

# Utjecaj otpadnih voda tvornice za preradu ribe na morsku mikrobnu zajednicu

---

**Stjepić, Bruna**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:751845>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

**BRUNA STJEPIĆ**

**UTJECAJ OTPADNIH VODA TVORNICE ZA PRERADU RIBE NA  
MORSKU MIKROBNU ZAJEDNICU**

ZAVRŠNI RAD

Pula, 2020.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

**BRUNA STJEPIĆ**

**UTJECAJ OTPADNIH VODA TVORNICE ZA PRERADU RIBE NA MORSKU  
MIKROBNU ZAJEDNICU**

Završni rad

JMBAG: 0303071211, redoviti student

Studijski smjer: Znanost o moru

Predmet: Mikrobiologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarno

Znanstvena grana: Znanost o moru

Mentor: doc. dr. sc. Paolo Paliaga

Komentor: dr.sc. Gioconda Millotti

Pula, 2020.



## IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisani \_\_\_Bruna Stjepić\_\_\_\_\_, kandidat za prvostupnika \_Znanosti o moru\_ ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student:

Bruna Stjepić

U Puli, 2020. Godine





## IZJAVA

### o korištenju autorskog djela

Ja, \_\_Bruna Stjepić\_\_ dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom " \_\_UTJECAJ OTPADNIH VODA TVORNICE ZA PRERADU RIBE NA MORSKU MIKROBNU ZAJEDNICU\_\_ " koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu sa Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, 2020. godine

Potpis

*Bruna Stjepić*

## Zahvala

*Prvenstveno zahvaljujem mentoru i profesoru doc.dr.sc. Paolu Paliagi na strpljenju, pomoći i volji pruženoj pri izradi ovoga rada, a i tijekom studiranja. Prenosanje znanja prihvatio je kao ozbiljan zadatak.*

*Zahvaljujem se i komentorici doc.dr.sc. Giocondi Millotti na pruženom znanju.*

*Hvala Centru za istraživanje mora u Rovinju na ustupljenoj opremi i prostoru za izradu ovoga rada. Također hvala svim djelatnicima koji rade tamo.*

*Hvala mojoj obitelji koja mi je nesebično pružala podršku tokom studiranja i gurali me izvan moje zone komfora iako su bili kilometrima daleko. Njihovo ohrabrenje uvijek znači.*

*Za kraj zahvalila bih se svim prijateljima i kolegama koji su imali veliki utjecaj na završetak ovog studija. Konstantna podrška i dobra energija uvijek pomognu olakšati sve.*

## Sadržaj

1. Uvod	1
2. Ciljevi istraživanja	2
3. Literaturni pregled	3
3.1. Sanitarna kakvoća mora	3
3.2. Patogeni mikroorganizmi i Indikatori sanitarne kakvoće mora	4
3.2.1. Ukupni (totalni) koliformi (UK)	5
3.2.1.1. Escherichia coli	5
3.2.2. Fekalni koliformi (FK)	6
3.2.3. Fekalni streptokoki (FS)	6
3.3. Morska mikrobna zajednica	7
3.3.1. Heterotrofne bakterije (HB)	7
3.3.2. Heterotrofni nanoflagelati	8
3.3.3. Cijanobakterije	8
4. Alohtone bakterije u moru	9
4.1. Preživljavanje alohtonih bakterija u moru	9
5. Materijali i metode	10
5.1. Područje istraživanja i uzorkovanje	10
5.2. Hidrografski uvjeti	12
5.3. Određivanje sanitarne kakvoće mora	12
5.3.1. 13	
5.3.2. Fekalni streptokoki	14
5.3.3. Brojnost heterotrofnih bakterija, heterotrofnih nanoflagelata i cijanobakterija	15
6. Rezultati	16
6.1. Temperatura	16
6.2. Salinitet	18
6.3. Koncentracije indikatorskih mikroorganizama	20
6.4. Koncentracije bakterijskih zajednica	24
6.5. Vrijeme preživljavanja bakterijskih zajednica pod utjecajem industrijskog ispusta	30
7. Rasprava	34
8. Zaključak	38

9. Literatura

40

Prilog

43

## 1. Uvod

Otpadne vode su tekućine koje se sastoje od tekućeg otpada otopljenog ili emulgiranog u vodi, odnosno disperzije krutog otpada u vodi (*Hrvatska enciklopedija otpadne vode*, 2020). Potječu iz kućanstava naselja i gradova (uključuju i organski, fekalni otpad), tvornica i industrijskih pogona ili poljoprivrednih djelatnosti. Njihovim ispuštanjem, bilo putem kanalizacije (točkasti ispusti) bilo izravnim ispiranjem tla (oborinske otpadne vode), u površinske kopnene vode (rijeke, jezera) ili more, može se zagađiti, odnosno smanjiti uporabna vrijednost vodenog sustava (akvatorija) u koji dospijevaju (*Hrvatska enciklopedija otpadne vode*, 2020).

Zbog povećanog broja stanovništva na Jadranu u zadnjim desetljećima došlo je do povećanog unosa onečišćivala i organskih tvari. Sve otpadne vode trebaju proći kroz uređaj za pročišćavanje kojim otpadne vode prvo prolaze kroz primarni stupanj obrade kojim se odstranjuju krutine, masti i pijesak (Ivančić i sur., 2014). Zatim prolaze kroz retencijski bazen gdje dolazi do njihove aeracije prije ispusta u more.

U Hrvatskoj veliki točkasti utjecaj na sanitarnu kvalitetu mora imaju kanalizacijski ispusti u priobalju Jadranskog mora, a posebice ispust industrijskih otpada iz tvornica (Ministarstvo zaštite okoliša i energetike, 2017). Takvim ispuštima dolazi do povećanja brojnosti patogenih mikroorganizama koji mogu biti štetni za ljudsko i životinjsko zdravlje. Također, broj patogenih mikroorganizama i njihova raspodjela u moru može ovisiti o samoj količini ispuštenih otpadnih voda, o strujanju i termo-halnim uvjetima u vodenom stupcu. Otpadne vode mogu sadržati i visoke udjele organskog materijala i anorganskih soli. Prekomjerni unos otpadnih industrijskih voda može utjecati na funkcioniranje hranidbene mreže i u ekstremnim slučajevima dovesti do cvjetanja mora, hipoksije, anoksije i eutrofikacije (Sović, 2017).

## **2. Ciljevi istraživanja**

Ciljevi ovog rada su:

1. Odrediti brojnost glavnih komponenti morske mikrobne zajednice i sanitarnu kakvoću mora u sjevernoj luci grada Rovinja na području pod utjecajem ispusta industrijskih otpadnih voda tvornice za preradu ribe tijekom ljeta i zime.
2. Izmjeriti vrijeme preživljavanja bakterijskih indikatora u vodama pod utjecajem ispusta industrijskih otpadnih voda tvornice za preradu ribe.

### 3. Literaturni pregled

#### 3.1. Sanitarna kakvoća mora

Sanitarna kakvoća mora omogućuje procjenu potencijalnog rizika zaraze patogenim mikroorganizmima, odnosno ukazuje da li broj prisutnih patogena predstavlja neprihvatljiv rizik za zdravlje (Krstulović i Šolić, 2006.).

Sanitarna kakvoća mora u Republici Hrvatskoj je određena Uredbom o kakvoći mora za kupanje (NN 73/08) (Narodne novine, 2008.) i EU direktivom o upravljanju kakvoćom vode za kupanje (br. 2006/7/EZ). HRN EN ISO, ili hrvatski normativni dokument, je određena metoda prema kojoj se nešto ispituje, u ovom slučaju brojnost crijevnih enterokoka i *E. coli* (Tablica 1.). Dokumente određuje i ažurira Hrvatski zavod za norme (eng. Croatian Standards Institute).

**Tablica 1.** Standardi za ocjenu kakvoće mora nakon svakog ispitivanja

Pokazatelj	Kakvoća mora			Metoda ispitivanja
	Izvrсна	Dobra	Zadovoljavajuća	
Crijevni enterokoki (bik*/100 ml)	<60	61-100	101-200	HRN EN ISO 7899-1 ili HRN EN ISO 7899-2
<i>Escherichia coli</i> (bik*/100 ml)	<100	101-200	201-300	HRN EN ISO 9308-1 ili HRN EN ISO 9308-3

\*bik – broj izraslih kolonija (eng. CFU – *Colony forming unit*)

### **3.2. Patogeni mikroorganizmi i Indikatori sanitarne kakvoće mora**

Patogeni i ostali alohtoni mikroorganizmi ulaze u morski okoliš u prvom redu kroz ispuste komunalnih otpadnih voda pa je u većini morskih područja mikrobiološko onečišćenje direktan rezultat ispuštanja nepročišćenih ili djelomično pročišćenih otpadnih voda. Atmosfera također može biti izvor patogenih i drugih mikroorganizama koji dospijevaju u more, budući da je utvrđeno da vjetar koji puše s kopna na more nosi sa sobom bakterije, viruse i parazite koje kiša obara u rijeke i mora (Krstulović i Šolić, 2006). Također, izvor patogenih mikroorganizama u moru mogu biti kupači i tlo. Patogeni su kvantitativno najznačajnija kategorija alohtonih mikroorganizama u morskom okolišu. Uključuju predstavnike bakterija, virusa, gljivica i protista, koji mogu uzrokovati širok spektar bolesti (Krstulović i Šolić, 2006). Indikatorski mikroorganizmi služe kao pokazatelji sanitarne kakvoće mora, odnosno stupnja rizika za ljudsko zdravlje.

Kako bi neki organizam mogao koristiti kao indikator, treba zadovoljavati slijedeće osobine: brojnost organizma se može brzo i jeftino odrediti; organizam ne smije biti patogen za ljude; mora biti prisutan u koncentracijama proporcionalnim koncentracijama patogenih organizama; mora biti prisutan i mjerljiv u svim tipovima medija (vodeni stupac, sediment, organizmi) (Carignan i Villard, 2001; Krstulović i Šolić, 2006.)

Indikatori mogu biti pokazatelji:

1. Fekalnog onečišćenja
2. Prisustva otpada iz domaćinstva
3. Prisustva patogena
4. Efikasnosti pojedinog procesa u obradi otpadnih voda
5. Sudbine patogena u okolišu
6. Kretanja suspendiranih čestica koje otpadnim vodama dospijevaju u more (Krstulović i Šolić 2006)



Danas, kao indikatori fekalnog onečišćenja se koriste tri skupine bakterija:

1. Ukupni (totalni) koliformi (UK)
2. Fekalni koliformi (FK)
3. Fekalni streptokoki (FS) (Krstulović i Šolić, 2006)

### **3.2.1. Ukupni (totalni) koliformi (UK)**

Ukupni koliformi predstavljaju skupinu aerobnih i fakultativno anaerobnih Gram-negativnih, nesporogenih štapića koji fermentiraju laktozu na temperaturi od 35 °C i pri tome u razdoblju od 24 sati proizvode kiselinu i plin. (Krstulović i Šolić, 2006.).

U skupinu ukupnih koliforma spadaju rodovi *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* i *Enterobacter*. Koliformi se oslobađaju u okoliš preko fekalija ljudi u koncentraciji od oko  $10^7$  stanica/g ili oko  $10^9$  stanica dnevno. Dakle ukupni koliformi se mogu koristiti kao pokazatelji fekalnog onečišćenja. Ipak, ova skupina indikatora uključuje i koliformne bakterije nefekalnog porijekla što znači da ukupni koliformi, u određenim situacijama, ne moraju biti specifični pokazatelji onečišćenja fekalnog porijekla. (Krstulović i Šolić, 2006).

S obzirom na vrlo kratko preživljavanje ukupnih koliforma u morskom okolišu (ovisno o jačini sunčevog zračenja, temperature, saliniteta i drugih čimbenika), ova skupina indikatora ukazuje isključivo na svježije onečišćenje bilo fekalnim materijalom, bilo zemljom nakon kiša (Krstulović i Šolić, 2006).

#### **3.2.1.1. Escherichia coli**

*Escherichia coli*, je vrsta bakterije iz roda *Escherichia*, porodice Enterobacteriaceae i široko je rasprostranjena u prirodi. Pripada grupi bakterija koje su uobičajeni stanovnici crijeva mnogih životinja i ljudi, gdje pomažu u probavi hrane. Ubraja se u grupu tzv. koliformnih bakterija tj. bakterija koje se redovito ili vrlo često nalaze u

ljudskoj stolici i koje pri sanitarnim pregledima vode i namirnica služe kao indikatori fekalne kontaminacije tj. zagađenja. Unutar ove vrste nalazi se veliki broj različitih serotipova od kojih neki mogu izazvati bolesti kod ljudi. To je štapićasta Gram-negativna bakterija, neki sojevi imaju kapsulu, dok većina ima na površini izdanke (flagele), koji služe za pokretanje. Aerobna je ili fakultativno anaerobna bakterija (što znači da može rasti bez kisika, ali ga može iskoristiti ako je prisutan) te dobro uspijeva u laboratorijskim uvjetima. Pripada prilično otpornim bakterijama: mjesecima može živjeti u vodi i zemlji, a dugo na raznim predmetima. U različitim vrstama hrane i namirnica lako se i brzo razmnožava. Toplina od 60 °C ubija je nakon 15 min (<https://javno-zdravlje.hr/e-coli-infekcije/> pristupljeno 19.8.2020.)

### **3.2.2. Fekalni koliformi (FK)**

Fekalni koliformi pokazuju vrlo visoku korelaciju sa stupnjem fekalnog onečišćenja koje potječe od toplokrvnih organizama, pa su prema tome bolji indikator sanitarne kakvoće mora u odnosu na ukupne koliforme. Pored toga mogućnost njihovog razmnožavanja u morskom okolišu je vrlo mala. Najzastupljenija vrsta unutar ove skupine je *Escherichia coli* koja čini između 75 i 95% od ukupnog broja fekalnih koliforma.

Iz istog razloga kao i ukupni koliformi, fekalni koliformi su indikator svježeg onečišćenja mora s fekalnim materijalom (Krstulović i Šolić, 2006.).

