

Utjecaj vremena izloženosti morskom okolišu na promjenu omjera bakterija Escherichia coli i crijevnih enterokoka u moru za kupanje

Perić, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:226:573964>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department of Marine Studies](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ EKOLOGIJA I ZAŠTITA MORA

Mia Perić

**UTJECAJ VREMENA IZLOŽENOSTI MORSKOM
OKOLIŠU NA PROMJENU OMJERA BAKTERIJA
Escherichia coli I CRIJEVNIH ENTEROKOKA U
MORU ZA KUPANJE**

Diplomski rad

Split, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ EKOLOGIJA I ZAŠTITA MORA

**UTJECAJ VREMENA IZLOŽENOSTI MORSKOM
OKOLIŠU NA PROMJENU OMJERA BAKTERIJA
Esherichia coli I CRIJEVNIH ENTEROKOKA U
MORU ZA KUPANJE**

Diplomski rad

Predmet: Ekologija mora

Mentor:

Prof. dr. sc. Mladen Šolić

Student:

Mia Perić

Split, rujan 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za mikrobiologiju Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu i financiran je projektom Hrvatske zaklade za znanost „Ususret novoj direktivi Europske unije o upravljanju kvalitetom vode za kupanje“ (HRZZ-IP-2020-02-1880, EUROBATH).

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Diplomski studij Ekologija i zaštita mora

Diplomski rad

**UTJECAJ VREMENA IZLOŽENOSTI MORSKOM OKOLIŠU NA PROMJENU
OMJERA BAKTERIJA *ESHERICHIA COLI* I CRIJEVNIH ENTEROKOKA U
MORU ZA KUPANJE**

Mia Perić

Sažetak

U ovom je radu istraživana je utjecaja vremena izloženosti morskom okolišu na promjenu omjera broja bakterija *Escherichia coli* i crijevnih enterokoka u moru za kupanje. Terenska istraživanja provedena su na plaži Gojača u Kaštel Sućurcu tijekom sezone kupanja 2022., dok su *in situ* eksperimenti provedeni u neposrednoj blizini Instituta za oceanografiju i ribarstvo. Rezultati terenskih istraživanja pokazali su da je omjer broja bakterija *E. coli* i crijevnih enterokoka manji na točki udaljenijoj od izvora onečišćenja, što je rezultat značajnijeg smanjenja broja *E. coli* nego crijevnih enterokoka tijekom izloženosti okolišnim čimbenicima na putu od izvora onečišćenja do kontrolne točke. Rezultati *in situ* eksperimenata pokazali su smanjenje omjera s vremenom izloženosti indikatorskih mikroorganizama utjecaju okolišnih čimbenika, što je također rezultat bržeg ugibanja *E. coli* u odnosu na crijevne enterokoke. Brže ugibanje obaju indikatorskih bakterija u površinskom sloju u odnosu na dublji sloj mora ukazuje na važnost Sunčevog zračenja za reduciranje indikatorskih bakterija u morskoj vodi.

(28 stranica, 25 slike, 1 tablica, 19 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: sunčevo zračenje, vrijeme izloženosti, morski okoliš, *Escherichia coli*, crijevni enterokoki, T90

Mentor: Prof. dr. sc. Mladen Šolić

Komentor: Dr. sc. Slaven Jozić

Ocjenjivači:

1. Prof. dr. sc. Mladen Šolić
2. Dr. sc. Slaven Jozić
3. Doc. dr. sc. Frano Matić

THE INFLUENCE OF TIME OF EXPOSURE TO THE MARINE ENVIRONMENT ON
THE CHANGE IN THE RATIO OF ESHERICHIA COLI BACTERIA AND
INTESTINAL ENTEROCOCCI IN THE SEA FOR SWIMMING

Mia Perić

Abstract

In this thesis, the influence of the exposure time in the marine environment on the change in the ratio of the number of *Escherichia coli* and intestinal enterococci in bathing seawater was investigated. The field research was conducted on Gojača beach in Kaštel Sućurac during the 2022 bathing season, while the *in situ* experiments took place in the immediate vicinity of the Institute of Oceanography and Fisheries. The results of the field investigations showed that the ratio of the number of *Escherichia coli* and intestinal enterococci is lower at a point further away from the pollution source, which is because the number of *E. coli* decreases more than that of intestinal enterococci during exposure to environmental factors on the way from the pollution source to the control point. The results of the *in situ* experiments showed a decrease in the ratio with the time the indicator microorganisms were exposed to the influence of environmental factors, which is also the result of a faster reduction of *E. coli* compared to the intestinal enterococci. The faster reduction of both indicator bacteria in the surface layer compared to the deeper layer of seawater indicates the importance of solar radiation for the reduction of indicator bacteria in seawater.

(28 pages, 25 figures, 1 table, 19 references, original in: Croatian)

Keywords: solar radiation, time of exposure, marine environment, *Echerichia coli*, intestinal enterococci, T90

Supervisor: Mladen Šolić, PhD / Assistant Professor

Co-supervisor: Slaven Jozić, PhD / Senior scientific associate

Reviewers:

1. Mladen Šolić, PhD / Assistant Professor
2. Slaven Jozić, PhD / Senior scientific associate
3. Frano Matić, PhD / Assistant Proffesor

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Indikatori (pokazatelji) mikrobiološke kakvoće mora za kupanje.....	1
1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	2
1.1.2. Crijevni enterokoki.....	3
1.2. Vrijeme zadržavanja indikatora u morskom okolišu	5
1.3. Dosadašnja istraživanja	6
1.4. Svrha i ciljevi rada	7
2. MATERIJALI I METODE	8
2.1. Terenska istraživanja i uzorkovanje.....	8
2.2. <i>In situ</i> eksperimenti	9
2.3. Mikrobiološke analize	11
2.4. Obrada podataka.....	12
3. REZULTATI.....	13
3.1. Terenska istraživanja	13
3.2. <i>In situ</i> eksperimenti.....	14
4. RASPRAVA.....	22
5. ZAKLJUČCI.....	26
6. LITERATURA.....	27

1. UVOD

Mikrobiološka kakvoća obalnih voda je tema od javnog interesa i odražava se na aktivnosti koje se provode u obalnim i prijelaznim područjima, kao što su akvakultura, ribarstvo, turizam, itd. Antropogeni utjecaj na obalne okoliše je funkcija ljudske gustoće duž obala, pretpostavljajući različite aspekte, kao što su eutrofikacija, širenje otpadnih voda ili organsko onečišćenje. Unosi onečišćujućih tvari uzrokuju pogoršanje kvalitete vode, što dovodi do ograničenja njihove rekreacijske i proizvodne uporabe te uključuje ozbiljne rizike za ljudsko zdravlje. Rizik od zaraze bolestima koje se prenose vodom strogo ovisi o razini fekalnog onečišćenja vodenog okoliša.

1.1. Indikatori (pokazatelji) mikrobiološke kakvoće mora za kupanje

Mikroorganizmi probavnog trakta ljudi i toplokrvnih životinja različitim putovima mogu dospjeti u morski okoliš. Najčešći izvor ovih, za morski okoliš alohtonih mikroorganizama, su nepročišćene ili nedovoljno pročišćene otpadne vode. Poseban problem predstavljaju zastarjeli kanalizacijski sustavi koji ne udovoljavaju suvremenim zahtjevima, pa su njihovi krajnji ispusti najčešće smješteni uz samu obalu, neposredno blizu plaža (Jozić, 2012). Osim nepatogenih mikroorganizama, otpadne vode mogu sadržavati i znatne količine i širok spektar patogenih mikroorganizama, koji mogu predstavljati izravan rizik za zdravlje ljudi koji koriste more za kupanje i rekreaciju, uzrokujući vrlo ozbiljna oboljenja, poput gastrointestinalnih i kožnih infekcija.

Zbog velikog broja različitih patogenih mikroorganizama koji mogu dospjeti u more te dugotrajnih i složenih postupaka njihovog određivanja, postupak ocjene mikrobiološke ispravnosti morske vode praćenjem svakog od njih bio bi skup, dugotrajan i složen. Potraga za brzim analitičkim metodama za određivanje bakterijskih patogena u morskoj vodi ima za cilj prevladavanje ograničenja konvencionalnih metoda kulture u smislu dugog vremena analize i odgovora, što otežava njihovu primjenu u praćenju okoliša. Zato se određivanje mikrobiološke kakvoće vode za kupanje svelo na praćenje tzv. indikatorskih mikroorganizama (pokazatelja). Sam odabir indikatorskih mikroorganizama mora se temeljiti na određenim znanstvenim razumijevanjima i pouzdanim istraživanjima. Od indikatora se traži da udovoljavaju određenim kriterijima, kao što su prisutnost u vodi kada i patogeni mikroorganizmi, brojnost im mora biti veća od brojnosti patogenih mikroorganizama, da u vodi nisu autohtoni ili da su vrlo rijetki, da

se ne razmnožavaju u vodenom okolišu, da posjeduju određenu otpornost na djelovanje različitih okolišnih čimbenika kao i sami patogeni, brojnost bi im trebala biti u korelaciji sa stupnjem onečišćenja te da je njihova identifikacija, izolacija i određivanje brojnosti jednostavna i rutinska (Menon, 2000).

