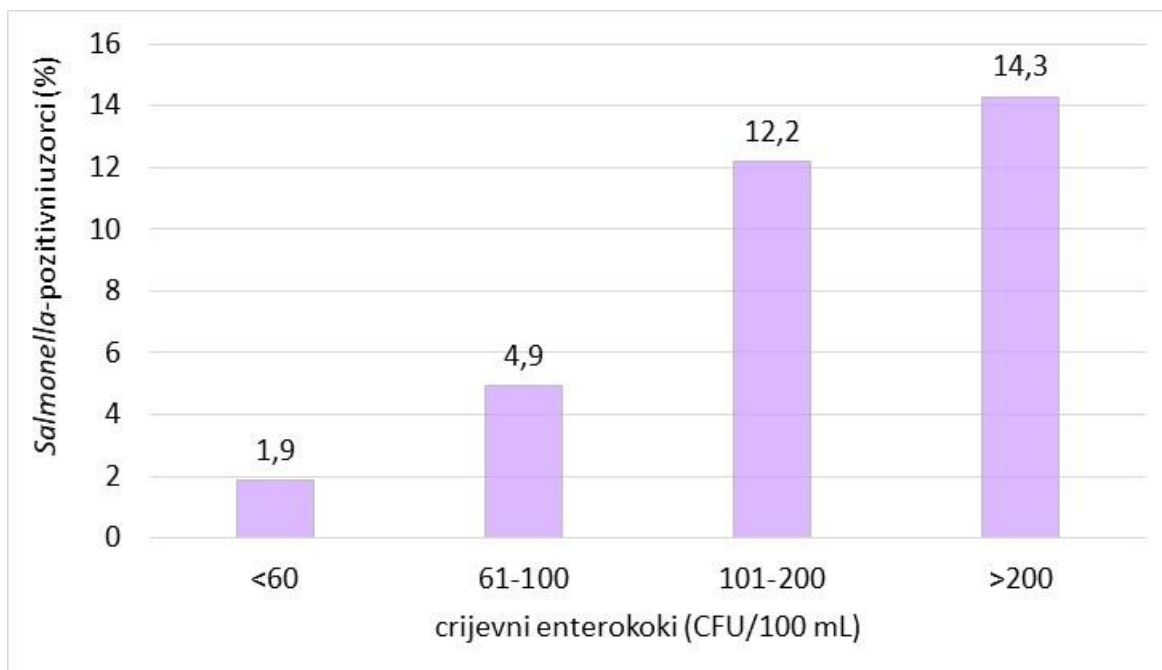


Slika 16.

Koncentracija *Escherichia coli* u *Salmonella* pozitivnim i negativnim uzorcima, s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25% - 75% percentila ( $\square$ ), raspona rezultata bez ekstrema ( $\top$ ) i ekstrema ( $\circ$ ).

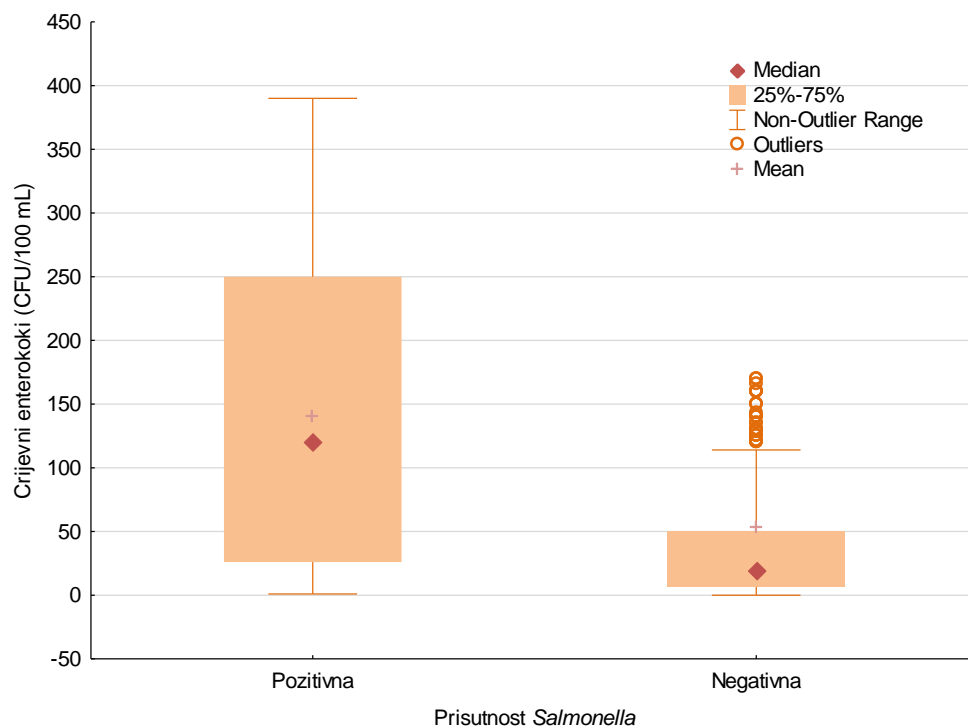
#### 4.2.4 Crijevni enterokoki

Slika 17 prikazuje udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja enterokokima. Uzorci su podijeljeni u četiri kategorije opterećenja crijevnim enterokokima: nisko <60, srednje 61-100, visoko 101-200, vrlo visoko >200 CFU/100 mL. Najveći udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka (14,3 %) utvrđen je u kategoriji uzoraka koja je bila najopterećenija s crijevnim enterokokima (>200 CFU/100 mL). Najmanji udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka (1,9 %) zabilježen je u kategoriji uzoraka niskog opterećenja s crijevnim enterokokima (<60 CFU/100 mL) te se ta grupa uzoraka statistički značajno razlikovala od kategorije srednjeg ( $\chi^2 = (1, N=974), p=0,034$ ), visokog ( $\chi^2 = (1, N=934), p<0,001$ ), i vrlo visokog opterećenja ( $\chi^2 = (1, N=915), p<0,001$ ).