### **3.2.3. Fekalni streptokoki (FS)**

Fekalni streptokoki su Gram-pozitivni, izduženi ili ovalni koki koji dolaze u parovima ili kratkim lancima. S obzirom da fekalni streptokoki najčešće vode porijeklo iz crijeva toplokrvnih organizama, njihovo prisustvo u morskom okolišu također ukazuje na onečišćenje fekalnim materijalom. Ipak, novija istraživanja su pokazala da se ove bakterije mogu naći i u nekim biljkama i biljnim proizvodima, što znači da bi otpadne tvari

prehrambene industrije mogle biti nefekalni izvor fekalnih streptokoka u moru. U kombinaciji s fekalnim koliformima, fekalni streptokoki mogu pružiti precizniju informaciju o izvoru onečišćenja s obzirom da neke vrste unutar ove skupine imaju specifične domaćine. Na taj način je moguće, utvrđivanjem kvalitativnog sastava fekalnih streptokoka, razlikovati je li određeni izvor fekalnog otpada potječe iz domaćinstava ili od životinja, npr. sa stočarskih farmi (Krstulović i Šolić, 2006.).

Omjer između koncentracija fekalnih koliforma i fekalnih streptokoka (FK:FS) u uzorku može se upotrijebiti kao pokazatelj porijekla fekalnog onečišćenja. FK:FS omjer koji je manji od 0.7 pokazatelj je životinjskog porijekla, dok je FK:FS omjer veći od 4.0 pokazatelj ljudskog porijekla fekalnog materijala, s tim da ovi odnosi vrijede isključivo za svježi fekalni otpad, odnosno ne stariji od 24 sata (Krstulović i Šolić, 2006).

### **3.3. Morska mikroba zajednica**

#### **3.3.1. Heterotrofne bakterije (HB)**

Heterotrofne bakterije se smatraju najbrojnijom skupinom pikoplanktona s veličinskom frakcijom od 0,2 do 2  $\mu\text{m}$  te imaju veliku ulogu kod ciklusa ugljika i nutrijenata. Bergey je, u svome priručniku za sistematiku bakterija, taksonomski opisao podjelu heterotrofnih bakterija. Prokariote je rasporedio u ekološke skupine prema filogenetskim osobinama, obliku stanica, njihovom rasporedu, potrebe za kisikom, metaboličkim i prehrambenim potrebama te pokretljivošću.

Heterotrofne bakterije za svoj rast koriste organsku tvar. Što znači da je njihova brojnost korelirana s količinom otopljene organske tvari. Što je više otopljene organske tvari više je i heterotrofnih bakterija. Također količina partikulatne organske tvari ima pozitivnu korelaciju sa brojem heterotrofnih bakterija. Količina tih dviju organskih tvari (otopljene organske i partikulatne organske tvari) je povećana u priobalnom moru čime zaključujemo da je tu prisutan i veći broj heterotrofnih bakterija.

Brojnost heterotrofnih bakterija ovisi o dostupnosti i kvaliteti otopljene organske tvari, temperaturi, o proizvodnji i biomasi fitoplanktona i raspoloživosti hranjivih soli dušika i fosfora. Na njihovu brojnost utječu i interakcije s ostalim mikroorganizmima poput predacije od strane heterotrofnih nanoflagelata (Tophøj i sur., 2018.) i parazitizam od strane morskih virusa. Sastav heterotrofnih bakterija u površinskim vodama sjevernog Jadrana se mijenja sezonski, a najveći udio (između 52-100%) imaju Gram-negativne bakterije (Zaccone i sur., 2002.).

### **3.3.2. Heterotrofni nanoflagelati**

Heterotrofni nanoflagelati su eukariotski jednostanični mikroorganizmi koji su veličinski svrstani u nanoplankton veličine od 2 do 20  $\mu\text{m}$ . Imaju veliku ulogu u morskom okolišu zbog načina ishrane. Hrane se bakterijama i drugim pikoplanktonskim mikroorganizmima te tako reguliraju koncentraciju bakterija u vodenom stupcu i posreduju u prenošenju bakterijske biomase na više trofičke razine morske hranidbene mreže. Nazivaju se i bakterijskim predatorima. Hrane se i nekim cijanobakterijama poput *Synechococcus* i *Prochlorococcus* koje su dva reda veličine manje nego heterotrofne bakterije. Biomasa ugljika koju heterotrofni nanoflagelati (HNF) dobivaju iz bakterija iznosi oko 30% dok iz cijanobakterija 0.8% -19% (Christaki i sur., 2001).

### **3.3.3. Cijanobakterije**

Cijanobakterije su drevna grupa fotosintetskih mikroba koji se javljaju u većini voda i mogu imati velike učinke na kvalitetu vode i funkcioniranje vodenih ekosustava. Najraširenija su skupina prokariota te spadaju veličinskom frakcijom pod pikoplanktone (2-20  $\mu\text{m}$ ).

Nosioци су фотосинтезе у мору при којој се ствара кисик у увјетима свјетла, уз коришћење воде као даваоца електрона. Сдрже кlorofil а који се налази у паровима фотосинтетских lamela, званих tilakoide. На површини tilakoida им се налазе granule (fikobilisomi) које сдрже fikobiliproteinske pigmente (fikobilini) који су у правилу њихови главни pigmenti (Glover, 1985). Могу посједовати и plinske vakuole које су грађене од коморика и мјехурића који олакшавају покретање односно лебдјети. Разликујемо покретне и непокретне облике цијанобактерија. Ако се покрећу оне то чине клизањем по површини, а не коришћењем бића. Цијанобактерије имају три основна морфолошка облика: 1) једностанични штапићи и кoki; 2) filamenti; 3) filamenti с heterocistama (специјализиране станице које дјелују као центри душичне активности за фиксацију молекуларног душика). Но, треба нагласити да фиксацију душика могу вршити и прва два облика цијанобактерија (Carr и Whitton, 1973).

## 4. Alohtone bakterije u moru

**Alohtona vrsta**, у биологији, врста биљака или животиња пренесена из другог мјеста, која није изворна (autohtona) у проматраном крају. Супротно је *autohtona vrsta*, која се у проматраном крају налази од давнине ( *Hrvatska enciklopedija alohtona vrsta*, 2020).

### 4.1. Preživljavanje alohtonih bakterija u moru

Preživljavanje mikroorganizama који у more dospjevaju путем отпадних вода фекалног поријекла опћенито је релативно кратко. Већина је аутора утврдила да се њихово вријеме преживљавања креће у распону од неколико сати до неколико дана (Mitchell и Morris, 1969; Faust и sur., 1975; Fujioka и sur., 1981; Krstulović и Šolić, 2006).

Uzroci њихова кратког животног вијека у морској води су физикални чимбеници као што су сунчева свјетлост и температура те хемијски чимбеници; salinitet, теški метали, pH, ksenobiotici. Биолошки чимбеници попут predatora, parazita, вирусне лизije станица, antibiotici

i biotoksini koje proizvode drugi mikroorganizmi imaju veliki učinak na relativno brzo ugibanje. Nagle promjene uvjeta koji su prisutni u moru uzrokuju veliki stres kod mikroorganizama koji su prije bili izloženi uvjetima prošlog staništa/domaćina. Istraživanjima se pokazalo da se alohtone bakterije dolaskom u novi okoliš mogu prilagoditi tako da prežive ili izgube sposobnosti rasta i razvoja i ta promjena može biti ireverzibilna. Tijekom takvih promjena na kraju se dobije potpuno neaktivna bakterija koja je do takvog stanja došla putem značajnih strukturnih i metaboličkih modifikacija. Zahvaljujući nedostatku hranjiva kojemu su izloženi organizmi u moru nastane inertna bakterija. No, u stanju neaktivnosti infektivnost ipak ostaje.

Sposobnost adaptacije mikrobne stanice može biti narušena kontaktom s morskom vodom koja za nju predstavlja nepovoljan okoliš, obzirom da taj kontakt može rezultirati fiziološkim oštećenjima koja mogu biti subletalna ili pak tako intenzivna da uzrokuju smrt stanice. Fiziološka se oštećenja ili stres, kojeg uvjetuje morski okoliš na alohtone mikroorganizme, mogu se proučiti opažanjem stupnja strukturne neorganiziranosti kod mikroorganizama, ili njegove nemogućnosti da obavlja određene metaboličke funkcije prilikom rasta na selektivnoj hranjivoj podlozi. Ipak, utvrđeno je da se stanice koje su preživjele stres mogu razviti u kulturi ukoliko hranjiva podloga ne sadrži inhibicijske supstance (Romero i Borrego, 1991; Krstulović i Šolić, 2006).

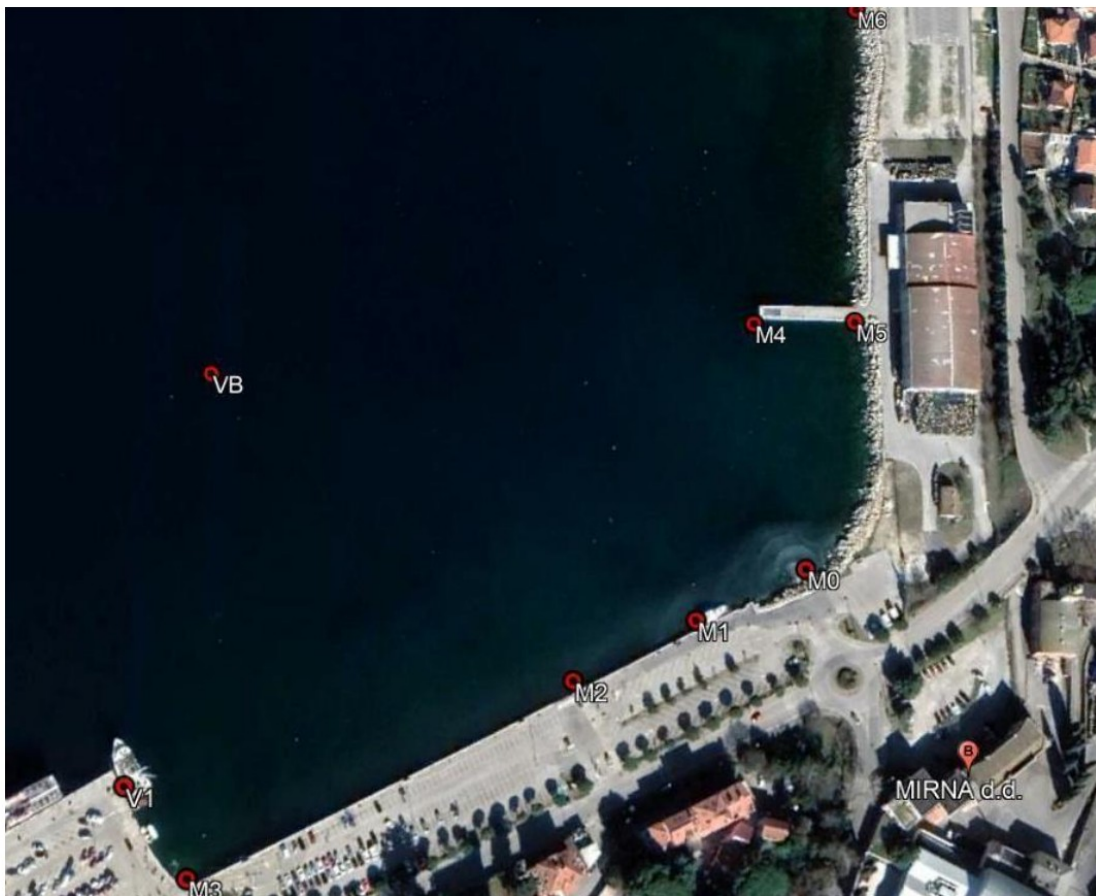
## **5. Materijali i metode**

### **5.1. Područje istraživanja i uzorkovanje**

Uvala Valdibora smještena na sjevernoj strani grada Rovinja, proteže se od starogradske jezgre do ortopedske bolnice "Martin Horvat". Površina uvale iznosi oko 1,3 km<sup>2</sup> a dubine se kreću između 10 m i 18 m u većem dijelu uvale (Paliaga i sur., 2015)



Istraživanje i uzimanje uzorka radi provjere sanitarne kakvoće mora odvijalo se na području ispred ispusta i na području oko tvornice za preradu ribe u Rovinju, u veljači i kolovozu 2019 (Slika 1.). Područje se nalazi u uvali Valdibora. Uzorci su prikupljeni u sterilne staklene boce od 500 ml, a za utvrđivanje brojnosti mikrobne zajednice dio iz prikupljenog uzorka je pretočen u polietilenske bočice od 20 ml. Za fiksiranje uzoraka dodan je 1 ml 36%-tnog formaldehida te su čuvani u frižideru na 4 °C do analize. Svi su uzorci analizirani u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđera Boškovića u Rovinju. Pri samom uzorkovanju zapažen je neugodan miris, žućkasta voda i čestice ribe i masti koji se šire dalje i do 200 m.



**Slika 1.** Prikaz područja/postaja uzorkovanja (M0,M1,M2,M3,M4,M5,M6,V1 i VB), jugoistični dio uvale Valdibore u Rovinju izvor; Google earth

## 5.2. Hidrografski uvjeti

Tijekom prikupljanja uzoraka u staklene boce, izmjereni su temperatura i salinitet (*in situ*) uz pomoć sonde za salinitet koja ima ugrađen i termometar (Slika 2.).



**Slika 2.** Uzimanje uzorka i mjerenje hidrografskih uvjeta sondom kod ispusta otpadnih voda tvornice za preradu ribe

## 5.3. Određivanje sanitarne kakvoće mora

Koristeći metodu membranske filtracije određena je sanitarna kakvoća mora koja se temelji na brojanju izraslih kolonija *Escherischia coli* i fekalnih streptokoka nakon inkubacije pri određenim temperaturama na selektivnim hranjivim podlogama.