Od uvođenja indikatorskih mikroorganizama pa do danas, različiti mikroorganizmi su bili korišteni za određivanje mikrobiološke ispravnosti vode za kupanje. Danas se u Europskoj uniji, ali i u većem dijelu svijeta koriste *Escherichia coli* (*E. coli*) i crijevni enterokoki.

1.1.1. *Escherichia coli*

E. coli je gram-negativna štapićasta bakterija iz obitelji Enterobacteriaceae koja prirodno obitava u donjem dijelu gastrointestinalnog trakta toplokrvnih organizama, uključujući ljude i toplokrvne životinje (Slika 1). Prvi ju je izolirao Theodor Escherich iz uzorka ljudske stolice 1886. Među prvim je bakterijama koje koloniziraju crijevni trakt dojenčadi te uspostavlja stabilnu populaciju od otprilike 10^8 CFU/g izmeta do odrasle dobi (Tenaillon i sur., 2010).

E. coli optimalno raste pri temperaturi od 37°C u aerobnim uvjetima, iako je fakultativni anaerob i stoga može rasti u anaerobnim uvjetima. *E. coli* je relativno otporna bakterija i može preživjeti pri temperaturama od 4°C tijekom duljeg vremenskog razdoblja (do 3 mjeseca) na krutom mediju. Iako može rasti u širokom pH rasponu, tipičan rast i održavanje *E. coli* odvija se pri neutralnom pH od 7,0.

E. coli je prepoznata kao glavni bakterijski indikator fekalne kontaminacije za praćenje higijensko-sanitarne kakvoće obalne morske vode za rekreacijsku uporabu (Erdberg i sur., 2000., Lebaron i sur., 2005).

Iako je većina sojeva *E. coli* bezopasna i igra korisnu ulogu u održavanju ravnoteže crijevne mikroflore, postoje i određeni sojevi koji mogu izazvati različite bolesti, od blagih gastrointestinalnih tegoba do ozbiljnih infekcija (Blount i sur., 2012). Najčešći uzročnici teških trovanja i infekcija kod ljudi su:

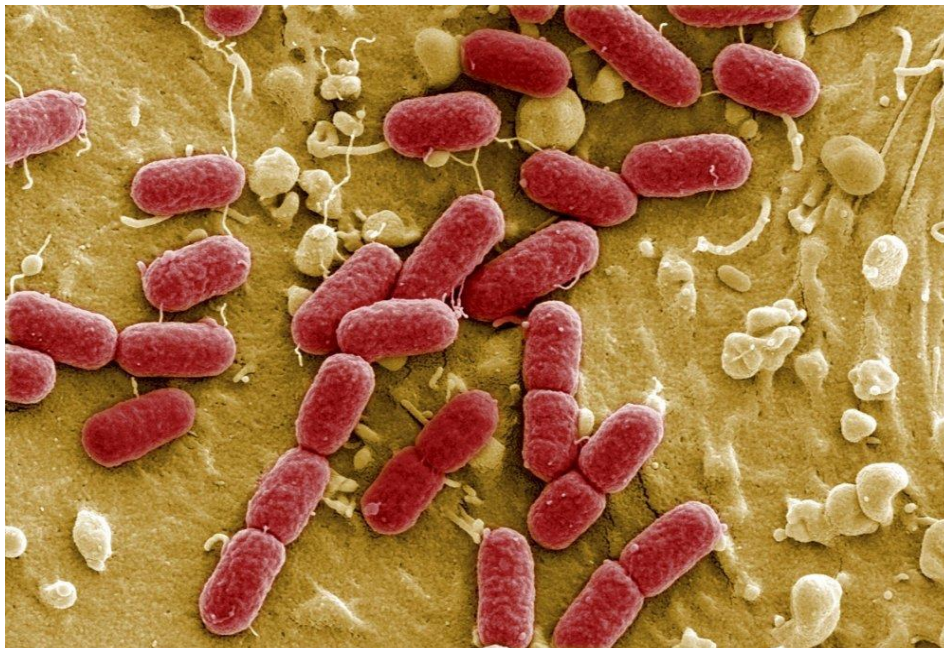
- Enterotoksigena *E. coli* (ETEC) - uzrokuje dječju i putničku dijareju u zemljama u razvoju
- Enteroinvazivna *E. coli* (EIEC) - uzrokuje dijareju sličnu dizenteriji
- Enterohemoragična *E. coli* (EHEC) - uzrokuje hemoragični kolitis i krvave dijereje koje se mogu razviti u hemolitički uremički sindrom

- Enteropatogena *E. coli* (EPEC) - uzrokuje dječju dijareju (često krvavu) u zemljama u razvoju
- Enteroagregativna *E. coli* (EAEC) - uzrokuje dječju dijareju (Todar, 2012).



Slika 1. *Escherichia coli* snimljena elektronskim mikroskopom

Izvor: <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/26315/Escherichia-coli.html>



1.1.2. Crijevni enterokoki

Rod enterokoki su fakultativno anaerobni koki. Oni su Gram-pozitivni, nesporulirajući mikroorganizmi koji nastanjuju mikrofloru donjeg dijela probavnog trakta kod ljudi i toplokrvnih životinja. Nalazimo ih u parovima ili kraćim lancima u kojima su izduženog, odnosno jajolikog oblika u smjeru samog lanca (Slika 2). Optimalno rastu pri temperaturi od 35°C, hidroliziraju eskulin u prisutnosti 40% žučnih soli i negativni su na katalazu. Sposobnost enterokoka da rastu u prisutnosti soli (6,5% NaCl) jedno je od razlikovnih obilježja roda.

Stanice enterokoka su promjera 0,5-1 µm. U ljudskom su fecesu zastupljeni za red veličine manje u odnosu na *E. coli*, dok je kod životinja obrnuto, odnosno zastupljenost je za red veličine viša (Sinton i sur., 1993.). Tek od 1984. enterokokne vrste su smatrane genetski različitim od roda *Streptococcus* i dodijeljen im je vlastiti rod (Schleifer i Kilper-Bälz, 1984). Dvije najzastupljenije vrste u probavnom traktu kod ljudi su *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*.



Slika 2. Enterokoki (*Enterococcus faecalis*) kulture snimljene elektronskim mikroskopom

Izvor: Birmiss.com

Smatra ih se oportunističkim patogenima koji kao takvi mogu uzrokovati različita ozbiljna oboljenja opasna po ljude, kao što su infekcije urinarnog trakta, diverkultitis, meningitis te bakterijski endokarditis. Neki enterokoki imaju jako visok stupanj rezistencije, odnosno otpornosti na glikopeptidne antibiotike te su kao takvi uzročnici mnogih bolničkih infekcija kod

hospitaliziranih pacijenata, što s medicinskog stajališta predstavlja problem od velike važnosti (Fisher i Phillips, 2009). Zbog rastuće zabrinutosti vezane uz otpornost na antibiotike i njihovu ulogu u izazivanju infekcija, istraživanja o crijevnim enterokokima postala su ključna u suvremenoj medicini. Ova istraživanja nastoje bolje razumjeti epidemiologiju, genetiku, mehanizme rezistencije i mogućnosti liječenja povezane s ovom skupinom bakterija.

1.2. Vrijeme zadržavanja indikatora u morskom okolišu

Oba indikatora, *E. coli* i crijevni enterokoki, dobro udovoljavaju svim kriterijima za izbor indikatorskih mikroorganizama, a koji bi bio bolji indikator očituje se u stupnju otpornosti na okolišne čimbenike. Brojnost indikatorskih mikroorganizama u morskoj vodi u izravnoj je vezi s količinom njihovog unosa i vremenom zadržavanja u morskom okolišu. Nepovoljan učinak morskog okoliša na navedene mikroorganizme očituje se u negativnom djelovanju abiotičkih čimbenika kao što su temperatura, salinitet, Sunčevo zračenje, pH vrijednost, osmotski tlak, te biotičkih kao što su dostupnost hranjiva, predacija i mnogi drugi (Jozić, 2012). S obzirom na sam utjecaj zajedničkog djelovanja navedenih čimbenika broj indikatorskih mikroorganizama se zapravo znatno smanji i prije nego dođe do mjesta namijenjenih za kupanje. Što je veća brojnost indikatorskih mikroorganizama veća je i mogućnost prisutnosti patogenih mikroorganizama, što znači i veći rizik za zdravlje ljudi. Velika većina dosadašnjih istraživanja o vremenu zadržavanja indikatorskih mikroorganizama u morskom okolišu i njihovom akumuliranju u određenim morskim organizmima provođena je na fekalnim koliformima i fekalnim streptokokima, prijašnjim indikatorskim skupinama bakterija. Međutim, u većini istraživanja zapravo nije bio poznat sastav populacije mikroorganizama, pa se stoga dovodi u pitanje mogu li se dobiveni podatci zapravo primijeniti na nove indikatorske mikroorganizme. Sam nedostatak potrebnih podataka ostavio je dovoljno prostora za nova istraživanja.

Različiti sojevi bakterije *E.coli* bili su predmet brojnih studija koje su se bavile njihovim preživljavanjem i adaptacijama vezanim za somatske, metaboličke i genetičke modifikacije nakon njihovog dolaska u morski okoliš. Papapetropoulou i sur. (1994) proučavali su strukturne i metaboličke promjene kod 13 sojeva *E. coli*, tijekom različitih razdoblja starvacije u morskoj vodi. Zaključili su da je starvacija bila popraćena različitim promjenama u stanici, kao što su modifikacija enzimatske aktivnosti, izmjene u sintezi proteina, gubitak nekih čimbenika koji doprinose virulentnosti te promjene u osjetljivosti na različite čimbenike. Neka istraživanja

pokazala su da se određeni sojevi *E. coli* mogu u određenoj mjeri prilagoditi na morske uvjete te na taj način produžiti vrijeme preživljavanja.