Slika 17. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja enterokokima

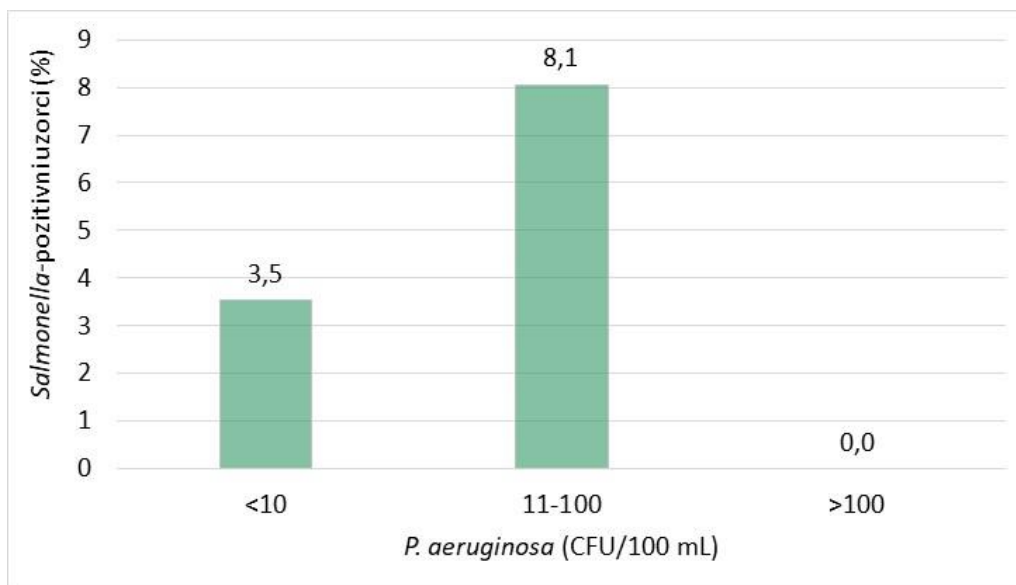
Na Slici 18. prikazan je medijan vrijednosti broja *E. coli* u *Salmonella*-pozitivnim i negativnim uzorcima. Mann-Whitney U testom utvrđena je statistički značajna razlika u vrijednosti medijana broja *E. coli* pozitivnih i negativnih uzoraka (M-W test,  $Z=2,24$ ,  $p=0,025$ ). U *Salmonella*-pozitivnim uzorcima medijan broja *E. coli* iznosio je 110,0 CFU/100 mL (raspon 0,0 – 2000,0 CFU/100 mL, sr. vr.  $241,2 \pm 383,1$  CFU/100 mL, IKR 33,0 – 260,0 CFU/100 mL), a u *Salmonella*-negativnim uzorcima 14,0 (raspon 0,0 – 5000,0 CFU/100 mL, sr. vr.  $99,9 \pm 300,9$  CFU/100 mL, IKR 3,0 – 70,0 CFU/100 mL).



Slika 18. Koncentracija crijevnih enterokoka u *Salmonella* pozitivnim i negativnim uzorcima, s prikazom medijana ( $\diamond$ ), 25% - 75% percentila( $\square$ ), raspona rezultata bez ekstrema( $\top$ ) i ekstrema (O).

#### 4.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

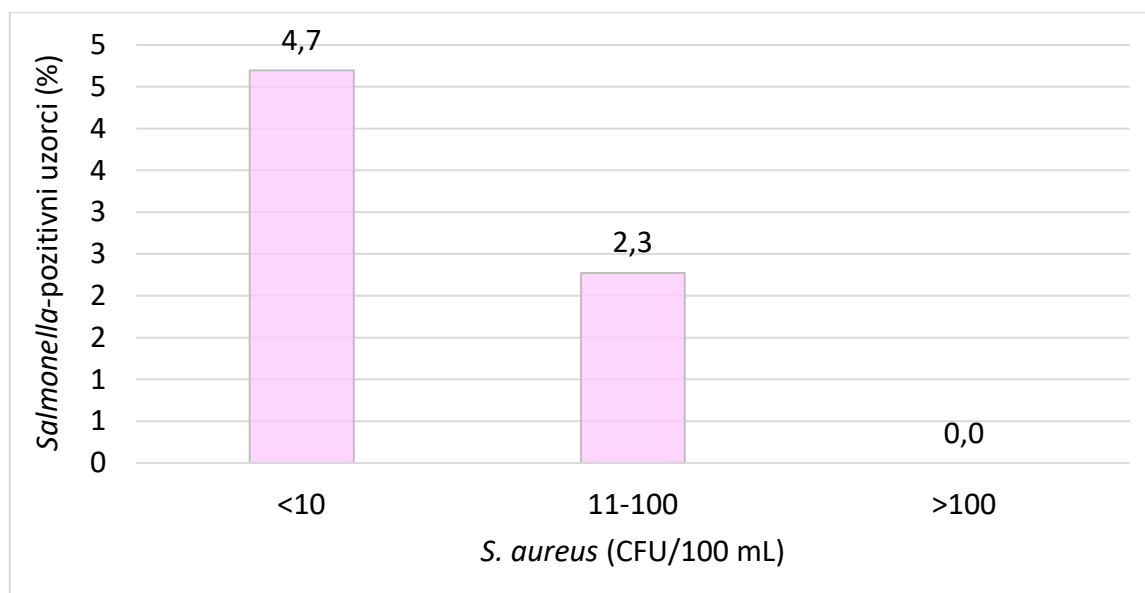
Na slici 19 prikazan je udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja *P. aeruginosa*. Uzorci su podijeljeni u tri kategorije opterećenja *P. aeruginosa*: nisko <10, srednje 11-100, visoko >100 CFU/100 mL. Zanimljivo je da u kategoriji uzoraka visokog opterećenja *P. aeruginosa* (>100 CFU/100 mL) prisutnost *Salmonella* nije dokazana. Između kategorija niskog (<10 CFU/100 mL) i srednjeg opterećenja (<100 CFU/100 mL) utvrđena je statistički značajna razlika ( $\chi^2 = (1, N=889), p=0,006$ ).



Slika 19. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja *P. aeruginosa*

#### 4.2.6 *Staphylococcus aureus*

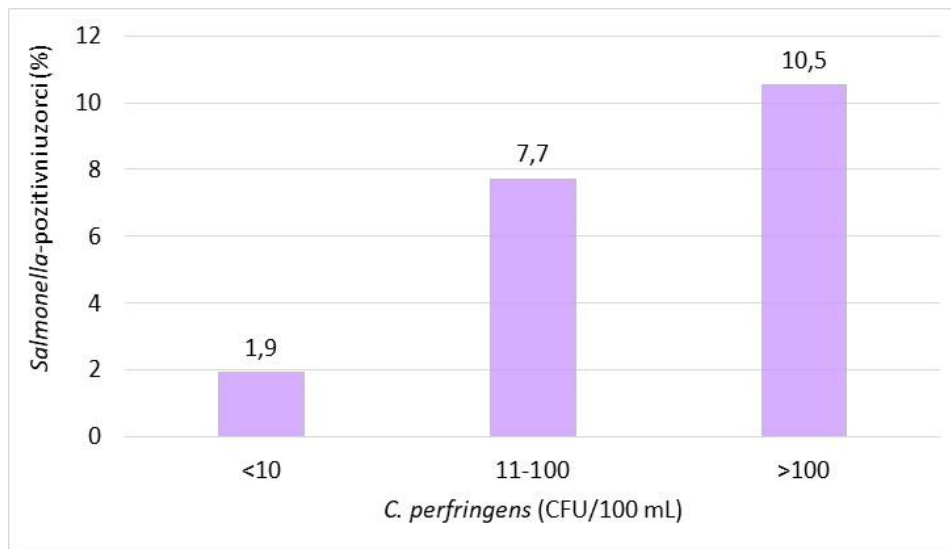
Na slici 20 prikazan je udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja *S. aureus*. Uzorci su podijeljeni u tri kategorije opterećenja *S. aureus*: nisko <10, srednje 11-100, visoko >100 CFU/100 mL. Kao i kod *P. aeruginosa*, u kategoriji visokog opterećenja *S. aureus* (>100 CFU/100 mL) prisutnost *Salmonella* nije dokazana.