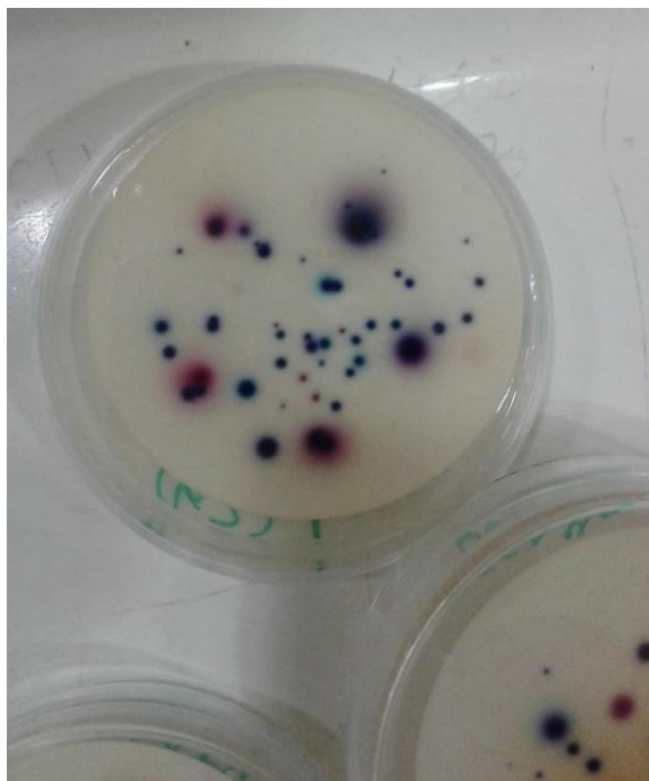


Metoda membranske filtracije obavlja se filtriranjem uzorka kroz filtere s porama veličine 0.45  $\mu\text{m}$ . Nakon toga filteri se stavljaju na hranjive podloge u petrijeve zdjelice i inkubiraju. Uzorci su filtrirani dva puta, jednom za uzgoj kolonija *E. coli*, a drugi puta za uzgoj fekalnih streptokoka.

Za mjerenje preživljavanja indikatorskih bakterija eksperiment je proveden kroz 3 dana za 3 različite početne koncentracije bakterijskih indikatora, a brojanje bakterijskih kolonija se odvijalo svakih par sati. Za svaku koncentraciju određen je broj bakterijskih kolonija koje su se razvile na svjetlu i u mraku u određenom vremenskom periodu. Koncentracije koje su bile su: originalna koncentracija u otpadnim vodama tvornice za preradu ribe, koncentracija razrijeđena 500 x i koncentracija razrijeđena 5000 x. Razrijeđenja su rađena dodavanjem prethodno filtrirane morske vode (kroz polikarbonatne filtere s promjerom pora od 0,2  $\mu\text{m}$ ).

### **5.3.1. *Escherichia coli* i fekalni koliformi**

Nakon filtracije uzoraka svih koncentracija, filteri su postavljeni na hranjive podloge *Chromogenic coliform agar* u petrijeve zdjelice na kojemu su uzgajane i određivane bakterijske kolonije *E. coli*. Uzorci u petrijevim zdjelicama stavljani su u inkubator na 24h i 36 °C. Kolonije koje su izrasle vidljive u plavoj boji identificirane su kao *E. coli*, te izbrojane su (Slika 3.). Izračunata je srednja vrijednost svih koncentracija i rezultat je izražen kao broj izraslih kolonija u 100 ml uzorka (CFU engl. colony forming unit ili BIK hr. Broj izraslih kolonija po 100 ml uzorka) .

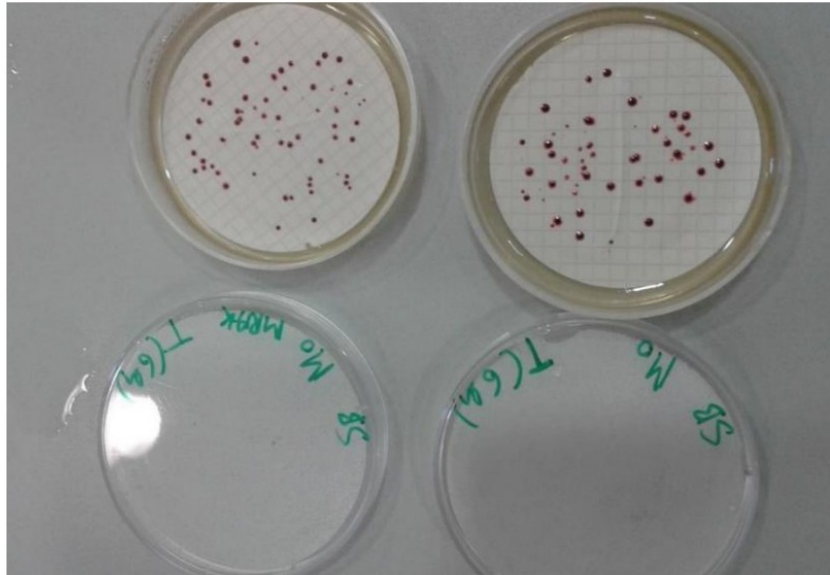


**Slika 3.** Prikaz izraslih kolonija *E. coli* na selektivnoj hranjivoj podlozi CCA agar

### 5.3.2. Fekalni streptokoki

Za određivanje fekalnih streptokoka korišten je *Slanetz-Bartley agar* u petrijevim zdjelicama. Također na njih su se stavljali filter papiri s prethodno filtriranim uzorcima. Uzorci su stavljeni u inkubator na 48 h i 36 °C. Nakon inkubiranja filter papiri s vidljivim crvenim kolonijama prebačeni su u petrijeve s *Bile aesculin agar*-om kako bi se potvrdile kolonije fekalnih streptokoka. Ovog puta petrijeve su dodatno inkubirane 2 h na 44.5 °C te kolonije koje su poprimile tamnocrvenu boju ili tamnocrveni krug su izbrojane (Slika 4.). Izračunata je srednja vrijednost svih razrjeđenja i rezultat se izražava kao broj kolonija

fekalnih streptokoka u 100 ml (CFU engl. colony forming unit ili BIK hr. Broj izraslih kolonija po 100 ml uzorka).



**Slika 4.** Kolonije fekalnih streptokoka na hranjivoj podlozi Slanetz-Bartley Agar

### 5.3.3. Brojnost heterotrofnih bakterija, heterotrofnih nanoflagelata i cijanobakterija

Od prethodno skupljenih uzoraka pipetom je odvojeno 2 ml uzorka iz polietilenskih bočica za određivanje heterotrofnih bakterija (HB). Svakom uzorku dodano je 100  $\mu$ l DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) boje. To je fluorescentna boja koja prodire kroz staničnu i jezgenu membranu te se veže za lance DNK. Nakon 15 minuta, uzorci su filtrirani kroz crne polikarbonatne filtere promjera 25 mm i pora širine 0,2  $\mu$ m. Filteri su postavljeni na mikroskopsko predmetno stakalce, dodano je imerzijsko ulje i pokrovno stakalce.

Isti postupak se ponavlja i za određivanje brojnosti heterotrofnih nanoflagelata (HNF), ali koristi se polikarbonatni filter promjera 25 mm koji ima pore širine 0,4  $\mu$ m.

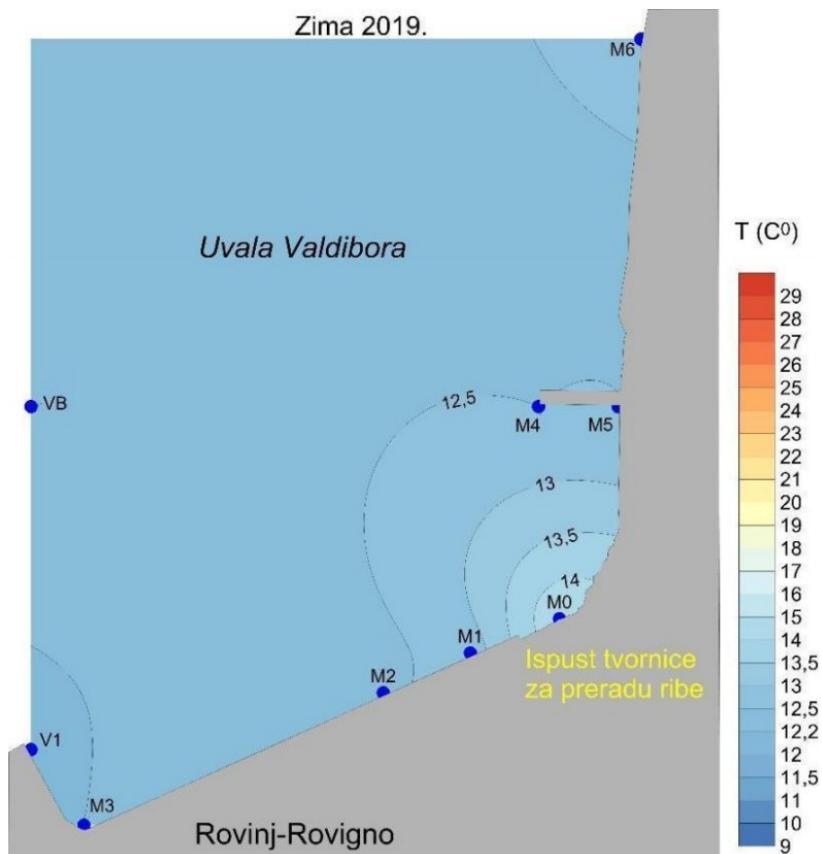
Za određivanje brojnosti cijanobakterija (CB) nije potrebno dodavati DAPI boju iz razloga što cijanobakterije sadrže fotosintetske pigmente koji fluoresciraju kada su izloženi zelenom svjetlu. Uzorak od 2 ml se filtrira kroz polikarbonatne filtere promjera 25 mm s porama širine 0,4  $\mu\text{m}$ .

Uzorci HB, HNF i CB su promatrani pod epifluorescentnim mikroskopom, a uzorci koji su bojani DAPI bojom emitirali su plavom bojom, a cijanobakterije narančasto-crvenom bojom zbog ekscitacije fotosintetskih pigmenata. Za svaki uzorak određena je srednja vrijednost po vidnom polju i pomnožena je sa specifičnim faktorom konverzije mikroskopa. Tako dobijemo broj mikroorganizama u 1 ml morske vode.

## **6. Rezultati**

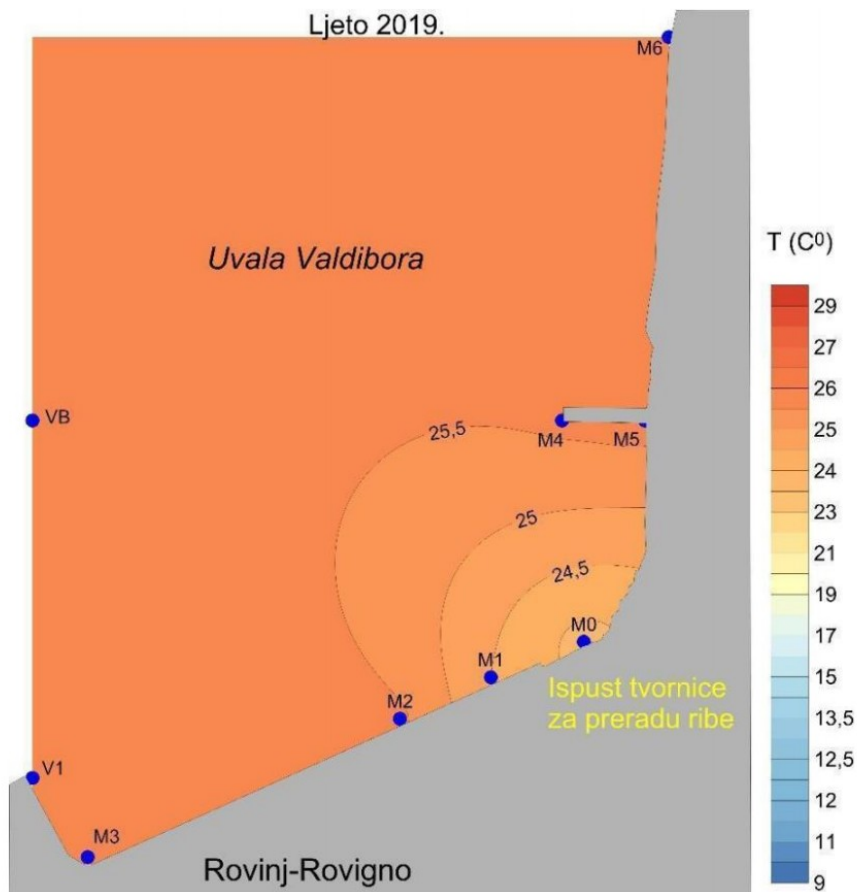
### **6.1. Temperatura**

U veljači 2019. godine temperatura površine mora koja je izmjerena za vrijeme uzorkovanja svoj maksimum dosegla je na postaji M0 (14.5 °C). Najniža temperatura zabilježena je na postaji M3 i VB te je iznosila 12.3 °C. Na prikazu raspodjele temperature za zimu 2019. (Slika 5.) vidljiv je gradijent smanjenja temperature od ispusta tvornice za preradu ribe prema vanjskim dijelovima Uvale Valdibora. Što znači da tvornica ispušta topliju vodu u odnosu na zimsku temperaturu mora. Srednja vrijednost temperature istraženog područja iznosila je 12.6 °C.



Slika 5. Raspodjela temperature (°C) za veljaču 2019.

