

Original Research

Mikrobna obremenitev morske vode in peska na plaži med kopalno sezono

Jerneja Čremožnik Zupančič^{1*}, Monika Novak Babič^{1*}

Povzetek

Slovenija je ena od najbolj vodnatih evropskih držav, kjer je voda pomembna ne le za pitje, ampak tudi za različne rekreacijske dejavnosti, še posebej plavanje. Naravne rekreacijske morske vode so pomembno okolje, v katerem so kopalci izpostavljeni bakterijam, ki so odporne proti protimikrobnim učinkovinam ter številnim vrstam gliv. Poleg morske vode ljudje veliko časa preživijo tudi na obmorskih površinah (plaža s peskom) za katere se ne izvaja mikrobiološki monitoring. Da bi določili mikrobiološko obremenitev morske vode in peska na plaži, smo tekom kopalne sezone analizirali prisotnost bakterije *Escherichia coli* in oportuno patogenih gliv, ki se prenašajo preko človeka. *E. coli* je bila prisotna le v morski vodi znotraj dovoljenih meja čez celo kopalno sezono, z največjo frekvenco v avgustu. Poleg okoljskih sevov smo zaznali tudi seve iz skupine B2, seve s povečano zmožnostjo adhezije in sistemov za privzem železa ter seve z geni za odpornost proti antibiotikom iz skupin fluorokinolonov in beta-laktamov. Gliv v vodi tekom kopalne sezone z uporabljenimi metodami nismo osamili. V nasprotju pa smo v pesku na plaži zasledili glive *Candida parapsilosis*, *Geotrichum candidum* in *Trichosporon asahii*, ki so del kožne mikrobiote ljudi. Število *E. coli* v morski vodi in gliv v pesku je naraščalo s številom kopalcev in je doseglo vrh v avgustovskem vzorcu. Glede na dobljene rezultate je *E. coli* primeren parameter za spremljanje kakovosti morske vode medtem ko bi za spremljanje kakovosti peska na plaži lahko kot dodatni parameter uporabljali določene vrste gliv antropogenega izvora.

Ključne besede

pesek, *Escherichia coli*, glive, zdravje, indikatorji, morska voda, mestna plaža

¹ Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, 1000 Ljubljana, Slovenia

* Corresponding author:

E-mail address: jerneja.zupancic@bf.uni-lj.si

Citation: Čremožnik Zupančič, J., Novak Babič, M. (2024). Mikrobna obremenitev morske vode in peska na plaži med kopalno sezono. *Acta Biologica Slovenica* 67 (2)

<https://doi.org/10.14720/abs.67.2.19186>

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY SA) license

Microbial burden of seawater and beach sand during bathing season

Abstract

Slovenia is one of the most water-rich countries in Europe, where water is important not only as drinking water but also for various recreational activities, especially swimming. Natural marine waters are an important environment where swimmers are exposed to resistant bacteria and also fungi. In addition to seawater, people spend a lot of time on sandy beaches, that are currently not microbiologically monitored. To determine the microbiological burden of seawater and beach sand during the bathing season, we analyzed the presence of bacteria *Escherichia coli* and opportunistic pathogenic fungi transmitted by humans. *E. coli* was present in seawater only within the permissible limits throughout the bathing season, with the highest incidence in August. Besides environmental strains, strains of the B2 phylogenetic group, strains with increased adhesion and iron uptake systems, and strains with genes for resistance to antibiotics from the fluoroquinolone and beta-lactam groups were also detected. With the method used, we were unable to isolate any fungi in the water during the bathing season. On the contrary, we found human-transmitted fungal species *Candida parapsilosis*, *Geotrichum candidum*, and *Trichosporon asahii* in the beach sand. The number of *E. coli* in the seawater and fungi in the sand increased with the number of bathers, both reaching a peak in the August sample. According to the results, *E. coli* is a suitable parameter for monitoring seawater quality, while certain types of human-related fungi could be used as an additional parameter for monitoring beach sand quality.

Keywords

beach sand, *Escherichia coli*, fungi, health, indicators, seawater, urban beach

Uvod

V poletnem času številni obiskovalci uporabljajo morske kopalne vode in njihova obrežja za oddih in rekreacijo. Kopenje v površinskih vodah pa lahko predstavlja nevarnost za zdravje ljudi zaradi morebitne fizikalno-kemijske, predvsem pa mikrobiološke onesnaženosti vode (npr. komunalni izpusti, izplake iz živinoreje, spiranje površin) (NIJZ, 2020). Leta 2003 je Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) objavila smernice za varno uporabo kopalne vode, tudi s priporočilom sledenja kakovosti obalnega peska, na katerem se zadržujejo ljudje (WHO, 2003). Tudi Evropska Direktiva o kopalnih vodah (2006/7/ES) v glavnem temelji na sledenju tradicionalnih fekalnih parametrov, kot so število enterokokov in *Escherichia coli*, ki so najpogosteje povezani s pojavom bolezni pri človeku po kopanju v naravnih kopalnih vodah (EEU, 2006). Vzroki fekalnega onesnaženja kopalnih voda so lahko točkovni ali razpršeni viri (Buer in sod., 2018; Kataržyté in sod., 2018). Točkovne vire je lažje izslediti in so običajno posledica enkratnega dogodka izpusta fekalij, medtem ko ima razpršeno onesnaženje običajno več bioloških in geografskih izvorov in je zato težje obvladljivo. K razpršenemu onesnaženju

prispevajo padavinsko spiranje okoliške prsti, lokalni manjši vodotoki ter prisotnost divjih in domačih živali (Brandão in sod., 2021). Poleg sledenja teh pa direktiva v 6. členu poziva k izvajanju „profila kopalnih voda“, s čemer bi identificirali in ocenili različne (ne le fekalne) vzroke onesnaženja, ki vplivajo na kakovost kopalne vode in zdravje kopalcev (EEU, 2006). Zaradi globalnega segrevanja, podnebnih sprememb, hitro rastoče človeške populacije in razvoja odpornosti proti antimikrobnim učinkovinam se v okolju pojavljajo tudi novi viri onesnaženja in potreba po sledenju drugim mikroorganizmom, ne le fekalnim indikatorjem (Weiskerger in sod., 2020), še posebej *E. coli*.

Kot mogoč parameter prihodnosti sledenja kakovosti kopalne vode in obalnega peska se v zadnjih nekaj letih omenjajo tudi glive. Pomen sledenja prisotnosti gliv in spreminjanja njihovega števila v morju in obalnem pesku je vezan na občutno povečanje glivnih bolezni kot so alergije, astma, dermatomikoze, sinusitis, otitis, micetomi in sistemske infekcije v svetu (de Hoog in sod., 2020) ter naraščajočo odpornostjo na protiglivne učinkovine v antimikotikih (WHO, 2022). Po dosedanjih podatkih se v morski vodi najpogosteje pojavljajo *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Cystofilobasidium*,

Didymella, *Exophiala*, *Hortaea*, *Meyerozyma*, *Penicillium*, *Rhodotorula* in *Wallemia* (Solo-Gabriele in sod., 2016; Brandão in sod., 2021; Novak Babič in sod., 2022; Cogliati in sod., 2023). Iz peska pa so bile najpogosteje osamljene filamentozne glive *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Chrysosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scedosporium*, *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Stachybotrys* in *Trichophyton*, ki so običajno prevladovala nad kvasovkami in kvasovkam podobnimi glivami iz rodov *Aureobasidium*, *Candida*, *Geotrichum*, *Exophiala*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula* in *Yarrowia* (Solo-Gabriele in sod., 2016; Brandão in sod., 2021; Novak Babič in sod., 2022; Cogliati in sod., 2023). Prisotnost gliv je v veliki meri odvisna od vremenskih razmer, vodnih tokov, prisotnosti ljudi in živali in nenadnih, enkratnih dogodkov kot so poplave, potresi ali onesnaženje z nafto in njenimi derivati (Solo-Gabriele in sod., 2016; Romão in sod., 2015; Brandão in sod., 2021; Novak Babič in sod., 2022; Cogliati in sod., 2023).

