

# POJAVNOST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* U MORU ZA KUPANJE NA PODRUČJU GRADA RIJEKE

**izv. prof. dr. sc. Darija Vukić Lušić**  
Sveučilište u Rijeci  
Medicinski fakultet  
Braće Branchetta 20, Rijeka,  
Hrvatska  
darija.vukic.lusic@medri.uniri.hr

**Andrea Huskić, mag. sanit. ing.**  
Sveučilište u Rijeci  
Medicinski fakultet  
Braće Branchetta 20, Rijeka,  
Hrvatska

**Marta Alvir, mag. ing. mech.**  
Sveučilište u Rijeci  
Tehnički fakultet  
Vukovarska 58, Rijeka, Hrvatska

**Neven Sučić, mag. med. lab. diag.**  
Sveučilište u Rijeci  
Medicinski fakultet  
Braće Branchetta 20, Rijeka,  
Hrvatska

**izv. prof. dr. sc. Dražen Lušić**  
Sveučilište u Rijeci  
Medicinski fakultet  
Braće Branchetta 20, Rijeka,  
Hrvatska

**prof. dr. sc. Lado Kranjčević**  
Sveučilište u Rijeci  
Tehnički fakultet  
Vukovarska 58, Rijeka, Hrvatska

**doc. dr. sc. Marin Glad**  
Nastavni zavod za javno zdravstvo  
Primorsko-goranske županije  
Krešimirova 52 a, Rijeka, Hrvatska

**doc. dr. sc. Arijana Cenov**  
Nastavni zavod za javno zdravstvo  
Primorsko-goranske županije  
Krešimirova 52 a, Rijeka, Hrvatska

Tijekom monitoringa kakvoće mora za kupanje rutinski se ispituje indikatore fekalnog onečišćenja – *Escherichia coli* i crijevne enterokoke, prema Uredbi o kakvoći mora za kupanje (NN 73/08). Ispitivanje se može proširiti dodatnim mikrobiološkim pokazateljima poput *P. aeruginosa*, bakterije koja kod izlaganja kontaminiranoj vodi uzrokuje infekcije kože, oka i uha. Cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje prisutnosti *Pseudomonasa aeruginosa* u moru za kupanje na području urbanih plaža zapadnog dijela grada Rijeke, u različitim okolišnim uvjetima. Obrađeni su podaci istraživanja provedenog od 2012. do 2014. te u 2023. godini. Za ispitivanje *P. aeruginosa* u uzorcima morske vode primijenjena je metoda HRN EN ISO 16266:2008. Prema rezultatima istraživanja, more za kupanje na području grada Rijeke slabo je do srednje opterećeno *P. aeruginosa*, a na pojavu ovog patogena značajno utječu oborine i dotoci slatke vode.. Monitoring rutinskih pokazatelja ne isključuje u potpunosti mogućnost kontakta i zaraze kupaca s bakterijama vrste *P. aeruginosa*.

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

## 1. UVOD

Nacionalni monitoring kakvoće mora za kupanje u Hrvatskoj se provodi temeljem odredbi Direktive o vodi za kupanje 2006/7/EC (The European Parliament and the Council of the European Union 2006), koja je

implementirana u nacionalno zakonodavstvo 2008. godine putem Uredbe o kakvoći mora za kupanje (NN 73/08 Vlada Republike Hrvatske 2008). U cilju procjene kakvoće mora za kupanje te utvrđivanja uzroka potencijalnog onečišćenja Uredba (NN 73/08) propisuje

rutinsko praćenje dva mikrobiološka pokazatelja, crijevnih enterokoka te *Escherichia coli*. Uredba (NN 73/08) navodi kriterije ocjenjivanja za pojedinačnu, godišnju te konačnu ocjenu. Određivanje pojedinačne ocjene provodi se nakon svakog ispitivanja za vrijeme trajanja sezone kupanja; godišnja ocjena daje se po završetku sezone kupanja; konačna ocjena daje se po završetku aktualne sezone kupanja, a uključuje i tri prethodne sezone. More za kupanje klasificira se u četiri kategorije kvalitete: izvrsno (označava se plavom bojom), dobro (zelenom), zadovoljavajuće (žutom) i nezadovoljavajuće (crvenom). U slučaju kada se ispitivanjem utvrde koncentracije indikatora fekalnog onečišćenja više od dozvoljenih, poduzimaju se mjere u cilju sprječavanja izlaganja kupaca onečišćenju, uzorkovanja se ponavljaju, a u slučaju ponovljenih loših rezultata oglašava se zabrana kupanja. Tijekom cijele sezone kupanja informacija o rezultatima ispitivanja mora biti aktivno podijeljena i dostupna. Ispitivanje kakvoće mora za kupanje provodi se od sredine svibnja do kraja rujna, svakih 15 dana. Uzorci se uzimaju 30 cm ispod površine mora, na dubini od najmanje jednog metra te na udaljenosti od najmanje jednog metra od linije obale. Uz mikrobiološke pokazatelje, na terenu se mjeri temperatura zraka i mora, salinitet, bilježi se vremenske uvjete (sunce, naoblaka, kiša) te vizualno onečišćenje, ukoliko je prisutno.