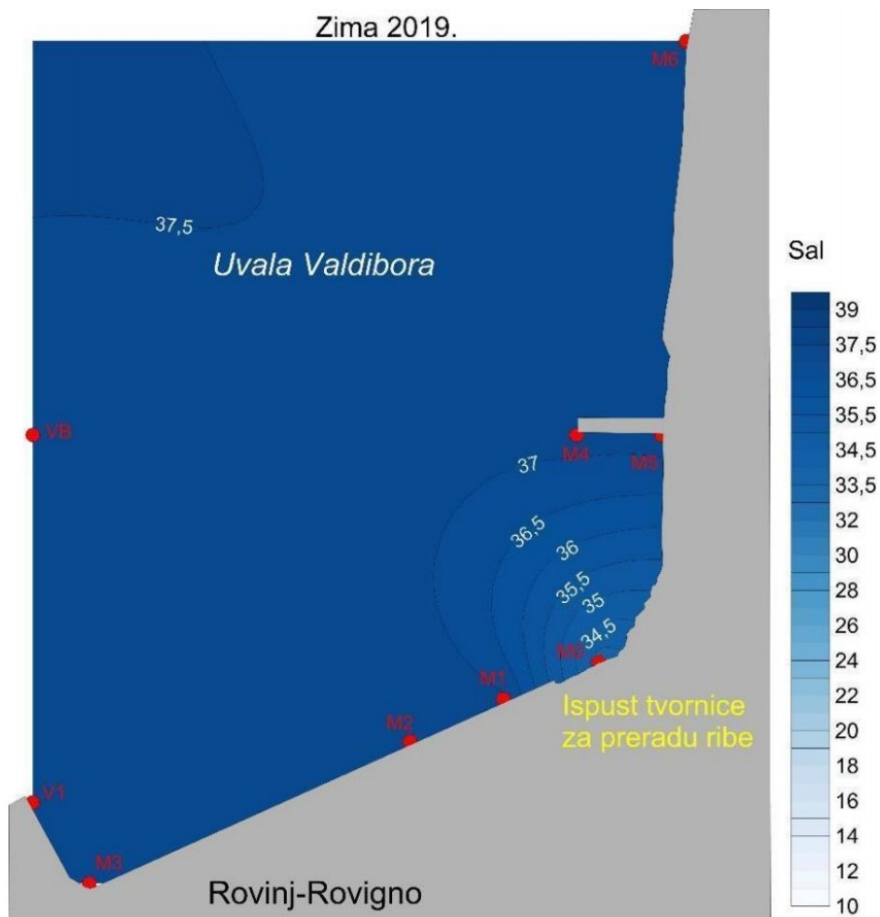
U kolovozu 2019. godine temperatura površine mora koja je za vrijeme ljetnog uzorkovanja dosegla svoj maksimum nalazila se na postaji V1 te iznosila 25. 8 °C, a najniža temperatura je zabilježena na postaji M0 (23.8 °C). Srednja vrijednost temperature iznosila je 25.3 °C. Rezultati ukazuju da je utjecaj ispusta tvornice bio vidljiv i tijekom ljeta iako je u ovom slučaju unesena voda bila hladnija od prihvatnog mora (Slika 6.).



Slika 6. Raspodjela temperature (°C) za kolovoz 2019.

## 6.2. Salinitet

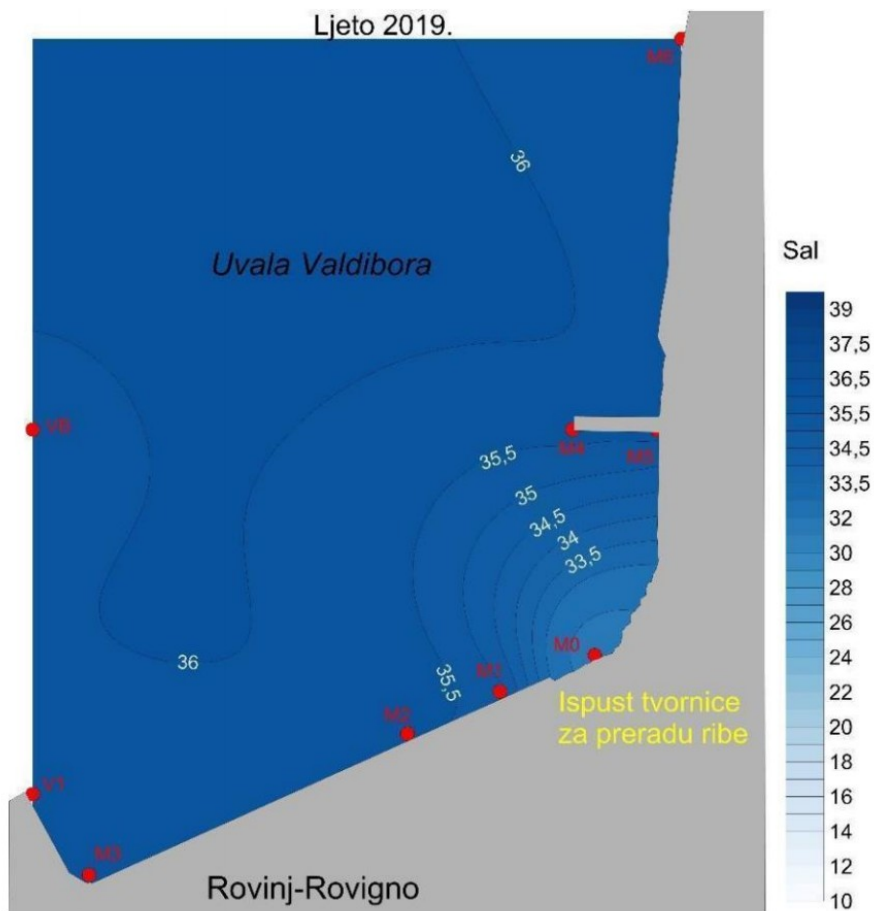
Tijekom zimskog uzorkovanja u veljači 2019. najniži izmjereni salinitet površine mora izmjeren je na postaji M0 te je iznosio 33,7 psu. Najviši izmjereni salinitet se nalazio na postaji VB s iznosom od 37,4 psu. Srednja vrijednost saliniteta iznosila je 36,8. Utjecaj ispusta slatkovodne vodene mase može se uvidjeti zbog smanjenog saliniteta na postaji M0 te području oko ispusta iz tvornice za preradu ribe (Slika 7.).



**Slika 7.** Raspodjela saliniteta za veljaču 2019.

Tijekom ljetnog uzorkovanja u kolovozu 2019. najniži izmjereni salinitet površine mora nalazio se također na postaji M0 i iznosio je 30,9 psu. Najviši izmjereni salinitet nalazi se na postajama VB i V1 te je iznosio 35,9 psu. Srednja vrijednost saliniteta iznosila je 35,1 psu. Tijekom ljetnih mjeseci primjetan je utjecaj ispusta slatkovodne vodene mase na dio uvale Valdibora (Slika 8.).



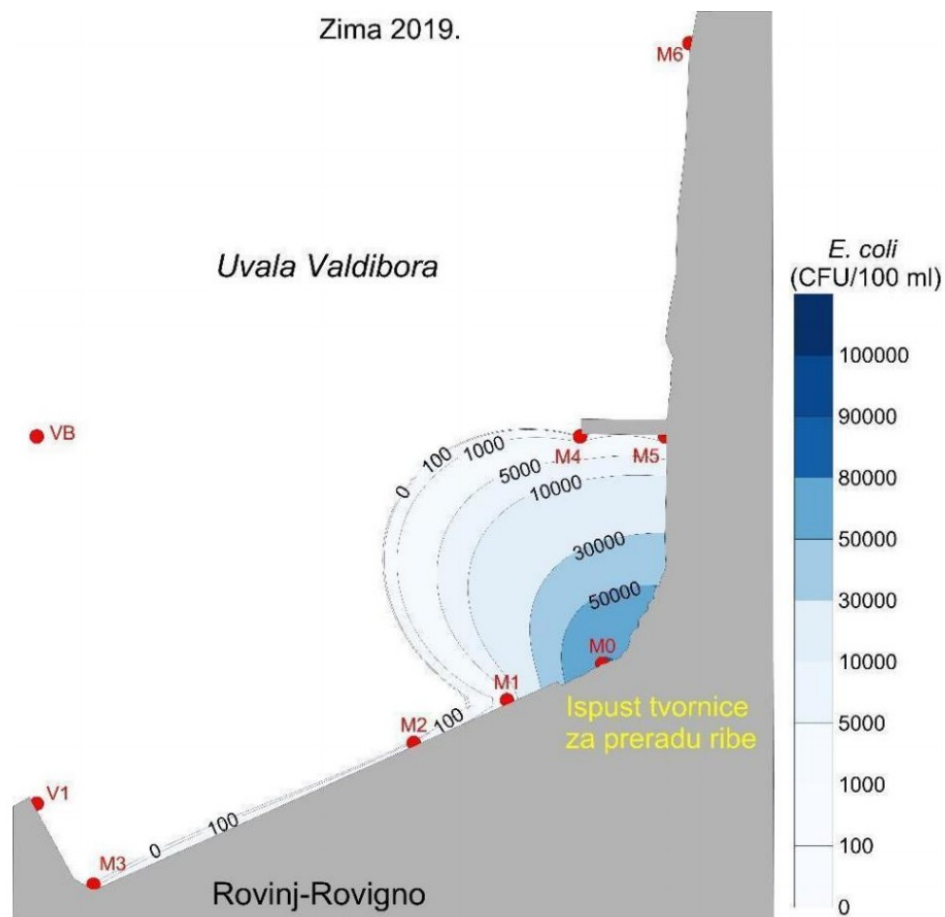


**Slika 8.** Raspodjela saliniteta za kolovoz 2019.

### 6.3. Koncentracije indikatorskih mikroorganizama

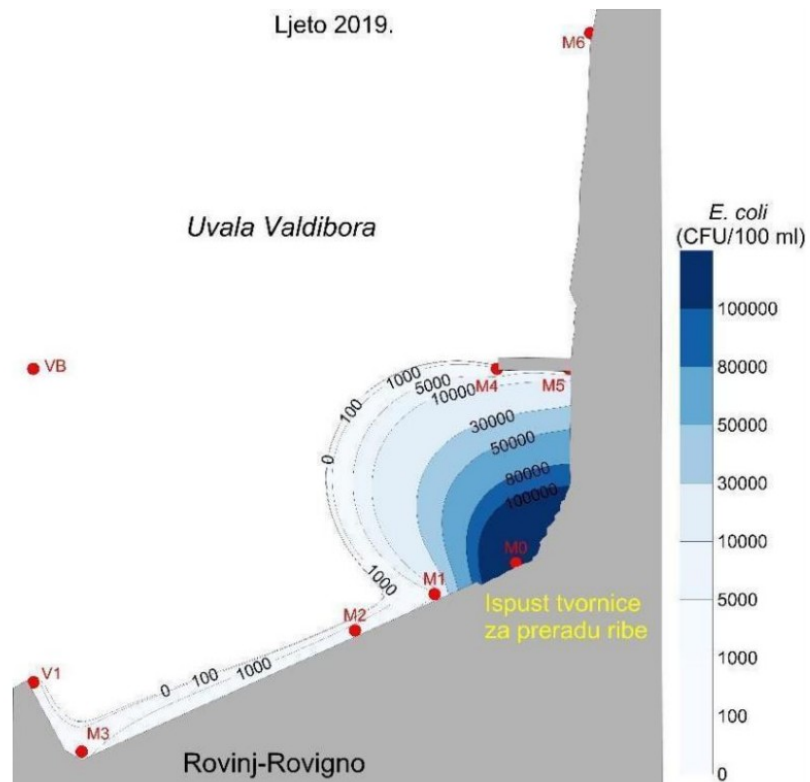
Tijekom zimskog mjerenja u veljači 2019. godine najveća koncentracija *E. coli* zabilježena je na postaji M0, odnosno kod ispusta tvornice, a iznosila je  $8,34 \cdot 10^4$  CFU/ 100 ml. Na najudaljenijim postajama (M4, M5, V1, M6) nije zabilježena prisutnost bakterije *E. coli*. Srednja vrijednost iznosila je  $9,44 \cdot 10^3$  CFU/ 100 ml. Koncentracija bakterija ulaskom u morsku vodu se drastično smanjila (Slika 9.).





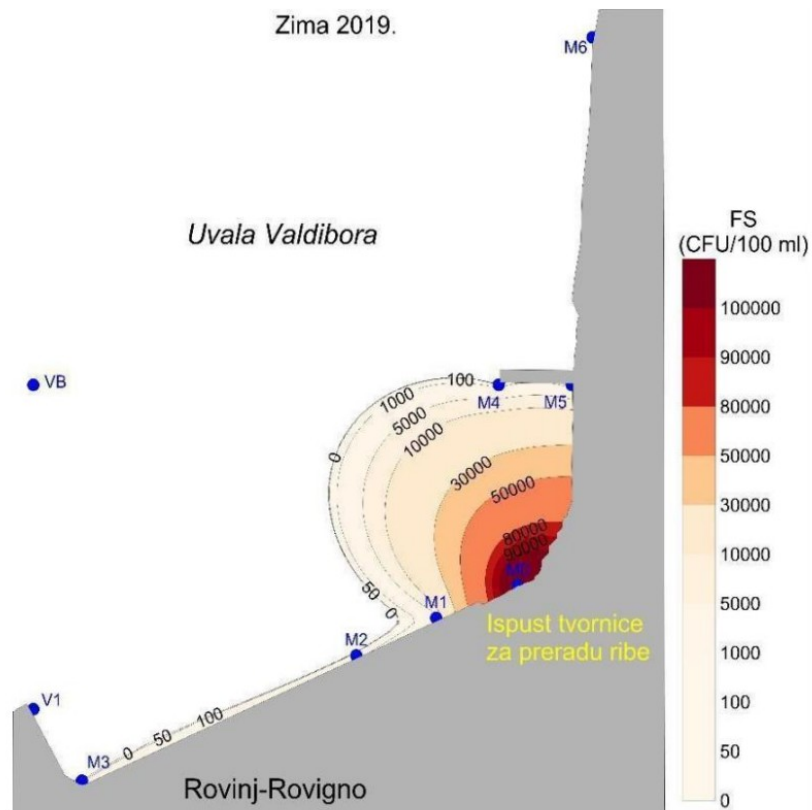
**Slika 9.** Raspodjela koncentracije *E. coli* za veljaču 2019.

Tijekom ljetnog uzorkovanja u kolovozu 2019. najveća koncentracija bakterija nalazila se na postaji M0 te je iznosila  $1,74 \cdot 10^5$  CFU/100 ml. Najniža koncentracija nalazila se na postaji M6 te je iznosila 0 CFU/100 ml. Srednja vrijednost iznosila je bila  $2,03 \cdot 10^4$  CFU/100 ml. Koncentracija bakterija je bila puno veća za vrijeme ljetnih mjeseci zbog povećane temperature mora, zagađivača i brodova koji pristaju u uvalu Valdibora (Slika 10.).