U drugim je studijama utvrđeno da je preživljavanje *E. coli*, ali i drugih enterobakterija kao što su *Salmonella paratyphi* B, *Shigella dysenteriae* i *Klebsiella pneumoniae*, jednim dijelom ovisilo o situaciji koja je prethodila njihovom dolasku u more; na primjer, preživljavanje je jako ovisilo o mogućnosti stanice da kompezira osmotski šok (Gauthier, 1992). Gauthier (1992) je istražujući *E. coli* opisao gene odgovorne za unutarstaničnu sintezu organskih osmolita, ili za njihovo uzimanje iz okoliša. Takvo je uzimanje i transport osmolita kod *E. coli* bilo vrlo učinkovito u morskim sedimentima gdje su prisutne značajne količine organske tvari. Dakle, može se zaključiti da je preživljavanje enterobakterija u morskom okolišu jednim dijelom rezultat njihovog posjedovanja ili mogućnosti izražavanja određenog broja gena koji izravno sudjeluju u održavanju homeostaze u uvjetima visokog osmotskog tlaka. S tim u vezi, postojanje hranjivih organskih supstrata igra značajnu ulogu (Krstulović i Šolić, 2016.).

Nepovoljan učinak morskog okoliša na indikatorske mikroorganizme očituje se u negativnom djelovanju abiotičkih čimbenika od kojih su najvažniji temperatura, slanost i Sunčevo zračenje (Šolić i Krstulović, 1993; Sinton i sur., 1994; Jozić, 2012). Pojedinačno i zajedničko djelovanje pojedinih čimbenika, značajno utječe na vrijeme zadržavanja (preživljavanja) indikatorskih mikroorganizama u morskom okolišu. Za izražavanje jakosti inaktivacije koja je u obrnutom razmjeru s dužinom preživljavanja bakterijskih stanica koristi se pokazatelj T_{90} -vrijeme potrebno za 90% smanjenje početnog broja bakterija. Većina istraživanja je pokazala da je vrijeme preživljavanja indikatorskih bakterija u negativnoj korelaciji sa temperaturom i slanošću morske vode te sa jakošću Sunčevog zračenja i da iznosi od nekoliko sati do nekoliko dana. Utvrđeno je i da su crijevni enterokoki otporniji i znatno duže preživljavaju od *E. coli*, pri čemu važnu ulogu imaju oblik, veličina i građa stanice (Jozic, 2012).

1.3. Dosadašnja istraživanja

Omjer brojnosti *E. coli* i crijevnih enterokoka u primarnom izvoru onečišćenja može se značajno razlikovati, ovisno o podrijetlu onečišćujućeg materijala. U ljudskom fecesu, brojnost fekalni koliforma, od kojih većinu čini *E. coli*, znatno nadmašuje brojnost fekalnih streptokoka, među kojima dominiraju crijevni enterokoki, čineći omjer FK/FS >4 (Geldreich i Kenner, 1969). U životinjskom fecesu dominiraju streptokoki čineći omjer FK:FS <0,7 (Kjellander,

1960; Raibaud i sur., 1961). Teoretski se prema ovom omjeru može odrediti je li onečišćenje ljudskog ili životinjskog podrijetla. Ako je omjer *E. coli* i crijevnih enterokoka veći od 4, radi se o fekalnoj kontaminaciji ljudskog podrijetla, a kada je omjer manji od 0,7, u pitanju je kontaminacija životinjskog podrijetla (Villacampa i sur., 2017). Međutim, ovaj način određivanja podrijetla onečišćenja može se primijeniti samo kod svježeg onečišćenja i vrlo kratko nakon dospijevanja onečišćenja u more. Naime, zbog različite otpornosti dvaju indikatora na okolišne čimbenike, a time i različitog vremena njihovog preživljavanja, njihov omjer se stalno mijenja, uglavnom u korist otpornijeg indikatora, ako nema dodatnog dotoka onečišćenja.

Bitan čimbenik za omjer indikatora je Sunčeva svjetlost, kao najjači čimbenik koji reducira bakterije u gornjim slojevima mora, ako je prozirnost zadovoljavajuća. Što je voda prozirnija oba indikatora brže ugibaju, a *E. coli* znatno brže od crijevnih enterokoka. Na području sjevernog Mediterana omjer navedenih bakterija iznosio je 1,2, a na području Kantabrijskog mora (visok raspon plime i oseke) 2,2 (Villacampa i sur., 2017). Na području Mediterana veći je utjecaj Sunčeve svjetlosti te znatno toplije more, čija temperatura ljeti doseže i do 30 °C a zimi ne pada ispod 15 °C. Tu je znatno brža redukcija *E. coli* nego na području Kantaribijskog mora gdje ja manja insolacija, a morska voda zadržava umjerenu temperaturu tijekom cijele godine (temperatura površine je 11°C stupnjeva zimi, a do 22 °C ljeti). Značajan utjecaj na omjer imaju i urbanizacija te tip sedimenta. Pjeskovite plaže jako pogoduju bakterijama, jer suspendirani pijesak blokira UV zračenje i inaktivaciju bakterija. Omjer je niži kod prirodnih plaža nego kod onih urbaniziranih. Kod prirodnih plaža veća je smrtnost bakterija, jer je veća prozirnost, čišća voda te je miješanje sedimenta manje u odnosu na urbane plaže s većim udjelom kupaca. Dostupnost urbanih plaža privlači jako velik broj kupaca u sezoni kupanja, a oni sa sobom nose i onečišćenje (Ariza i sur., 2010).

1.4.Svrha i ciljevi rada

Cilj rada je istražiti utjecaj vremena izloženosti morskom okolišu na promjenu omjera bakterija *E.coli* i crijevnih enterokoka u moru za kupanje, što je u najvećoj mjeri ovisi o razlici u preživljavanjem istih u morskom okolišu.

Rezultati istraživanja bit će od iznimne važnosti za razumijevanje dinamike promjene omjera dvaju indikatora, što je važno pri određivanju kriterija za standarde kakvoće mora za kupanje. Ispitivanja su obavljena na Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Terenska istraživanja i uzorkovanje

Terenska istraživanja obavljena su na plaži Gojača, najistočnijoj kaštelanskoj plaži. Plaža je relativno zatvorena i zaštićena od dominantnog sezonskog vjetra (maestrala), a u centralnom dijelu plaže more je vrlo plitko. Uzorkovanje je obavljano na dvije točke, VK1-1 i VK1-3 (Slika 3). Utvrđena su dva izvora onečišćenja, potok i kanalizacijski ispust (tzv. tumbin) koji donosi neusporedivo veće količine onečišćene vode od potoka .

Tijekom sezona kupanja (od kraja svibnja do kraja rujna) 2022., uzorci morske vode uzimani su 2-3 puta tjedno u jutarnjim i popodnevnim satima. Uzorci morske vode prikupljeni su standardnim postupkom, 30 centimetara ispod površine, i transportirani u laboratorij u prijenosnim hladnjacima. Svi uzorci obrađeni su isti dan, unutar 2-3 sata od uzorkovanja.



Slika 3. Područje istraživanja – plaža Gojača sa dvije kontrolne točke

2.2. *In situ* eksperimenti

In situ eksperimenti obavljani su u moru ispred Instituta za oceanografiju i ribarstvo. Uzorci onečišćene vode za eksperimente prikupljeni su iz potoka koji se ulijeva neposredno uz plažu Gojača. Brojnost indikatorskih bakterija određivana je neposredno nakon svakog uzorkovanja. Sutradan ujutro, nakon očitavanja broja indikatorskih bakterija, morska voda za eksperimente pripremana je na način da je u čistu morsku vodu dodavana željena količina onečišćene potočne vode, kako bi ciljana koncentracija *E. coli* u količini morske vode koja je uzimana za analizu (30 mL) bila otprilike 100 CFU. Salinitet mora nakon dodavanja onečišćene slatke vode namještan je na 35,0, dodavanjem NaCl. Nakon homogenizacije, onečišćena morska voda prebacivana je u staklene boce volumena 1L. Boce su obložene metalnom mrežicom, za lakše vješanje i rukovanje u moru (Slika 4).



Slika 4. Staklena boca za eksperimente omotana metalnom mrežom

Tri boce (replike) su pomoću metalne konstrukcije i konopa vješane u more na dubinu od 1.5 m, a tri boce na dubinu od 0.3 m (Slika 5). Tri dodatne boce (kontrola) čuvane su u mraku, u prostoriji temperiranoj na temperaturu mora. Uzorci morske vode iz svih boca uzeti su i analizirani neposredno prije stavljanja u more, odnosno stavljanja na čuvanje u mraku. Uzorci morske vode iz boca obješenih u more uzimani su i analizirani svakih 0.5-1 h tijekom četiri sata, dok su uzorci morske vode iz boca čuvanih u mraku uzimani nakon 24 i 48 sati.