Slika 20. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja *S. aureus*

#### 4.2.7 *Clostridium perfringens*

Na slici 21 prikazan je udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja *C. perfringens*. Uzorci su podijeljeni u tri kategorije opterećenja *C. perfringens*: nisko <10, srednje 11-100, visoko >100 CFU/100 mL. Statistički značajna razlika utvrđena je između kategorije niskog s kategorijama srednjeg ( $\chi^2 = (1, N=842)$ ,  $p<0,001$ ) i visokog opterećenja ( $\chi^2 = (1, N=575)$ ,  $p<0,001$ ).

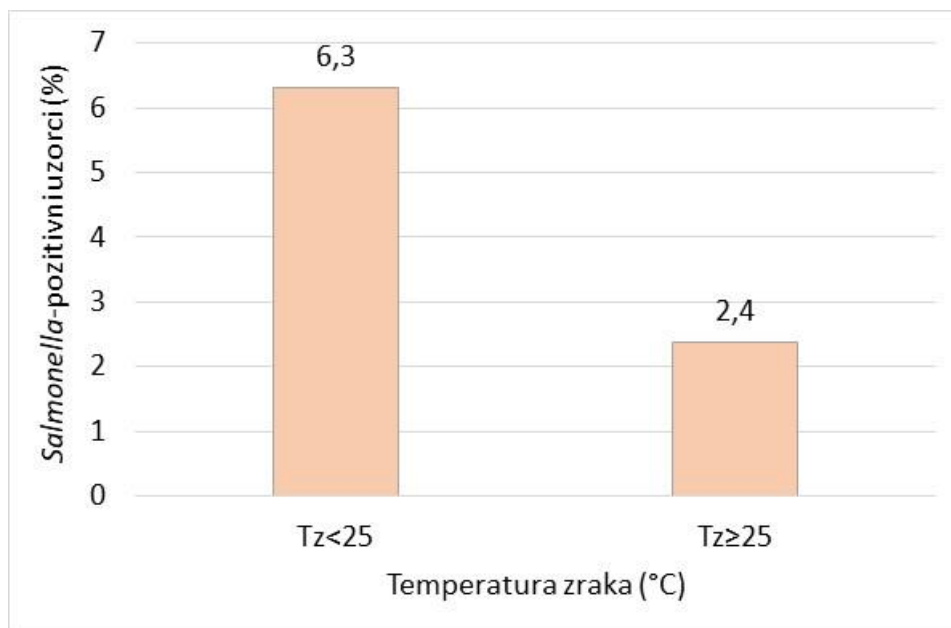


Slika 21. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji opterećenja *C. perfringens*

### 4.3 Utjecaj okolišnih čimbenika na udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka

#### 4.3.1 Temperatura zraka

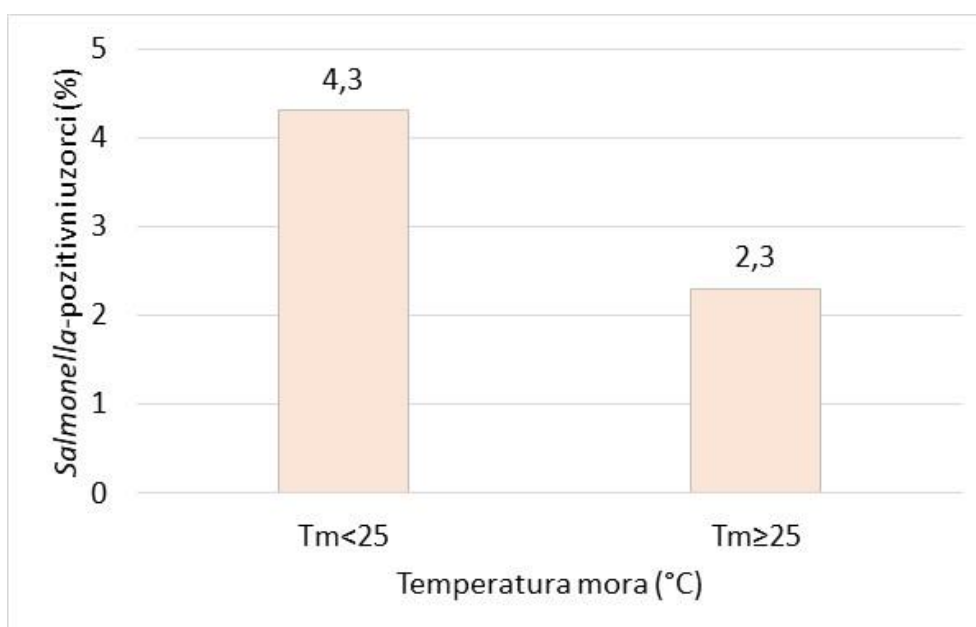
Obzirom na temperaturu zraka u trenutku uzorkovanja, uzorci su podijeljeni u dvije kategorije: <25°C i >25°C. Slika 22 prikazuje udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka u dvije navedene kategorije. Značajno veći udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka (6,3 %) utvrđen je u kategoriji uzoraka uzetih pri temperaturi zraka < 25 °C u odnosu na uzorke uzete pri višim temperaturama (2,4 %) ( $\chi^2 = (1, N=1119)$ ,  $p=0,001$ ).