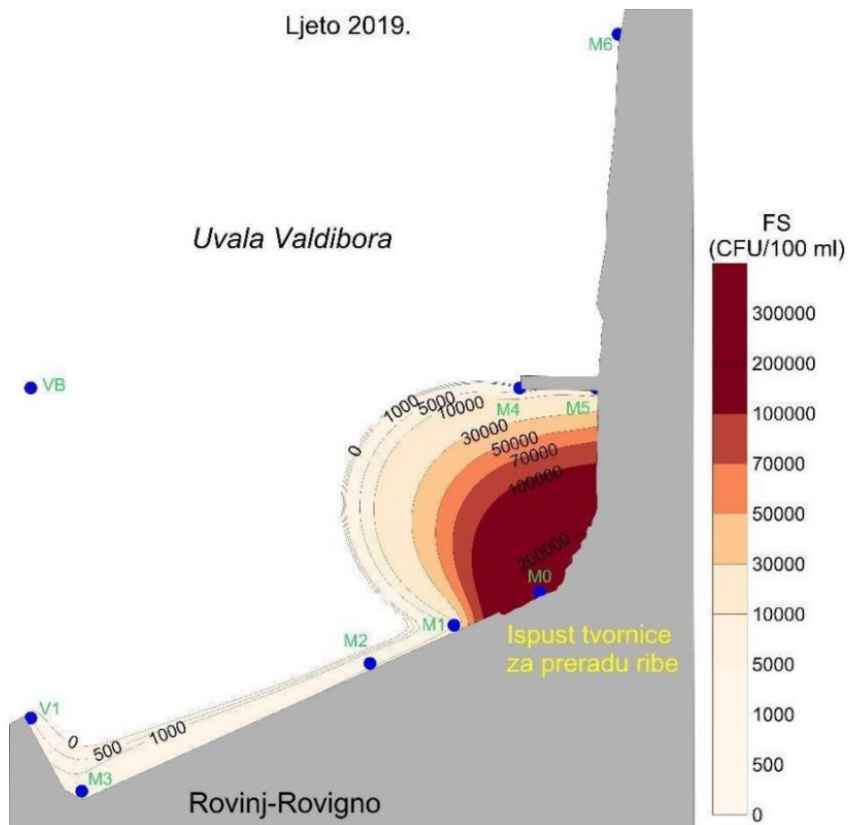
**Slika 10.** Raspodjela *E. coli* za kolovoz 2019.

Tijekom zimskog uzorkovanja u veljači 2019. koncentracija fekalnih streptokoka dosegla je svoj maksimum na postaji M0 te je iznosila  $1,27 \cdot 10^5$  CFU/100 ml. Najniža koncentracija nalazila se na području postaja M4, M5 i M6 te je tu koncentracija iznosila 0 CFU/100 ml. Prosječna koncentracija fekalnih streptokoka iznosila je  $1,43 \cdot 10^4$  CFU/100 ml (Slika 11.).



**Slika 11.** Raspodjela fekalnih streptokoka za veljaču 2019.

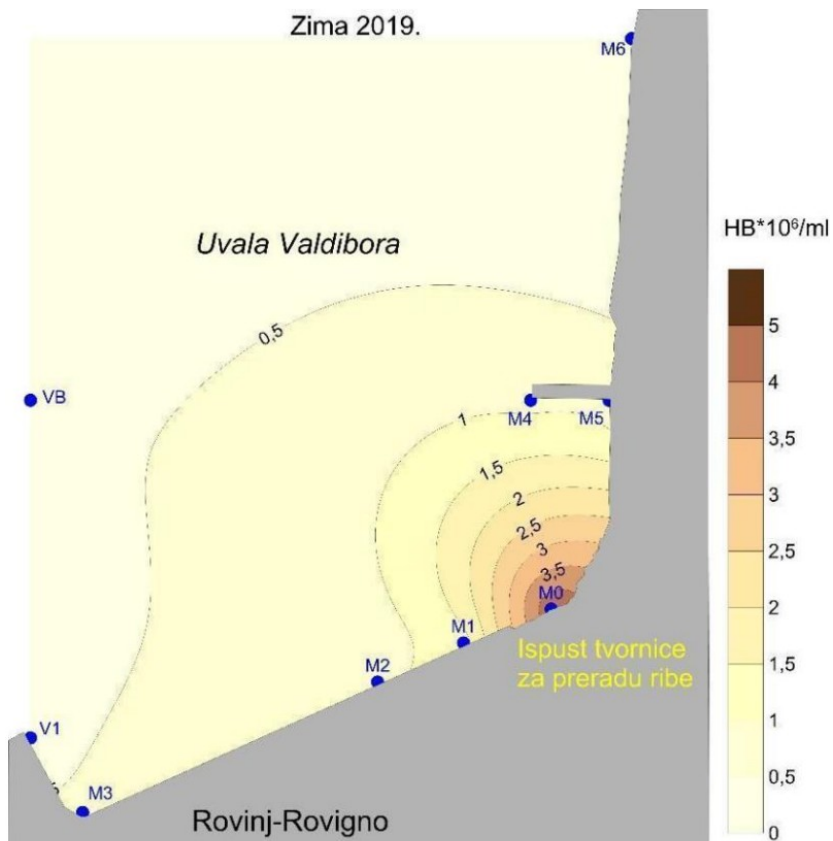
Tijekom ljetnog uzorkovanja u kolovozu 2019. koncentracija fekalnih streptokoka dosegla je ponovno svoj maksimum na području postaje M0, odnosno na području ispusta tvornice. Koncentracija je iznosila  $2,95 \cdot 10^5$  CFU/100 ml. Najniža koncentracija nalazila se na području M6 te je iznosila 12 CFU/100 ml. Srednja vrijednost koncentracije fekalnih streptokoka iznosila je  $3,41 \cdot 10^4$  CFU/100 ml što je znatno veći iznos nego tijekom zimskih mjeseci (Slika 12.).



Slika 12. Raspodjela fekalnih streptokoka za kolovoz 2019.

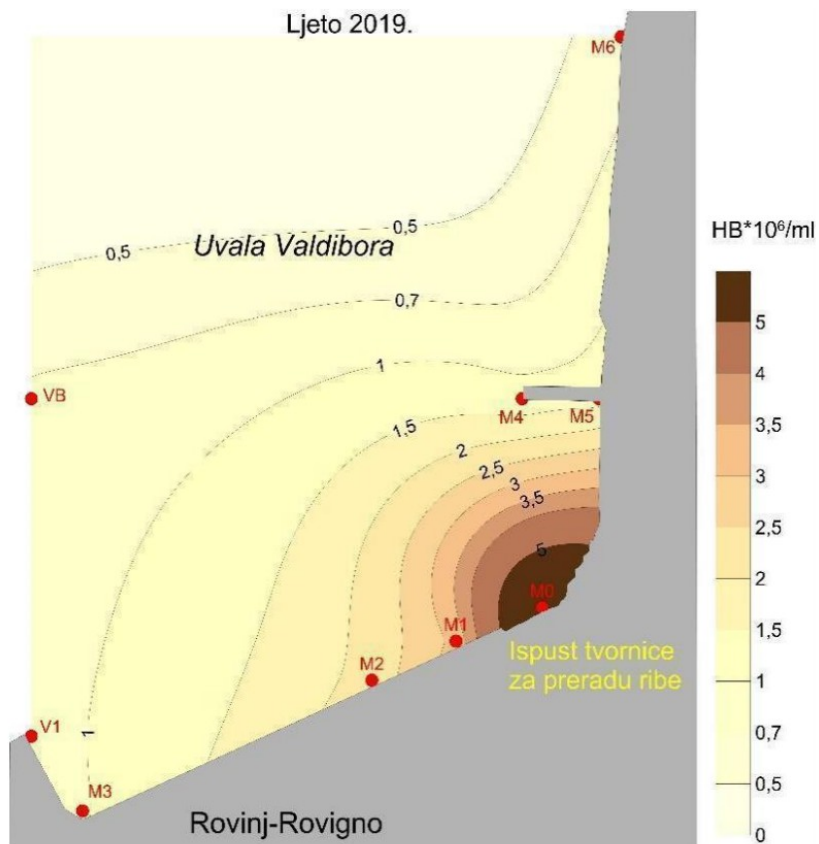
#### 6.4. Koncentracije bakterijskih zajednica

Koncentracija heterotrofnih bakterija (HB) za vrijeme zimskog uzorkovanja u veljači 2019. dosegla je svoj maksimum na postaji M0. Koncentracija na toj postaji iznosila je  $4,45 \cdot 10^6$  stanica/ml. Najmanja koncentracija bila je na postaji V1 te je iznosila  $0,41 \cdot 10^6$  stanica/ml. Prosječna vrijednost koncentracije HB iznosila je  $1,13 \cdot 10^6$  stanica/ml (Slika 13.).



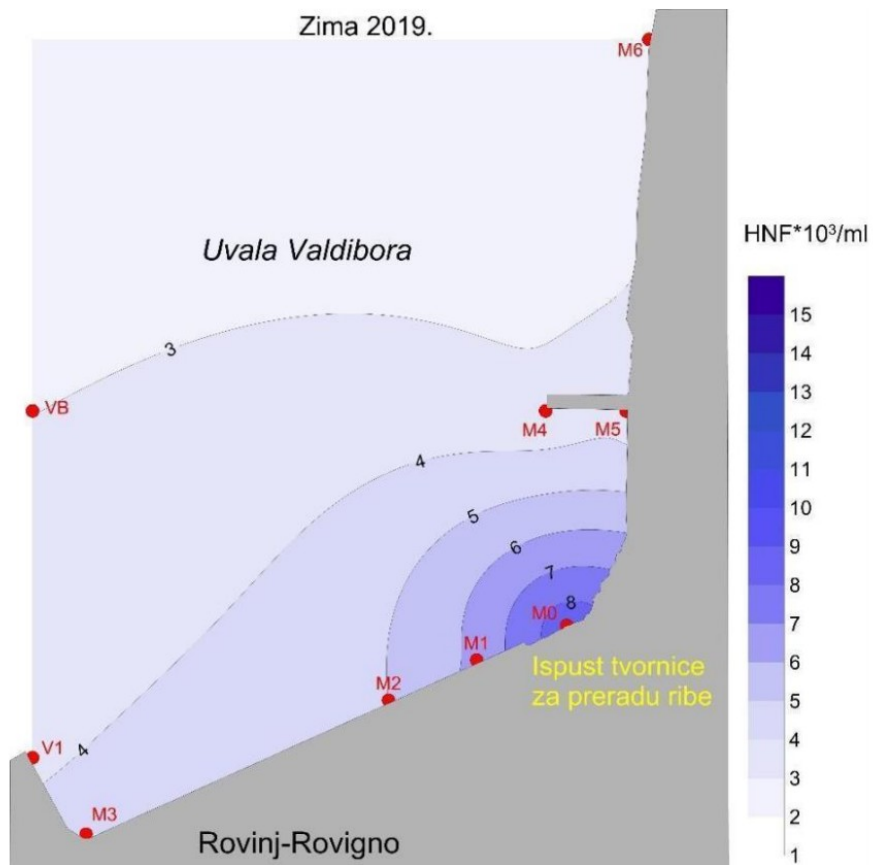
**Slika 13.** Raspodjela heterotrofnih bakterija za veljaču 2019.

Maksimalna koncentracija heterotrofnih bakterija za vrijeme ljetnog uzorkovanja u kolovozu 2019. bila je također na postaji M0 te je iznosila  $6,89 \cdot 10^6$  stanica/ml. Najmanja koncentracija nalazila se na postaji M6 i iznosila je  $0,69 \cdot 10^6$  stanica/ml. Prosječna vrijednost koncentracije heterotrofnih bakterija iznosila je  $1,99 \cdot 10^6$  stanica/ml (Slika 14.).



**Slika 14.** Raspodjela heterotrofnih bakterija za kolovoz 2019.

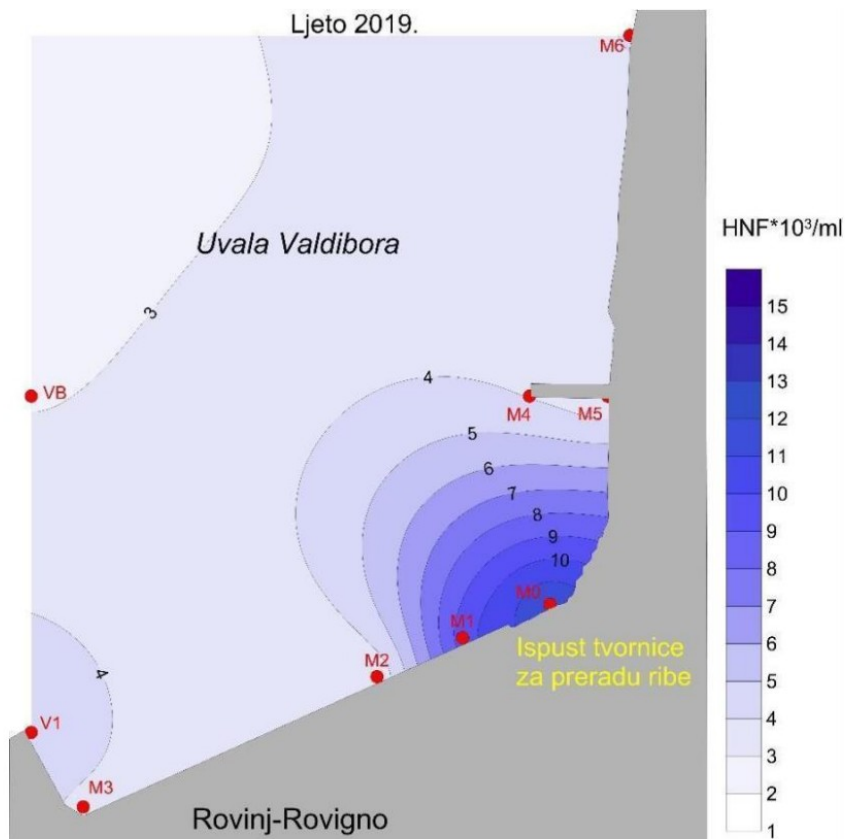
Koncentracija heterotrofnih nanoflagelata za vrijeme zimskog uzorkovanja svoj maksimum je dosegla na postaji M0 u iznosu  $8,75 \cdot 10^3$  stanica/ml. A minimum se nalazio na postajama VB i M6 u koncentraciji od  $2,99 \cdot 10^3$  stanica/ml. Srednja vrijednost koncentracije za heterotrofne nanoflagelate u veljači 2019. godine iznosila je  $4,48 \cdot 10^3$  stanica/ml (Slika 15.).