Jakost Sunčevog zračenja kontinuirano je mjerena tijekom cijelog eksperimenta. Mjerenje je obavljano meteorološkom stanicom Davis vantage pro 2, smještenom u neposrednoj blizini mjesta provođenja eksperimenata.



Slika 5. Konstrukcija za držanje boca u moru

2.3. Mikrobiološke analize

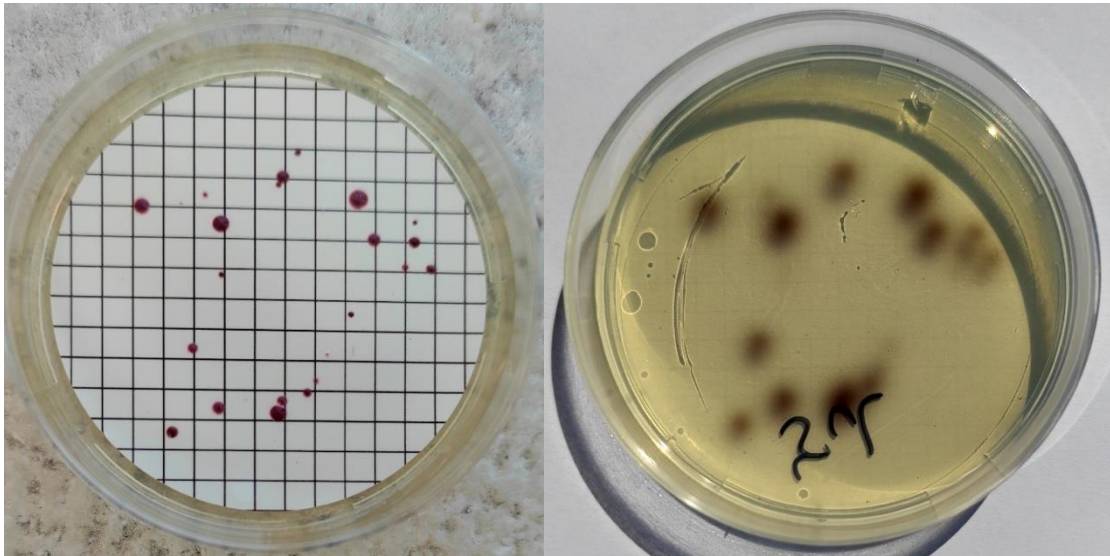
Obje indikatorske bakterije određivane su metodom membranske filtracije. *E. coli* je određivana koristeći temperaturno modificiranu metodu ISO 9308-1:2014 (Jozić i sur, 2018). Kromogeni koliformni agar (CCA) inkubiran je 4 sata pri temperaturi 36 ± 2 °C, a zatim 20 sati pri $44 \pm 0,5$ °C. Sve tamnoplave do ljubičaste kolonije (β -D-galaktozidaza i β -D-glukuronidaza pozitivne) brojane su kao potvrđena *E. coli* (Slika 6).



Slika 6. Kolonije *E.coli* na CCA

Za određivanje crijevnih enterokoka korištena je standardna metoda ISO 7899-2:2000. Nakon inkubacije na Slanetz & Bartley agaru pri temperaturi 36 °C \pm 2 °C tijekom 44 ± 4 sata

(Slika 7), uslijedio je potvrdni test, inkubacija na prethodno zagrijanom (44 °C) Bile aesculin azide agaru pri temperaturi $44 \pm 0,5$ °C tijekom 2 sata. Sve ružičaste, crvene ili smeđe kolonije koje su u potvrdnom testu razvile smeđi ili crni halo brojene su kao potvrđeni crijevni enterokoki (Slika 7).



Slika 7. Crijevni enterokoki na Slanetz & Bartley agaru (lijevo) i na Bile aesculin azide agaru (desno)

2.4.Obrada podataka

Za obradu podataka i grafički prikaz rezultata korišteni su Microsoft Excel i Statistica 13 (Stat. Soft. Inc., Tulsa, SAD). U svim provedenim eksperimentima smanjenje broja bakterija je odgovaralo eksponencijalnom modelu $N_t = N_0 e^{kt}$, gdje je N_0 početni broj bakterija, a N_t broj bakterija u vremenu uzorkovanja (t). Logaritmiranjem rezultata prirodnim logaritmom dobiveni su linearni pravci matematičkog oblika $\ln(N_t) = \ln(N_0) + kt$ iz kojih je izračunavan koeficijent regresije (k), te potom T_{90} prema jednadžbi:

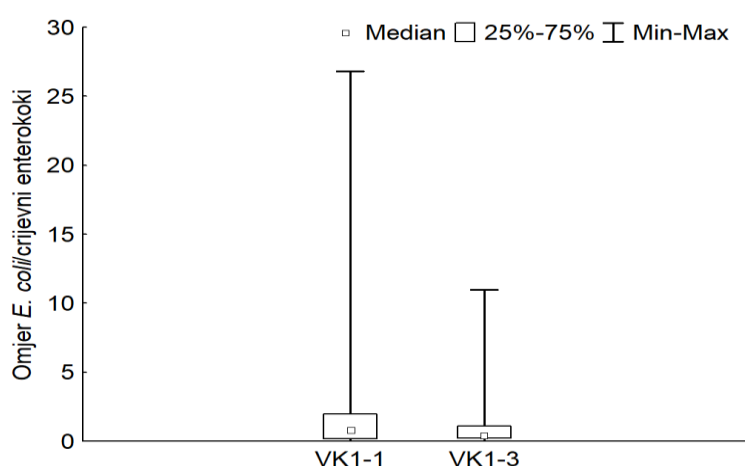
$$T_{90(h)} = -\ln(0.1)/k$$

3. REZULTATI

3.1. Terenska istraživanja

U sezoni kupanja 2022., na točkama VK1-1 i VK1-3 prikupljeno je ukupno 86 uzoraka po točki. Od 42 dana u kojima je obavljano uzorkovanje, tijekom 9 dana prikupljen je po jedan uzorak (ujutro), tijekom 27 dana po 2 uzorka (ujutro i popodne) i tijekom 6 dana po 3 uzorka (ujutro, prijepodne i popodne) po točki. Nakon prikupljanja rezultata koncentracija indikatora za cijelu sezonu, iz izračuna omjera *E.coli*/crijevni enterokoki uklonjeni su rezultata u kojima je koncentracija barem jednog od indikatora iznosila 0 CFU/100 mL, ukupno 7 rezultata za VK1-1 i 3 rezultata za VK1-3. Nakon izračuna omjera *E.coli*/crijevni enterokoki za preostale rezultate, testirana je razdioba podataka (omjera). S obzirom da izračunati omjeri nisu pokazali normalnu razdiobu, za sve ostale izračune korištena je neparametrijska statistika.

Medijani omjera *E.coli*/crijevni enterokoki za točke VK1-1 i VK1-3 prikazani su na slici 8, dok je u tablici 1 prikazana deskriptivna statistika za omjere na obje točke.



Slika 8. Omjer *E.coli*/crijevni enterokoki za točke VK1-1 i VK1-3 (medijan, raspon minimum-maksimum i interkvartilni raspon)

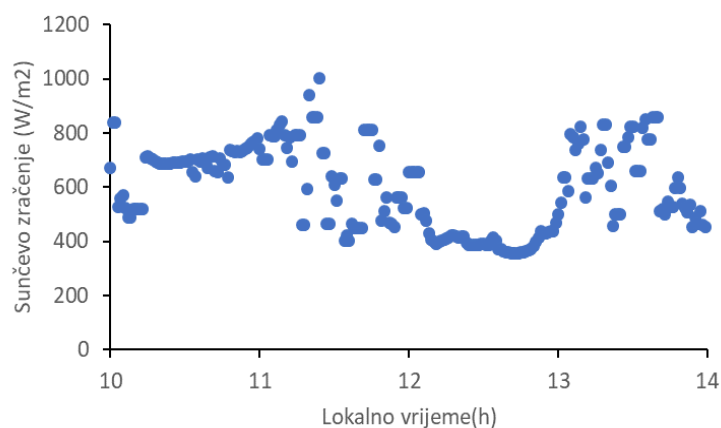
Medijan omjera *E.coli*/crijevni enterokoki na točki VK1-1 iznosio je 0,82, dok je na točki VK1-3 iznosio 0,4. Veliki raspon između najviše i najniže zabilježene vrijednosti ukazuju na velike varijacije unutar rezultata, osobito na točki VK1-1.

Tablica 1. Deskriptivna statistika za *E.coli*/crijevni enterokoki omjere za točke VK1-1 i VK1-3

	Arit. sredina	Medijan	Min.	Max.	25. perc.	75. perc.	St.dev.	Varijanca
VK1-1	1,69	0,82	0,009	26,8	0,193	1,98	3,38	11,42
VK1-3	0,96	0,40	0,01	11,0	0,2	1,08	1,63	2,65

3.2. *In situ* eksperimenti

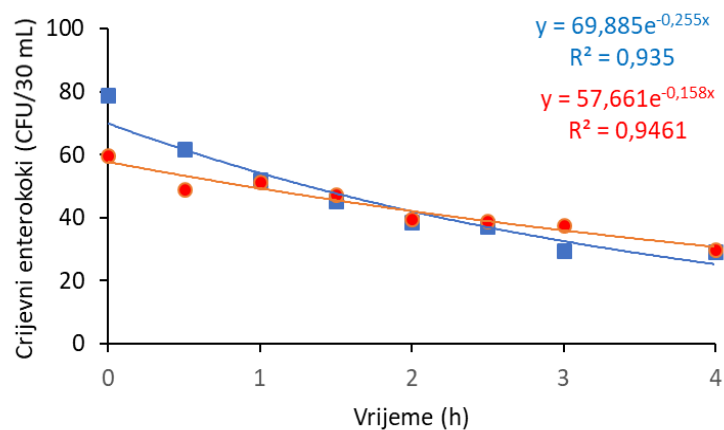
Obavljena su ukupno 3 *in situ* eksperimenta. Prvi eksperiment obavljen je 14.06.2023. godine, a trajao je od 10:00 do 14:00 sati. Zbog povremene lagane naoblake, dozračena Sunčeva energija je bila promjenljiva, s prosječnom vrijednošću od 598 Wm^{-2} (Slika 9).