Slika 22. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji temperature zraka

#### 4.3.2 Temperatura mora

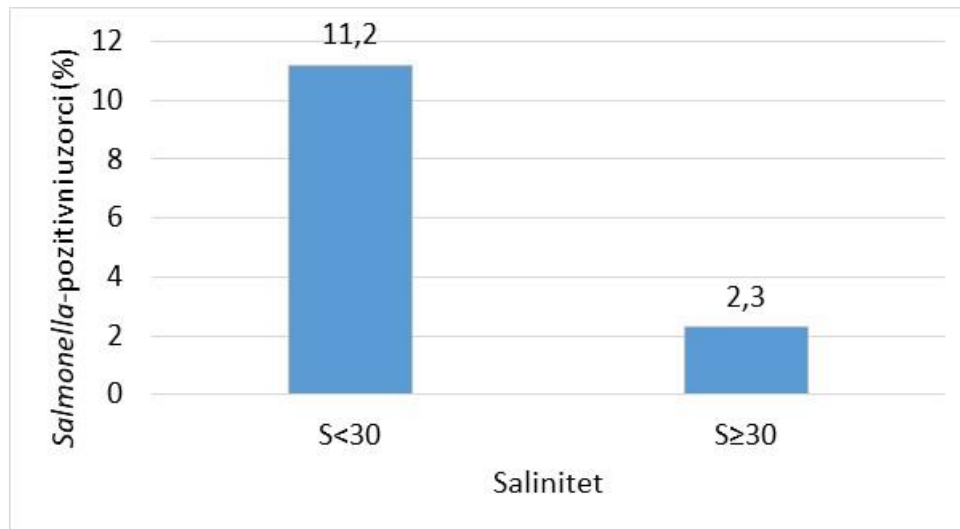
Uzorci mora su prema vrijednosti izmjerene temperature podijeljeni u dvije kategorije: <25°C i >25°C. Na slici 23 vidljivo je da udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka viši (4,3 %) u uzorcima u kojima je mjerena temperatura ispod 25 °C.



Slika 23. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji temperature mora

#### 4.3.3 Salinitet

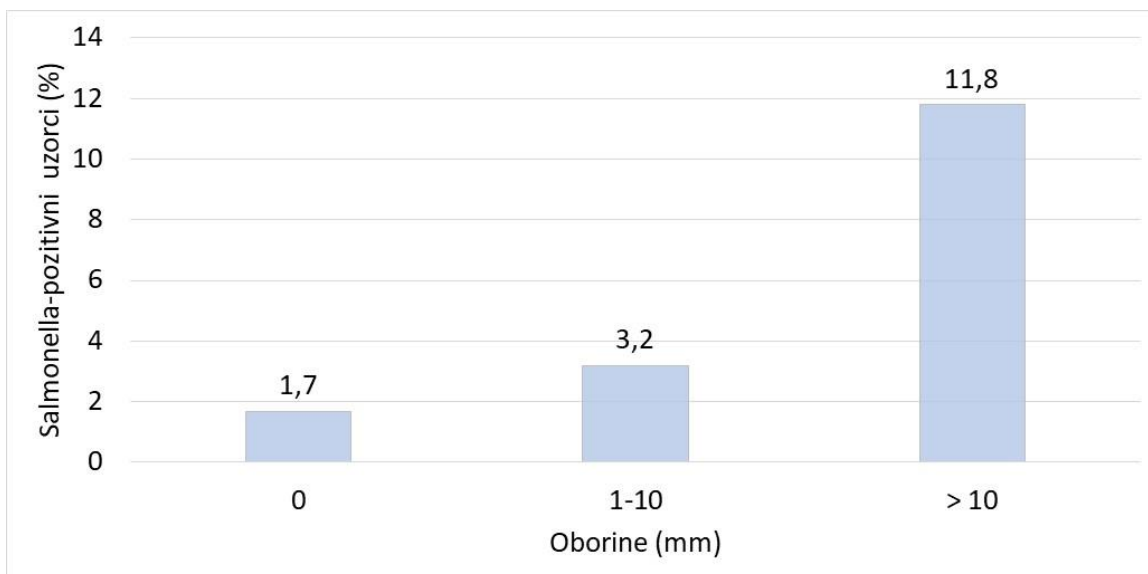
Uzorci mora su obzirom na vrijednosti saliniteta podijeljeni u dvije kategorije:  $<30$  i  $\geq 30$ . Slika 24 prikazuje da je udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka veći (11,2 %) u kategoriji uzoraka u kojima je salinitet bio manji od 30. Hi kvadrat testom je između ove dvije kategorije utvrđena statistički značajna razlika ( $\chi^2 = (1, N=1119)$ ,  $p < 0,001$ ).



Slika 24. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji saliniteta

#### 4.3.4 Oborine

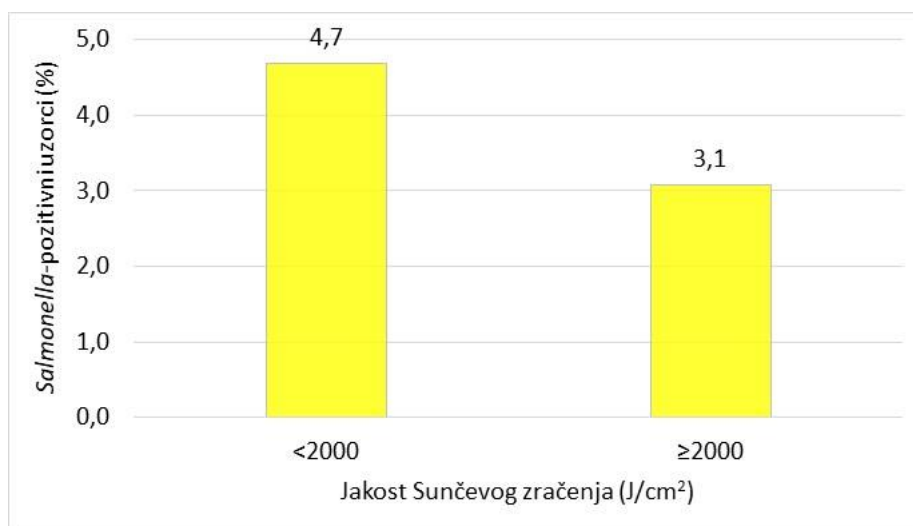
Na slici 25 prikazan je udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka, ovisno u količini oborina u razdoblju prije uzorkovanja. Za oborine uzet je zbroj količine oborina na dan uzorkovanja i prethodni dan. Uzorci su podijeljeni u tri kategorije: bez kiše 0 mm, malo kiše 1-10 mm, jača kiša  $>10$  mm. Najveći udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka (11,8 %) uočen je u kategoriji uzoraka prikupljenijih pri oborinama  $>10$  mm, a najmanji (1,7 %) u kategoriji "bez kiše". Hi kvadrat testom utvrđena je statistički značajna razlika između kategorije "bez kiše" i kategorija "malo kiše" ( $\chi^2 = (1, N=789)$ ,  $p < 0,001$ ) te "jača kiša" ( $\chi^2 = (1, N=414)$ ,  $p < 0,001$ ).



Slika 25. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji količine oborina

#### 4.3.5 Jakost Sunčevog zračenja

Slika 26 prikazuje udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka u odnosu na jakost Sunčevog zračenja. Uzorci su podijeljeni u dvije kategorije:  $<2000 \text{ J/cm}^2$  i  $\geq 2000 \text{ J/cm}^2$ . U uzorcima mora koji su prikupljeni za vrijeme Sunčevog zračenja jakosti  $<2000 \text{ J/cm}^2$ , udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka bio je veći (4,7 %) u odnosu na uzorke prikupljene pri Sunčevom zračenju jačine  $\geq 2000 \text{ J/cm}^2$ .