Čeprav je prisotnost gliv v pesku plaž in v morju pogosto dokumentirana pa trenutno ni dovolj podatkov o glivnih skupinah, ki bi jih lahko uporabili kot kazalnike za sledenje različnim virom onesnaženja in tako tudi ni vzpostavljenega enotnega monitoringa za te mikroorganizme (Novak Babič in sod., 2022). Kot del iniciative »Mycosands«, smo zato v študiji želeli opredeliti pojav gliv in njihovo pogostost v pesku in morju v času kopalne sezone, hkrati pa smo spremljali tudi pojav in število *Escherichia coli* kot redno spremljan parameter fekalnega onesnaženja v kopalnih vodah. Poleg tega nas je zanimala tudi genotipska raznolikost izoliranih bakterij *E. coli* in njihov pripadajoči virulentni potencial.

Material in metode

Vzorčenje peska in morske vode

Vzorčenje peska in morske vode smo izvedli v letu 2022 v času kopalne sezone na Centralni plaži v Portorožu (Slovenija) v okviru širše evropske pobude "Mycosands II". Centralna plaža Portorož je nastala umetno in je zaradi svoje lege v središču urbanega okolja ena najbolj priljubljenih plaž v Sloveniji. Pesek je med kopalno sezono (od junija do septembra) vsakodnevno čiščen in mehansko prezračevan. Plaža redno prejema Modro Zastavo - certifikat kakovosti za čisto, varno in uporabniku prijazno plažo. Vzorčenje peska in morske vode je potekalo v kopalni sezoni, enkrat mesečno, od junija do septembra 2022 med 9. in 10. uro

dopoldan. Pesek smo vsakič vzorčili na petih točkah plaže, na robovih in na sredini, na globini 5 - 10 cm. Vzorce smo aseptično zbrali v sterilne 50 ml centrifugirke.

Morsko vodo smo vzorčili na pomolu nasproti plaže na globini 20 cm v vodnem stolpcu ~1 m. Vzorce morske vode smo aseptično zbirali v sterilne 500 ml posode (Golias, Slovenija). Vsi vzorci so bili označeni in v 2 urah po vzorčenju prepeljani v laboratorij v hladnih pogojih, po vzoru Sabino in sodelavcev (2011).

Izolacija čistih glivnih kultur in trajno shranjevanje

V sterilne erlenmajerice smo zatehtali 40 g peska in nato dodali 40 ml sterilne destilirane vode (dH₂O). Glive smo is peska sprali s stresanjem pri 100 obratih na minuto, 30 minut. Po 200 in 100 µl suspenzije smo v treh ponovitvah konfluentno nacepili na Sabouraudov dekstrozni agar (SDA) (Biolife, Italija) in Mycosel agar (Becton Dickinson, Nemčija) z dodatkom cikloheksimida in kloramfenikola. Plošče smo nato inkubirali pri 30 in 37 °C, 5 - 7 dni (SDA) in do 21 dni (Mycosel). Enak postopek izolacije je bil uporabljen tudi za vzorce morske vode (Sabino in sod., 2011). Po inkubaciji smo prešteli morfološko enake kolonije in izračunali enote, ki tvorijo kolonije (CFU) v gramu peska in litru morske vode in jih podali kot povprečno vrednost triplikatov. Vsako od morfološko različnih kolonij gliv smo nato prenesli na svežo SDA ali Mycosel ploščo in inkubirali 5 - 20 dni do vidne rasti. Vse čiste kulture so bile trajno shranjene v zbirki ekstremofilnih mikroorganizmov Ex Infrastrukturnega centra Mycosmo, MRIC UL, Slovenija (<http://www.ex-genebank.com/>), na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Izolacija DNA in molekularno-genetska identifikacija izoliranih gliv

Čiste kulture gliv smo gojili na ploščah SDA ali Mycosel pri 25 °C, do vidne rasti. DNA nitastih gliv smo ekstrahirali po protokolu Van den Ende in de Hoog-a (1999) z mehansko lizo in ekstrakcijo s kloroformom. Kvasovke smo gojili na SDA pri 25 °C, 3 dni, nato pa DNA ekstrahirali z reagentom PrepMan Ultra (Applied Biosystems, Foster City, ZDA) po priloženih navodilih proizvajalca. Dobljene vzorce DNA smo shranili pri -20 °C.

Glive smo grobo identificirali z opazovanjem njihovih makro- in mikromorfoloških značilnosti. V skladu s tem smo

v nadaljevanju izvedli identifikacijo nitastih gliv na podlagi nukleotidnih sekvenc rDNA bodisi dela gena za aktin (*act*) (rod *Cladosporium*), dela gena za beta-tubulin (*benA*) (rodova *Aspergillus* in *Penicillium*), dela gena za translacijski elongacijski faktor 1-alfa (*tef*) (rod *Fusarium*) in celotno regijo notranjega distančnika (ITS = ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) (vse ostale nitaste glive). Identifikacija kvasovk je potekala na podlagi DNA nukleotidnih zaporedij velike podenote ribosoma (LSU = delna 28S rDNA, domene D1/D2). Pri analizah smo uporabili sledeče oligonukleotidne začetnike: ACT-512F in ACT-783R (*act*) (Carbone in Kohn, 1999), Bt2a in Bt2b (*benA*) (Glass in Donaldson, 1995), EF1 in EF2 (*tef*) (O'Donnell in sod., 1998), ITS5 in ITS4 (ITS) (White in sod., 1990) ter NL1 in NL4 (LSU) (Boekhout in Kurtzman, 1996).

Določevanje nukleotidnega zaporedja je bilo izvedeno pri Microsynth AG, Avstrija. Zaporedja so bila nato pregledana s programsko opremo FinchTV 1.4 (Geospiza, Perkin-Elmer Inc., Seattle, ZDA) in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) različica 7.0 (Kumar in sod., 2016).

Identifikacija nukleotidnih zaporedij je bila izvedena z algoritmom BLAST na spletni strani NCBI (Altschul in sod., 1990) in primerjana s tipskimi sevi iz taksonomskih baz podatkov, kot sta Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Utrecht, Nizozemska) in Index Fungorum (www.indexfungorum.org). Sekvence sevov so deponirane v bazi podatkov zbirke Ex Infrastrukturnega centra Mycosmo (<http://www.ex-genebank.com/>).

Izolacija, identifikacija in karakterizacija sevov bakterijske vrste *E. coli*

Za osamitev bakterijske vrste *E. coli* iz peska smo se poslužili enakega postopka, opisanega pri izolaciji gliv iz peska. Na kratko, v sterilne erlenmajerice smo zatehtali 40 g peska in nato dodali 40 ml sterilne destilirane vode (dH₂O). Celokupne bakterije smo iz peska sprali s stresanjem pri 100 obratih na minuto, 30 minut. Po 50 µl suspenzije smo v treh ponovitvah konfluentno nacepili na gojišče UriSelect (UriSelect™ 4 Medium, BioRaD, FRA). Plošče smo inkubirali pri 37 °C 1-2 dni. Po inkubaciji smo prešteli morfološko enake kolonije in izračunali enote, ki tvorijo kolonije (CFU) v gramu peska.

Za osamitev čistih kultur bakterijske vrste *E. coli* iz morske vode smo uporabili dve različni selektivni kromogeni gojiščici. Kot primarno selektivno gojišče smo za detekcijo *E. coli* v vodnih vzorcih uporabili gojišče Compact Dry EC (Nissui Pharmaceutical), kamor smo nanесли po 1 ml

vzorčene morske vode. Na tem kromogenem gojišču so kolonije *E. coli* modre barve. Sočasno smo morsko vodo tudi filtrirali preko nitroceluloznih filtrov Millipore s premerom por 0,45 µm. Filtrirali smo 50 ml in 100 ml vzorčene morske vode ter filtre aseptično položili na gojišče UriSelect (UriSelect™ 4 Medium, BioRaD, FRA), vse filtracije smo opravili v treh ponovitvah. Plošče smo inkubirali pri 37 °C 1-2 dni. Na tem kromogenem gojišču so kolonije *E. coli* rožnate barve. Porasle kolonije iz obeh tipov kromogenih gojišč smo prešteli in izračunali povprečno število kolonijski enot (CFU) na 50 oz. 100 ml morske vode.