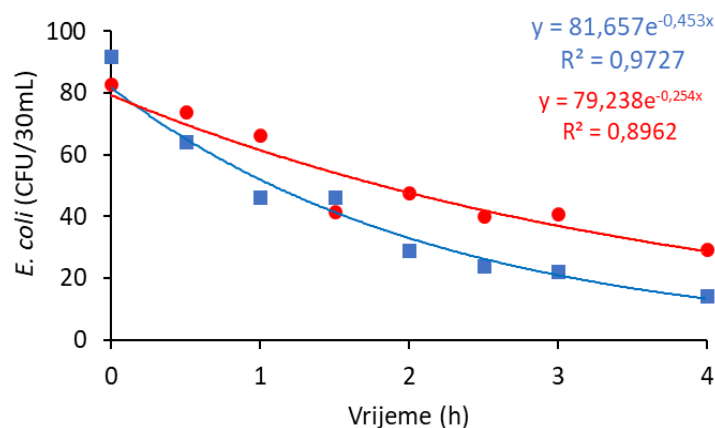
Slika 9. Jakost Sunčevog zračenja tijekom prvog eksperimenta

Početne vrijednosti crijevnih enterokoka i *E. coli* bile su oko 80 CFU/30 mL i opadale su tijekom eksperimenta (Slike 10 i 11). Trend opadanja broja crijevnih enterokoka i *E.coli* bio je eksponencijalnog oblika, i bio je brži u bocama smještenim na površinu morskog stupca (30

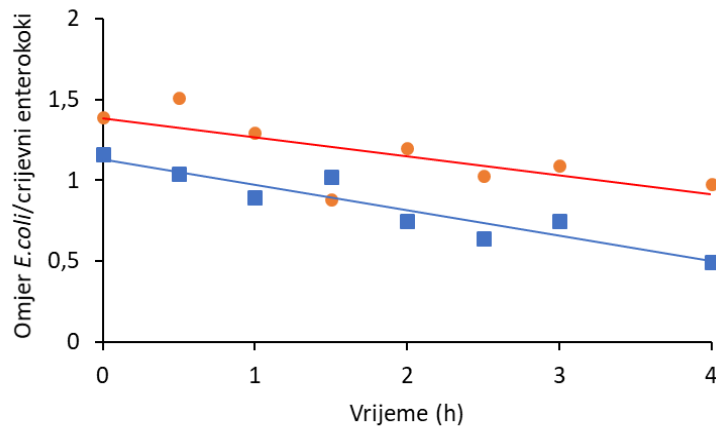
cm) nego u bocama postavljenim na dubinu od 1,5 m. T_{90} crijevnih enterokoka u površinskom sloju iznosio je 9 sati dok je na 1.5 m dubine iznosio 14,6 sati. Broj *E. coli* smanjivao se brže i T_{90} je iznosio 5 sati na površini, odnosno 9 sati na 1.5 m dubine. U kontrolnim uzorcima, u odsutnosti Sunčevog zračenja, broj *E.coli* se u 24 sata smanjio za 42 a crijevnih enterokoka za 18 %, odnosno 64 i 23% tijekom 48 sati. Omjer *E.coli*/crijevni enterokoki linearno se smanjivao, kako u morskoj vodi u bocama izloženim Sunčevom zračenju tako i u onoj u kontrolnim bocama (Slike 12 i 13). U uzorcima morske vode u bocama smještenim na površini, omjer se tijekom eksperimenta smanjio s 1,16 na 0,49, dok se u uzorcima u bocama smještenim na 1,5 m smanjio s 1,39 na 0,97. U kontrolnim uzorcima, omjer se tijekom 48 sati smanjio s 1,14 na 0,53.



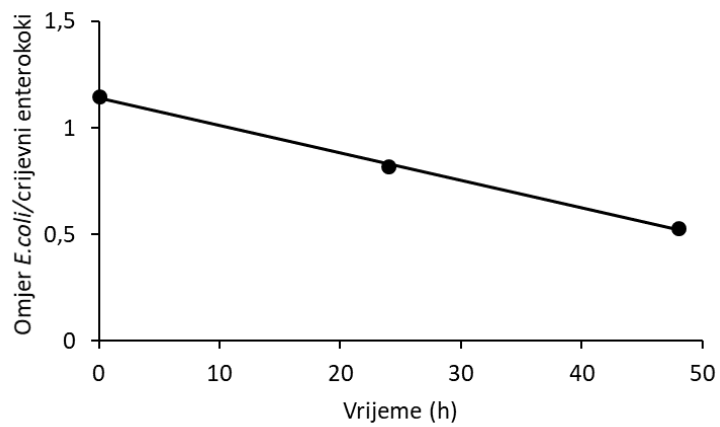
Slika 10. Promjena broja crijevnih enterokoka u prvom *in situ* eksperimentu pri Sunčevom svjetlu (crvena boja-1.5 m, plava boja-0,3 m)



Slika 11. Promjena broja *E. coli* u prvom *in situ* eksperimentu pri Sunčevom svjetlu
(crvena boja-1.5 m, plava boja-0,3 m)

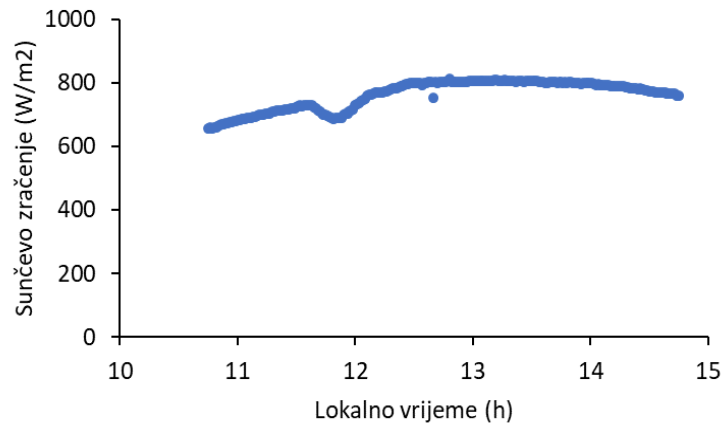


Slika 12. Promjena omjera *E.coli*/crijevni enterokoki tijekom prvog *in situ* eksperimenta pri izloženosti Sunčevom svjetlu (crvena boja-1.5 m, plava boja-0,3 m)



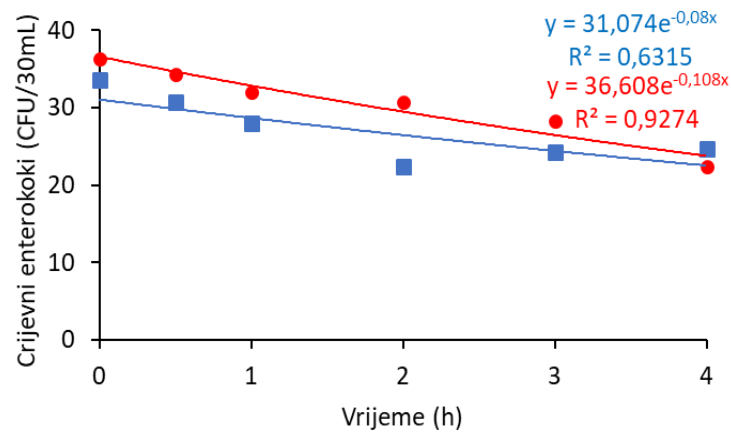
Slika 13. Promjena omjera *E.coli*/crijevni enterokoki tijekom prvog *in situ* eksperimenta u odsutnosti Sunčevog svjetla

Drugi eksperiment obavljen je 12.07.2023. godine, a trajao je od 10:45 do 14:45 sati. Iznos Sunčevog zračenja bio je stabilan (nije bilo pojave naoblake), s prosječnom vrijednošću od 762 Wm^{-2} (slika 14).