Pri onečišćenju rekreacijskih voda fekalnim sadržajem, u vodu dospijevaju mikroorganizmi koji mogu izazivati različite hidrične bolesti. Izvor onečišćenja najčešće su vode iz sustava za odvodnju komunalnih otpadnih voda, aktivni kratki obalni ispusti otpadnih voda, neadekvatno prikupljene oborinske vode, propusne septičke jame, izlučevine domaćih i divljih životinja, procjedne vode deponija komunalnog otpada, muljevi s uređaja za pročišćavanje otpadnih voda te poljoprivredne aktivnosti. Životinjske izlučevine predstavljaju manji rizik za zdravlje ljudi u odnosu na ljudske izlučevine (U.S. EPA 2012). Galebovi te vodene ptice također mogu znatno utjecati na povišenje broja indikatora fekalnog onečišćenja.

Komunalna otpadna voda može sadržavati različite vrste patogenih mikroorganizama. Od enteričnih virusa to su adenovirusi, astrovirusi, virus hepatitisa A, hepatitisa E, norovirusi, rotavirusi, enterovirusi (A, B, C i D) te indikatorski virusi F+ kolifagi i somatski kolifagi. Od patogenih bakterija u otpadnoj vodi se mogu naći *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio spp.* Od parazita nalazimo protozoe *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis* te helminte *Ascaris spp.*, *Ancylostoma spp.* i *Trichuris spp.* Međutim, navedene se patogene u rutinskoj kontroli zdravstvene ispravnosti i kakvoće voda ne određuje. Razlozi za to su višestruki: detekcija i kvantifikacija patogenih mikroorganizama vrlo je zahtjevan postupak jer se patogeni u prirodnim vodama pojavljuju povremeno, u niskim koncentracijama, što ovisi o uvjetima u okolišu; broj patogenih mikroorganizama je velik, a analitičke

metode utvrđivanja njihove prisutnosti i broja još uvijek su nedovoljno razvijene (Savichtcheva and Okabe 2006; Benjamin-Chung i dr. 2017). Stoga se rutinski monitoring mikrobiološke kvalitete vode temelji na dokazivanju fekalnih indikatorskih bakterija, koji s patogenima dijele isto stanište.

Fekalni indikator izbora za kontrolu kakvoće mora za kupanje su crijevni enterokoki, koji pripadaju rodu *Enterococcus*. To su komenzalne bakterije koje se izlučuju putem izmeta ljudi i životinja u velikom broju, a jedini su obavezni mikrobiološki pokazatelj za morsku vodu prema kriterijima U.S. EPA (2012). Zbog dužeg preživljavanja u odnosu na *E. coli* ukazuju na starije onečišćenje (Byappanahalli i dr. 2012). Iako europska regulativa za morsku vodu propisuje određivanje i fekalnog indikatora *E. coli*, koja pripada porodici *Enterobacteriaceae*, ova se bakterija smatra boljim pokazateljem fekalnog onečišćenja za slatke vode zbog jače korelacije s gastrointestinalnim oboljenjima (Bonilla i dr. 2007). Uz navedene fekalne indikatore, povremeno se određuje i *Clostridium perfringens*, anaerob koji stvara spore te ukazuje na starije ili isprekidano fekalno onečišćenje mora (Curiel-Ayala i dr. 2012), kao i *Staphylococcus aureus*, nefekalni patogen, povezan s rizikom od infekcije kože, oka i uha (Enns i dr. 2012). Zbog sve više dokaza koji ukazuju da su virusi odgovorni za većinu bolesti koje se javljaju uslijed izloženosti onečišćenoj vodi za kupanje, koriste se i kolifage, viruse koji inficiraju *E. coli*, s obzirom na to da bolje od fekalnih indikatorskih bakterija oponašaju prisutnost patogenih virusa u vodi (Benjamin-Chung i dr. 2017).

*P. aeruginosa* sveprisutni je oportunistički patogen koji se prenosi vodom. Najčešće se povezuje s blagim vanjskim infekcijama kože (folikulitis, upala korijena dlake), gornjeg dišnog sustava, oka, uha (otitis externa, plivačko uho), nosa i grla, ali se javljaju i ozbiljnije unutarnje infekcije (pluća, urinarni, gastrointestinalni sustav, srčani zalisci) kojima su podložne imunokompromitirane osobe te pacijenti koji primaju antibiotsku terapiju (WHO 2021; HeMED 2023). U morskoj vodi utvrđena je pozitivna korelacija između infekcije kože i razine opterećenja ovom bakterijom (Esiobu i dr. 2004). Zbog relativno velikog genoma i fleksibilnih metaboličkih sposobnosti, *P. aeruginosa* iskorištava brojne ekološke niše (Mielko i dr. 2019), s izuzetnom fiziološkom sposobnošću prilagodbe na rast pri visokim koncentracijama soli. Fekalni indikatori onečišćenja koji se rutinski koriste u procjeni kakvoće mora ne isključuju mogućnost zaraze necrijevnim patogenima. Zbog sve češćih slučajeva zaraze nefekalnim mikroorganizmima, javlja se potreba za uvođenjem nefekalnih indikatorskih organizama, pri čemu *P. aeruginosa* može biti koristan pokazatelj prilikom procjene kakvoće mora za kupanje (Karbasdehi i dr. 2017).