Slika 26. Udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka po pojedinoj kategoriji jakosti Sunčevog zračenja



#### 4.4 Korelacija ispitanih pokazatelja

Primjenom Spearmanove korelacijske analize utvrđena je značajna negativna korelacija između saliniteta i svih mikrobioloških pokazatelja ( $r_s = -0,123 - 0,462$ ;  $p < 0,05$ ), izuzev UBB/22 i *S. aureus*. Oborine (na dan uzorkovana, na dan uzorkovana + 1 prethodni dan, na dan uzorkovana + 2 prethodna dana) su bile značajno pozitivno povezane sa svim mikrobiološkim pokazateljima ( $r_s = 0,189 - 0,369$ ;  $p < 0,05$ ), izuzev *S. aureus* koji je bio negativno koreliran ( $r_s = -0,108 - 0,133$ ;  $p < 0,05$ ), dok kod UBB/22 i UBB/37 nije utvrđena značajna korelacija. Pokazatelji fekalnog onečišćenja, *E. coli*, crijevni enterokoki i *C. perfringens* međusobno su u dobroj korelaciji ( $r_s = 0,555 - 0,632$ ;  $p < 0,05$ ), kao i sa *P. aeruginosa* ( $r_s = 0,402 - 0,471$ ;  $p < 0,05$ ), međutim sa *S. aureus* značajna korelacija nije utvrđena. Sunčevo zračenje je u negativnoj korelaciji sa svim mikrobiološkim pokazateljima ( $r_s = -0,071 - 0,335$ ;  $p < 0,05$ ), izuzev UBB/22 i *S. aureus*. Temperatura zraka je u pozitivnoj korelaciji s UBB/22, UBB/37 i *S. aureus* ( $r_s = 0,103 - 0,266$ ;  $p < 0,05$ ), a u negativnoj korelaciji s *E. coli*, crijevnim enterokokima i *C. perfringens* i *P. aeruginosa* ( $r_s = -0,096 - 0,356$ ;  $p < 0,05$ ), (Tablica 4).

Tablica 4. Prikaz Spearmanove korelacije ispitanih pokazatelja (podebljane vrijednosti ukazuju na statistički značajnu korelaciju)

	Salinitet	UBB/37 <sup>1</sup>	UBB/22 <sup>2</sup>	EC <sup>3</sup>	ENT <sup>4</sup>	PA <sup>5</sup>	SA <sup>6</sup>	CP <sup>7</sup>	Oborine 1 dan <sup>8</sup>	Oborine 2 dana <sup>9</sup>	Oborine 3 dana <sup>10</sup>	T zraka <sup>11</sup>	Sunce <sup>12</sup>
Salinitet	-												
UBB/37 <sup>1</sup>	<b>0,214</b>	-											
UBB/22 <sup>2</sup>	-0,011	<b>0,531</b>	-										
EC <sup>3</sup>	<b>-0,367</b>	0,048	0,059	-									
ENT <sup>4</sup>	<b>-0,348</b>	<b>0,171</b>	<b>0,207</b>	<b>0,632</b>	-								
PA <sup>5</sup>	<b>-0,123</b>	<b>0,276</b>	<b>0,17</b>	<b>0,471</b>	<b>0,457</b>	-							
SA <sup>6</sup>	<b>0,161</b>	<b>0,086</b>	0,002	-0,051	0,008	-0,05	-						
CP <sup>7</sup>	<b>-0,462</b>	0,033	<b>0,116</b>	<b>0,553</b>	<b>0,555</b>	<b>0,402</b>	-0,049	-					
Oborine 1 dan <sup>8</sup>	<b>-0,236</b>	<b>-0,085</b>	0,035	<b>0,224</b>	<b>0,249</b>	<b>0,206</b>	-0,063	0,369	-				
Oborine 2 dana <sup>9</sup>	<b>-0,298</b>	-0,037	0,044	<b>0,248</b>	<b>0,269</b>	<b>0,217</b>	<b>-0,108</b>	<b>0,368</b>	<b>0,882</b>	-			
Oborine 3 dana <sup>10</sup>	<b>-0,308</b>	-0,04	0,043	<b>0,244</b>	<b>0,276</b>	<b>0,189</b>	<b>-0,133</b>	<b>0,336</b>	<b>0,742</b>	<b>0,928</b>	-		
T zraka <sup>11</sup>	<b>0,358</b>	<b>0,266</b>	<b>0,103</b>	<b>-0,199</b>	<b>-0,164</b>	<b>-0,096</b>	<b>0,176</b>	<b>-0,356</b>	<b>-0,509</b>	<b>-0,5</b>	<b>-0,385</b>	-	
Sunce <sup>12</sup>	0,019	<b>-0,071</b>	-0,014	<b>-0,179</b>	<b>-0,205</b>	<b>-0,246</b>	-0,029	<b>-0,336</b>	<b>-0,436</b>	<b>-0,444</b>	<b>-0,342</b>	<b>0,597</b>	-

<sup>1</sup>UBB/37 – ukupni broj kolonija na 37 °C (CFU/mL)

<sup>2</sup>UBB/22 – ukupni broj kolonija na 22 °C (CFU/mL)

<sup>3</sup>EC – *Escherichia coli* (CFU/100 mL)

<sup>4</sup>ENT – crijevni enterokoki (CFU/100 mL)

<sup>5</sup>PA – *Pseudomonas aeruginosa* (CFU/100 mL)

<sup>6</sup>SA – *Staphylococcus aureus* (CFU/mL)

<sup>7</sup>CP – *Clostridium perfringens* (CFU/100 mL)

<sup>8</sup>Oborine 1 dan (mm) – oborine na dan uzorkovanja (mm)

<sup>9</sup>Oborine 2 dana (mm) – oborine na dan uzorkovanja + jedan prethodni dan (mm)

<sup>10</sup>Oborine 3 dana (mm) – oborine na dan uzorkovanja + dva prethodna dana (mm)

<sup>11</sup>Tzraka – temperatura zraka (°C)

<sup>12</sup>Sunce – jakost Sunčevog zračenja (J/cm<sup>2</sup>)

## 5 RASPRAVA

Monitoring kakvoće mora za kupanje se u Hrvatskoj provodi u cilju očuvanja zdravlja kupaca, a propisan je Uredbom o kakvoći mora za kupanje (NN 73/08). Rutinski mikrobiološki pokazatelji koji su prate su crijevni enterokoki i *E. coli*, a ovo je istraživanje prošireno na dodatne pokazatelje, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. perfringens* i *Salmonella* spp. Od fizikalno-kemijskih pokazatelja mjereni su temperatura zraka, temperatura mora, salinitet, količina oborina i jakost Sunčevog zračenja.