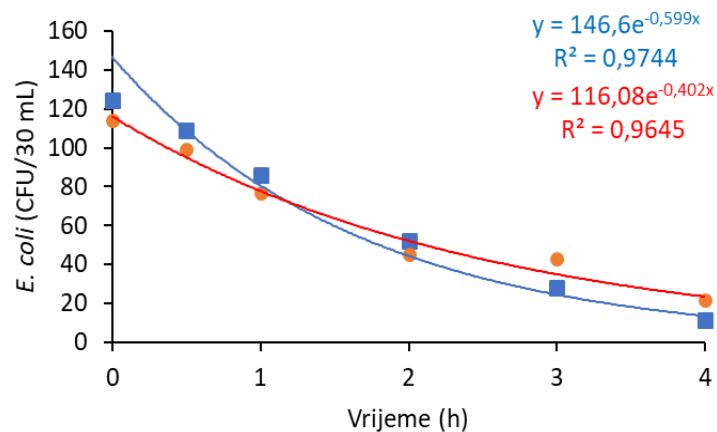
Slika 14. Iznos Sunčevog zračenja tijekom drugog eksperimenta

Početne vrijednosti crijevnih enterokoka i *E. coli* bile su oko 35 odnosno 130 CFU/30 mL i opadale su tijekom eksperimenta (Slike 15 i 16).

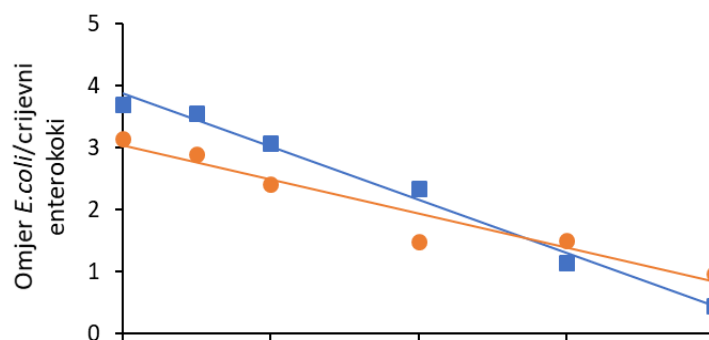


Slika 15. Promjena broja crijevnih enterokoka u drugom *in situ* eksperimentu pri Sunčevom svjetlu (crvena boja-1.5 m, plava boja-0,3 m)

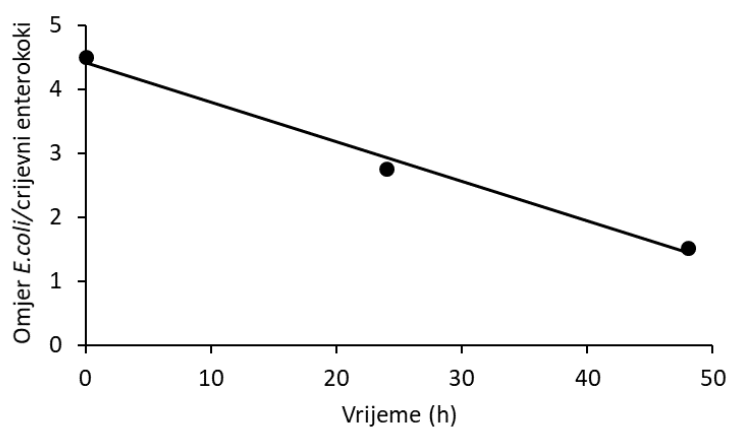
Trend opadanja broja crijevnih enterokoka i *E.coli* bio je eksponencijalnog oblika, i bio je brži u bocama smještenim na površinu morskog stupca (30 cm) nego u bocama postavljenim na dubinu od 1,5 m. T_{90} crijevnih enterokoka u površinskom sloju iznosio je 28,7 sati dok je na 1.5 m dubine iznosio 21,2 sata. Broj *E. coli* smanjivao se brže i T_{90} je iznosio 3,9 sati na površini, odnosno 5,7 sati na 1.5 m dubine. U kontrolnim uzorcima, u odsutnosti Sunčevog svjetla, broj *E. coli* se u 24 sata smanjio za 39 a crijevnih enterokoka za 0 %, odnosno 68 i 7% tijekom 48 sati. Omjer *E.coli*/crijevni enterokoki linearno se smanjivao, kako u morskoj vodi u bocama izloženim Sunčevom svjetlu tako i u onoj u kontrolnim bocama (Slike 17 i 18). U uzorcima morske vode u bocama smještenim na površini, omjer se tijekom eksperimenta smanjio s 3,69 na 0,44, dok se u uzorcima u bocama smještenim na 1,5 m smanjio s 3,14 na 0,95. U kontrolnim uzorcima, omjer se tijekom 48 sati smanjio s 4,5 na 1,5.



Slika 16. Promjena broja *E. coli* u drugom *in situ* eksperimentu pri Sunčevom svjetlu (crvena boja-1.5 m, plava boja-0,3 m)

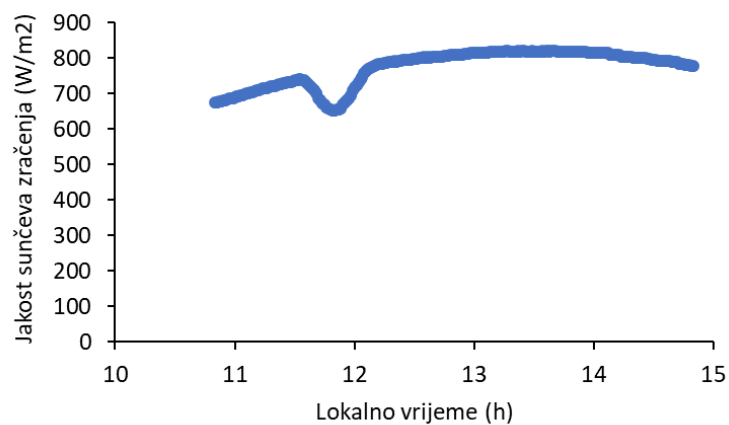


Slika 17. Promjena omjera *E.coli*/crijevni enterokoki tijekom drugog *in situ* eksperimenta pri izloženosti Sunčevom svjetlu (crvena boja-1.5 m, plava boja-0,3 m)



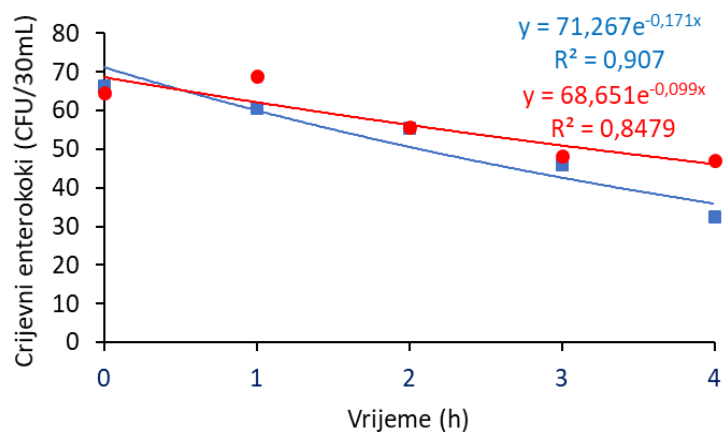
Slika 18. Promjena omjera *E.coli*/crijevni enterokoki tijekom drugog *in situ* eksperimenta u odsutnosti Sunčevog svjetla

Treći eksperiment obavljen je 18.07.2023. godine, a trajao je od 10:45 do 14:45 sati. Iznos Sunčevog zračenja bio je stabilan (nije bilo pojave naoblake), s prosječnom vrijednošću od 773 Wm^{-2} (Slika 19).

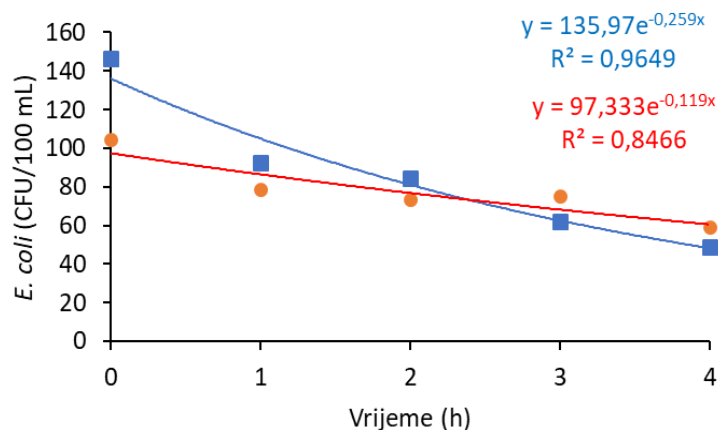


Slika 19. Iznos Sunčevog zračenja tijekom trećeg eksperimenta

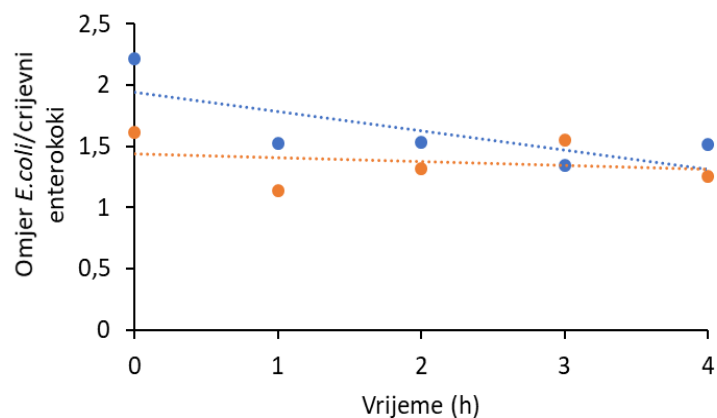
Početne vrijednosti crijevnih enterokoka i *E. coli* bile su oko 65 odnosno 140 (100) CFU/30 mL i opadale su tijekom eksperimenta (Slike 20 i 21). Trend opadanja broja crijevnih enterokoka i *E.coli* bio je eksponencijalnog oblika, i bio je brži u bocama smještenim na površinu morskog stupca (30 cm) nego u bocama postavljenim na dubinu od 1,5 m. T_{90} crijevnih enterokoka u površinskom sloju iznosio je 13,5 sati dok je na 1.5 m dubine iznosio 23,3 sata. Broj *E. coli* smanjivao se brže i T_{90} je iznosio 8,9 sati na površini, odnosno 19,3 sata na 1.5 m dubine. U kontrolnim uzorcima, u odsutnosti Sunčevog svjetla, broj *E. coli* se u 24 sata smanjio za 11 a crijevnih enterokoka za 23 %, odnosno 48 i 28% tijekom 48 sati. Omjer *E.coli*/crijevni enterokoki nepravilno se mijenjao, kako u morskoj vodi u bocama izloženim Sunčevom svjetlu tako i u onoj u kontrolnim bocama (Slike 22 i 23). U uzorcima morske vode u bocama smještenim na površini, omjer se tijekom eksperimenta smanjio s 2,21 na 1,51, dok se u uzorcima u bocama smještenim na 1,5 m smanjio s 1,61 na 1,25. U kontrolnim uzorcima, omjer se tijekom 48 sati smanjio s 2,6 na 1,9.