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

uvjetima. Također, ispitana je povezanost pokazatelja *P. aeruginosa* s indikatorima fekalnog onečišćenja koji se rutinski određuju prema Uredbi (NN 73/08) (*E. coli* i crijevni enterokoki), kao i s dodatnim fekalnim (*C. perfringens*) i nefekalnim (*S. aureus*, ukupnim brojem kolonija na temperaturama inkubacije od 37 °C i 22 °C – UBB/37 i UBB/22) pokazateljima mikrobiološkog opterećenja.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Područje istraživanja

Istraživano područje uključuje pet lokacija na tri plaže u zapadnom dijelu grada Rijeke (Kantrida): 1) 3. maj, 2) Kantrida – istok, 3) Kantrida – zapad, 4) Ploče – istok i 5) Ploče – zapad (slika 1). Lokacije uzorkovanja izabrane su temeljem povijesnih podataka koji su ukazivali na pojačano mikrobiološko opterećenje. Na navedenom području provedeno je intenzivno uzorkovanje u razdoblju od 2012. do 2014. godine (Vukić Lušić i dr. 2017), tijekom kojeg je prikupljeno 956 uzoraka. U veljači 2023. na istom je području na većem broju lokacija (25) uzorkovanje provedeno dva puta, u suhom i kišnom razdoblju (50 uzoraka), u cilju prikupljanja novijih podataka te što pouzdanije procjene prisutnosti *P. aeruginosa*.

### 2.2. Uzorkovanje

Uzorkovanje se provodilo pomoću ručnog uzorkivača u koji se umetne sterilnu bocu od 250 mL ili 500 mL. Uzorci su uzeti s obale, u moru dubine najmanje jedan metar te najmanje jedan metar od obalne linije, 30-ak cm ispod površine mora. Nakon toga svakoj su lokaciji terenskom sondom (YSI) mjereni salinitet i temperatura mora te alkoholnim termometrom temperatura zraka. Uzorci su spremljeni u hladnjake te transportirani u Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, laboratorij za mikrobiologiju voda, gdje su u što kraćem vremenu analitički obrađeni.

Analizirani su podaci 965 uzoraka, proistekli iz istraživanja provedenog 2012. – 2014. godine, u različitim vremenskim uvjetima. Dodatno, na istim je lokacijama u veljači 2023. godini uzeto 50 uzoraka, 25 tijekom sušnog razdoblja te 25 nakon kiše. Ukupan broj analiziranih uzoraka iznosio je 1015.

### 2.3. Metode ispitivanja

Prisutnost i broj bakterije *P. aeruginosa* određivani su metodom HRN EN ISO 16266:2008. Uzorci za pokazatelj ukupnog broj kolonija obrađeni su tehnikom ulijevanja temperiranog hranjivog agara, prema modificiranoj normi HRN EN ISO 6222:2000. Metoda je modificirana na način da se umjesto kvašćevog agara koristio marine agar, po sastavu bogatiji solima te stoga pogodniji za kultivaciju bakterija iz morskog okoliša. Prisutnost i broj crijevnih enterokoka određivani su prema HRN EN ISO 78992:2000. Prisutnost i broj *E. coli* određivani su temperaturno modificiranom metodom HRN EN ISO 9308-1:2014/A1:2017. S obzirom na to da za dokazivanje i brojenje *S. aureus* u vodi nije dostupna ISO norma, korištena je modificirana metoda Američkog javno zdravstvenog udruženja (engl. *American Public Health Association* – APHA) u dijelu 9312 B standardnih metoda. Modifikacija se odnosila na primjenu CHROMagar™ staph aureus hranjive podloge, umjesto Baird-Parker egg yolk hranjivog agara. Za dokazivanje i brojenje *C. perfringens* primijenjena je metoda HRN EN ISO 14189:2016.

Od fizikalno-kemijskih pokazatelja mjerena je temperatura zraka, temperatura mora, salinitet, pH-vrijednost te mutnoća. Salinitet mora određivao se *in situ* terenskom sondom (YSI Model 30). Temperatura mora i zraka mjerilo se alkoholnim termometrom, s podjelom ljestvice 10/1 °C. Mutnoću uzoraka mjerilo se u skladu s normom HRN EN ISO 7027-1:2016, a pH-vrijednost prema normi HRN ISO 10523:2012.

Podaci o količini oborina i jakosti Sunčevog zračenja zatraženi su od Državnog hidrometeorološkog zavoda



Slika 1: Područje istraživanja u zapadnom dijelu grada Rijeke (Kantrida) – pet lokacija na kojima se provodi rutinsko uzorkovanje: 1) 3. maj, 2) Kantrida – istok, 3) Kantrida - zapad, 4) Ploče – istok i 5) Ploče – zapad

(DHMZ).