Rožnate kolonije z gojišča UriSelect smo precepili do čistih kultur in jih shranili na trajen, metabolno neaktiven način v mikrobiološko zbirko ekstremofilnih mikroorganizmov Ex Infrastrukturnega centra Mycosmo, MRIC UL, Slovenija (<http://www.ex-genebank.com/>), na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Izolirane seve *E. coli* smo dodatno identificirali tudi z MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) masno spektrometrijo in potrdili, da gre za bakterije vrste *E. coli*. Vsem sevom smo pripravili bakterijske lizate, ki smo jih nato uporabili kot matrično / vzorčno DNA za verižno reakcijo s polimerazo. Z uporabo metode PCR smo seve tudi genotipsko opredelili. Na podlagi pridobljenih PCR-pomnožkov smo jih uvrstili v filogenetske skupine po prvotni (Clermont in sod., 2000) in prenovljeni metodi (Clermont in sod., 2013).

Vsem osamljenim sevom smo z metodo določanja prstnega odtisa DNA bakterij ERIC-PCR (angl. enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction) ter uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov ERIC1R in ERIC2, ki pomnožujejo enterobakterijska ponavljajoča se medgenska ohranjena zaporedja, ugotavljali njihovo klonalnost na podlagi profilov, pridobljenih po agarozni gelski elektroforezi PCR pomnožkov. Hkrati smo izoliranim sevom z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov definirali njihovo možno pripadnost 4 različnim sekvenčnim skupinam (ST angl. sequence type): ST69, ST73, ST95 in ST131 (Doumith in sod., 2015).

Neklonalnim sevom *E. coli* smo tako določili prisotnost genov za dejavnike virulence kot so adhezini (gen *fimH*; gene skupine *afa*, ki se vežejo na receptorje DAF (angl. decay-accelerating factor); gen *dra*, gen *papGII*, gen *papC* ter gen *iha*), avtotransporterji (gen *fluA*, gen *sat*, gen *vat*), protektini (gen *iss*, gen *kpsMTII*, gen *ompTAPEC* in gen *traT*), sistemi za privzem železa (gen *fyuA*, gen *iroN*, gen *irp2*, gen *iucD* in gen *iutA*) in toksini (gen *ups deg*). Pravtako

smo neklonalnim sevom *E. coli* določili prisotnost genov z zapisi za odpornostjo proti protimikrobnim učinkovinam, predvsem odpornost proti betalaktamskim antibiotikom (gen $bla_{CTX-M-1}$, gen $bla_{CTX-M-2}$, gen $bla_{CTX-M-8}$, gen $bla_{CTX-M-9}$, gen $bla_{CTX-M-25}$, gen bla_{SVH7} , gen bla_{TEM1} , in bla_{OXA}) in plazmidno posredovane odpornosti proti (fluoro)kinolonom (PMQR, angl. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance) (gen $qnrA$, gen $qnrB$ in $qnrS$).

Rezultati

Mikrobna raznolikost in številčnost v pesku mestne plaže med kopalno sezono 2022

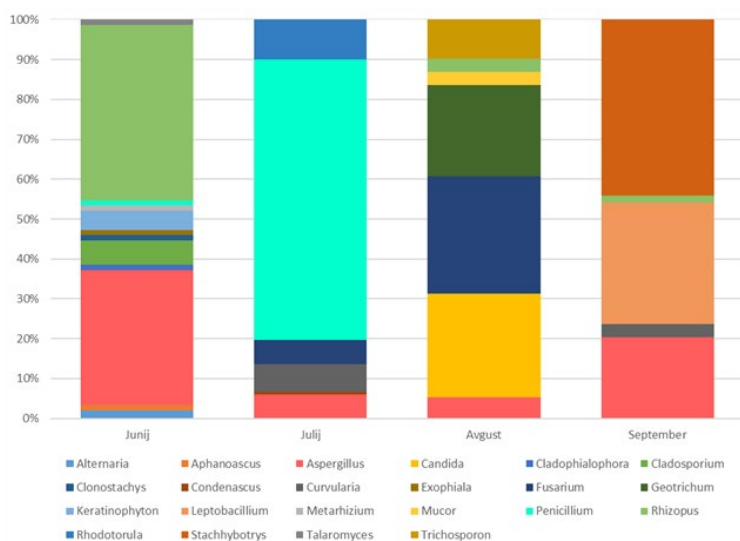
V času kopalne sezone, od junija do septembra 2022, smo mesečno vzorčili pesek na mestni portoroški plaži. V vseh štirih mesecih skupaj smo iz peska osamili 32 glivnih vrst, ki pripadajo 22 rodovom (Tabela 1, Slika 1). Najmanjše celokupno število gliv smo zabeležili junija (CFU/g = 145), hkrati pa smo v tem vzorcu opazili največjo raznolikost (15 vrst iz 12 rodov). Julijski in septembrski vzorec sta imela primerljivo številčnost (CFU/g_{september} : CFU/g_{julij} = 985 : 997), vendar je bila septembra zabeležena najmanjša raznolikost s 7 vrstami iz 5 rodov. Avgusta smo iz peska osamili 8 vrst gliv iz 10 rodov, pri čemer je bila številčnost v tem vzorcu najvišja (CFU/g = 1018) (Slika 1). Izmed vrst, osamljenih iz peska, *Aphanoascus fulvescens*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium*

oxysporum, *F. solani*, *Rhizopus arrhizus* in *Trichosporon asahii* spadajo med oportuno patogene glive 2. varnostne stopnje (BSL-2). Največ teh gliv smo osamili avgusta (37,5% vseh vrst), najmanj pa junija in julija (oboje 20%).

Iz vzorcev peska smo v kopalni sezoni osamili številne bakterije. Na podlagi svetlo modre in temno modre barve kolonij na kromogenem gojišču UriSelect smo v vseh vzorcih peska fenotipsko potrdili prisotnost različnih vrst *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp. ter *Pseudomonas* spp. Najmanj prisotnih bakterij je bilo v junijskem vzorcu (26 CFU/g vzorca), medtem ko sta si vzorca julij in september po celokupnem številu bakterij primerljiva (58 CFU /g julijski vzorec peska in 64 CFU/g septembrski vzorec peska). Največje celokupno število bakterij smo zabeležili v vzorcu peska meseca avgusta (162 CFU/g). Iz vzorcev peska tekom kopalne sezone 2022 nismo osamili nobene bakterijske kolonije vrste *E. coli*.

Glive kot kazalniki človekovega vpliva na mikrobiološko kakovost peska plaže

V času največje obiskanosti mestne plaže (mesec avgust) smo poleg redno prisotnih rodov *Aspergillus*, *Fusarium* in *Rhizopus*, zabeležili tudi pojav humanih oportuno patogenih vrst *Candida parapsilosis*, *Geotrichum candidum* in *Trichosporon asahii*. Te vrste so bile osamljene le iz avgustovskega vzorca, njihovo celokupno število pa predstavlja 58,7 % vseh gliv iz tega vzorca (26,0 %, 22,9 % in 9,8 %) (Tabela 1, Slika 1).



Slika 1. Zastopanost glivnih rodov (%) v vzorcih peska vzorčenega mesečno med kopalno sezono leta 2022.

Figure 1. Representation of cultured fungal genera (%) in beach sand samples taken monthly during the bathing season in 2022.

Tabela 1. Glive, osamljene iz peska plaže v Portorožu (Slovenija) med kopalno sezono v letu 2022.

Table 1. Fungi, isolated from beach sand in Portorož (Slovenija) during the bathing season in 2022.