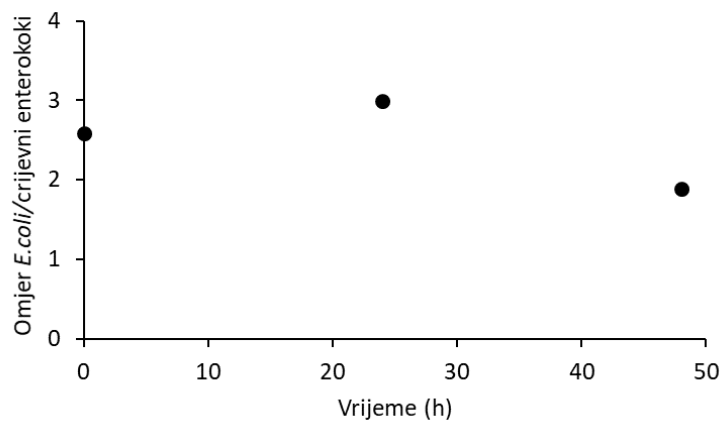
Slika 20. Promjena broja crijevnih enterokoka u trećem *in situ* eksperimentu pri Sunčevom svjetlu (crvena boja-1.5 m, plava boja-0,3 m)



Slika 21. Promjena broja *E. coli* u trećem in situ eksperimentu pri Sunčevom svjetlu
(crvena boja-1.5 m, plava boja-0,3 m)



Slika 22. Promjena omjera *E.coli*/crijevni enterokoki tijekom trećeg in situ eksperimenta
pri izloženosti Sunčevom svjetlu (crvena boja-1.5 m, plava boja-0,3 m)



Slika 23. Promjena omjera *E.coli*/crijevni enterokoki tijekom drugog in situ eksperimenta
u odsutnosti Sunčevog svjetla

4. RASPRAVA

U ovom radu istraživana je utjecaj vremena izloženosti indikatorskih bakterija morskom okolišu na njihovo preživljavanje. Također je istraživana i promjenu omjera *E. coli*/crijevni enterokoki, kao rezultat različite stope ugibanja dvaju indikatorskih bakterija pri izloženosti utjecaju okolišnih čimbenika, osobito Sunčevom zračenju.

Rezultati terenskih istraživanja na plaži Gojača u Kaštel Sućurcu, na točkama označenim kao VK1-1 i VK1-3 (Slika 24) u sezoni kupanja 2022., pokazali su da je omjer *E. coli*/crijevni enterokoki manji na točki VK1-3 (Tablica 3). Najvjerojatniji razlog manjeg omjera, u odnosu na omjer na točki VK1-1, je veća udaljenost točke od utvrđenog izvora onečišćenja, nego što je udaljenost točke VK1-1. Kao rezultat veće udaljenosti od izvora onečišćenja, onečišćenju je potrebno više vremena da dosegne točku, a posljedično su indikatorske bakterije bile duže izložene utjecaju okolišnih čimbenika, osobito Sunčevom zračenju. U konačnici, broj *E. coli* se smanjio značajnije nego broj crijevnih enterokoka, što za posljedicu ima značajnije smanjenje omjera *E. coli*/crijevni enterokoki u odnosu na točku VK1-1. Zabilježene su velike varijacije unutar omjera *E. coli*/crijevni enterokoki. Na to ukazuje veliki raspon između najviše i najniže zabilježene vrijednosti, osobito na točki VK1-1 na kojoj je medijan omjera *E. coli*/crijevni enterokoki iznosio 0,82, dok je na VK1-3 iznosio 0,4. Navedena velika varijabilnost se može objasniti položajem točaka mjerenja u odnosu na izvor onečišćenja. Naime, dnevni vjetar iz zapadnih smjerova (maestral) nosi onečišćenje iz izvora onečišćenja prema istoku. Dio onečišćenja odmah dosegne točku VK1-1, a najveći dio površinskim strujama bude odnesen istočnije. Predvečer prestaje vjetar zapadnog smjera te se onečišćenje dominantnom cirkulacijom mora na istraživanom području (obrnuto od smjera kretanja kazaljke na satu), a osobito tijekom noći dodatno pokretano sjevernim-sjeveroistočnim vjetrom (burinom), vraća prema zapadu i dolazi do VK1-3. U tom je onečišćenju, zbog duge izloženosti utjecaju okolišnih čimbenika *E. coli* značajnije reducirana pa je omjer manji i manji su rasponi omjera, jer nema miješanja onečišćenja sa svježijim onečišćenjem. Veliki dio bakterija bude reduciran Sunčevim

zračenjem tijekom dana ili se rasprši pa se ponekad i ne vrati do plaže. Na točki VK1-1 se miješaju svježije onečišćenje iz izvora onečišćenja i onečišćenje koje se vrati, ali vjerojatno dominira svježije jer je intenzivnije s obzirom da se onečišćenje koje se vrati znatno reducira. Tu se stalno miješaju starije i novije onečišćenje, u kojima su omjeri manji odnosno veći, pa su i rasponi omjera veći i varijacije veće.

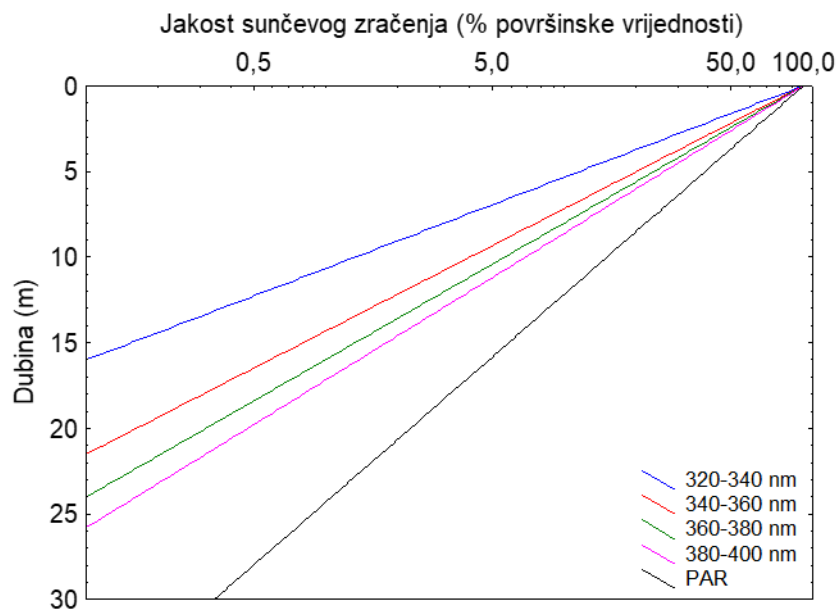
Inače su omjeri broja indikatora ali i varijacije omjera na točkama praćenja kakvoće mora za kupnje rezultat prirode onečišćenja. Ako se radi o kratkotrajnom, jednokratnom onečišćenju, omjeri se mijenjaju vremenom izloženosti morskom okolišu a varijacije su male. Međutim, ako je područje izloženo čestim onečišćenjima, dolazi do stalnog dotoka onečišćene vode u kojoj su brojnosti indikatorskih bakterija ali i njihovi omjeri različiti. Onečišćenje se također može dogoditi u različito doba dana pa su i bakterije izložene različitim utjecajima. Ako se onečišćenje dogodi tijekom noći, u odsutnosti Sunčevog svjetla promjena broja bakterija ovisit će o utjecaju drugih čimbenika kao što su slanost, temperatura, pH, predacija, itd., pa će i promjena omjera biti drugačija od one tijekom dana. Rezultat ovakve dinamike onečišćenja su i velike varijacije u omjerima broja indikatorskih bakterija.