**Slika 15.** Raspodjela heterotrofnih nanoflagelata za veljaču 2019.

Za vrijeme uzorkovanja u ljetnom periodu koncentracija heterotrofnih nanoflagelata dosegla je svoj maksimum u uvali Valdibora na postaji M0, a koncentracija je iznosila  $12,00 \cdot 10^3$  stanica/ml. Najmanja koncentracija nalazila se na postaji VB u iznosu od  $2,93 \cdot 10^3$  stanica/ml. Prosječna koncentracija HNF-a za kolovoz 2019. iznosila je  $5,25 \cdot 10^3$  stanica/ml (Slika 16.).

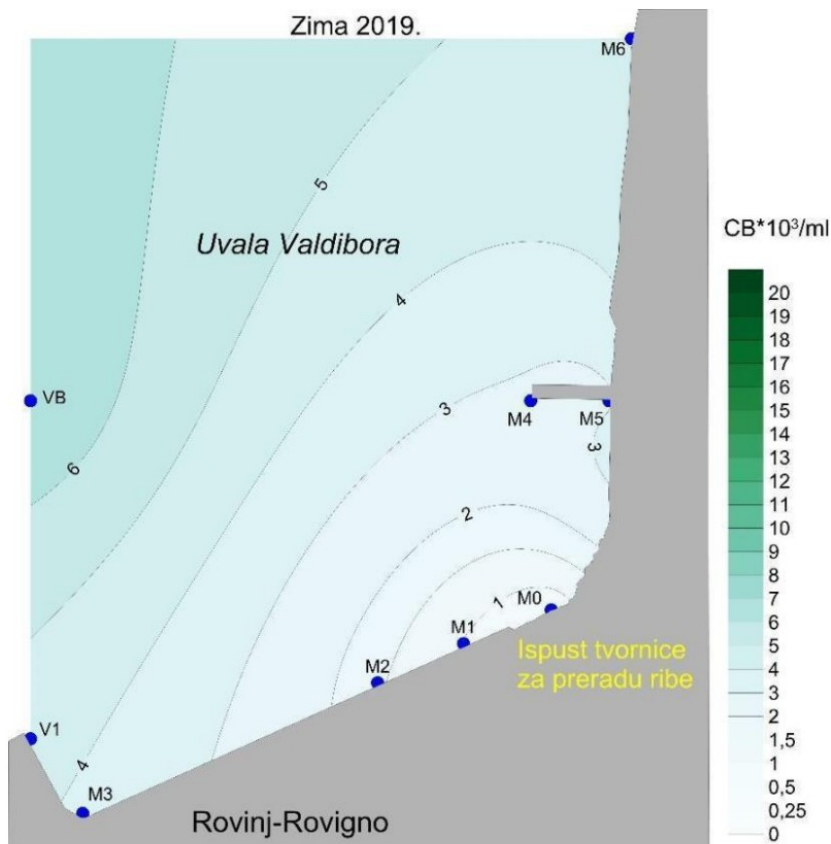




**Slika 16.** Raspodjela heterotrofnih nanoflagelata za kolovoz 2019.

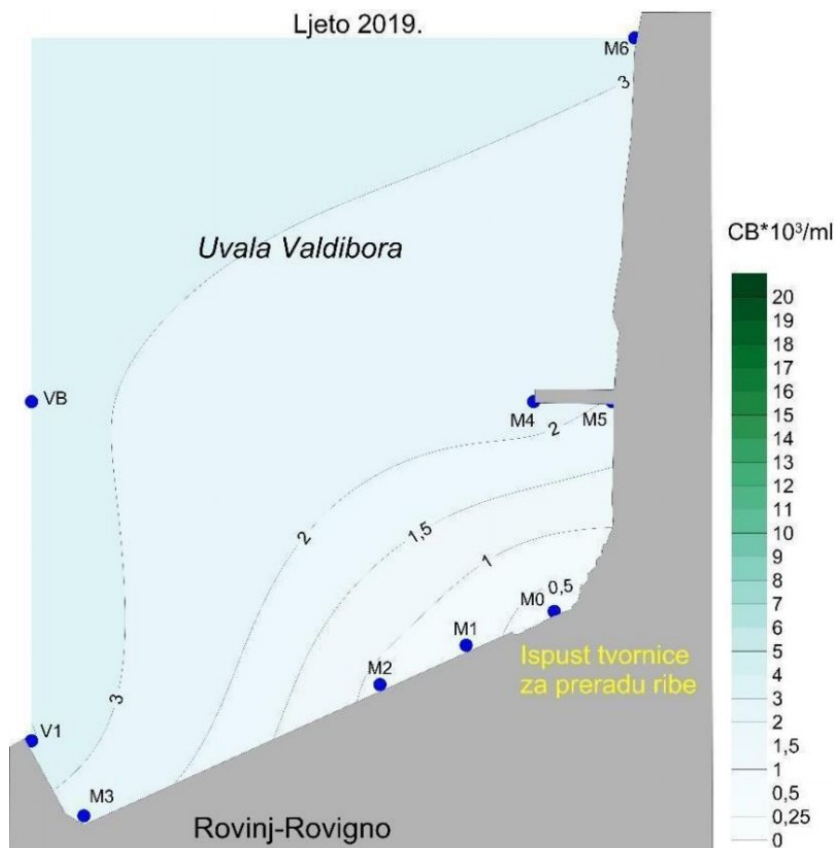
Koncentracija cijanobakterija za vrijeme zimskog uzorkovanja, u veljači, svoj maksimum dosegla je na postaji VB u iznosu od  $6,98 \cdot 10^3$  stanica/ml. Najmanja koncentracija nalazi se na postaji M0 te iznosi  $0,67 \cdot 10^3$  stanica/ml. Srednja vrijednost koncentracija iznosila je  $3,13 \cdot 10^3$  stanica/ml. Koncentracija cijanobakterija povećava se s obzirom na udaljenost od ispusta tvornice za preradu ribe (Slika 17.).





**Slika 17.** Raspodjela cijanobakterija za veljaču 2019.

Koncentracija cijanobakterija za kolovoz 2019. svoj maksimum dosegla je na području postaje V1, a minimum također na postaji M0 kod ispusta tvornice. Koncentracija na postaji M0 iznosila je  $0,24 \cdot 10^3$  stanica/ml. Prosječna vrijednost koncentracija cijanobakterija za ljetno uzorkovanje iznosila je  $2,06 \cdot 10^3$  stanica/ml. Također se koncentracija cijanobakterija pokazala je povećanje na većoj udaljenosti od tvorničkog ispusta (Slika 18.).

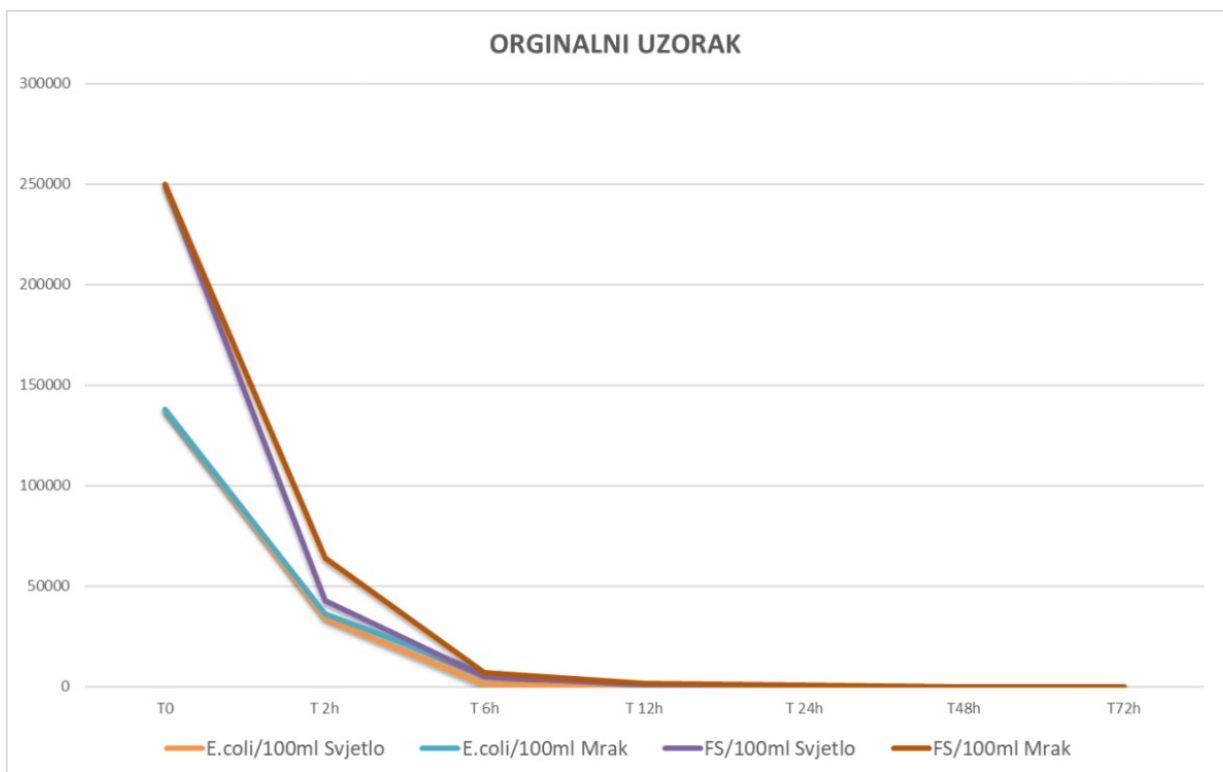


**Slika 18.** Raspodjela cijanobakterija za kolovoz 2019.

### 6.5. Vrijeme preživljavanja bakterijskih zajednica pod utjecajem industrijskog ispusta

Kod sva tri razrjeđenja opažen je značajan i brz pad koncentracije indikatorskih mikroorganizama u prvih par sati. Kod originalnog uzorka u početnom vremenu u mraku i na svjetlu koncentracija *E. coli* iznosila je 138000 CFU/100 ml, a zabilježen je nešto brži pad koncentracije kod bakterija izloženih svjetlu. Nakon 2h koncentracija bakterija na svjetlu se smanjila na 34000 CFU/100 ml, a u mraku na 36000 CFU/100 ml. Nakon 24 h inkubacije koncentracija *E. coli* iznosila je 19 CFU/100 ml na svjetlu, a u mraku 60 CFU/100 ml. Fekalni streptokoki su u početnom vremenu imali koncentraciju u iznosu od

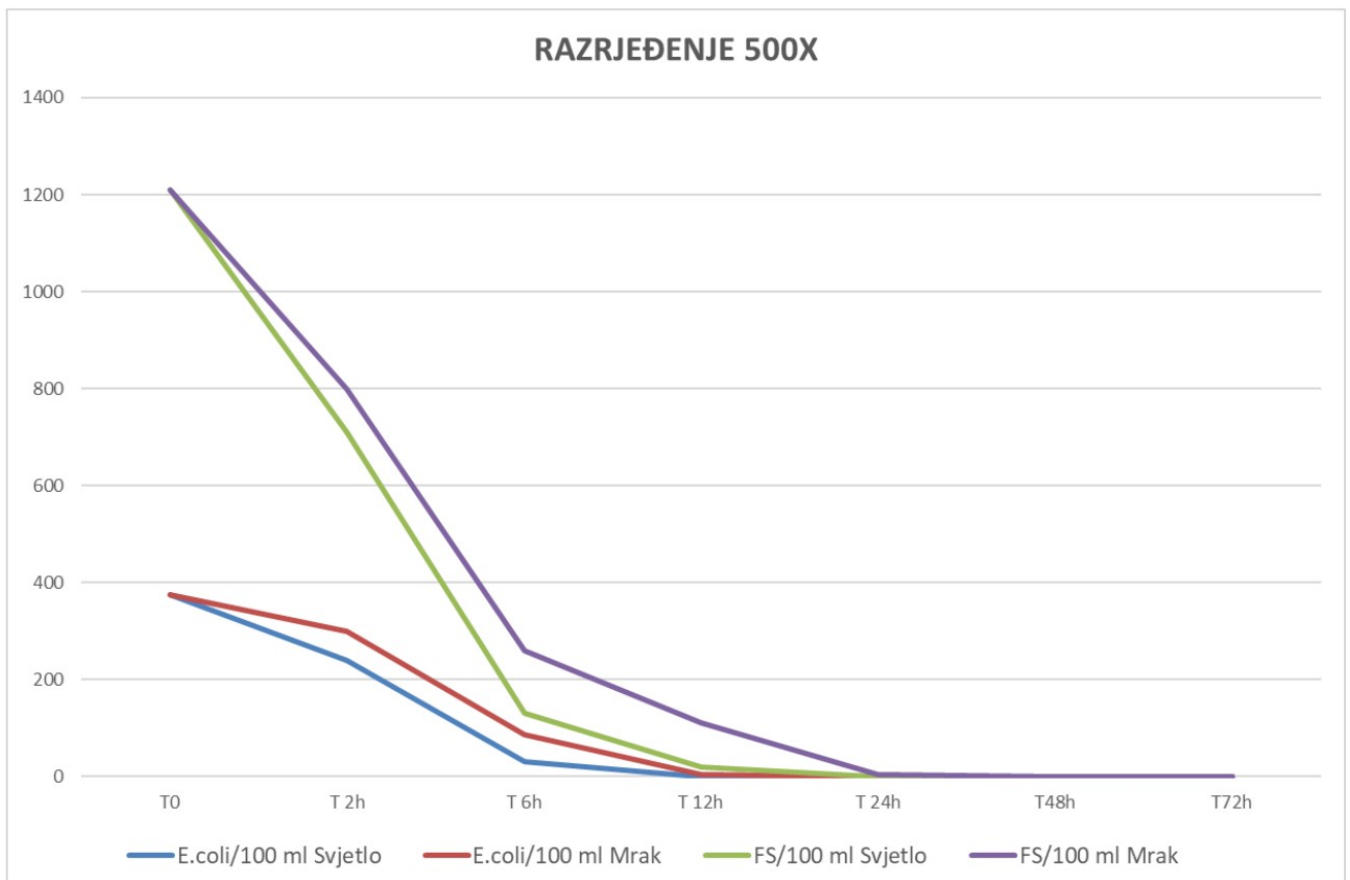
250000 CFU/100 ml, nakon 2h koncentracija bakterija na svjetlu se smanjila na 43000 CFU/100 ml, u mraku na 64000 CFU/100 ml. Nakon 24 h inkubacije koncentracija pada je na 170 CFU/100 ml na svjetlu i na 653 CFU/100 ml u mraku. Zadnji dan inkubacije (nakon 72h) bakterije *E. coli* na svjetlu i u mraku više nisu registrirane, a također niti fekalnih streptokoka na svjetlu više nema. U mraku zabilježena je samo jako niska koncentracija od 5 CFU/ 100 ml (Slika 19.).