*Salmonella* može doći u more izravno s fekalijama zaraženih ljudi ili životinja ili neizravno, primjerice, putem otpadnih voda ili ispiranjem s poljoprivrednog zemljišta (6). Prosječan salinitet otvorenog dijela Jadranskog mora iznosi 38. S obzirom na veliki raspon izmjenjenog saliniteta u ovom istraživanju (od 0,5 do 38), može se zaključiti da je obalno more pod značajnim utjecajem pritoka slatke vode. Kopnene slatke vode nerijetko sadrže fekalno onečišćenje zbog neispravno izgrađenih septičkih jama na obali. Unatoč tome što *Salmonella* nije uključena u međunarodnu legislativu kao rutinski pokazatelj kakvoće morske vode, prisutnost ove bakterije ukazuje na sanitarnu kakvoću obalnog mora. Garrido-Perez i suradnici su u svom istraživanju zaključili kako odsutnost fekalnih koliforma u rekreacijskim vodama ne znači nužno da nije prisutno fekalno onečišćenje, te je za točniju sliku onečišćenja potrebno uzeti u obzir i druge bakterije (24). Jedan od tih dodatnih pokazatelja mogla bi biti upravo *Salmonella*.

*Salmonella* je u našem istraživanju dokazana u 41 uzorku (3,7%) od kojih je 28 označeno kao more pogodno za kupanje. Tako značajan udio nam ukazuje kako trenutni pokazatelji kakvoće mora za kupanje nisu dovoljni da otklone sumnju na mogućnost kontaminacije mora salmonelom. Uspoređujući uzorke prikupljene ujutro s onim popodne, uočava se u popodnevnim satima nešto veći udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka. Taj rezultat je neočekivan, obzirom na činjenicu da sunčevo zračenje ima veći utjecaj popodne te u većoj mjeri reducira broj bakterija. Udio uzoraka koji su ocjenjeni kao pogodni za kupanje u *Salmonella*-pozitivnim uzorcima u jednakom je omjeru ujutro i popodne. Promatrajući rezultate po pojedinim plažama vidimo da je najveći udio *Salmonella*-pozitivnih rezultata na plažama Nogometno igralište i 3. maj, a najmanji na plaži Ploče. Mogući uzrok tome je što je plaža Ploče otvorenijeg tipa pa je i veće strujanje mora koje smanjuje koncentraciju *Salmonella*. Međutim, iako je plaža 3. maj više zaklonjena, pa potvrđuje pretpostavku, plaža Nogometno igralište je također otvorena i samim time u suprotnosti s pretpostavkom. Drugi mogući razlog ovoj raspodjeli je sama količina slatke vode koja se ulijeva na pojedinu plažu. Na plaži 3. maj je češće mjerena niža temperatura vode

i vrlo niski salinitet koji ukazuju na veći pritek vode s kopna pa time i veću kontaminaciju. Na tom su području, prilikom uzorkovanja, uočen veći broj priobalnih izvora.

Rezultati kazuju da je, u 3 sezone kupanja, najveći udio *Salmonella*-pozitivnih rezultata bio 2023. (5,6%) a najmanji 2022. godine (2,1%). Mogući razlog tome je količina oborina i sunčevog zračenja po pojedinim godinama. Promatranjem podataka o oborinama možemo vidjeti da je 2023. zabilježena najveća prosječna količina oborina. Ukoliko se uzme u obzir podatak o količini oborina na dan uzorkovanja i dva dana prije uzorkovanja, može se vidjeti da prosječna količina oborina u 2023. više nego dvostruko nadmašuje prosječnu količinu oborina iz 2022. Navedeno ide u prilog pretpostavci da s porastom količine oborina raste i pritek slatke vode te posljedično i razina fekalnog onečišćenja. Suprotno tome, pretpostavljamo da veća jačina Sunčevog zračenja negativno utječe na koncentraciju *Salmonella*, odnosno povećanjem jačine zračenja smanjuje se koncentracija bakterija. Podaci govore da je 2022., kada je bio najmanji udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka, zabilježeno najjače prosječno Sunčevo zračenje. Usporedimo li oba parametra vidimo da je u 2022. zabilježena nešto veća prosječna količina oborina nego u 2021. Međutim, u 2022. je također izmjerena veća jačina Sunčevog zračenja što je moguće uzrokom manjeg udjela *Salmonella*-pozitivnih uzoraka 2022. godine u odnosu na 2021. godinu.

Analizom podataka također su utvrđene razlike između mjeseci. Uzorkovanje mora za kupanje provodi od sredine svibnja do kraja rujna, za vrijeme trajanja sezone kupanja. Promatrajući rezultate vidimo da je najmanji udio (1,8%) *Salmonella*-pozitivnih rezultata bio u lipnju, a najveći (5,6%) u rujnu. Od ostalih promatranih mjeseci, svibanj je imao nešto niži udio, a srpanj i kolovoz nešto viši. Na rezultate prisutnosti *Salmonella* u obalnom moru utječu količina oborina, jakost Sunčevog zračenja ali i opterećenost plaža i stambenih objekata u blizini. U rujnu je zabilježena najmanja jačina Sunčevog zračenja, što bi mogao biti uzrok velikom udjelu *Salmonella*-pozitivnih rezultata. U srpnju i kolovozu zabilježena je velika količina oborina ali i najveća jačina Sunčevog zračenja pa je udio *Salmonella*-pozitivnih rezultata niži nego u rujnu. To znači da bi sagledavanje oba okolišna parametra, količine oborina i jakosti Sunčevog zračenja, mogla dati bolju predikciju količine kontaminacije. Također, potrebno je uzeti u obzir da, zbog kratkotrajnih ali obilnih ljetnih pljuskova u srpnju i kolovozu, mjesečni prosjek oborina možda nije mjerodavan. Prema rezultatima istraživanja Bagi i Skogerbø u Norveškoj najveće količine fekalnog zagađenja u moru za kupanje zabilježene su u rujnu. Taj podatak u njihovom istraživanju odgovara pozitivnoj korelaciji količine padalina i fekalnog onečišćenja kojeg pritek slatke vode donosi s obližnjih poljoprivrednih zemljišta (25).