Slika 24. Područje istraživanja – plaža Gojača sa dvije kontrolne točke uz zabilježen izvor onečišćenja

Rezultati obavjenijih eksperimenata potvrdili su utjecaj izloženosti indikatorskih bakterija Sunčevom zračenju na promjenu (smanjenje) omjera *E. coli*/crijevni enterokoki, ali i utjecaj jakosti Sunčevog zračenja na brzinu ugibanja indikatorskih bakterija. Samo kod prvog eksperimenta zabilježena je povremena lagana naoblaka, pa je iznos Sunčevog zračenja bio promjenjiv. Tijekom provođena ostala dva eksperimenta nije bilo pojave naoblake. Iako su indikatorske bakterije tijekom eksperimenata bile izložene negativnom utjecaju više okolišnih čimbenika, kao što su slanost, temperatura, pH i predacija, zbog neznatnog utjecaja navedenih čimbenika u odnosu na utjecaj Sunčevog zračenja (Jozić, 2012), isti nije niti razmatran.

Zbog veće jakost Sunčevog zračenja, na površini je ugibanje obaju indikatora bilo brže nego na dubini od 1,5 m. Inače, iznos Sunčevog zračenje značajno slabi s dubinom vodenog stupca. Slabljenje je obrnuto razmjerno valnoj duljini Sunčevog zračenja, što je u ranijim istraživanjima potvrđeno i na području provođenja eksperimenata (Slika 25).



Slika 25. Slabljenje prosječne jakosti dijela spektra sunčevog zračenja po dubini stupca mora (Jozić, 2012)

Zabilježeno je eksponencijalno smanjenje broja obaju indikatora, uobičajena funkcija promjene brojnosti indikatora izloženih utjecaju okolišnih čimbenika, što ukazuje na uspješno provođenje eksperimenata.

Rezultati T_{90} ukazuju i da su crijevni enterokoki otporniji na utjecaj Sunčevog zračenja nego *E. coli*, što je zabilježeno u većini dosadašnjih istraživanja (Sinton i sur., 1994). Osim toga, crijevni

enterokoki su otporniji i u odsutnosti Sunčevog svjetla, što potvrđuje promjena odnosa *E. coli*/crijevni enterokoki u kontrolnim eksperimentima provedenim u odsutnosti Sunčevog svjetla.

Omjeri *E. coli*/crijevni enterokoki su se mijenjali (smanjivali) vremenom izloženosti, a promjena je uglavnom linearna. Smanjenje omjera rezultat je bržeg ugibanja *E. coli*. Nagib pravca promjene omjera bio je veći u površinskom sloju, gdje je jakost Sunčevog zračenja bila veća, što ukazuje na činjenicu da povećanje jakosti Sunčevog zračenja više utječe na *E. coli* nego na crijevne enterokoke.

Eksperimenti su također pokazali da vrijeme ugibanja bakterija nije uvijek u korelaciji s jakošću Sunčevog svjetla. Za razliku od T_{90} , koji je dobar pokazatelj ugibanja bakterija u odsutnosti Sunčevog svjetla, S_{90} -iradijacija (energija Sunčevog zračenja) potrebna za 90 % smanjenje broja bakterija smatra se puno boljim pokazateljem za izražavanje inaktivacije indikatorskih bakterija koja je uzrokovana Sunčevim zračenjem u uvjetima njegove promjenjive jakosti, kakva je i inače u prirodi (Jozić, 2012). Sporije ugibanje obaju indikatora u eksperimentu tijekom kojeg je zabilježeno jače Sunčevo zračenje može se djelomično objasniti podrijetlom bakterijskih kultura. Naime, vjerojatno su kulture indikatora korištenih u tom eksperimentu bile otpornije. Moguće je da su bile manje izložene negativnim čimbenicima prije nego što su uzorci vode za eksperiment prikupljeni u potoku. Ranije je zabilježena različita otpornost sojeva istih mikroorganizama na utjecaj Sunčevog zračenja, ali i ostalih okolišnih čimbenika. Neka istraživanja su pokazala da su na Sunčevo zračenje otporniji sojevi koji u odsutnosti zračenja pokazuju manju otpornost na morski okoliš, što zapravo govori da navedeni mikroorganizmi vjerojatno nemaju jednako razvijene mehanizme zaštite od različitih abiotičkih čimbenika s kojima se susreću unutar morskog okoliša (Jozić 2012). U istraživanjima koje je proveo Jozić (2012), zabilježeno je značajno duže preživljavanje soja *E. coli* ATCC 8739, koji je u uvjetima bez sunčevog zračenja preživljavao značajno kraće od soja *E. coli* ATCC 35218.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu istraživana je utjecaj vremena izloženosti morskom okolišu na promjenu omjera broja bakterija *E. coli* i crijevnih enterokoka u moru za kupanje. Obavljena su terenska istraživanja i *in situ* eksperimenti.

Terenskim istraživanjima utvrđeno je da je omjer broja *E. coli* i crijevnih enterokoka manji na točki udaljenijoj od mjesta onečišćenja. To je rezultat značajnijeg smanjenja broja *E. coli* nego crijevnih enterokoka pod utjecajem negativnog djelovanja okolišnih čimbenika na putu onečišćenja od izvora do točke uzorkovanja za određivanje kakvoće mora za kupanje. Na točki bližoj izvoru onečišćenja zabilježen je veći omjer broja *E. coli* i crijevnih enterokoka ali i značajno veća kolebanja omjera, zbog miješanja morske vode koja sadržava starije i svježije onečišćenje.

Eksperimenti su pokazali eksponencijalno opadanje broja obaju indikatora tijekom vremena izloženosti Sunčevom zračenju. Zabilježeno je brže opadanje broja *E. coli*, što je rezultiralo stalnim smanjenjem omjera broja *E. coli* i crijevnih enterokoka. Zbog jačeg Sunčevog zračenja u površinskom sloju, i vrijeme preživljavanja je u tom sloju bilo kraće, kako za crijevne enterokoke tako i za *E. coli*. Promjena (smanjenja) omjera broja *E. coli* i crijevnih enterokoka također je bila brža u površinskom sloju, što ukazuje na činjenicu da povećanje jakosti Sunčevog zračenja više utječe na *E. coli* nego na crijevne enterokoke.

6. LITERATURA

Ariza, E., Jimenez, J.A., Sarda, R., Villares, M., Pinto, J., Fraguell, R., Roca, E., Marti, C., Valdemoro, H. & Ballester, R. 2010. Proposal for an integral quality index for urban and urbanized beaches.

Blount, Z.D., Barrick, J.E., Davidson, C.J., Lenski, R.E. 2012. Genomic analysis of a key innovation in an experimental *Escherichia coli* population. *Nature*, 489(7417):513-518. doi:10.1038/nature11514

Fisher, K. & C. Phillips. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155:1749–1757.

Gauthier, M.J. 1992. Influence des systemes d'osmoregulation sur la survie et l'adaptation des bacteries enteriques dans l'environnement marin. MAP Technical Reports Series, No. 63, pp. 1-16. United Nations Environment Programme Athens.

Geldreich, E. E.; Kenner, B. A. 1969: Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 41: 8, Part 2, R336-R352.

Jozić, S., 2012. Vrijeme zadržavanja indikatora fekalnog onečišćenja u moru i morskim organizmima/ 2012. (doktorska disertacija)

Kjellander, J. 1960: Enteric streptococci as indicators of fecal contamination of water. *Ada pathologica et microbiologica Scandinavica Suppl.* 136, 48: 1-133.

Lebaron, P., Henry, A., Lepeuple, A.S., Pena, G., Servais, P. 2005. An operational method for the real-time monitoring of *E. coli* numbers in bathing waters. *Mar Poll Bull* 50: 652-659.

Menon, A.S., 2000. (Internet) Bacterial indicators of shellfish water quality. Raspoloživo na www.shellfishquality.ca/Safety/BacterialIndicators.htm

Papapetropoulou, M., Nicolopoulou, A., Papageorgacopoulou, N., Zombou, K. (1994.) Metabolic and compositional changes in *Escherichia coli* cells starved in seawater. 149(4):343-50

Raibaud, P., Caulet, M., Galphin, J. V., Mocquot, G. 1961: Studies on the bacterial flora of pigs. *Journal of applied bacteriology* 24: 285-306.

Schleifer, K.H. & R. Kilper-Bälz. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev.as *Enterococcus faecalis* comb.nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34:31-34.

Sinton, L.W. Donnison, A.M. & C.M. Hastie. 1993. Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review. Part II: Sanitary significance, survival and use. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.*, 27:117-137.

Sinton, L.W., Davies-Coley, R.J. & R.G. Bell. 1994. Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *Appl. Environ. Microb.*, 60: 2040-2048.

Šolić, M. & Krstulović, N. 1993. Važnost poznavanja vremena preživljavanja indikatora fekalnog zagađenja za određivanje obilježja podmorskih ispusta. *Hrvat. Vode*, 2:407-411.

Šolić, M., Krstulović, N., Šestanović, S., Šantić, D, Bojanić, N., Ordulj, M., Jozić, S. 2016. *Microbial Community Ecology of the Adriatic Sea*. Saarbrücken, Germany : LAP Lambert Academic Publishing, 2016 (monografija).

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli* . *Nature Reviews Microbiology*. 8(3):207–217.

Todar, K. 2012. *Bacterial Resistance to Antibiotics*. The Microbial World. Lectures in Microbiology, University of Wisconsin-Madison.

Villacampa ,Y., Lopez, I., Aragonés, L., Garcia, C., Palazon, A. 2017. Water quality of the beach in an urban and not urban environment. *Vol. 12, No. 4 (2017) 713–723*