**Slika 19.** Grafički prikaz opadanja bakterija na svjetlu i u mraku u originalnom uzorku

Kod razrjeđenja 500 puta također zabilježen je brzi pad u prvih par sati. Početna koncentracija *E. coli* na svjetlu i mraku iznosila je 376 CFU/ 100ml. Nakon 2h inkubiranja koncentracija izložena svjetlu smanjila se na 240 CFU/100 ml, a koncentracija inkubirana u mraku pala je na 300 CFU/100 ml. Fekalni streptokoki su početnu koncentraciju imali u

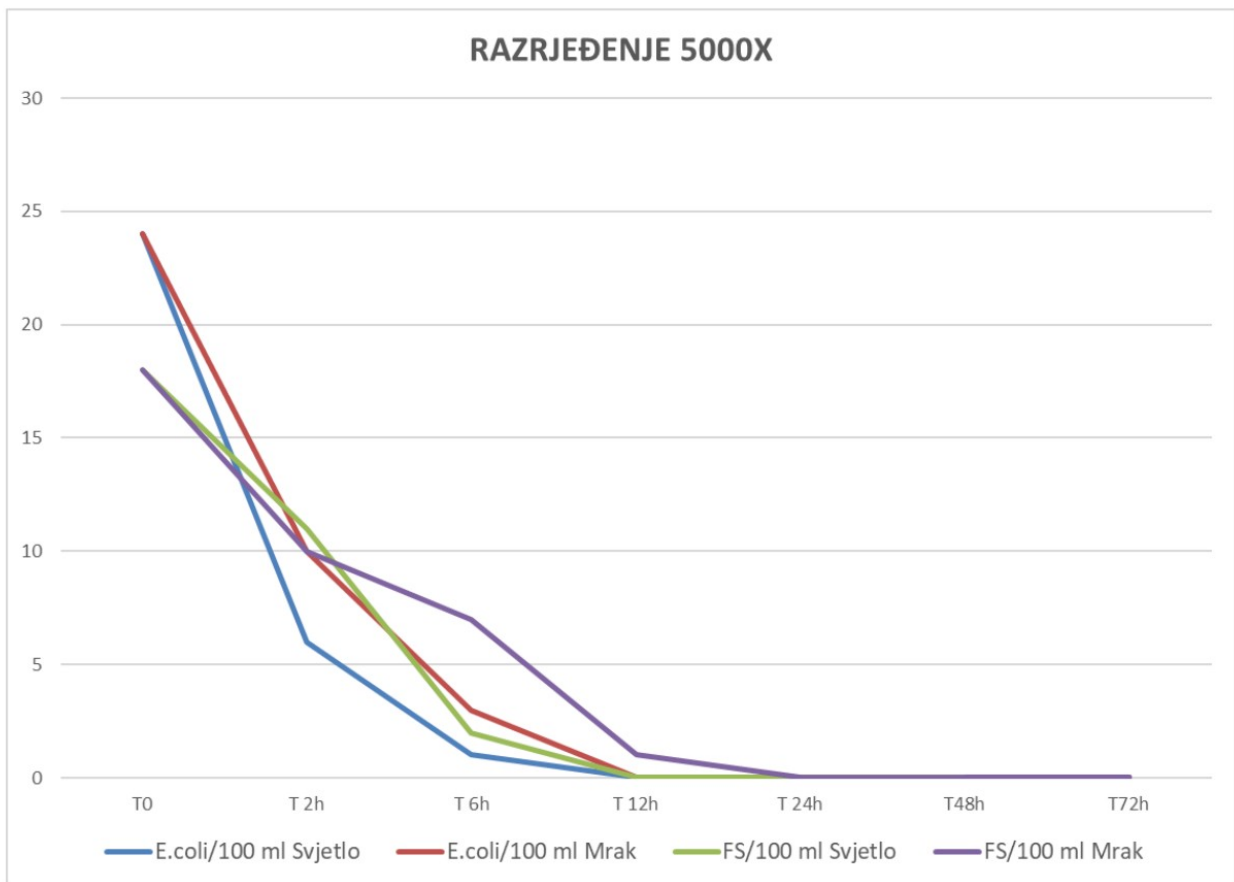
iznosu od 1210 CFU/100 ml. Nakon 2h inkubiranja koncentracija fekalnih streptokoka smanjila se na 710 CFU/100 ml na svjetlu i 800 CFU/100 ml u mraku. Već nakon 24 h inkubiranja *E. coli* nije registrirana na svjetlu i u mraku, fekalnih streptokoka inkubiranih na svjetlu također više nije bilo, a u mraku ih je bilo u koncentraciji od 4 CFU/100 ml. Zadnji dan (nakon 72h) obje skupine indikatora nisu izrasle (Slika 20.).



**Slika 20.** Grafički prikaz opadanja bakterija na svjetlu i u mraku za razrijeđenije od 500x

U razrjeđenju od 5000 puta početna koncentracija *E. coli* iznosila je 24 CFU/100ml na svjetlu i mraku. Nakon 2 h inkubiranja koncentracije se smanjuju na iznos od 6 CFU/100 ml na svjetlu i 10 CFU/100 ml u mraku. Nakon 12 h inkubiranja *E. coli* više nije

bilo moguće brojati. Koncentracija fekalnih streptokoka u početnom vremenu iznosila je 18 CFU/100 ml na svjetlu i mraku. Nakon 2 h inkubacije koncentracija se smanjuje na 11 CFU/100 ml na svjetlu i 10 CFU/100 ml u mraku. Nakon 12 h inkubacije bakterije više nije bilo moguće brojati na svjetlu, a u mraku koncentracija je iznosila 1 CFU/100 ml. Nakon 24 h fekalne streptokoke nije više bilo moguće brojati niti u mraku (Slika 21.).



**Slika 21.** Grafički prikaz opadanja bakterija na svjetlu i u mraku za razrijeđenje od 5000x

## 7. Rasprava

Na kvalitetu vode u uvali Valdibora utječu različiti kanalizacijski izvori kao što su ispusti otpadnih voda iz bolnice i bolničkog naselja, ispusti oborinskih voda grada iz kanala, nekoliko manjih kanalizacijskih ispusta na području starog grada, a najveća količina otpadnih voda dolazi iz ispusta tvornice za preradu ribe na jugoistočnom dijelu uvale. Utjecaj ispusta tvornice za preradu ribe je, osim vidljivih mrlja i neugodnog mirisa bio vidljiv na lokalne osnovne hidrografske uvjete mora. Temperatura mora u zimskom periodu u Rovinju prema podacima sa stranice Seawater Temperature za veljaču kreće se oko 10.7 °C (pristupljeno 26.8.2020). Usporedbom rezultata dobivenih istraživanjem temperatura u blizini ispusta tvornice za preradu ribe temperatura na tom području povišena je za 2 do 3 °C, a na postaji M0 koja se nalazi ispred ispusta povišena je za gotovo 4 °C te iznosi 14.5 °C. S obzirom na podatke vidljiv je utjecaj unosa toplije industrijske vode u moru. U ljetnim mjesecima također prema podacima sa stranice temperature u kolovozu kreću se u prosjeku oko 26.5 °C. Na postajama u blizini ispusta temperatura je niža za 1 do 2 °C, a ispred samog ispusta (M0) za gotovo 3 °C. Uočljiv utjecaj hladnije vode koja dolazi putem tvorničkog ispusta.

Prema podacima monitoringa (Paliaga i sur., 2015.) prosječna vrijednost saliniteta uvale Valdibora u zimskom periodu iznosi 37,4 psu na površinskom sloju. Usporedbom podataka uočljivo je da je na postaji M0 salinitet značajno niži te iznosi 33,7 psu. A na ostalim postajama salinitet varira između 37,1 i 37,4 psu. Tijekom ljetnog mjerenja prosječna vrijednost saliniteta iznosila je 35,1 psu, a značajno niži salinitet nalazio se također na postaji M0 te je iznosio 30,9 psu. Na ostalim postajama salinitet je varirao između 35,1 i 35,9 psu. Salinitet je najniži na samom ispustu tvornice za preradu ribe zbog unosa slatkovodne vodene mase koja iznosi oko  $20 \cdot 10^3 / \text{m}^3$  na mjesec (Djelatnik tvornice za preradu ribe, osobno priopćenje ).



Otpadne vode gradske i industrijske kanalizacije ulazeći u more bez ikakvog tretmana unose ostatke ribljeg i fekalnog materijala, a time i znatan broj alohtonih mikroorganizama i organske tvari (Paliaga i sur., 2015).

Prema Uredbi o kakvoći mora za kupanje (73/08) ocijenjena je sanitarna kakvoća mora na temelju brojnosti *E. coli* i crijevnih enterokoka, a granične vrijednosti se nalaze u Tablici 1.

Sanitarna kakvoća na postaji M0 i M1 nije zadovoljavajuća niti u ljetnom niti u zimskom periodu. Brojnost *E. coli* bakterija je iznad dopuštenih vrijednosti te voda nije pogodna za kupanje i druge aktivnosti na vodi. Tijekom ljetnog razdoblja samo postaje VB, V1 i M6. Postaja V1 (290 CFU/100 ml) ima zadovoljavajuću ocjenu, a VB (5 CFU/100 ml) i V1 (0 CFU/100 ml) izvrsnu. Nadalje, u zimskom periodu samo postaje M0 i M1 nemaju zadovoljavajuću ocjenu, postaja M2 (138 CFU/100 ml) ima zadovoljavajuću. Ostale postaje u zimskom periodu imaju izvrsnu ocjenu.

Obzirom na rezultate o fekalnim streptokokima u ljetnom periodu sve postaje osim postaje M6 imaju nezadovoljavajuću ocjenu. Postaja M6 (12 CFU/100 ml) ima izvrsnu ocjenu. Najveći broj fekalnih streptokoka nalazi se na postaji M0 ( $2,9 \cdot 10^5$  CFU/100 ml), odnosno na ispustu tvornice za preradu ribe. U zimskom periodu postaje M0, M1 i M2 imaju nezadovoljavajuću ocjenu, a ostale postaje imaju izvrsnu ocjenu.

Prema podacima i ocjenama očito je sanitarna kvaliteta vode lošija u ljetnom vremenskom periodu. Razlog tomu može biti pojačana industrijska aktivnost koja ovisi o ulovu i obradi plave ribe, povećanje aktivnosti sporednih ispusta koji nisu priključeni glavnoj gradskoj kanalizacijskoj tijekom turističke sezone, češći dolasci brodova u luku Valdibora te njihovih ispuštanja otpada (vode iz toaleta i ostaci hrane) u more.

U sjevernom Jadranu brojnosti bakterija u površinskom sloju mora variraju između  $0,23 \cdot 10^6$  i  $0,56 \cdot 10^6$  stanica/ml zimi, dok ljeti i u listopadu dostižu maksimalne vrijednosti preko  $10^6$  stanica/ml (Zaccone i sur., 2002). U zimskom i ljetnom periodu, u uvali Valdibora zabilježen je najveći broj heterotrofnih bakterija na području postaje M0 koji je



iznosio  $4,45 \cdot 10^6$  /ml zimi i  $6,89 \cdot 10^6$  /ml ljeti što je značajno veći broj u odnosu na uobičajene brojnosti u sjevernom Jadranu. Do takvog značajnog povećanja dolazi zbog ispusta iz tvornice. Brojnost heterotrofnih bakterija zimi se smanjuje i relativno je ravnomjerno raspoređena dužinom cijelog vodenog stupca. Zagrijavanjem morske vode, dolazi do postepenog rasta brojnosti bakterija, pogotovo u površinskom sloju. Osim na brojnost, temperatura utječe na stanične procese poput metabolizma i funkcije stanične membrane (Sović, 2016). Uspoređujući rezultate koncentracija s radovima kolegica Sović (zima) i Venier (ljetno) iz 2016. vidljivo je da je i tada na području postaje M0 kvaliteta vode nezadovoljavajuća. Koncentracija heterotrofnih bakterija zimi na postaji (M0) ispred tvornice za preradu ribe iznosila je 2016. godine  $1,10 \cdot 10^6$  /ml, a koncentracija 2019. godine iznosila je 4 puta više, odnosno  $4,45 \cdot 10^6$ /ml. Brojnost heterotrofnih bakterija bila je povećana ljeti kao što je i očekivano. Koncentracija heterotrofnih bakterija dobivene ljeti 2016. godine iznosila je  $3 \cdot 10^6$ /ml, a rezultati dobiveni 2019. godine iznose  $6,89 \cdot 10^6$ /ml što je 2 puta veći iznos. Usporedimo li vrijednosti dobivene u Tarskoj uvali na ušću rijeke Mirne u kolovozu 2016. godine iz rada kolege Ivana Kodele Pacentija vidljivo je da je na području ispusta tvornice Mirne preko 7x više heterotrofnih bakterija.