## 2.4. Statistička obrada podataka

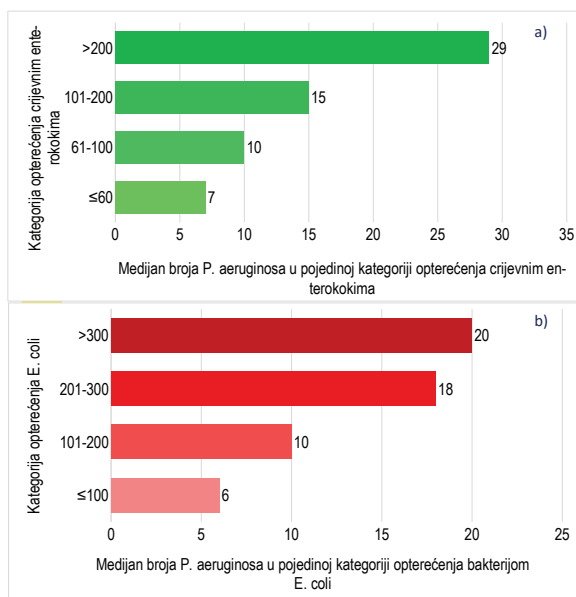
Statistička obrada podataka provedena je pomoću TIBCO statistica v. 14.0.1.25 programskog paketa (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, SAD). Za prikaz rezultata korištena je deskriptivna statistika. Kolmogorov-Smirnovljev testom ispitana je distribucija podataka. Kako dobiveni podaci nisu pokazali normalnu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

## 3. REZULTATI I RASPRAVA

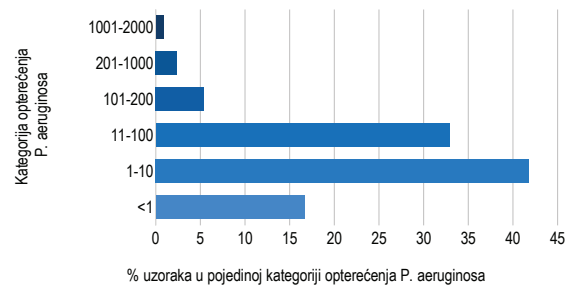
### Prisutnost *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* je bakterija sveprisutna u većini voda, ali uglavnom na niskim ili nepatogenim razinama (World Health Organization 2021). U istraživanju obalnog mora na urbanim plažama zapadnog dijela grada Rijeke prisutnost bakterije *P. aeruginosa* dokazana je u 83,3 % uzoraka, od ukupno ispitanih 1015 (846/1015). Raspon utvrđenih koncentracija kretao se od 0,0 do 1950,0 CFU/100 mL, sa srednjom vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (sr. vr.  $\pm$  SD)  $44,6 \pm 154,2$  CFU/100 mL; medijanom 8,0 CFU/100 mL.

U odnosu na kategorije kakvoće mora za kupanje koje su Uredbom (NN 73/08) definirane prema koncentracijama crijevnih enterokoka i *E. coli*, na slici 2 vidljivo je povećanje opterećenja bakterijom *P. aeruginosa* s pogoršanjem kategorije kakvoće mora za kupanje. Međutim, prisutnost *P. aeruginosa* vidljiva je i u



Slika 2: Medijan broja *P. aeruginosa* u pojedinoj kategoriji opterećenja rutinskim indikatorima fekalnog onečišćenja prema Uredbi (73/08) a) prema kategoriji opterećenja crijevnim enterokokima, b) prema kategoriji opterećenja *E. coli*



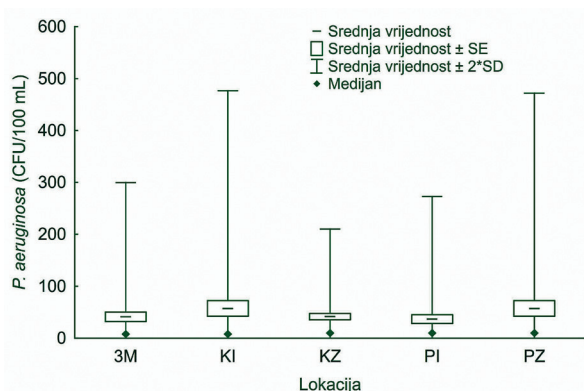
Slika 3: Udio uzoraka u pojedinoj kategoriji opterećenja *P. aeruginosa* (N = 1015 uzoraka)

moru izvrsne kakvoće. U uzorcima ocijenjenim izvrsnom kakvoćom temeljem broja crijevnih enterokoka raspon vrijednosti *P. aeruginosa* kreće se od 0 do 1600 CFU/100 mL (medijan iznosi 7), a kod uzoraka ocijenjenim izvrsnom kakvoćom temeljem broja *E. coli* raspon se također kretao od 0 do 1600 CFU/100 mL, uz medijan od 6.