Molekularno-genetska identifikacija	Gojišče	Mesec vzorčenja	CFU/g	Genetski označevalec	EXF številka ¹	Varnostna stopnja (BSL) ²
<i>Alternaria alternata</i>	Mycosel	Junij	3	ITS	EXF-16980	BSL-1
<i>Aphanoascus fulvescens</i>	Mycosel	Junij	2	ITS	EXF-16983	BSL-2
<i>Aspergillus calidoustus</i>	Mycosel	Junij	5	<i>benA</i>	EXF-16978	BSL-1
<i>Aspergillus flavus</i>	SDA	Junij Avgust September	20 33 67	<i>benA</i>	EXF-16974 EXF-17030 EXF-17035 EXF-17040	BSL-2
<i>Aspergillus nidulans</i>	SDA	Junij Julij September	25 43 33	<i>benA</i>	EXF-16973 EXF-16990 EXF-17042	BSL-1
<i>Aspergillus niger</i>	SDA	Avgust	20	<i>benA</i>	EXF-17036	BSL-1
<i>Aspergillus tamarii</i>	SDA	Julij	13	<i>benA</i>	EXF-16991	BSL-1
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	SDA	Julij September	3 100	<i>benA</i>	EXF-16992 EXF-17043	Ni podatka
<i>Candida parapsilosis</i>	SDA	Avgust	265	ITS, LSU	EXF-17031	BSL-1
<i>Cladophialophora immunda</i>	Mycosel	Junij	2	ITS	EXF-16981	BSL-1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Mycosel	Junij	2	<i>act</i>	EXF-16979	BSL-1
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	Mycosel	Junij	7	<i>act</i>	EXF-16977	BSL-1
<i>Clonostachys rosea</i>	Mycosel	Junij	2	ITS	EXF-16984	BSL-1
<i>Condenascus tortuosus</i>	SDA	Julij	7	ITS	EXF-17004	Ni podatka
<i>Curvularia buchloes</i>	SDA	September	33	ITS	EXF-17041	Ni podatka
<i>Curvularia inaequalis</i>	SDA	Julij	70	ITS	EXF-16997	BSL-1
<i>Exophiala equina</i>	Mycosel	Junij	2	ITS	EXF-16985	BSL-1
<i>Fusarium delphinoides</i>	SDA	Julij Avgust	18 300	<i>tef</i>	EXF-16993 EXF-17033	BSL-1
<i>Fusarium oxysporum</i>	SDA	Julij	20	<i>tef</i>	EXF-17000 EXF-17001 EXF-17002	BSL-2
<i>Fusarium solani</i>	SDA	Julij	22	<i>tef</i>	EXF-16994 EXF-16996	BSL-2
<i>Geotrichum candidum</i>	Mycosel	Avgust	233	ITS	EXF-17038	BSL-1
<i>Keratinophyton indicum</i>	Mycosel	Junij	7	ITS	EXF-16986 EXF-16988	BSL-1
<i>Leptobacillium leprobactrum</i>	Mycosel	Junij	2	ITS	EXF-17045	Ni podatka
<i>Metarhizium robertsii</i>	Mycosel	Junij	2	ITS	EXF-16982	BSL-1
<i>Mucor circinelloides</i>	SDA	Avgust	33	ITS	EXF-17034	BSL-1
<i>Penicillium citrinum</i>	Mycosel	Junij	2	<i>benA</i>	EXF-16987	BSL-1
<i>Penicillium lanosocoeruleum</i>	SDA	Julij	700	<i>benA</i>	EXF-16999	BSL-1
<i>Rhizopus arrhizus</i>	SDA	Junij Avgust September	65 33 17	ITS	EXF-16975 EXF-17037 EXF-17039	BSL-2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	SDA	Julij	100	ITS, LSU	EXF-16998	BSL-1
<i>Stachybotrys sp.</i>	Mycosel	September	435	ITS	EXF-17044	BSL-1
<i>Talaromyces pinophilus</i>	Mycosel	September	300	ITS	EXF-16976	BSL-1
<i>Trichosporon asahii</i>	SDA	Avgust	100	ITS	EXF-17029	BSL-2

Legenda:

¹ EXF številka; zaporedna številka seva v zbirki ekstremofilnih mikroorganizmov Ex, IC Mycosmo Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani² Varnostna stopnja (ang. Biosafety Level; BSL); podatek povzet po de Hoog in sod. (2020) in ATCC (2023).

V morski vodi se tekom kopalne sezone pojavljajo genetsko različni sevi bakterije *E. coli*

Nasprotno z vzorci peska mestne plaže, smo bakterijsko vrsto *E. coli* zasledili v vseh vodnih vzorcih morske vode tekom kopalne sezone 2022. Skupno smo osamili 49 izolatov, v nadaljne analize pa smo vključili 37 (76%) neklonalnih izolatov, ki so imeli glede na rezultate ERIC-PCR enake profile in so se uvrstili v 9 različnih ERIC skupin in so bili neenakomerno porazdeljeni tekom kopalne sezone; 5 izolatov junija, 3 izolati julija in 29 izolatov avgusta. Pri razvrstitvi v filogenetske skupine po prvotni metodi (Clermont in sod., 2000) so se sevi iz morske vode najpogosteje uvrstili v skupino A0 (41,67%), nato so po pogostosti sledile skupine A1 (31,25%), B1 (16,67%), in B23 (10,42%). Pri razvrstitvi sevov *E. coli* v filogenetske skupine po prenovljeni metodi (Clermont in sod., 2013) je pričakovano prišlo do manjše prerazporeditve sevov v druge skupine; sevi iz morske vode so se še vedno najpogosteje uvrstili v skupino A (67,6%), nato so si sledile skupine B2 (13,5%), C (10,8%) in B1 (8,1%). Sevov, ki so se pri razvrščanju v filogenetske skupine po prenovljeni metodi prerazporedili v drugačno skupino od prvotne, je bilo 10,8%.

Pri vseh neklonalnih izolatih *E. coli* (N = 37) smo s pomočjo metode PCR preverili prisotnost 18 različnih genov z zapisi za dejavnike virulence (DV), kot so adhezini, avtotransporterji, toksini, dejavniki povezani z odpornostjo proti serumu in izogibanjem imunskemu sistemu gostitelja ter sistemi za privzem železa. Med njimi je kar v 60 % najpogosteje prisoten gen za DV *fimH*, ki sodeluje pri tvorbi adhezina na koncu fimbrij tipa I in je faktor kolonizacije z bakterijami pri izvenčrevesnih infekcijah, omogoča pa tudi tvorbo bakterijskih biofilmov. V 27% oziroma 24 % smo zasledili tudi pojavnost genov *fyuA* in *irp2*, oba sodelujeta v sistemih za privzem železa. Med geni za dejavnike virulence, povezane z izogibanjem imunskemu sistemu, je prevladovala prisotnost genov *traT* in *kpsMTII*; oba smo potrdili pri 6 (16,2%) sevih.

Bakterije lahko sintetizirajo tudi posebne toksine, kot so genotoksini, ki povzročajo poškodbe DNA. Pri uropatogenih sevih *E. coli* se lahko pojavlja gen *usp* (angl. uropathogenic-specific protein) za genotoksin z DNazno aktivnostjo, ki deluje na celice sesalcev. Njegovo prisotnost povezujejo z obolenji, kot so pielonefritis (okužba ledvic), prostatitis (vnetje prostate) in bakteriemija (prisotnost bakterij v krvi). Pri sevih, osamljenih iz morske vode, smo

prisotnost gena *usp* potrdili pri 5 (13,5%) sevih.

Razmeroma veliko (7) je bilo genov, ki so bili prisotni izključno pri sevih iz filogenetske podskupine B2₃. To so bili geni *iha*, *papC*, *papGII*, *sfa*, *sat*, *vat* ter *ibeA*. Prav tako je bilo veliko genov, ki so v filogenetski podskupini B2₃ najbolj prevladovali, v manjšem deležu pa smo jih potrdili tudi pri sevih iz ostalih skupin. Gre za gene *fluA*, *hlyA*, *usp*, *fyuA*, *iroN*, *irp2* in *sitA*.