Najveća brojnost heterotrofnih nanoflagelata zabilježena je na područjima tvorničkog ispusta (M0) te su iznosile  $8,75 \cdot 10^3$ /ml zimi i ljeti  $12,00 \cdot 10^3$ /ml. Njihova brojnost bila je tijekom ljeta i zime veća od  $10^3$ /ml. Također koncentracija HNF-a bila je očekivano veća u ljetnom periodu zbog povećanog broja heterotrofnih bakterija iz razloga što se hrane njima.

Tijekom ljeta i zime koncentracija cijanobakterija na području postaje M0 je najniža što je suprotno heterotrofnim bakterijama i nanoflagelatima. Prosjek cijanobakterija je manji u ljetnom periodu nego u zimskom periodu. Njihova prostorna raspodjela ukazuje na smanjenu brojnost na područjima nižeg saliniteta. Cijanobakterije ne samo da rastu u slanim ekosustavima, već i poboljšavaju njihova fizičko-kemijska svojstva obogaćujući ih s ugljikom, dušikom i dostupnim fosforom. Povećani udio organske tvari u tlu zabilježen je u tlima gdje su bile dodane cijanobakterije (Aziz i Hashem, 2003). Također glavni razlog

zmanjene brojnosti na postajama bližima ispustu je i povećana količina suspendiranih masnih partikulata koji smanjuju prozirnost mora te time smanjuje mogućnost odvijanja fotosinteze.

Preživljavanje mikroorganizama koji u more dospijevaju putem otpadnih voda fekalnog porijekla općenito je relativno kratko. Većina je autora utvrdila da se njihovo vrijeme preživljavanja kreće u rasponu od nekoliko sati do nekoliko dana (Mitchell i Morris, 1969; Faust i sur., 1975; Fujioka i sur., 1981). Prema dobivenim rezultatima uočljivo je da fekalni streptokoki i *E. coli* u roku od 3 dana ugibaju. Uzroci njihovog relativno brzog ugibanja u morskoj vodi uključuju fizikalne čimbenike kao što su sunčeva radijacija (svjetlo) i temperatura; kemijske čimbenike kao što su salinitet, teški metali, pH i ksenobiotici; te biološke čimbenike kao što su predacija, parazitizam, virusna lizija stanica, te antibiotici i biotoksini koje proizvode drugi mikroorganizmi u moru (Krstulović i Šolić 2006). Također more je oligotrofni supstrat s malo hranjivih tvari pa i to ima ulogu u preživljavanju alohtonih mikroorganizama.

Sinergističko djelovanje više čimbenika kao što su temperatura, svjetlost i salinitet mogu imati značajan utjecaj na preživljavanje indikatora fekalnog onečišćenja. To su utvrdili Šolić i Krstulović (1992. , 1994). Prema dobivenim rezultatima očito je da su bakterije izložene svjetlu, promijenjenoj temperaturi i salinitetu ugibaju nešto brže nego bakterije izložene samo promijenjenoj temperaturi i salinitetu. Također kod većih razrjeđenja manja je koncentracija bakterija u početnom vremenu tako da dolazi do njihova smanjenja u kraćem roku. U kraćem roku sanitarna kakvoća mora bude bolja.

## 8. Zaključak

Na temelju ovog istraživanja i usporedbe s prethodnim studijama može se tvrditi da je more oko ispusta tvornice za preradu ribe već dugoročno jako onečišćeno otpadnim vodama koje sadrže izrazito visoke koncentracije fekalnih bakterija. Stoga, područje se ne može smatrati sigurnim za kupanje i rekreaciju. Dio suspendiranog masnog partikulata koji pluta na površini putem vjetra može dospjeti i na druge lokacije i najvjerojatnije donosi sa sobom potencijalne patogene bakterije koje mogu ugroziti ljudsko zdravlje i na udaljenijim lokacijama. Također treba skrenuti pažnju da nekolicina ljudi peca na tom području pa ukoliko riba nije termički dobro obrađena može doći do kontaminacije i otrovanja.

Utjecaj unošenja industrijskih otpadnih voda očituje se i na hidrografske uvjete u neposrednoj blizini ispusta i poremećuje prirodne uvjete mora.

Brojnost raznih komponenti morske mikrobna zajednica je, zbog unošenja velikih količina organskog materijala i izmijenjenih hidrografskih uvjeta znatno različita u odnosu na okolne lokacije koje nisu onečišćene.

Heterotrofne bakterije i njihovi predatori heterotrofni nanoflagelati bili su izuzetno brojni u vodi izloženoj industrijskom ispustu. Suprotno tome autotrofne cijanobakterije uglavnom zbog smanjenog prodiranja svjetla u onečišćenom moru pokazale su znatno smanjenje svoje abundancije. Iz navedenog može se zaključiti da je ispuštanje industrijskih otpadnih voda znatno poremetilo strukturu mikrobne zajednice u uvali Valdibora.

Eksperimentom o vremenu preživljavanja pokazalo se kako alohtone indikatorske bakterije dolaskom u more vrlo brzo smanjuju svoju brojnost zbog nagle promjene ekoloških uvjeta u staništ što označava da se potencijalna patogenost ispuštenih otpadnih voda drastično smanjuje u roku od nekoliko sati. Stoga, zahvaljujući kratkom preživljavanju i razrjeđenju u morskoj vodi, područje koje predstavlja ozbiljni sanitarni rizik ograničen je na neposrednu blizinu (od 100 do 300 m) oko ispusta.

Ugradnjom uređaja za pročišćavanje otpadnih voda tvornice za preradu ribe smanjila bi se količina masnoća i ostataka ribe u području oko ispusta tvornice. Također poboljšala bi se sanitarna kakvoća mora i smanjio antropogeni učinak na ekosustav. Istraživanjem je dokazano kako bi se u kratkom roku poboljšala kvaliteta. Uz takav pozitivan učinak bonus bi bio i estetski izgled te smanjen neugodan miris koji dočeka svakog posjetitelja Rovinja.

## 9. Literatura

**Bajić, I.** (2019) Dinamika hranjivih soli i mikrobne zajednice. Završni rad, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

**Google earth-** satelitska snimka područja istraživanja. Dostupno na: <https://www.google.hr/intl/hr/earth/>

**Javno zdravlje,** <https://javno-zdravlje.hr/e-coli-infekcije/> (pristupljeno 19.8.2020.)

**Kakvoća mora u Republici Hrvatskoj** (2019). ; Internet. Podaci dostupni na: [http://baltazar.izor.hr/plazepub/kakvoca\\_detalij10](http://baltazar.izor.hr/plazepub/kakvoca_detalij10) (pristupljeno 22. lipnja 2020.)

**Kodela, P. I.** (2020) Mikrobiološko stanje estuarija rijeke Mirne. Završni rad, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

**Kolarić, D.** (2019) Utjecaj *Escherichia coli* na preživljavanje i razmnožavanje *Francisella novicida* u vodi. Diplomski rad, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,

**Krstulović N., Šolić M.** (2006) Mikrobiologija mora, Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split; 81-84: 89-91; 197-259

**Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje** (2020) Otpadne vode (online). Podaci dostupni na: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=45899> (Pristupljeno 22. 6. 2020.)

**Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje.** (2020). Alohtona vrsta (online). Podaci dostupni na: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=1928> (Pristupljeno 16. 8. 2020.)

**Ministarstvo zaštite okoliša i energetike, Uprava za klimatske aktivnosti, održivi razvoj i zaštitu zraka, tla i od svjetlosnog onečišćenja, Služba za zaštitu mora i priobalja** (2017) Nacionalno izvješće o godišnjoj i konačnoj ocjeni kakvoće mora na plažama hrvatskog Jadrana u 2017. godini. Podaci dostupni na: [https://mzoe.gov.hr/UserDocImages/Uprava\\_vodnoga\\_gospodarstva\\_i\\_zast\\_mora/More\\_za\\_kupanje/Nacionalno\\_izvjesce\\_o\\_kakvoci\\_mora\\_na\\_plazama\\_hrvatskog\\_Jadrana\\_u\\_2017..pdf](https://mzoe.gov.hr/UserDocImages/Uprava_vodnoga_gospodarstva_i_zast_mora/More_za_kupanje/Nacionalno_izvjesce_o_kakvoci_mora_na_plazama_hrvatskog_Jadrana_u_2017..pdf)

**Narodne novine, 2008.** Uredba o kakvoći mora za kupanje, Narodne novine d.d., 73/2008., Internet, podaci dostupni na; [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008\\_06\\_73\\_2426.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_06_73_2426.html) (pristupljeno 22. lipnja i 27. kolovoza 2020.)

**Paliaga P., Najdek Dragić, M., Ivančić, I., Iveša, L.J., Felja, I., Ušić, U., Matošević, K.** (2015) Studija utjecaja otpadnih voda grada Rovinja i tvornice za Preradu ribe "Mirna" na akvatorij sjeverne luke Rovinja (uvala Valdibora), Institut Ruđera Boškovića Rovinj; istraživanje

**Pera, K.** (2016) Preživljavanje alohtonih mikroorganizama u morskom okolišu. Završni rad, Sveučilište u Splitu

**Plešić, M.** (2016) Cijanobakterije kao ubikvisti. Završni rad, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku



**Vukušić, M.** (2020) Mikrobiološka analiza iz Riječke luke i ušća Rječine. Završni rad. Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

**Seawater temperature** , Temperature mora u svijetu ; Internet. Podaci dostupni na <https://www.seatemperature.org/europe/croatia/rovinj.htm> (pristupljeno 26. kolovoza 2020.)

**Sović, T.** (2017) Procjena mikrobiološkog stanja mora priobalja zapadne Istre. Završni rad, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

**Tophøj J., Dam Wollenberg R., Sondergaard T. E., Eriksen N. T.** (2018) Feeding and growth of the marine heterotrophic nanoflagellates, *Procyptobia sorokini* and *Paraphysomonas imperforata* on a bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. with an inducible defence against grazing. Journals Plos One (online), 13(4): 1-13. Podaci dostupni na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0195935> (Pristupljeno 16. kolovoza 2020.)

**Venier, R.** (2016) Struktura mikrobne zajednice u Uvali Valdibora. Završni rad, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

**Zaccone R., Caruso G., Cali C.** (2002) Heterotrophic bacteria in the northern Adriatic Sea: seasonal changes and ectoenzyme profile. Science direct (online); 1-19



**W.F. Vincent, in Encyclopedia of Inland Waters** (2009) Cyanobacteria. Science direct (online). Podaci dostupni na: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/cyanobacteria> (Pristupljeno 16. Kolovoza 2020.)

## Prilog

Tablica 1. Rezultati uzorkovanja u veljači 2019. Izmjerene vrijednosti *E. coli*, fekalnih streptokoka (FS), heterotrofnih bakterija (HB), heterotrofnih nanoflagelata(HNF), cijanobakterija (CB), temperature (T) i saliniteta (S)

Postaja	E.coli (CFU/100 ml)	FS (CFU/100 ml)	HB*10 <sup>6</sup> /ml	HNF*10 <sup>3</sup> /ml	CB*10 <sup>3</sup> /ml	T	S
M0	83567	127644	4,45	8,75	0,67	14,5	33,7
M1	1260	2190	1,27	6,24	0,98	12,7	37,1
M2	138	405	0,83	5,00	1,56	12,4	37,2
M3	2	3	0,53	4,21	3,83	12,2	37,3
M4	0	0	0,87	3,19	2,83	12,5	37,2
M5	0	0	0,85	3,88	2,44	12,6	37,2
VB	2	3	0,49	2,99	6,98	12,3	37,4
V1	0	2	0,41	3,12	5,21	12,2	37,2
M6	0	0	0,44	2,99	4,67	12,6	37,1

Tablica 2. Rezultati uzorkovanja tijekom kolovoza 2019. Izmjerene vrijednosti *E. coli*, fekalnih streptokoka (FS), heterotrofnih bakterija (HB), heterotrofnih nanoflagelata (HNF), cijanobakterija (CB), temperature (T) i saliniteta (S)

Postaja	E.coli (CFU/100 ml)	FS (CFU/100 ml)	HB*10 <sup>6</sup> /ml	HNF*10 <sup>3</sup> /ml	CB*10 <sup>3</sup> /ml	T	S
M0	174990	294263	6,89	12,00	0,24	23,8	30,9
M1	3709	4008	3,15	9,62	0,69	24,5	35,2
M2	2010	3894	2,20	3,03	0,87	25,6	35,8
M3	702	1919	0,97	3,73	2,10	25,7	35,7
M4	1090	938	1,18	3,94	2,33	25,6	35,7
M5	651	981	1,31	3,08	1,97	25,7	35,7
VB	5	318	0,74	2,93	3,15	25,7	35,9
V1	290	560	0,91	4,89	4,09	25,8	35,9
M6	0	12	0,60	4,06	3,10	25,5	35,6

Tablica 3. Rezultati vremena preživljavanja bakterijskih kolonija pod utjecajem industrijskog ispusta za *E.coli* i fekalne streptokoke pod utjecajem svjetla i mraka.

	<b>M0</b>				<b>M1 (R 500)</b>				<b>M2 (R5000)</b>			
	E. coli/100 ml		FS/100 ml		E. coli/100 ml		FS/100 ml		E. coli/100 ml		FS/100 ml	
	Svjetlo	Mrak	Svjetlo	Mrak	Svjetlo	Mrak	Svjetlo	Mrak	Svjetlo	Mrak	Svjetlo	Mrak
T0	138000	138000	250000	250000	376	376	1210	1210	24	24	18	18
T 2h	34000	36000	43000	64000	240	300	710	800	6	10	11	10
T 6h	1100	7000	5000	6900	30	87	130	260	1	3	2	7
T 12h	120	380	930	1810	0	5	20	110	0	0	0	1
T 24h	19	60	170	653	0	0	0	4	0	0	0	0
T48h	0	2	21	63	0	0	0	0	0	0	0	0
T72h	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0