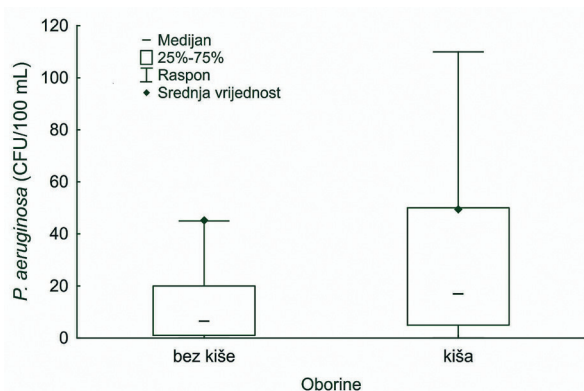
Prema stupnju opterećenja bakterijskom vrstom *P. aeruginosa*, uzorke smo podijelili u šest kategorija: < 1, 1 – 10, 11 – 100, 101 – 200, 201 – 1000, 1001 – 2000 CFU/100 mL. Najveći udio uzoraka pripadao je kategoriji manjeg (1 – 10 CFU/100 mL, 41,8 %) i srednjeg opterećenja (11 – 100 CFU/100 mL, 32,9 %), međutim, kod 8,7 % uzoraka (88/1015) broj kolonija bio je veći od 100 CFU/100 mL, a kod 0,9 % uzoraka veći od 1000 CFU/100 mL (slika 3).

Veličina infektivne doze potrebne za pojavu infekcije uzrokovane bakterijom *P. aeruginosa* je nepoznata, odnosno znatno varira. Tako su Roser i dr. (2014) ustvrdili da se infektivna doza za folikulitis u bazenskim vodama kreće od  $10^0$  –  $10^9$  CFU/100 mL, a van Asperen i dr. (1995) su za otitis externa prijavili omjer izgleda od 15,5 % za prirodne slatke vode s koncentracijom *P. aeruginosa* 1 – 17 CFU/100 mL (medijan iznosi 2). Razvoj višestruke otpornosti *P. aeruginosa* na lijekove, slabljenje imunološkog odgovora, posebno kod sve većeg broja starijih ljudi, dovodi do smanjenja infektivne doze te povećanja osjetljivosti populacije na ovu bakteriju (Public Health Agency of Canada 2012).

Najveći udio uzoraka (65,9 %, 58/88) s koncentracijom *P. aeruginosa* > 100 CFU/100 mL, zadovoljio je kriterije Uredbe (NN 73/08) za rutinske fekalne indikatore (*E. coli* i crijevni enterokoki) te je more ocijenjeno kao pogodno za kupanje. Prema tome, usklađenost rezultata ispitivanja sa standardima za *E. coli* i enterokoke nije isključila mogućnost zaraze kupaca bakterijom *P. aeruginosa*. U slučajevima kada kupaci imaju oštećenja kože, opekline i kronične rane, vjerojatnost infekcije značajno raste. Zbog razvoja otpornosti na antibiotike te nedostatka novih antimikrobnih lijekova, terapija protiv *P. aeruginosa* predstavlja sve veći izazov. Mogućnost stvaranja biofilma poboljšava sposobnost uzrokovanja infekcije, dodatno smanjujući učinkovitost lijekova (Mielko i dr. 2019). Prema tome, prisutnost *P. aeruginosa* u vodi koja se koristi za rekreaciju, predstavlja javnozdravstveni problem (De Giglio i dr. 2022).



Slika 4: Medijan vrijednosti *P. aeruginosa* po točkama (lokacijama) 3. Maj (3M), Kantrida istok (KI), Kantrida zapad (KZ), Ploče istok (PI) te ploče zapad (PZ), s prikazom medijana (0), srednje vrijednosti (I), srednja vrijednost ± standardna pogreška (O) i srednja vrijednost ± 2 x standardna devijacija (+).



Slika 5: Koncentracija *P. aeruginosa* u razdoblju bez kiše i s kišom (>0,1 mm), s prikazom medijana (0), 25% - 75% percentila (I) i raspona rezultata bez ekstrema (±).

Između ispitanih lokacija Kruskal-Wallis testom nije utvrđena statistički značajna razlika (slika 4). Najveći medijan broja *P. aeruginosa* mjereno je na lokaciji Kantrida – zapad (raspon 0,0 – 780,0 CFU/100 mL, medijan 10 CFU/100 mL) i Ploče – istok (raspon 0,0 – 1560,0 CFU/100 mL, medijan 8 CFU/100 mL), što je vjerojatno povezano s velikim brojem priobalnih izvora na plaži Kantrida te neadekvatnim prikupljanjem oborinskih voda u slučaju većih oborina na plaži Ploče.

Na slici 5 prikazan je medijan broja *P. aeruginosa* u razdoblju bez kiše (N = 398 uzoraka) te u razdoblju s kišom (u obzir su uzeta 24 h prije uzorkovanja, dani s oborinama > 0,1 mm; N = 617 uzoraka). Mann-Whitney U testom utvrđena je statistički značajna razlika u vrijednosti medijana broja *P. aeruginosa* između dva

promatrana razdoblja (M-W test, Z = -8,04, p = 5000W/m<sup>2</sup> (K-W test, N = 1015, H = 47,89, p < 0,0001).