Pri vseh izolatih smo z metodo PCR testirali njihovo uvrstitev v sekvenčne skupine ST69, ST73, ST95 in ST131. Izmed skupno 37 neklonalnih izolatov so se 4 (10,8%) uvrstili v skupino ST131, po 1 (2,7%) izolat v skupino ST69, in en (2,7%) izolat v skupino ST95. V skupino ST73 nismo uvrstili nobenega izolata.

Izolate smo testirali tudi na prisotnost genov za betalaktamaze iz skupin CTX, SHV, TEM in OXA ter genov PMQR. Izmed preučevanih skupin genov za betalaktamaze je najpogosteje prisotna skupina genov *bla*_{TEM} (10,8%). Ostalih testiranih genov *bla* (petih preučevanih skupin genov *bla*_{CTX-M}), *bla*_{TEM} in *bla*_{OXA} nismo zaznali v nobenem izmed testiranih izolatov.

V preiskovanih izolatih smo ugotavljali prisotnost treh genov *qnr*, ki omogočajo odpornost proti nižjim koncentracijam kinolonov. Genov *qnrA* in *qnrS* nismo zaznali v nobenem izmed testiranih izolatov, smo pa zaznali en izolat z zapisom za gen *qnrB*. Vsi sevi, pri katerih smo potrdili prisotnost genov za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam, so se uvrščali v filogenetsko skupino A po prenovljeni metodi (Clermont in sod., 2013).

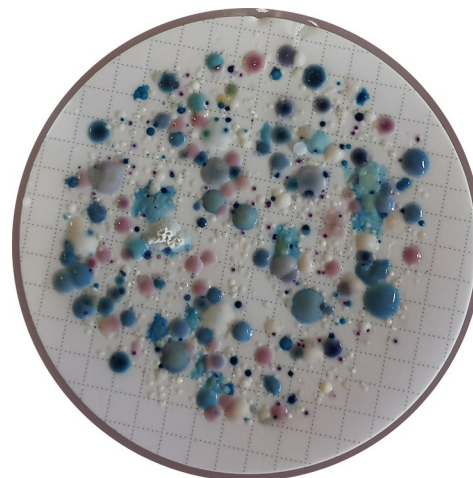
Razprava

Priljubljenost razvedrilnih dejavnosti, povezanih z vodo, narašča povsod po svetu. Hkrati pa tovrstna rekreacija omogoča stik s patogenimi mikroorganizmi. Možni načini za prenos le-teh na ljudi v kopalnih okoljih so preko kože, oči in sluhovoda ter zaužitjem kopalne vode ali vdihavanjem aerosolov (Solo-Gabriele et al. 2016). Kopalne vode (naravna rekreativna vodna okolja), kot jih definira direktiva kopalnih voda (European Environment Agency (EEA), so obalne ali celinske vode (reke, naravna jezera, zajetja in ribniki), v katerih je kopanje bodisi avtorizirano ali ni prepovedano in jih redno uporablja večje število kopalcev. V Sloveniji področje kakovosti kopalnih voda urejajo Zakon o vodah (ZV-1) (2002), Pravilnik o podrobnejših kriterijih za ugotavljanje kopalnih voda (2008) in Uredba

Tabela 2. Molekularna karakterizacija sevov *E. coli* iz morske vode. Klasifikacija preisovanih sevov v filogenetske skupine po prenovljeni metodi (Clermont in sod., 2013), prisotnost genov za dejavnike virulence ter prisotnost genov za odpornost proti protimikrobnim učinkovinom pri preiskovanih sevih.

Table 2. Molecular characterization of *E. coli* strains from seawater. Classification of the investigated strains into phylogenetic groups according to the revised method (Clermont et al., 2013), the presence of genes for virulence factors and the presence of genes for antimicrobial resistance in the investigated strains.

		MORJE N = 37 (100%) n (%)
Filogenetske skupine	Clermont, 2013	
	A	25 (67,6%)
	B1	3 (8,1%)
	B2	5 (13,5%)
	C	4 (10,8%)
	D	0 (0%)
	E	0 (0%)
	F	0 (0%)
Clade I/II	0 (0%)	
Clade III/IV/V	0 (0%)	
Unknown	0 (0%)	
Geni z zapisi za odpornost proti antibiotikom	PMQR	
	<i>qnrA</i>	0 (0%)
	<i>qnrB</i>	1 (2,7%)
	<i>qnrS</i>	0 (0%)
	β-laktamaze	
	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	0 (0%)
	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	0 (0%)
	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	0 (0%)
	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	0 (0%)
	<i>bla</i> _{CTX-M-25}	0 (0%)
	<i>bla</i> _{TEM}	4 (10,8%)
	<i>bla</i> _{SHV}	0 (0%)
	Geni z zapisi za dejavnike virulence	Adhezini
<i>afa/dra</i>		0 (0%)
<i>fimH</i>		22 (59,5%)
<i>iha</i>		0 (0%)
<i>papC</i>		1 (2,7%)
<i>papGII</i>		0 (0%)
Avtotransporterji		
<i>fluA</i>		1 (2,7%)
<i>sat</i>		0 (0%)
<i>vat</i>		5 (13,5%)
Protektini		
<i>iss</i>		0 (0%)
<i>kpsMTII</i>		6 (16,2%)
<i>ompTAPEC</i>		0 (0%)
<i>traT</i>		6 (16,2%)
Sistemi za privzem železa		
<i>fyuA</i>		10 (27%)
<i>iroN</i>		1 (2,7%)
<i>irp2</i>		9 (24,3%)
<i>iucD</i>		0 (0%)
<i>iutA</i>	0 (0%)	
Toksini		
<i>usp deg</i>	5 (13,5%)	



Slika 2. Rast bakterijskih kolonij sevov *E. coli* iz morske vode. Filtracija 100 ml morske vode, vzorčene avgusta, preko nitroceluloznih filtrov Millipore s premerom por 0,45 μm in inokulacija in inkubacija na gojišču URISelect. Vrsta *E. coli* se na tem kromogenem gojišču obarva rožnato.

Figure 2. Bacterial colony growth of *E. coli* strains from seawater. Filtration of 100 mL of seawater sampled in August through millipore nitrocellulose filters with a pore diameter of 0.45 μm, inoculation, and incubation on URISelect medium. The *E. coli* species turns pink on this chromogenic medium.

o upravljanju kakovosti kopalnih voda (2008). Država zagotavlja spremljanje kakovosti kopalne vode na naravnih kopališčih in kopalnih območjih. Izdelan je tudi program monitoringa, ki določa parametre kakovosti, merilna mesta in pogostost spremljanja (Poje, 2021). Glede na 16. člen Uredbe lahko kopalno vodo razdelimo v štiri kakovostne razrede, in sicer na odlično, dobro, zadostno in na slabo. Ocena kakovosti se določi glede na mikrobiološko kakovost vode. Mikrobiološki parametri, ki se določajo v celinskih vodah, so enterokoki in bakterija *E. coli* (Uredba o upravljanju kakovosti kopalnih voda, 2008). V kopalnih vodah je pozornost namenjena predvsem prisotnosti fekalnih bakterij – *E. coli* in enterokokov, ki so v vodi kot posledica izpustov komunalnih čistilnih naprav, neurejene kanalizacije, spiranja obrežnih površin ob močnem dežju, iztrebkov živali in nenazadnje zaradi kopalcev. Ker te bakterije v slani vodi preživijo le kratek čas, nanje vpliva tudi sončna svetloba, jih v morju navadno ne zaznamo ali pa so njihove koncentracije zelo nizke (NLZOH, Kakovost morske kopalne vode, 2021). Smerne vrednosti za *E. coli* v morski vodi so do 500 CFU na 100 ml vzorčene vode (NLZOH, Kakovost morske kopalne vode, 2021). Glede na naše rezultate (5–29 CFU *E. coli* /100 ml morske vode) lahko sklepamo, da je bila morska voda v času našega vzorčenja skladna s parametri za dobro kakovost kopalne vode, kot jih določa metodologija za mikrobiološka vrednotenja po Uredbi o upravljanju kakovosti kopalnih voda (Uradni list RS, št. 25/08).