Kod usporedbe *Salmonella*-pozitivnih rezultata i ukupnog broja bakterija pri 37 °C (UBB/37) rezultati su podijeljeni u 4 skupine opterećenja UBB/37. Najmanji udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka utvrđen je u najnižoj skupini opterećenja UBB/37, a najviši udio u drugoj skupini opterećenja. Razlog tome može biti to što su nepovoljni uvjeti za rast jednaki većini vrsta bakterija koje se nalaze u moru. Slični rezultati se javljaju kod usporedbe *Salmonella*-pozitivnih uzoraka s ukupnim brojem bakterija pri 22°C (UBB/22). U najnižoj razini opterećenosti nema *Salmonella*-pozitivnih rezultata, razlog tome je vjerojatno to što su nepovoljni uvjeti za ukupne bakterije također nepovoljni za salmonele. Najviši udio *Salmonella*-pozitivnih rezultata je bio u trećoj razini opterećenosti. Nije utvrđen razlog opadanja udjela *Salmonella*-pozitivnih uzoraka s povećanjem opterećenosti UBB/37 i UBB/22, ali je potrebno naglasiti da su UBB i *Salmonella* vrste koje ne potječu iz istog izvora. Usporedimo li podatke s razinom opterećenosti s *E. coli* vidimo da je najveći udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka u skupini srednjeg opterećenja, a najniži u skupini niskog opterećenja. U skupini vrlo visokog opterećenja nema *Salmonella*-pozitivnih uzoraka. Za pretpostaviti je da je u skupini niskog opterećenja *E. coli* i nizak udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka, obzirom da je riječ o vrstama koje u morsku vodu dospijevaju fekalnim onečišćenjem, no to ne objašnjava zašto u skupini visokog opterećenja nema *Salmonella*-pozitivnih uzoraka. Iako sa sigurnošću ne možemo utvrditi, za pretpostaviti je da je razlog odsutnosti *Salmonella* u uzorcima morske vode koji su svrstani u kategoriju visoko opterećenih uzoraka s UBB i *E. coli*, malen broj takvih uzoraka.

U kolumbijskom istraživanju provedenom od strane Soto-Varela i suradnika dokazano je da koncentracije *E. coli* i *Salmonella* koreliraju te da dolaze od istog izvora, što je najčešće fekalno onečišćenje uzrokovano neadekvatnim prikupljanjem otpadnih voda objekata smještenih u blizini obale. Prisutnost *Salmonella* u ovom istraživanju dokazana je PCR testom (7). Sagledavanjem *Salmonella*-pozitivnih uzoraka u pojedinim kategorijama opterećenosti crijevnim enterokokima uočava se da udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka raste s razinom opterećenosti vode enterokokima. Najmanji udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka utvrđen je u skupini niskog opterećenja crijevnim enterokokima, dok je najviši udio bio u skupini vrlo visokog opterećenja. Možemo pretpostaviti da je razlog tome isti ili sličan izvor kontaminacije ovih bakterija. Slično se javlja i kod *C. perfringens*, kod kojeg također broj *Salmonella*-pozitivnih uzoraka raste s opterećenjem. Može se pretpostaviti da je razlog sličan kao i u slučaju crijevnih enterokoka, ista priroda izvora onečišćenja.

Kod *P. aeruginosa* i *S. aureus* su rezultati su drugačiji. U uzorcima iz kategorije najveće razine opterećenosti ovim bakterijama nije bilo *Salmonella*-pozitivnih uzoraka. Curiel-Ayala i

suradnici u svom istraživanju su dokazali suprotno. U njihovom istraživanju, provedenom u Meksiku, dokazana je značajna pozitivna korelacija između koncentracije enterokoka i koncentracija *C. perfringens* i *S. aureus* (23). Potrebno je naglasiti da su u ovom istraživanju točke uzorkovanja bile smještene u blizini izljevima obrađene otpadne vode pa je, u usporedbi s ovim istraživanjem, izvor kontaminacije nešto drugačiji.

Od fizikalno-kemijskih parametara mjereni su temperatura zraka, temperatura mora i salinitet. Uzorci su u odnosu na temperaturu mora podijeljeni u dvije skupine;  $<25^{\circ}$  i  $>25^{\circ}$ . Utvrđen je značajno veći udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka u skupini  $<25^{\circ}$ . Za pretpostaviti je da je uzrok tome dotok slatke vode koja sadrži fekalno onečišćenje, a temperature ovih kopnenih voda koje dotječu iz podzemlja su niže temperature morske vode. C. Levantesi i suradnici su u svom istraživanju zaključili kako je dotok slatke vode s kopna najčešći izvor *Salmonella* u moru (6). Temperatura zraka i jakost Sunčevog zračenja su također podijeljeni u dvije kategorije.  $<25^{\circ}$  i  $>25^{\circ}$  za temperaturu zraka i  $<2000 \text{ J/cm}^2$  i  $\geq 2000 \text{ J/cm}^2$  za Sunčevo zračenje. Prema dobivenim rezultatima, u uzorcima koji su uzeti pri nižim temperaturama zraka i pri nižoj jačini Sunčevog zračenja, utvrđen je veći udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka. Sunčevo zračenje je negativno korelirano s koncentracijom *Salmonella* obzirom da ono isušuje i uništava bakterije. Visoka temperatura zraka je posljedica, između ostalog, jačeg Sunčevog zračenja pa također postoji ista korelacija sa udjelom *Salmonella*-pozitivnih uzoraka. Uzorci mora su obzirom na vrijednosti saliniteta podijeljeni u dvije kategorije:  $<30$  i  $\geq 30$ . Najveći dio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka je imao salinitet  $<30$ . To također možemo pripisati pritoku slatke vode s obale koja snižava salinitet mora i donosi fekalno onečišćenje. Prema količini oborina uzorci su podijeljeni u 3 skupine (bez kiše 0 mm, malo kiše 1-10 mm, jača kiša  $>10$  mm). Između navedenih kategorija utvrđena je statistički značajna razlika u pojavnosti *Salmonella*-pozitivnih uzoraka, kojih je najviše bilo u skupini jače kiše. Najviše slatke vode, koja je potencijalno opterećena fekalnim materijalom, pritječe nakon obilnih kiša te su ovakvi rezultati očekivani. Za svaki uzorak morske vode je zabilježen podatak o oborinama na dan uzorkovanja te dva dana prije uzorkovanja. Dosadašnja istraživanja na ovom području pokazala su najveću korelaciju indikatora fekalnog onečišćenja i kumulativnih oborina od tri dana, obzirom da je potrebno vrijeme da se oborine infiltriraju u podzemlje te se pojave u obliku priobalnih izvora (26).

Spearmanovom korelacijskom analizom potvrđena je većina već navedenih pretpostavki. Utvrđena je značajna negativna korelacija između saliniteta i svih mikrobioloških pokazatelja, izuzev UBB/22 i *S. aureus*. To potvrđuje da je manji udio *Salmonella*-pozitivnih uzoraka u

obalnom moru koje nema značajnih pritoka slatke vode s kopna. Oborine su bile značajno pozitivno povezane sa svim mikrobiološkim pokazateljima, izuzev *S. aureus* koji je bio negativno koreliran, dok kod UBB/22 i UBB/37 nije utvrđena značajna korelacija. To također ukazuje na unos patogena u more slatkim vodom. Za oborine nije utvrđena značajna korelacija s UBB/22 i UBB/37, jer su to vrste koje prirodno nastanjuju more. Pokazatelji fekalnog onečišćenja, *E. coli*, crijevni enterokoki i *C. perfringens* međusobno su u dobroj korelaciji, što je očekivano s obzirom da se koriste kao glavni pokazatelji fekalnog onečišćenja. Jačina Sunčevog zračenja je u negativnoj korelaciji sa svim mikrobiološkim pokazateljima, osim UBB/22 i *S. aureus*. Razlog tome je to što je Sunčevo zračenje ima najjači utjecaj na smanjenje broja mikroorganizama.