Na vjerojatnost prisutnosti *P. aeruginosa* utječu brojni lokalni čimbenici i karakteristike vode. Spearmanovom korelacijskom analizom (tablica 1) utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između *P. aeruginosa* i prosječnog dnevnog Sunčevog zračenja (rs = -0,182; p < 0,05), temperature vode (rs = -0,194; p < 0,05), saliniteta (rs = -0,100; p < 0,05) te statistički značajna pozitivna korelacija s mutnoćom (rs = 0,083; p < 0,05). Iako su korelacije statistički značajne (zbog velikog broja uzoraka) koeficijenti korelacije su relativno mali, što sugerira slabu vezu između koreliranih varijabli. Ipak, i te slabe veze sugeriraju prirodu povezanosti bakterije *P. aeruginosa* s istraživanim okolišnim parametrima. Navedene inverzne korelacije potvrđuju utjecaj Sunčevog zračenja na redukciju broja bakterija, čijem se djelovanju pripisuje najjači okolišni efekt (Enns i dr. 2012), kao i na utjecaj slatke vode, posebno izražen nakon većih oborina, a koja može djelovati kao transporter mikrobiološkog onečišćenja. Vrijeme preživljavanja *P. aeruginosa* u morskoj vodi slično je enterokokima, a duže je u odnosu na *E. coli* (de Vicente i dr. 1988).

Rasprostranjenost i brojnost mikroorganizama u rekreacijskim vodama ovisi o okolišnim uvjetima s jedne strane te sposobnosti prilagodbe bakterijskih stanica s druge strane (Sagarduy i dr. 2019). Značajna pozitivna korelacija između *P. aeruginosa* i pH (rs = 0,080; p < 0,05) ukazuje na dobru sposobnost preživljavanja ove bakterije u neoptimalnim uvjetima, s obzirom na to da se optimalni pH za rast *P. aeruginosa* kreće u rasponu od 6,8 do 7,0 (Chen i dr. 2007).

Sa svim ispitanim mikrobiološkim pokazateljima, izuzev s UBB/37 i *C. perfringens*, *P. aeruginosa* bio je u značajnoj pozitivnoj korelaciji, i to prema jačini korelacije sljedećim redom: *S. aureus* (rs = 0,280; p < 0,05), *E. coli* (rs = 0,268; p < 0,05), enterokoki (rs = 0,220; p < 0,05) i UBB/22 (rs = 0,063; p < 0,05). Navedeno ukazuje da s porastom koncentracije indikatora fekalnog onečišćenja (*E. coli* i crijevni enterokoki) raste i broj nefekalnih indikatora (*S. aureus*, UBB/22 i *P. aeruginosa*), u najvećoj mjeri nakon kišnog razdoblja. To ukazuje na mogućnost istovremenog utjecaja više različitih izvora onečišćenja te na pojavu najvećeg broja prekoračenja graničnih vrijednosti nakon obilnih kiša (Elmanama i dr. 2005). Pozitivna korelacija između infekcije kože te razina *P. aeruginosa* i *S. aureus* prisutnih u vodi utvrđena je u istraživanju Mohammed i dr. 2012. godine na

Tablica 1: Prikaz Spearmanove korelacije ispitanih pokazatelja

	Sunce W/m <sup>2</sup>	Tv	Sal	pH	Mut	UBB/37	UBB/22	EC	ENT	SA	CP
<i>P. aeruginosa</i>	-0,182	-0,194	-0,100	0,080	0,083	0,013	0,063	0,268	0,220	0,280	0,010

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

\* Podebljane vrijednosti ukazuju na statistički značajnu korelaciju (p < 0,05).

plažama južne Floride (2012.). Navedeno ukazuje da je uz rutinske fekalne indikatorske vrste povremeno potrebno ispitivati i nefekalne mikrobiološke pokazatelje, posebno u slučajevima pojave bolesti.

#### 4. ZAKLJUČAK

Morezakupanjeu području grada Rijeke pokazuje nisko do umjereno opterećenje bakterijom *P. aeruginosa* (1 – 100 CFU/100 mL), pri čemu oborine značajno utječu na povećanje njezine prisutnosti. *P. aeruginosa* u pozitivnoj je korelaciji s mutnoćom vode (turbulentni dotoci slatke vode), pH-vrijednosti morske vode (prilagodba višim pH-vrijednostima). Negativna korelacija utvrđena je temperaturom vode i salinitetom, što ukazuje na utjecaj slatke vode koja pronosi mikrobiološko onečišćenje. *P. aeruginosa* pokazuje pozitivnu korelaciju s fekalnim i nefekalnim mikrobiološkim parametrima (*E. coli*, crijevni enterokoki, UBB/22, *S. aureus*), što ukazuje na mogućnost utjecaja različitih izvora onečišćenja. Iako su korelacije statistički značajne (zbog velikog broja uzoraka), koeficijenti korelacije relativno su mali, što ukazuje na slabu vezu. Ipak, i te slabe veze sugeriraju povezanost *P. aeruginosa* s istraživanim parametrima.

Praćenje rutinskih pokazatelja (*E. coli* i enterokoki) ne isključuje u potpunosti mogućnost kontakta i zaraze kupaca s bakterijama vrste *P. aeruginosa*. Primjena dodatnih mikrobioloških pokazatelja povećava sposobnost predviđanja i smanjenja zdravstvenih rizika povezanih s korištenjem površinskih voda.

#### ZAHVALA

Ovaj rad djelomično je financiran iz sljedećih triju projekata: 1) Prilagodba novoj EU Direktivi o kvaliteti vode za kupanje, UNIRI projekti 2018 (uniri-biomed-18-292), 2) KLIMOD – Računalni model strujanja, poplavlivanja i širenja onečišćenja u rijekama i obalnim morskim područjima; Operativni program "Konkurentnost i kohezija 2014. – 2020." (OPKK) od Europskih strukturnih i investicijskih fondova (ESIF) i 3) Okolišno praćenje brojnosti i raznolikosti gljiva na pješčanim plažama i moru u Primorsko-goranskoj županiji, UNIRI projekti iskusnih znanstvenika 2023 (uniri-iskusni-biomed-23-245).

Zahvaljujemo Državnom hidrometeorološkom zavodu na ustupljenim podacima o količini oborina i jačini Sunčevog zračenja. ■

#### LITERATURA

Benjamin-Chung, J., B. F. Arnold, T. J. Wade, K. Schiff, J. F. Griffith, A. P. Dufour, S. B. Weisberg and J. M. Colford, Jr. 2017. Coliphages and Gastrointestinal Illness in Recreational Waters: Pooled Analysis of Six Coastal Beach Cohorts. *Epidemiology*. 28(5). 644–652.

Bonilla, T. D., K. Nowosielski, M. Cuvelier, A. Hartz, M. Green, N. Esiobu, D. S. McCorquodale, J. M. Fleisher and A. Rogerson 2007. Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. *Marine Pollution Bulletin*. 54(9). 1472–1482.

Byappanahalli, M. N., M. B. Nevers, A. Korajkic, Z. R. Staley and V. J. Harwood 2012. Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76(4). 685–706.

Chen, S. Y., Y. H. Wei and J. S. Chang 2007. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76(1). 67–74.

Curriel-Ayala, F., E. I. Quiñones-Ramírez, R. C. Pless and E. González-Jasso 2012. Comparative studies on *Enterococcus*, *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* as quality indicators in tropical seawater at a Pacific Mexican beach resort. *Marine Pollution Bulletin*. 64(10). 2193–2198.

De Giglio, O., M. Narracci, F. Apollonio, F. Triggiano, M. I. Acquaviva, C. Caroppo, G. Diella, A. Di Leo, F. Fasano, S. Giandomenico, L. Spada, R. A. Cavallo and M. T. Montagna 2022. Microbiological and chemical characteristics of

beaches along the Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy). *Environmental Monitoring and Assessment*. 194(6). 448.

de Vicente, A., M. Avilés, J. J. Borrego and P. Romero 1988. Die-off and survival of *Pseudomonas aeruginosa* in seawater. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Serie B, Umwelthygiene, Krankenhaushygiene, Arbeitshygiene, präventive Medizin*. 186(3). 261–272.

Elmanama, A. A., M. I. Fahd, S. Afifi, S. Abdallah and S. Bahr 2005. Microbiological beach sand quality in Gaza Strip in comparison to seawater quality. *Environmental Research*. 99(1). 1–10.

Enns, A. A., L. J. Vogel, A. M. Abdelzاهر, H. M. Solo-Gabriele, L. R. Plano, M. L. Gidley, M. C. Phillips, J. S. Klaus, A. M. Piggot, Z. Feng, A. J. Reniers, B. K. Haus, S. M. Elmir, Y. Zhang, N. H. Jimenez, N. Abdel-Mottaleb, M. E. Schoor, A. Brown, S. Q. Khan, A. S. Dameron, N. C. Salazar and L. E. Fleming 2012. Spatial and temporal variation in indicator microbe sampling is influential in beach management decisions. *Water Research*. 46(7). 2237–2246.

Esiobu, N., R. Mohammed, A. Echeverry, M. Green, T. Bonilla, A. Hartz, D. McCorquodale and A. Rogerson 2004. The application of peptide nucleic acid probes for rapid detection and enumeration of eubacteria, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in recreational beaches of S. Florida. *Journal of Microbiological Methods*. 57(2). 157–162.

Hrvatska elektronička medicinska edukacija (HeMED). 2023. *Pseudomonas infekcije*. Accessed 28 december 2023 from <https://hemed.hr/Default.aspx?sid=18026>.

Karbasdehi, V. N., S. Dobaradaran, I. Nabipour, A. Ostovar, H. Arfaeina, A. Vazirzadeh, R. Mirahmadi, M.

Keshtkar, F. F. Ghasemi and F. Khalifei 2017. Indicator bacteria community in seawater and coastal sediment: the Persian Gulf as a case. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 15. 6.

Mielko, K. A., S. J. Jabłoński, J. Milczewska, D. Sands, M. Łukaszewicz and P. Młynarz 2019. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 35(11). 178.

Mohammed, R. L., A. Echeverry, C. M. Stinson, M. Green, T. D. Bonilla, A. Hartz, D. S. McCorquodale, A. Rogerson and N. Esiobu 2012. Survival trends of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Clostridium perfringens* in a sandy South Florida beach. *Marine Pollution Bulletin*. 64(6). 1201–1209.

Public Health Agency of Canada. 2012. *Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances – Pseudomonas spp.* Accessed 10 January 2024 from <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/pseudomonas.html>.

Roser, D. J., B. van den Akker, S. Boase, C. N. Haas, N. J. Ashbolt and S. A. Rice 2014. *Pseudomonas aeruginosa* dose response and bathing water infection. *Epidemiology and Infection*. 142(3). 449–462.

Sagarduy, M., S. Courtois, A. Del Campo, J. M. Garmendia and A. Petrau 2019. Differential decay and prediction of persistence of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* culturable cells and molecular markers in freshwater and seawater environments. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 222(4). 695–704.

Savichtcheva, O. and S. Okabe 2006. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Research*. 40(13). 2463–2476.

The European Parliament and the Council of the European Union 2006. Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. Official Journal of the European Union.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 2012. *Recreational Water Quality Criteria*. Accessed 19 January 2024 from <https://www.epa.gov/wqc/recreational-water-quality-criteria-and-methods>.

van Asperen, I. A., C. M. de Rover, J. F. Schijven, S. B. Oetomo, J. F. Schellekens, N. J. van Leeuwen, C. Collé, A. H. Havelaar, D. Kromhout and M. W. Sprenger 1995. Risk of otitis externa after swimming in recreational fresh water lakes containing *Pseudomonas aeruginosa*. *BMJ (Clinical research ed.)*. 311(7017). 1407–1410.

Vlada Republike Hrvatske 2008. Uredba o kakvoći mora za kupanje. NN 73/2008.

Vukić Lušić, D., L. Kranjčević, S. Maćešić, D. Lušić, S. Jozić, Ž. Linšak, L. Bilajac, L. Grbčić and N. Bilajac 2017. Temporal variations analyses and predictive modeling of microbiological seawater quality. *Water Research*. 119. 160–170.

World Health Organization. 2021. Guidelines on recreational water quality. *Volume 1: coastal and fresh waters*. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

## PSEUDOMONAS AERUGINOSA OCCURRENCES IN THE CITY OF RIJEKA BATHING SEAWATERS

**Abstract:** Faecal pollution indicators, *Escherichia coli* and intestinal enterococci, are routinely tested during monitoring of seawater quality for bathing, in accordance with the Regulation on seawater quality for bathing (OG 73/08). These tests can be extended to include additional microbiological indicators, such as *P. aeruginosa*, a bacterium that causes skin, eye and ear infections in cases of exposure to contaminated water. The purpose of this research has been a testing for *Pseudomonas aeruginosa* presence in bathing seawaters of urban beaches in the western part of the City of Rijeka under different environmental conditions. Data from a research conducted from 2012 to 2014 and in 2023 have been processed, and the HRN EN ISO 16266:2008 method used for testing *P. aeruginosa* in seawater samples. According to research results, the seawater quality for bathing in the City of Rijeka area is slightly to moderately loaded with *P. aeruginosa*, whose occurrences are significantly affected by precipitation and freshwater inflows. Monitoring of routine indicators does not fully exclude a possibility of contact and infection of bathers with *P. aeruginosa* bacteria.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, seawater quality for bathing, faecal pollution indicators, non-faecal microbiological indicators, freshwater inflows

## VORKOMMEN VON PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN DEN KÜSTENBADEGEWÄSSERN AUF DEM GEBIET DER STADT RIJEKA

**Zusammenfassung:** Bei der Überwachung der Qualität der Küstenbadegewässer werden gemäß der Verordnung über die Qualität der Küstenbadegewässer (Narodne novine /das amtliche Gesetzblatt der Republik Kroatien/ 73/08) Indikatoren für fäkale Verschmutzung – *Escherichia coli* und intestinale Enterokokken – routinemäßig untersucht. Die Tests können um zusätzliche mikrobiologische Indikatoren erweitert werden, beispielsweise um *P. aeruginosa*, ein Bakterium, das im Kontakt mit verunreinigtem Wasser Haut-, Augen- und Ohreninfektionen verursacht. Ziel dieser Studie war es, das Vorhandensein von *Pseudomonas aeruginosa* im Meerwasser an den Stränden im westlichen Teil der Stadt Rijeka unter unterschiedlichen Umweltbedingungen zu untersuchen. Es wurden Daten aus Forschungsarbeiten verarbeitet, die in den Jahren 2012 bis 2014 und im Jahr 2023 durchgeführt wurden. Zum Testen von *P. aeruginosa* in Meerwasserproben wurde die Methode HRN EN ISO 16266:2008 verwendet. Den Forschungsergebnissen zufolge sind die Küstenbadegewässer auf dem Gebiet der Stadt Rijeka leicht bis mäßig mit *P. aeruginosa* belastet. Außerdem wird das Vorkommen von *P. aeruginosa* durch Niederschläge und Süßwasserzuflüsse erheblich beeinflusst. Die Überwachung routinemäßiger Indikatoren schließt die Möglichkeit eines Kontakts und einer Infektion von Badegästen mit *P. aeruginosa*-Bakterien nicht vollständig aus.

**Schlüsselwörter:** *Pseudomonas aeruginosa*, die Qualität der Küstenbadegewässer, Indikatoren für fäkale Verschmutzung, nicht-fäkale mikrobiologische Indikatoren, Süßwasserzuflüsse