Bakterija *E. coli* je običajno komenzal v prebavnem traktu človeka. Plastičnost genoma zaradi horizontalnih prenosov genov in rekombinacij omogoča razvoj številnih, tudi za človeka patogenih sevov. Ti lahko povzročijo raznolika črevesna in zunaj črevesna obolenja. Nabor dodatnih genov za dejavnike virulence (DV) omogoča bakteriji kolonizacijo sicer sterilnih telesnih področij, izogibanje imunskemu sistemu, privzem železa iz okolja, izločanje toksinov ter posledično tudi boljše preživetje v različnih razmerah (Croxen in Finlay, 2010; Sarowska in sod., 2019). Da bi dobili vpogled v patogeni potencial *E. coli*, izolirane iz morske vode tekom kopalne sezone, smo pri vsakemu od 37 neklonalnih izolatov preverili prisotnost 18 genov, povezanih z DV. Neklonalni izolati so imeli različno število genov za DV (med 1 in 10). Kar 11 % vseh izolatov pa je imelo po 7 genov za DV in vsi so pripadali filogenetski skupini B₂ po prvotni, oziroma B2 po prenovljeni metodi. Za to filogenetsko skupino je namreč značilno, da se vanje uvrščajo predvsem bolj virulentni sevi humanega izvora in

se posledično tipično pojavlja pri kliničnih izolatih *E. coli* (Clermont in sod., 2000). Hkrati je potrebno poudariti, da so bili vsi ti problematični izolati osamljeni iz vzorca vode v avgustu, ko je frekvenca kopalcev v morski vodi najvišja. Navkljub hipotezam pa natančnega vira kontaminacije oziroma organizma, iz katerega sev izhaja, ne moremo zagotovo potrditi. Poleg najverjetnejšega človeškega izvora, so pogost izvor patogenih bakterij lahko tudi galebi. V morebitnem nadaljevanju študije, bi bilo zato smiselno vzorčiti tudi iztrebke ptic (Ewbank in sod., 2022).

Poleg povezave med filogenetsko skupino sevov *E. coli* in njihovim izvorom lahko v literaturi zasledimo tudi navedbe o povezanosti filogenetskih skupin s tipom seva oziroma njegovim virulentnim potencialom (Ishii in sod., 2007). Sevi iz skupin A in B1 so običajno komenzali, z manjšim številom genov za dejavnike virulence, medtem ko so sevi iz filogenetske skupine B2 (in v manjši meri skupine D) pogosto bolj virulentni, zaradi večjega nabora genov za dejavnike virulence (Clermont in sod., 2000; Branger in sod., 2005). V naših vzorcih so prevladovali sevi iz filogenetske skupine A (68%), kateri so sledili sevi iz skupin B2 (14%), C (10%) in B1 (8%). Prisotnosti ostalih filogenetskih skupin nismo potrdili.

Horizontalni prenos genov (HGT) povezanih z geni, ki posredujejo odpornost proti protimikrobnim učinkovinam, predvsem antibiotikom, je eden glavnih razlogov za širjenje odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam in vitro in in vivo okoljih, med katerimi imajo mobilni genetski elementi (MGE) pglavitno vlogo pri širjenju bakterijske odpornosti (Stadler in sod., 2017). Horizontalni prenosi genov omogočajo bakteriji *E. coli* hitro pridobivanje odpornosti tudi proti več protimikrobnim učinkovinam hkrati. Kinoloni in β-laktami so protimikrobne učinkovine, ki se po vsem svetu široko uporabljajo pri zdravljenju številnih nalezljivih bolezni, ki jih povzročajo okužbe s po Gramu negativnimi bakterijami, kot so *Enterobacteriaceae*, še zlasti z *E. coli*. Hkrati se v populaciji že pojavljajo sevi, ki so odporni proti navedenim antibiotikom, zlasti zaradi posedovanja genov za determinante odpornosti na mobilnih genetskih elementih. Pri izoliranih sevih smo preverili prisotnost plazmidno zapisanih genov, ki so povezani z nizko odpornostjo proti kinolonu (PMQR). Za testiranje smo izbrali gene *qnrA*, *qnrB* in *qnrS*. Med vsemi izolati smo samo pri enem sevu, izoliranem iz avgustovskega vzorca vode, potrdili zapis za *qnrB*, ki se med *qnr* geni najpogosteje pojavlja in je velikokrat tudi so-lokaliziran na istem plazmidu skupaj z geni *bla* (pretežno *qnrB1* in *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-3} ali *bla*_{SHV-12}) v Evropi, Združenih državah, Aziji in Afriki (Juraschek in sod., 2022). Pri tem

istem sevu drugih genov za odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam nismo potrdili. V povezavi s pojavljanjem in širjenjem *E. coli*, odpornih proti protimikrobnim učinkovinam sodijo med najbolj problematične sevi, ki izločajo encime β -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL; angl. Extended spectrum β -lactamases). Sevi ESBL imajo lahko genetski zapis *bla* za encime skupine TEM, SHV ali CTX (Rasheed in sod., 1997). Med našimi izolati so bili prisotni sevi *E. coli*, ki so bili odporni proti protimikrobnim učinkovinam. Z genotipizacijo smo potrdili gen *bla*_{TEM} pri 11% izolatov, vsi so bili osamljeni v avgustovskem vzorcu vode in spadajo v filogenetsko skupino A1 po prenovljeni metodi. Prisotnost zgolj genskega zapisa *bla*_{TEM} nas ne preseneča, saj tudi v literaturi zasledimo podatke, da se omenjeni gen uvršča med pri *E. coli* najpogosteje prisotne zapise za β -laktamaze (Branger in sod., 2005; Bou in sod., 2002). Pri ostalih sevih nismo zasledili testiranih genov za odpornost.

Čeprav se sevi *E. coli* uvrščajo v številne sekvenčne tipe (ST), se približno polovica vseh izvenčrevesnih sevov *E. coli* uvršča v štiri prevladujoče tipe (ST69, ST73, ST95 in ST131) (Horner in sod., 2014). Med temi prevladujejo sevi ST131 z geni za številne virulentne dejavnike in odpornostjo proti različnim protimikrobnim učinkovinam (Hojabri in sod., 2019). Šestim izolatom smo lahko določili sekvenčno skupino, en je pripadel sekvenčni skupini ST69, drugi ST95, štirje neklonalni izolati (10,8 %) pa sekvenčni skupini ST131. Sekvenčna skupina ST131 se je pojavila šele po letu 2000 in predstavlja pomemben človeški patogen, ki se je močno razširil po vsem svetu in je odgovoren za hitro povečanje protimikrobne odpornosti med *E. coli* (Peirano in sod., 2010). Znano je, da ST131 povzroča zunaj črevesne okužbe, saj je odporen proti fluorokinolonom in je povezan s proizvodnjo beta laktamaz z razširjenim spektrom delovanja, najpogosteje zaradi prisotnosti gena *bla*_{CTX-M-15} (Nicolas-Chanoine et al., 2014). Vsi štirje neklonalni izolati ST131 so se uvrstili v filogenetsko skupino B2₃ po prvotni razporeditvi, imeli hkrati prisotnih med 7 in 10 genov za dejavnike virulence, medtem ko genov za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam (CTX, TSO in PMQR) pri njih nismo potrdili.

Za razliko od bakterij in virusov so glive kot mikrobiološki pokazatelj ustreznosti vode popolnoma prezrte. Glive kot heterotrofi imajo ključno vlogo pri kroženju organskih snovi v okolju. Pomembne so predvsem z vidika razgradnje dolgoveržnih in kompleksnih ogljikovodikov kot so hitin, celuloza, lignin pa tudi nafta in njeni derivati, guma, silikoni in plastike (Lumibao in sod., 2018; Neto in sod., 2019).

Umetni materiali so zaradi naraščajoče človeške populacije, urbanizacije in industrializacije vedno pogosteje zastopani v naravnem okolju, eno od teh so tudi peščene plaže in morje (Pérez-Alvelo in sod., 2021; Bridson in sod., 2020). V zadnjih desetletjih so glive tudi vedno pogosteje povezane z različnimi človeškimi boleznimi, od blagih do kroničnih (de Hoog in sod., 2020; Pathakumari in sod., 2020). V nasprotju z virusnimi ali bakterijskimi okužbami se simptomi glivnih okužb pojavijo pozneje in jih je zato težje povezati s primarnim okoljskim virom (Bongomin in sod., 2017). Raziskave o njihovem številu in raznolikosti v naravnih okoljih so zato pomembne za zaposlitev vrzeli o izvoru in pogostosti vpliva na zdravje ljudi, k čemur poziva tudi dokument, izdan s strani WHO (WHO, 2022).

V vseevropski iniciativi »Mycosands« pri preučevanju gliv v pesku plaž in priobalnem morju sodeluje 13 držav, med njimi tudi Slovenija. Cilj je raziskati raznolikost in številčnost gliv v različnih okoljskih razmerah po evropski celini ter oceniti tveganje za zdravje, ki bi ga glive lahko predstavljale za ljudi (Brandão in sod., 2021). Vzorčenje v Sloveniji je potekalo na urbani plaži v centru Portoroža kot mesečni monitoring v času kopalne sezone med junijem in septembrom 2022. Plažo od morja ločuje betonska pešpot, ki preprečuje odplavljanje peska zaradi plimovanja. Pesek zaposleni redno čistijo, odstranjujejo odpadke in ga mehansko pregrabljajo. Plaža redno prejema nagrado Modra zastava kot sinonim za kakovost in varnost (FEE, 2023). V sklopu monitoringa smo vzorčili oboje, morsko vodo na pomolu nasproti plaže in pesek. Z uporabljeno metodo iz morske vode nismo izolirali gliv. Da bi uspeli izolirati tudi glive iz morja, bi morali uporabiti gojišča z dodatki soli, vodo pa filtrirati, s čemer bi vzorec skoncetrirali (Novak Babič in sod., 2022). Gojišča, predlagana v iniciativi »Mycosands« so specializirana za osamitev gliv iz peska. Tekom monitoringa smo tako osamili 32 glivnih vrst iz 22 rodov. Rezultati so primerljivi z monitoringom prejšnje študije (Novak Babič in sod., 2022) in drugih svetovnih študij, ki poročajo o velikem številu in pestrosti gliv, tudi ko je pesek suh, izpostavljen močnemu soncu in dobro prezračen (Weiskerger in sod., 2020 Londoño in sod., 2018; Frenkel in sod., 2020). V pesku so konstantno prisotne glive »jedrne mikrobiote« *Aspergillus*, *Aphanoascus*, *Fusarium* in *Rhizopus*, njihovo število pa variira glede na mesec vzorčenja (Slika 1). Vrstna raznolikost je bila najvišja junija, prisotne pa so bile glive, ki so povezane predvsem z rastlinami in žuželkami (Novak Babič in sod., 2022). Junija so vremenski pogoji najugodnejši za razrast in cvetenje okoliške

vegetacije, obisk ljudi pa je še razmeroma nizek. Nasprotno pa smo avgusta iz peska osamili oportuno patogene vrste *Candida parapsilosis*, *Geotrichum candidum* in *Trichosporon asahii*, ki poseljujejo človeško kožo, nohte in lase (de Hoog in sod., 2020). Prav tako so pogoste v urbanih področjih, v gospodinjstvih, odpadnih vodah in na domačih živalih, ki bi lahko poleg ljudi predstavljale vir vnosa teh gliv na plažo. Njihovo število je predstavljalo skoraj dve tretjini vseh gliv. Podatek je pomemben, saj smo drugič zapovrstjo v času kopalne sezone v pesku te plaže zasledili glive, ki so najpogosteje vezane na človeški vir ali domače živali (Novak Babič in sod., 2022). S tem smo potrdili rezultate prejšnje študije, ki opisuje pesek kot prehodni rezervoar za oportune patogene ljudi (Brandão in sod., 2021; Novak Babič in sod., 2022). Rodove *Candida*, *Geotrichum*, *Trichosporon* in *Meyerozyma* bi v prihodnosti lahko uvrstili na seznam indikatorskih mikroorganizmov za spremljanje kakovosti peska.

Sklepi

Svetovna zdravstvena organizacija in Evropska Unija spodbujata raziskave mikroorganizmov v okolju, da bi sledili virom porajajočih se patogenov. Prisotnost mikrobov (tudi gliv) v pesku urbanih in naravnih plaž je v zadnjih letih dobro raziskana. Medtem ko bakterije in viruse ponavadi povezujejo z viri fekalnega onesnaženja pa so glive pogosto povezane s prisotnostjo rastlin, divjimi in domačimi živalmi in sestavo peska na plažah. Na vrhuncu turistične sezone smo iz peska osamili oportuno patogene glive, medtem ko jih v morski vodi nismo zaznali. Obraten trend pa smo

zasledili pri bakteriji *E. coli*, katere prisotnost nismo potrdili v vzorcih peska, ampak le v morski vodi tekom celotne kopalne sezone v dovoljenih vrednostih. Pri osamljenih sevih *E. coli* smo potrdili različen nabor genov za dejavnike virulence, ki predstavljajo vir možnega širjenja v druge, zaenkrat še neproblematične bakterijske vrste. Medtem ko je *E. coli* ustrezen indikator za spremljanje kakovosti morske vode, pa rezultati študije nakazujejo potrebo po uvedbi dodatnih indikatorskih mikroorganizmov za nadzor kakovosti peska.

Author Contributions

Koncept, metodologija, validacija, analize, urejanje podatkov in pisanje prispevka J.Č.Z. in M.N.B. Vsi avtorji so prebrali objavljeno različico rokopisa in se z njo strinjali.

Acknowledgement

Please acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections.

Funding

Delo dr. Monike Novak Babič je bilo financirano s podoktorskim raziskovalnim projektom (številka Z7-2668) preko Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS). Delo dr. Jerneje Čremožnik Zupančič in dr. Monike Novak Babič je bilo financirano iz raziskovalnega programa (številka P1-0198) preko Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

Conflicts of Interest

Avtorji ne navajajo navzkrižja interesov.

Reference

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- ATCC. American Type Culture Collection. Available online: <https://www.atcc.org/> (accessed on 20. 03. 2023).
- Boekhout, T., Kurtzman, C.P., 1996. Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. In: Wolf, K., (ed.): *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, Springer, Berlin, Germany, pp. 1–81.
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R.O., Denning, D.W., 2017. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *Journal of Fungi*, 3, 57.
- Brandão, J., Gangneux, J.P., Arian-Akdaglı, S., Barac, A., Bostanaru, A.C., et al., 2021. Mycosands: Fungal diversity and abundance in beach sand and recreational waters - relevance to human health. *Science of the Total Environment*, 781, 146598. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146598.
- Branger, C., Zamfir, O., Geoffroy, S., Laurans, G., Arlet, G., Thien, H.V., et al., 2005. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum betalactamase type. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1), 54-61.
- Bridson, J.H., Patel, M., Lewis, A., Gaw, S., Parker, K., 2020. Microplastic contamination in Auckland (New Zealand) beach sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 151, 110867.
- Bou, G., Cartelle, M., Tomas, M., Canle, D., Molina, F., Moure, R., Eiros, J.M., Guerrero, A., 2002. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 β -lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 4030–4036.
- Buer, A.L., Gyraite, G., Wegener, P., Lange, X., Katarzŷtę, M., Hauk, G., et al., 2018. Long term development of Bathing Water Quality at the German Baltic coast: spatial patterns, problems and model simulations. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 1055-1066.
- Carbone, I., Kohn, L.M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91, 553–556. doi: 10.1080/00275514.1999.12061051.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555-4558.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58-65.
- Cogliati, M., Arian-Akdaglı, S., Barac, A., Bostanaru, A.C., Brito, S., Çerikçiođlu, N., et al., 2023. Environmental and bioclimatic factors influencing yeasts and molds distribution along European shores, *Science of The Total Environment*, 859(Pt 1), 160132.
- Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 26–38. doi: 10.1038/nrmicro2265.
- de Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Ahmed, S., Al-Hatmi, A.M.S., Figueras, M.J., Vitale, R.G., 2020. *Atlas of Clinical Fungi*, 4th ed. Hilversum, The Netherlands.
- Doumith, M., Day, M., Ciesielczuk, H., Hope, R., Underwood, A., Reynolds R., et al., 2015. Rapid identification of major *Escherichia coli* sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(1), 160-166.
- EEU 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*, 64, 37-51.
- Ewbank, A. C., Fuentes-Castillo, D., Sacristán, C., Cardoso, B., Esposito, F., Fuga, B., de Macedo, E. C., Lincopan, N., Catão-Dias, J. L., 2022. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* survey in wild seabirds at a pristine atoll in the southern Atlantic Ocean, Brazil: First report of the O25b-ST131 clone harboring blaCTX-M-8. *The Science of the total environment*, 806(Pt 2), 150539.
- FEE, 2023. Pure water, clean coasts, safety and access for all. Foundation for Environmental Education. Copenhagen, Denmark. Available online: <https://www.blueflag.global/> (20. 03. 2023).
- Frenkel, M.; Yunik, Y.; Fleker, M.; Blum, S.E.; Sionov, E., et al., 2020. Fungi in sands of Mediterranean Sea beaches of Israel—Potential relevance to human health and well being. *Mycoses*, 63(11), 1255-1261.
- Van den Ende, A.H.G., de Hoog, G.S., 1999. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Studies in Mycology* 43, 151e162.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323-1330. doi: 10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995.
- Hojabri, Z., Darabi, N., Arab, M., Saffari, F., Pajand, O., 2019. Clonal diversity, virulence genes content and subclone status of *Escherichia coli* sequence type 131: Comparative analysis of *E. coli* ST131 and non-ST131 isolates from Iran. *BMC Microbiology*, 19 (1), 117. doi: 10.1186/s12866-019-1493-8
- Horner, C., Fawley, W., Morris, K., Parnell, P., Denton, M., Wilcox, M., 2014. *Escherichia coli* bacteraemia: 2 years of prospective regional surveillance (2010-12). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(1), 91–100.
- Ishii, S., Meyer, K.P., Sadowsky, M.J., 2007. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5703-5710. doi: 10.1128/AEM.00275-07.
- Juraschek, K., Malekzadah, J., Malorny, B., Käsbohrer, A., Schwarz, S., Meemken, D., Hammerl, J.A., 2022. Characterization of *qnrB*-carrying plasmids from ESBL- and non-ESBL-producing *Escherichia coli*. *BMC Genomics*. 12, 23(1), 365. doi: 10.1186/s12864-022-08564-y.
- Katarzŷtę, M., Męzinę, J., Vaičiūtė, D., Liaugaudaitė, S., Mukauskaitė, K., Umgiesser, G., et al., 2018. Fecal contamination in shallow temperate estuarine lagoon:

Source of the pollution and environmental factors. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 762-772.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.

Londoño, C.O., Fernández, R.R., Gulloso, E.R.M., 2018. Identification of fungi dermatophytes in the coastal area of district of Riohacha, La Guajira. *Contemporary Engineering Sciences* 11, 4691-4699.

Lumibao, C.Y., Formel, S., Elango, V., Pardue, J.H., Blum, M., Van Bael, S.A., 2018. Persisting responses of salt marsh fungal communities to the Deepwater Horizon oil spill. *Science of the Total Environment*, 642, 904-913.

NLZOH, 2021. Kakovost morske kopalne vode. Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Maribor, <https://www.nlzoh.si/objave/kakovost-morske-kopalne-vode/> (19. avg. 2023).

NIJZ, 2020. Smerne vrednosti za odsvetovanje ali prepoved kopanja na naravnih kopalniščih in kopalnih območjih. Nacionalni inštitut za javno zdravje, Ljubljana, https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/smernice_vrednosti_24.6.2020.pdf (11. jan. 2024).

Neto, J.A.B., Gaylarde, C., Beech, I., Bastos, A.C., da Silva Quaresma, V., de Carvalho, D.G., 2019. Microplastics and attached microorganisms in sediments of the Vitória bay estuarine system in SE Brazil. *Ocean and Coastal Management*, 169, 247-253.

Nicolas-Chanoine, M.H., Bertrand, X., Madec, J.Y., 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews*, 27 (3), 543-574.

Novak Babič, M., Gunde-Cimerman, N., Breskvar, M., Džeroski, S., Brandão, J., 2022. Occurrence, diversity and anti-fungal resistance of fungi in sand of an urban beach in Slovenia - environmental monitoring with possible health risk implications. *Journal of Fungi (Basel)*, 8, 860.

O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C., 1988. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95(5), 2044-2049. doi: 10.1073/pnas.95.5.2044.

Pathakumari, B., Liang, G., Liu, W., 2020. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110550.

Peirano, G., Costello, M., Pitout J.D.D., 2010. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from the Chicago area: high prevalence of ST131 producing CTX-M-15 in community hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(1), 19–23.

Pérez-Alvelo, K.M., Llegus, E.M., Forestier-Babilonia, J.M., Elías-Arroyo, C.V., Pagán-Malavé, K.N., Bird-Rivera, G.J., Rodríguez-Sierra, C.J., 2021. Microplastic pollution on sandy beaches of Puerto Rico. *Marine Pollution Bulletin*, 164, 112010.

Pitout, J.D.D., 2012. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 3. doi: 10.3389/fmicb.2012.00009.

Poje, M., 2021. Kakovost kopalnih voda v Sloveniji. Poročilo za leto 2020. Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija RS za okolje, Ljubljana. ISSN 1855-0339.

Rasheed, J.K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., et al., 1997. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41 (3), 647-653.

Romão, D., Sabino, R., Veríssimo, C., Viegas, C., Barroso, H., et al., 2015. Children and sand play: screening of potential harmful microorganisms in sandboxes, parks, and beaches. *Current Fungal Infection Reports*, 9(3), 155-163.

Sabino, R., Verissimo, C., Cunha, M.A., Wergikoski, B., Ferreira, F.C., et al., 2011. Pathogenic fungi: an unacknowledged risk at coastal resorts? New insights on microbiological sand quality in Portugal. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 1506-1511.

Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmieciak, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., Choroszy-Krol, I., 2019. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. *Gut Pathogens*, 11. doi: 10.1186/s13099-019-0290-0

Solo-Gabriele, H.M., Harwood, V.J., Kay, D., Fujioka, R.S., Sadowsky, M.J., Whitman, R.L., et al., 2016. Beach sand and the potential for infectious disease transmission: observations and recommendations. *Journal of the Marine Biological Association UK*, 96, 101-120.

Stadler, T., Rogers, L.M., Renfrow, C., Yano, H., Smith, Z., Top, E.M., 2017. Emerging patterns of plasmid-host coevolution that stabilize antibiotic resistance. *Scientific Reports*, 7(1), 4853. doi: 10.1038/s41598-017-04662-0.

Uredba o upravljanju kakovosti kopalnih voda, 2008. Uradni list RS, št. 25/08 in 44/22 – ZVO-2. Ministrstvo za okolje in prostor, Vlada Republike Slovenije, Ljubljana, Slovenija, <https://pisrs.si/pregledPredpisa?id=URED4701> (11. 1. 2024).

Weiskerger, C.J., Brandão, J., 2020. Fungal contaminants in water and sand: A new frontier for quantitative microbial risk assessment. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 16, 73-81.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 315–322.

WHO, 2003. Guidelines on Recreational Water Quality: Volume 1 Coastal and Fresh Waters. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

WHO, 2022. Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Licence