## 6 ZAKLJUČCI

- Istraživanjem je utvrđeno prisustvo bakterije roda *Salmonella* u morskoj vodi na plažama u užem području grada Rijeke (3,7% pozitivnih uzoraka).
- Salinitet i Sunčevo zračenje značajno utječu na koncentraciju *Salmonella* u moru.
- Pojavnost *Salmonella* u moru u značajnoj mjeri ovisi o količini oborina.
- *Salmonella* je u dobroj korelaciji s crijevnim enterokokima i *C. perfringens*.
- Praćenje samo rutinskih pokazatelja, *E. coli* i enterokoka ne isključuje mogućnost kontakta kupaca sa bakterijama vrste *Salmonella*.
- Dotok slatke vode u more povezan je s rizikom od mikrobiološkog onečišćenja.



## 7 LITERATURA

1. Vlada Republike Hrvatske, Uredba o kakvoći mora za kupanje. 2008.
2. Kalenić S. Medicinska mikrobiologija 2013.
3. Aragonés L, López I, Palazón A, López-Úbeda R, García C. Evaluation of the quality of coastal bathing waters in Spain through fecal bacteria *Escherichia coli* and *Enterococcus*. *Science of The Total Environment*. 2016;566-567:288-97.
4. Nada Krstulović MŠ. Mikrobiologija mora 2006.
5. World Health Organization, Guidelines on recreational water quality: Volume 1 Coastal and fresh waters. 2021.
6. Levantesi C, Bonadonna L, Briancesco R, Grohmann E, Toze S, Tandoi V. Salmonella in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International*. 2012;45(2):587-602.
7. Soto-Varela ZE, Rosado-Porto D, Bolívar-Anillo HJ, Pichón González C, Granados Pantoja B, Estrada Alvarado D, et al. Preliminary Microbiological Coastal Water Quality Determination along the Department of Atlántico (Colombia): Relationships with Beach Characteristics. *Journal of Marine Science and Engineering [Internet]*. 2021; 9(2).
8. Kim S. Salmonella Serovars from Foodborne and Waterborne Diseases in Korea, 1998-2007: Total Isolates Decreasing Versus Rare Serovars Emerging. *J Korean Med Sci*. 2010.
9. Meena B, Anburajan L, Selvaganapathi K, Vinithkumar NV, Dharani G. Characteristics and dynamics of Salmonella diversity and prevalence of biomarker genes in Port Blair Bays, South Andaman, India. *Marine Pollution Bulletin*. 2020;160:111582.
10. Rubini S, Galletti G, D'Incau M, Govoni G, Boschetti L, Berardelli C, et al. Occurrence of Salmonella enterica subsp. enterica in bivalve molluscs and associations with *Escherichia coli* in molluscs and faecal coliforms in seawater. *Food Control*. 2018;84:429-35.
11. World Health Organization, World health statistics 2015. 2015.
12. Gonçalves J, Gutiérrez-Aguirre I, Balasubramanian MN, Zagorščak M, Ravnikar M, Turk V. Surveillance of human enteric viruses in coastal waters using concentration with methacrylate monolithic supports prior to detection by RT-qPCR. *Marine Pollution Bulletin*. 2018;128:307-17.
13. Blanch AR, Méndez J, Lucena F, Casas-Mangas R, Chesa-Marro MJ, Llopart-Mascaró A, et al. Somatic Coliphages as an Operational Tool to Assess Loss of Bathing Water Quality after Heavy Rain Events. *Water Research*. 2024;249:120981.
14. European union, Bathing Water Directive 2006.
15. World Health Organization, WHO recommendations on scientific, analytical and epidemiological developments relevant to the parameters for bathing water quality in the Bathing Water Directive (2006/7/EC). 2018.
16. Eurobath [Available from: <https://jadran.izor.hr/eurobath/team.html>].
17. Kakvoća vode -- Detekcija i brojenje crijevnih enterokoka -- 2. dio: Metoda membranske filtracije (ISO 7899-2:2000; EN ISO 7899-2:2000). 2000.
18. Kvaliteta vode -- Brojenje *Escherichia coli* i koliformnih bakterija -- 1. dio: Metoda membranske filtracije za vode s niskom pozadinom bakterijske flore. 2017.
19. Kvaliteta vode -- Brojenje *Clostridium perfringens* -- Metoda s uporabom membranske filtracije (ISO 14189:2013; EN ISO 14189:2016). 2016.
20. E. W. Rice RBB, A. D. Eaton. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition.
21. Kakvoća vode -- Detekcija i brojenje *Pseudomonas aeruginosa* -- Metoda membranske filtracije (ISO 16266:2006; EN ISO 16266:2008). 2008.
22. Kvaliteta vode -- Detekcija vrsta roda *Salmonella* (ISO 19250:2010; EN ISO 19250:2013). 2013.

23. F. Curiel-Ayala, E.I. Quiñones-Ramírez, R.C. Pless, Eva González-Jasso, Comparative studies on Enterococcus, Clostridium perfringens and Staphylococcus aureus as quality indicators in tropical seawater at a Pacific Mexican beach resort, Marine Pollution Bulletin, 2012.07.052
24. M.C. Garrido-Pérez, E. Anfuso, A. Acevedo, J.A. Perales-Vargas-Machuca, Microbial indicators of faecal contamination in waters and sediments of beach bathing zones, International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2007.09.010.
25. A. Bagi, G. Skogerbø, Tracking bacterial pollution at a marine wastewater outfall site – A case study from Norway, Science of the Total Environment, 2022.154257
26. D. Vukić Lušić, L. Kranjčević, S. Maćešić, D. Lušić, S. Jozić, Ž. Linšak, L. Bilajac, L. Grbčić, N. Bilajac. Temporal variations analyses and predictive modeling of microbiological seawater quality, Water Research, 2017;119:160-170

## **ŽIVOTOPIS**

Lovro Baričević rođen je 22. 12. 2000. u Rijeci. Pohađao je Osnovnu školu Ivana Mažuranića u Novom Vinodolskom. Srednjoškolsko obrazovanje stekao je u Medicinskoj školi u Rijeci gdje je završio smjer sanitarni tehničar. 2020. upisao je Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva.