

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2017/11



ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1.Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	V4-1402
Naslov projekta	Dejavniki bakterijskih in virusnih okužb klapavic Factors which influence on bacterial and viral infections in mussels
Vodja projekta	18888 Andrej Kirbiš
Naziv težišča v okviru CRP	1.01.02 Dejavniki bakterijskih in virusnih okužb klapavic
Obseg raziskovalnih ur	1323
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	07.2014 - 06.2016
Nosilna raziskovalna organizacija	510 Univerza v Ljubljani 406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	211 INŠTITUT ZA VODE REPUBLIKE SLOVENIJE 481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.04 Veterina 4.04.05 Zdravstveno varstvo živil živalskega izvora
Družbeno-ekonomski cilj	07. Zdravje
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	4 Kmetijske vede 4.03 Veterina

2.Sofinancerji

	Sofinancerji	
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
	Naslov	Dunajska 22, 1000 Ljubljana

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

V treh slovenskih školjčičih (Seča, Strunjan in Debeli rtič) ter prostem nabirališču (ob svetilniku na Debelem rtiču) smo v enoletnem obdobju vzorčili klapavice ter obenem izvajali tudi fizikalne meritve morske vode. Skupno smo izvedli 34 vzorčenj. V školjkah smo ugotavljali število *E. coli*, prisotnost norovirusov in virusa hepatitisa A (VHA), v morski vodi iz školjčič pa tudi vsebnost *E. coli* in enterokokov. Pri izoliranih sevih bakterij *E. coli* smo ugotavljali prisotnost genov, ki bakterijam omogočajo patogeno delovanje ter njihovo odpornost na protimikrobna zdravila. Poleg mikrobioloških preiskav smo v školjkah preiskovali tudi vsebnost kovin: Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Hg in As. V morski vodi smo analizirali vrednosti šestih parametrov onesnaževal: prosti baker, celokupni baker, nikelj, cink, sulfat in 6-valentni krom.

V naši študiji smo evidentirali vse potencialne onesnaževalce morske vode in spremljali podatke, ki so rezultati posameznih monitoringov na tem področju. Proučili smo morebitne dejavnike, ki bi lahko bili vzrok za povišane vrednosti *E. coli* v školjkah. Analizirali smo vzroke za povišane vrednosti *E. coli*, in tudi, v primeru ustreznih rezultatov, napisali priporočila za pre kategorizacijo školjčič.

Prisotnost sevov *E. coli*, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja - ESBL (angl. extended spectrum β lactamase) smo ugotovili pri 14,7 % (5/34) vzorcih prosto nabranih klapavic ob svetilniku na Debelem rtiču, v 5,9 % (2/34) vzorcev iz gojišča Seča; pri enakem odstotku tudi v gojišču Strunjan, medtem ko na Debelem rtiču niso bili prisotni. V vseh primerih, kjer so bili ti sevi prisotni, je bilo tudi število bakterij *E. coli* povišano nad 230 MPN/100g v mesu školjk.

Ugotovljena stopnja kontaminacije klapavic z norovirusi v je bila v gojišču Seča 29,4 % (10/34), v Strunjanu 54,5 % (18/33), na Debelem rtiču 48,5 % (16/33) in pri prosto nabranih klapavicah ob svetilniku na Debelem rtiču 67,7 % (21/31). Od 100 testiranih vzorcev klapavic iz gojišč, jih je 44 vsebovalo norovirusno RNA: 18,2 % (8/44) genske skupine GI, 43,2 % (19/44) genske skupine GII ter 38,6 % (17/44) obe skupini. V zimskem obdobju je bila stopnja kontaminacije statistično značilno višja kot v poletnih mesecih. Virus hepatitisa A v preiskovanih vzorcih nismo ugotovili. Tako ugotavljamo, da klapavice predstavljajo potencialno nevarnost za zdravje ljudi zaradi vsebnosti norovirusov, vendar pa podatki o okužbah v Sloveniji kažejo predvsem na prenos iz osebe na osebo. Podatka, da bi bile vir okužbe klapavice v Sloveniji nismo zasledili.

Vsebnosti Cr, Mn, Fe, Ni, Hg in Pb v mesu školjk so bile najvišje v zimskih mesecih, od januarja do marca, vsebnost ostalih elementov v školjkah pa se z letnimi časi ni bistveno spreminjala.

ANG

During a one year period 34 samplings of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and seawater were carried out at three Slovenian shellfish harvesting areas (at Seča, Strunjan and Debeli Rtič) and in one location of wild Mediterranean mussels (at the lighthouse near Debeli Rtič). Samples of mussels were analysed for the presence of *E. coli*, norovirus and hepatitis A virus as well as for metal content (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Hg and As). Samples of seawater were analysed for the presence of *E. coli* and enterococci and for six parameters of pollutants: free copper, total copper, nickel, zinc sulphate and 6-valent chromium. The isolated *E. coli* strains were tested for the presence of virulence genes and anti-microbial resistance. Measurements of physical parameters of seawater (temperature, pH, conductivity and concentration of dissolved oxygen in the water) were also carried out.

In our study, we recorded all potential polluters of the sea water and monitor data that is collected from a variety of monitoring. We examined the potential factors that could be the cause of elevated levels of *E. coli* in bivalve molluscs. We have analysed the causes of elevated levels of *E. coli*, and also, in the case of relevant results, write recommendations for the

classification.

E. coli strains beta-lactamases with extended spectrum of activity - ESBL tested positive in 14.7% (5/34) of wild mussels collected at the lighthouse at Debeli rtič, at 5.9% (2/34) of the harvesting area Seča, the same percentage also in Strunjan, while none was detected at Debeli rtič. The number of *E. coli* was elevated in all samples where these strains were present,

Mussels at the Seča harvesting area tested positive for noroviruses in 29.4% (10/34) at the Strunjan in 54.5% (18/33), at the Debeli rtič harvesting area in 48.5% (16/33). Wild mussels collected at the lighthouse Debeli rtič tested positive in 67.7% (21/31). Of the 100 mussels from harvesting areas, 18.2% (8/44) tested positive for GI, 43.2% (19/44) for GII and 38.6% (17/44) for both genogroups. In the winter period, the rate of contamination was significantly higher than in the summer months. Hepatitis A virus was not detected. The mussels pose a potential threat to human health due to the presence of noroviruses, but data on infection in Slovenia mainly reflected the transfer from person to person, the information to be a source of infection mussels in Slovenia was not detected.

The concentration of Cr, Mn, Fe, Ni, Hg and Pb in shellfish flesh were highest during the winter months, from January to March, but still below the limit of the regulation. The content of other elements in the shellfish with the seasons did not change significantly.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev na raziskovalnem projektu²

V raziskovalnem projektu smo v enoletnem obdobju analizirali vzorce školjk klapavic (*Mytilus galloprovincialis*), gojenih v školjčičih na Slovenski obali. V raziskavo smo poleg školjčič v Seči, Strunjanu in na Debelem rtiču vključili tudi prosto nabiralništvo ob svetilniku na Debelem rtiču. Na vsaki od omenjenih lokacij smo izvedli 34 vzorčenj. Vzorce školjk smo mikrobiološko in kemijsko analizirali. Za proučitev dejavnikov, ki vplivajo na mikrobiološko in kemijsko kontaminacijo školjk, smo vzporedno jemali tudi vzorce morske vode. Proučili smo povezanost dejavnikov okolja s kontaminacijo vode in školjk in analizirali vzroke za najizrazitejša odstopanja od mejnih vrednosti, določenih z Uredbo (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških kriterijih za živila. Skladno z zastavljenimi cilji raziskovalnega projekta smo:

Evidentirali vire onesnaženja v bližini proizvodnih področji, ki lahko vplivajo na mikrobiološko in kemijsko kontaminacijo školjk.

Analizirali dobljene rezultate glede gibanja vrednosti števila bakterij *E. coli* v školjkah in ovrednotili vplive parametrov, katerih meritve smo izvajali vzporedno. Ugotovili smo, da sta onesnaženost morske vode z indikatorskimi mikrobi *E. coli* in enterokoki ter kontaminacija školjk z bakterijami *E. coli* med seboj značilno povezani ($p < 0,0001$). Koncentracija indikatorskih mikroorganizmov je značilno negativno povezana z oksidacijsko redukcijskim potencialom vode in pH vode. Korelacija je sicer šibka, vendar statistično značilna ($p < 0,05$).

Dobljene rezultate števila bakterij *E. coli* smo ovrednotili glede na mejne vrednosti, ki določajo klasifikacijo školjčič in jih tudi ovrednotili glede na posamezna časovna obdobja v letu. Delež vseh rezultatov, ki so pod nivojem 230 MPN *E. coli*/100 g školjk, je visok (88,9 %), kar je v skladu z Uredbo (ES) 2285/2015 (≥ 80 %) in to velja tudi za posamezne točke v školjčičih. Vendar pa so koncentracije v 22 (7,1 %) vzorcih presegale mejo 700 MPN *E. coli*/100 g, dva rezultata pa sta presegala mejo 4600, ki predstavlja spodnjo mejno vrednost klasifikacije školjčič razreda B. Kontaminacija školjk je v

iskovanem obdobju od oktobra do decembra statistično višja glede na ostala trimesečja.

Poleg kvalitativnih preiskav na prisotnost bakterije *E. coli* smo ugotavljali tudi stopnjo kontaminacije s sevi *E. coli*, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja – ESBL in tudi ugotavljali njihovo virulentnost.

Proučili smo stopnjo kontaminacije školjk z norovirusi in virusom hepatitisa A. Delež kontaminiranih školjk z norovirusi je bil najnižji v gojišču Seča - 29,4 %, nato na Debelem rtiču - 48,5 %, v Strunjanu 54,5 %, najvišji pa na področju prostega nabiranja (67,7 %). Prisotnosti virusa hepatitisa A nismo ugotovili.

Proučili smo stopnjo kemijske onesnaženosti z elementi (kovinami in nekovinami). Ugotovili smo, da je na vsebnost kadmija, svine in živega srebra v školjkah statistično vplivalo mesto vzorčenja, medtem ko na vsebnost cinka nista signifikantno vplivala ne čas vzorčenja in ne lokacija vzorčenja. Vsebnosti Cr, Mn, Fe, Ni, Hg in Pb v mesu školjk so bile najvišje v zimskih mesecih od januarja do marca.

Z analizo tokov, batimetrije in plimovanja na območjih, namenjenih za gojenje školjk, smo ovrednotili vpliv najverjetnejših onesnaževalcev.

Podali smo oceno tveganja glede kontaminacije školjk z norovirusi in virusom hepatitisa A. Ugotovili smo, da obstaja nevarnost tovrstne okužbe predvsem v zimskih mesecih. V izogib tovrstnih okužb bi bilo potrebno izdelati priporočila za varno pripravo jedi iz školjk in jih tudi predstaviti gostinskim delavcem in širši javnosti.

Interpretirali smo rezultate testiranja vzorcev, odvzetih v naši študiji in ovrednotili tudi podatke predhodnih študij. Rezultate, pridobljene v letu, ko je potekala raziskava, smo razdelili na tromesečna obdobja in ugotovili, da je stanje glede onesnaženosti školjk z bakterijami *E. coli* najslabše v mesecih oktober, november in december.

Ugotovitve kažejo, da bi bilo smiselno v okviru uradnega nadzora spremljati mikrobiološko kontaminacijo školjk, predvsem v obdobju, ko so le-te primerne za prodajo oz. krajše obdobje pred tem. Z večjim številom zbranih rezultatov v teh terminih (skozi daljše časovno obdobje) bi tudi bistveno lažje in realneje določili klasifikacijo školjčičišča. Takšno priporočilo je podano tudi v dokumentu EU, ki se nanaša na Uredbo (ES) št. 854/2004 "Community Guide to the Principles of Good Practice for the Microbiological classification and monitoring of bivalve molluscs production relaying and holding areas with regard to regulation 854/2004".

5.Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Namen raziskovalnega projekta je bil pridobitev celotne slike na področjih gojenja klapavic, tako z vidika mikrobioloških parametrov kot tudi z analizo vzrokov za povišane vrednosti bakterij *E. coli*, ki kažejo na fekalno kontaminacijo. Proučitev povezanosti dejavnikov okolja, kontaminacije morske vode in školjk je prispevala k možnemu napovedovanju dogodkov, predvsem ob izjemnih vremenskih stanjih. S poznavanjem dejavnikov tveganja ter njihovo soodvisnost s pojavljanjem virusov v školjkah je oblikovano poročilo s poudarkom na

oceni varnosti za zagotavljanje varne hrane. Na podlagi ocene tveganja so lahko sprejeti začasni ukrepi, možnosti za obvladovanje tveganja oz. možnosti zmanjšanja tveganja na sprejemljivo raven. Glede na evidentirane vire onesnaževanja smo izdelali analizo tveganja za obstoječe lokacije šoljčič. Ugotovitve, pridobljene z raziskavo, omogočajo odgovornim institucijam učinkovitejši nadzor kvalitete in varnosti pridelane morske hrane, nosilec živilske dejavnosti - gojitelj šoljk pa podaja smernice pri zagotavljanju varnosti živil, ki jih proizvajajo. Končni doprinosi izsledkov, ocen in priporočil je namenjen zagotavljanju varne hrane potrošniku. Izvedene raziskave v kombinaciji z ocenami tveganja predvsem na področju virusne kontaminacije šoljk bodo služile tudi potrošniku kot napotek k zmanjšanju tveganja glede tovrstnih okužb. S projektom smo pridobili strokovno oceno stanja, pridobili nova praktična znanja, informacije in veščine. Rezultate bomo predstavili v članku.

6. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁴

Ni bilo sprememb.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

	Znanstveni dosežek		
1.	COBISS ID		
	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Objavljeno v		
	Tipologija		

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID		
	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Šifra		
	Objavljeno v		
	Tipologija		

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁷

Glede na številne izsledke iz literature in rezultate enoletnega vzorčenja povezujemo sezonsko odvisnost kontaminacije školjk z bakterijami *E. coli*, to je pojavljanje višjih koncentracij v spomladanskem in jesenskem času. V poletnih mesecih, ko je opaziti nižjo pojavnost mikrobov in virusov, praviloma tudi ni obilnih, predvsem pa dolgotrajnih poslabšanj vremena. V raziskavi je sezonski vpliv zelo očiten, vendar ga zaradi prekratkega obdobja spremljanja ne moremo z gotovostjo potrditi oz. natančno opredeliti glede na mesece v letu. Podali smo tudi oceno tveganja. Glede na trenutno zakonodajo nobenega od školjčičišč ni mogoče direktno uvrstiti v razred A. Ugotavljamo, da imajo ekstremni vremenski pogoji, predvsem obilna deževja močan vpliv na onesnaženje morske vode in posledičen porast vrednosti bakterij *E. coli* v školjkah. Te podatke lahko pristojen organ po direktivi EU 2015/2285 upošteva pri kategorizaciji školjčičišč. Norovirusi so bili pogostejše prisotni v mesecih od oktobra do marca, najvišja stopnja kontaminacije je bila med januarjem in marcem. V našem obdobju vzorčenja je bila najnižja stopnja kontaminacije školjčičišč v Seči - 29,4 %, na Debelem rtiču 48,5 % in največ v Strunjanu - 54,5 %. Virusa hepatitisa A v naši študiji nismo ugotovili. Tudi po podatkih predhodnih študij je stanje v gojiščih školjk glede virusa hepatitisa A ugodno, vendar možnosti kontaminacij ne smemo izključiti. Potrdili smo logično pozitivno korelacijo med fekalno onesnaženostjo vode in kontaminacijo školjk ter negativno korelacijo med kontaminacije vode in školjk z oksidacijsko redukcijskim potencialom, pH vode in temperaturo. Toplejši del leta kaže na manjšo kontaminacijo školjk z virusi, kakor tudi s številom indikatorskih mikrobov *E. coli*, zato ocenjujemo, da je v poletnih mesecih mikrobiološka slika školjk najugodnejša.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

10.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Z intenzivnim enoletnim spremljanjem fizikalnih, kemijskih in mikrobioloških parametrov pri školjkah klapavicah (*Mytilus galloprovincialis*) in morske vode iz gojitvenih območij, smo dobili razširjen vpogled glede stanja v slovenski marikulturi. Dobljene rezultate smo povezali s izrednimi dogajanjem na morju, kot so npr. močni vetrovi, obilne padavine, morski tokovi in viri onesnaževanja. Z molekularnimi metodami smo ugotavljali prisotnost norovirusnih sevov in leti nam bomo glede na njihovo genetsko karakterizacijo služili pri epidemiološkemu povezovanju ob morebitnih izbruhih tovrstnih obolenj pri ljudeh. V študiji smo poleg analize gibanja koncentracije bakterij *E. coli* v školjkah ovrednotili tudi vplive vzporedno merjenih parametrov. Z natančno načrtovanim odvzemom vseh potrebnih vzorcev smo z opravljenim delom pridobili rezultate, ki podrobno razčlenjujejo posamezne lokacije slovenskih školjčičišč oz. mest, kjer se izvaja nabiranje školjk. Pri izoliranih bakterijah *E. coli* smo ugotavljali tudi prisotnost faktorjev patogenosti in odpornost proti protimikrobnim snovem in s tem dobili vpogled v nabor tovrstnih sevov v preiskovanem morskem ekosistemu. Izolirane seve smo razvrščali v skupino patogenih oz. komenzalnih bakterij. Podatki so v pomoč pri raziskovanju na področju morske ekologije, pomembni pa so tudi z vidika varnosti živil. S poznavanjem dejavnikov tveganja ter njihovo soodvisnost s pojavljanjem virusov in bakterij v školjkah smo oblikovali poročilo s poudarkom na oceni varnosti, ki je ključna pri zagotavljanju varnosti potrošnika.

ANG

With intensive one-year monitoring of the physical, chemical and microbiological parameters in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and sea water from the production areas, we obtained a broad view about the mariculture situation in Slovenia. These results were connected with special events at the sea, such as strong winds, heavy rainfall, sea currents and other sources of pollution. With molecular methods we determined the presence of norovirus strains. Regarding their genetic characterization it is possible to make an epidemiologic connection with outbreaks in humans, if they occur. In addition to the *E. coli* analysis in bivalve molluscs we gathered and evaluated information on the impact of other parameters measured at the same time. With planned collection of the samples, results were obtained of the individual locations of mussels harvesting areas. We tested antimicrobial resistance of the isolated *E. coli* strains and determined the presence of virulence factors. We got insight into a range of such strains in this marine ecosystem. The isolated strains were also sorted into groups of pathogenic or commensal bacteria. This data is helpful in marine ecology research and important in terms of food safety. By knowing the risk factors and their

correlation with the incidence of viruses and bacteria in shellfish a report was produced on the assessment of food safety.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Vse žive školjke, ki gredo na trg za neposredno prehrano ljudi, morajo biti skladne z mikrobiološkimi merili, določenimi z Uredbo (ES) 2073/2015 in zdravstvenimi standardi za žive školjke, ki so opredeljeni v Poglavju V oddelka VII Priloge III Uredbe (ES) št. 853/2007 - glede organoleptičnih lastnosti in vsebnosti morskih biotoksinov. Slovenska školjčičišča so uvrščena v razred B, v primerjavi s sosednjimi školjčičišči na Hrvaškem in v Italiji, v nižjo kategorijo. Gojitev školjk poteka v izredno spremenljivih pogojih, s številnimi zunanjimi vplivi. S pomočjo analize stanja kontaminacije školjk smo ugotavljali možnosti uvrstitve posameznih slovenskih školjčičišč v razred A, kar bi za proizvajalce predstavljalo višjo konkurenčnost na trgu in znižanje stroškov proizvodnje. Ocena stanja virov onesnaženja na področju priobalnega pasu, ki vpliva na kvaliteto morske vode v školjčičiščih, je uporaben podatek in pomoč pri določanju novih lokacij školjčičišč ter možne širitve že obstoječih. Proizvodnja klapavic, ki jih gojijo v Seči, Strunjanu in na Debelem rtiču, se je v zadnjem desetletju povišala na 500 ton. Stroški proizvodnje školjk so bistveno večji v primeru, da je le-te potrebno zaradi same kategorizacije pred oddajo v promet obvezno obdelati v centrih za prečiščevanje. S študijo smo ugotovili stopnjo mikrobiološke kontaminacije gojenih in prostoživečih klapavic v slovenskem morju. Pri ugotavljanju kontaminacije smo se osredotočili na prisotnost bakterij E. coli, virusa hepatitis A in norovirusov, poleg tega pa smo preiskovali tudi vsebnost bakterij E. coli in enterokokov v morski vodi iz gojišč ter ugotavljali vsebnost kovin tako v klapavicah kot tudi v morski vodi. S spremljanjem kvalitete morske vode v samih školjčičiščih in s spremljanjem vpliva okoljskih onesnaževalcev smo evidentirali najpomembnejše dejavnike tveganja in podali predloge za zmanjšanje tovrstnega tveganja. S poznavanjem dejavnikov tveganja ter njihovo soodvisnost s pojavljanjem virusov v školjkah smo oblikovali poročilo s poudarkom na oceni varnosti za zagotavljanje varne hrane za vsa slovenska školjčičišča. Te ugotovitve omogočajo odgovornim institucijam v Sloveniji učinkovitejši nadzor kvalitete in varnosti pridelane morske hrane, nosilec živilske dejavnosti - gojitelj školjk pa smernice in pomoč pri zagotavljanju varnosti živil, ki jih proizvajajo in za katera so odgovorni. Izvedena raziskava v kombinaciji z ocenami tveganja predvsem na področju virusne kontaminacije školjk služi potrošniku kot napotek k preprečevanju tovrstnih okužb. Podatki o vplivu okoljskih dejavnikov, kot so lastnosti morja (globina, plimovanje, morski tokovi) ter vremenski pojavi, ki smo jih tekom raziskave spremljali, omogočajo razumevanje kompleksnega dogajanja v morskem ekosistemu. Rezultati periodičnega spremljanja stanja kontaminacije na posameznih školjčičiščih služijo tako za načrtovanje vzorčenja v okviru uradnega nadzora, kakor tudi za potrebe interne kontrole nosilcev živilske dejavnosti.

ANG

All live bivalve molluscs, placed on the market for direct human consumption must comply with the microbiological criteria laid down in Regulation (EC) 2073/2015 and health standards for live bivalve molluscs, as defined in Chapter V of Section VII of Annex III of Regulation (EC) No. 853/2007 concerning the organoleptic characteristics and presence of marine biotoxins. Shellfish harvesting areas in Slovenia are classified as B category, in comparison with the neighboring harvesting areas in Croatia and in Italy, in a lower category. Shellfish breeding takes place in highly variable conditions with a number of external influences. Through the analysis of the contamination of shellfish we wanted to determine whether certain Slovenian harvesting areas could be placed in class A, which could result in a better market position of the producers and reduce their production costs. Assessment of the sources of pollution in the coastal waters, which affects the quality of seawater in harvesting areas, is useful information and helps to determine the new locations for harvesting and possible expansion of the existing ones. Yearly production of mussels, cultivated in Seča, Strunjan and Debeli Rtič, increased to 500 tonnes in the last decade. The cost of production increases with the additional purification in the depuration centre. With the study we determined the level of microbiological contamination of harvested and wild mussels in the Slovenian coastal waters. In determining the contamination, we focused on E. coli, hepatitis A virus and norovirus; in addition, we have examined the samples of marine water from harvesting areas for the content of E. coli and enterococci and we determined the content of metals in the Mediterranean mussel and in sea

water. By monitoring the quality of seawater in shellfish harvesting areas and the impact of environmental pollutants, we recorded the risk factors and made proposals to reduce such risks. By knowing the risk factors and their correlation with the incidence of viruses in shellfish we created a report with an emphasis on the food safety for all Slovenian harvesting areas. These findings can be used by the responsible institutions in Slovenia to carry out more effective control of the quality and safety of farmed seafood; they can also serve as guidance and assistance for the food business operators in ensuring the safety of produced food for which they are responsible. The research carried out in combination with risk assessments, in particular in the field of viral contamination of shellfish, may be used by consumers as a reference for the prevention of such infections. Data on the impact of environmental factors such as characteristics of the sea (depth, tides, sea currents) and weather events, which were monitored during the research, allow for an understanding of complex developments in the marine ecosystem. The results of periodic monitoring of contamination in some shellfish harvesting areas are useful for the planning of samplings for the purposes of official controls, as well as for the needs of internal control operators.

11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- ☒ v domačih znanstvenih krogih
☒ pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sfinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?¹¹

Gojitelji školjk.

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- ☒ v mednarodnih znanstvenih krogih
☒ pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:¹²

/

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:¹³

/

12. Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE

	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanju naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE

	Rezultat	Dosežen ▼
	Uporaba rezultatov	V celoti ▼
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	▼
	Uporaba rezultatov	▼
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	▼
	Uporaba rezultatov	▼
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	▼
	Uporaba rezultatov	▼
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen ▼
	Uporaba rezultatov	V celoti ▼
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	▼
	Uporaba rezultatov	▼

Komentar

/

13.Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☒	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☒	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☒	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☒	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☐	☒	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☐	☐	☐	☒	

G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti					
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost					
G.02.07.	Večji delež izvoza					
G.02.08.	Povečanje dobička					
G.02.09.	Nova delovna mesta					
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih					
G.02.11.	Nov investicijski zagon					
G.02.12.	Drugo:					
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti					
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti					
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij					
G.03.04.	Drugo:					
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01.	Dvig kvalitete življenja					
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja					
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave					
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti					
G.04.05.	Razvoj civilne družbe					
G.04.06.	Drugo:					
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura					
G.07.02.	Prometna infrastruktura					
G.07.03.	Energetska infrastruktura					
G.07.04.	Drugo:					
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					
G.09.	Drugo:					

Komentar

/

14.Izjemni dosežek v letu 2016¹⁴**14.1. Izjemni znanstveni dosežek**

/

14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

/

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Veterinarska
fakulteta

Andrej Kirbiš

ŽIG

Datum:

1.3.2017

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2017/11

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite cilje iz prijave projekta in napišite, ali so bili cilji projekta doseženi. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ V primeru odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih

nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹¹ Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹² Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹³ Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁴ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2016 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu.

Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/> [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2017 v1.00

E7-5F-84-7F-01-98-DE-55-61-47-F6-7B-30-DB-CD-A2-85-23-DB-C8

Priloga 1: Vsebinsko poročilo

Povzetek

V treh slovenskih školjčičih (Seča, Strunjan in Debeli rtič) ter prostem nabirališču (ob svetilniku na Debelem rtiču) smo v enoletnem obdobju vzorčili klapavice ter obenem izvajali tudi fizikalne meritve morske vode (temperatura, pH, elektroprevodnost in koncentracija v vodi raztopljenega kisika). Skupno smo izvedli 34 vzorčenj. V školjkah smo ugotavljali število bakterij *E. coli*, prisotnost norovirusov in virusa hepatitisa A (VHA), v morski vodi iz školjčič pa tudi vsebnost bakterij *E. coli* in enterokokov. Pri izoliranih sevih bakterij *E. coli* smo ugotavljali prisotnost genov, ki bakterijam omogočajo patogeno delovanje ter njihovo odpornost na protimikrobna zdravila. Poleg mikrobioloških preiskav smo v školjkah preiskovali tudi vsebnost kovin: Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Hg in As. V morski vodi smo analizirali vrednosti šestih parametrov onesnaževal: prosti baker, celokupni baker, nikelj, cink, sulfat in 6-valentni krom.

Podlaga za klasifikacijo školjčič so rezultati večletnega spremljanja števila bakterij *E. coli* v školjkah. Slovenska školjčiča so uvrščena v cono B, kar pomeni, da je školjke, preden so poslano v prodajo, potrebno prečistiti (depurirati). S spremljanjem kontaminacije školjk preko celega leta, večkrat mesečno, smo želeli zbrati čim več podatkov in odstopanja povezati z morebitnimi vzročnimi dogajanjem v okolju (padavine, vetrovi, različni izpusti). Upoštevali smo tudi rezultate uradnega monitoringa zadnjih treh let. Trenutna zakonodaja za klasifikacijo školjk v razred A določa mejno vrednost števila bakterij *E. coli* 230 MPN/100 g. S pregledom rezultatov 3-letnega obdobja, zbranih v programu Nacionalnega monitoringa školjk, ki obsega mesečno vzorčenje, ugotavljamo, da školjčiča teh zahtev ne dosegajo. Tudi v obdobju študije ob vzorčenju do trikrat mesečno, so posamezni rezultati na vseh školjčičih presegali mejne vrednosti 230 MPN/100g.

V naši študiji smo evidentirali vse potencialne onesnaževalce morske vode in spremljali podatke, ki so rezultati posameznih monitoringov na tem področju. Proučili smo morebitne dejavnike, ki bi lahko bili vzrok za povišane vrednosti bakterij *E. coli* v školjkah. Analizirali smo vzroke za povišane vrednosti bakterij *E. coli*, in tudi, v primeru ustreznih rezultatov, napisali priporočila za prekategorizacijo školjčič.

V Seči in Strunjanu je v obdobju vzorčenja prihajalo do posameznih povišanih vsebnosti bakterij *E. coli* v jesenskem obdobju, medtem ko tega na Debelem rtiču nismo opazili. V obdobju med koncem aprila in začetkom avgusta, v glavni kopalni sezoni, v nobenem školjčiču ni bila presežena vrednost 230 MPN/100 g, oz. do prvega tedna septembra nobena 700 MPN/100 g mesa in intravalvularne tekočine.

Prisotnost sevov *E. coli*, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja - ESBL (angl. extended spectrum β lactamase) smo ugotovili pri 14,7 % (5/34) vzorcih prosto nabranih klapavicah ob svetilniku na Debelem rtiču, v 5,9 % (2/34) vzorcev iz gojišča Seča, pri enakem odstotku tudi v gojišču Strunjan, medtem ko na Debelem rtiču niso bili prisotni. V vseh primerih, kjer so bili ti sevi prisotni, je bilo tudi število bakterij *E. coli* povišano nad 230 MPN/100 g v mesu školjk.

Seve *E. coli*, ki smo jih izolirali iz klapavic, smo uvrstili v skupine po Clermontu in tako ugotovili ali spadajo med komenzalne ali patogene bakterije. Iz školjčiča Strunjan je bilo 72,1 % sevov *E. coli* komenzalnih (skupine A0, A1, B1), 27,9 % pa potencialno patogenih (skupine B22, B23, D1, D2). Na območju Strunjana smo pri 4,9 % ugotovili tudi prisotnost gena *eae* in pri 1,6 % enterohemolizin *hly*. Pri vzorcih iz Seče je bil delež komenzalnih in patogenih bakterij nekoliko višji v korist prvih

(85,9 % : 14,1 %), pri sevih iz Debelega rtiča podobno kot pri Strunjanu (73,1 % : 26,9 %) in tudi pri prosto nabranih školjkah (75,0 % : 25,0 %). Pri vzorcih iz Seče, Debelega rtiča in prosto nabranih klapavic gena *eae* in *hlyen* nista bila prisotna, medtem ko verotoksinov (*vtx1* in *vtx2*) na preiskovanih lokacijah nismo ugotovili.

Ugotovljena stopnja kontaminacije klapavic z norovirusi v je bila v gojišču Seča 29,4 % (10/34), v Strunjanu 54,50 % (18/33), na Debelem rtiču 48,50 % (16/33) in pri prosto nabranih klapavicah ob svetilniku na Debelem rtiču 67,70 % (21/31). Od 100 testiranih vzorcev klapavic iz gojišč, jih je 44 vsebovalo norovirusno RNA: 18,2 % (8/44) genske skupine GI, 43,2 % (19/44) genske skupine GII ter 38,6 % (17/44) obe skupini. V zimskem obdobju je bila stopnja kontaminacije statistično značilno višja kot v poletnih mesecih. Virus hepatitisa A v nobenem od preiskovanih vzorcev nismo ugotovili. Tako ugotavljamo, da klapavice predstavljajo potencialno nevarnost za zdravje ljudi zaradi vsebnosti norovirusov, vendar pa podatki o okužbah v Sloveniji kažejo predvsem na prenos iz osebe na osebo. Podatka, da bi bile vir okužbe klapavice v Sloveniji nismo zasledili.

Vsebnosti Cr, Mn, Fe, Ni, Hg in Pb v mesu školjk so bile najvišje v zimskih mesecih, od januarja do marca, vsebnost ostalih elementov v školjkah pa se z letnimi časi ni bistveno spreminjala.

Od šestih merjenih parametrov onesnaževal v morski vodi smo statistično značilne razlike med vzorčnimi mesti ugotovili za koncentracije celotnega bakra, niklja in 6-valentnega kroma. Na podlagi rezultatov sklepamo, da imajo na koncentracije teh spojin večji vpliv lokalni kakor regionalni viri onesnaženja. Statistično značilnih razlik med vzorčnimi mesti nismo ugotovili za prosti baker, cink in sulfat. Enake vrednosti analiziranih parametrov na vseh vzorčnih mestih nakazujejo, da ima pomemben vir onesnaženja vpliv na celotno območje slovenskega morja in s tem tudi na območja školjišč in je verjetno regionalne narave.

Summary

During a one year period 34 samplings of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and seawater were carried out at three Slovenian shellfish harvesting areas (at Seča, Strunjan and Debeli Rtič) and in one location of wild Mediterranean mussels (at the lighthouse near Debeli Rtič). Samples of mussels were analysed for the presence of *E. coli*, norovirus and hepatitis A virus as well as for metal content (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Hg and As). Samples of seawater were analysed for the presence of *E. coli* and enterococci and for six parameters of pollutants: free copper, total copper, nickel, zinc sulphate and 6-valent chromium. The isolated *E. coli* strains were tested for the presence of virulence genes and anti-microbial resistance. Measurements of physical parameters of seawater (temperature, pH, conductivity and concentration of dissolved oxygen in the water) were also carried out.

The classification of bivalve mollusc harvesting areas shall be carried out on the basis of multiannual monitoring the number of *E. coli* in bivalve molluscs. Slovenian harvesting areas have been placed in class B, which means that the shellfish must go under the depuration procedure. By monitoring the contamination of shellfish throughout the year several times a month, we want to gather as much data and tolerances associated with causal events in the environment (rain, wind, different releases). We took into account the results of the official monitoring for the last three years. The current legislation for the classification of shellfish in Class A states the limit of the number of *E. coli* 230 MPN / 100 g. A review of the results of the 3-year period, collected in the program of national monitoring of shellfish, comprising monthly sampling note that harvesting areas do not meet those requirements. Even during the period of study at sampling up to three times a month, the individual results of all

shellfish farms exceeded the limit of 230 MPN / 100g.

In our study, we recorded all potential polluters of the sea water and monitor data that is collected from a variety of monitoring. We examined the potential factors that could be the cause of elevated levels of *E. coli* in bivalve molluscs. We have analysed the causes of elevated levels of *E. coli*, and also, in the case of relevant results, write recommendations for the classification.

During the sampling period there were some individual high peaks of *E. coli* in the autumn period at Seča and Strunjan harvesting areas, but not at Debeli rtič. In the period between the end of April and the beginning of August, the main bathing season, the value of 230 MPN/100 g, was not exceeded, and to the first week of September no 700 MPN/100 g respectively.

E. coli strains beta-lactamases with extended spectrum of activity - ESBL tested positive in 14.7% (5/34) of wild mussels collected at the lighthouse at Debeli rtič, at 5, 9% (2/34) of the harvesting area Seča, the same percentage also in Strunjan, while none was detected at Debeli rtič. The number of *E. coli* was elevated in all samples where these strains were present,

E. coli strains isolated from mussels, were further classified according to Clermont to determine whether the strains are commensal or pathogenic. From the Strunjan harvesting area 72.1% were commensal strains of *E. coli* (Group A0, A1, B1) and 27.9% were potentially pathogenic (groups B22, B23, D1, D2). In the Strunjan harvesting area 4.9% also carried *eae* gene, and 1.6% enterohemolysin *hly*. In samples from the Seča harvesting area the percent of commensal and pathogenic bacteria was slightly higher in favour of the commensal (85.9%: 14.1%), in strains from Debeli rtič, like at the Strunjan harvesting area (73.1%: 26.9%) and in wild mussels (75.0%: 25.0%). At the Seča and Debeli rtič harvesting areas, and also from wild mussels genes *eae* and *hly* were not detected. Verotoxins (*vtx1* and *vtx2*) were not detected.

Mussels at the Seča harvesting area tested positive for noroviruses in 29.4% (10/34) at the Strunjan in 54.50% (18/33), at the Debeli rtič harvesting area in 48.50% (16/33). Wild mussels collected at the lighthouse Debeli rtič tested positive in 67.70% (21/31). Of the 100 mussels from harvesting areas, 18.2% (8/44) tested positive for GI, 43.2% (19/44) for GII and 38.6% (17/44) for both genogroups. In the winter period, the rate of contamination was significantly higher than in the summer months. Hepatitis A virus was not detected. The mussels pose a potential threat to human health due to the presence of noroviruses, but data on infection in Slovenia mainly reflected the transfer from person to person, the information to be a source of infection mussels in Slovenia was not detected.

The concentration of Cr, Mn, Fe, Ni, Hg and Pb in shellfish flesh were highest during the winter months, from January to March, but still below the limit of the regulation. The content of other elements in the shellfish with the seasons did not change significantly.

Of the measured parameters of pollutants in seawater there were statistically significant differences between sampling sites identified for concentrations of total copper, nickel and 6-valent chromium. Based on the results we conclude that concentrations of these compounds are more influenced by local then by regional sources of pollution. Statistically significant differences between sampling sites for free copper, zinc and sulfate were not found. Equal concentrations of these parameters in all sites indicate that a significant source of pollution rather similar impact on the entire area of the Slovenian sea shell farms and probably regional.

Opis problema in ciljev

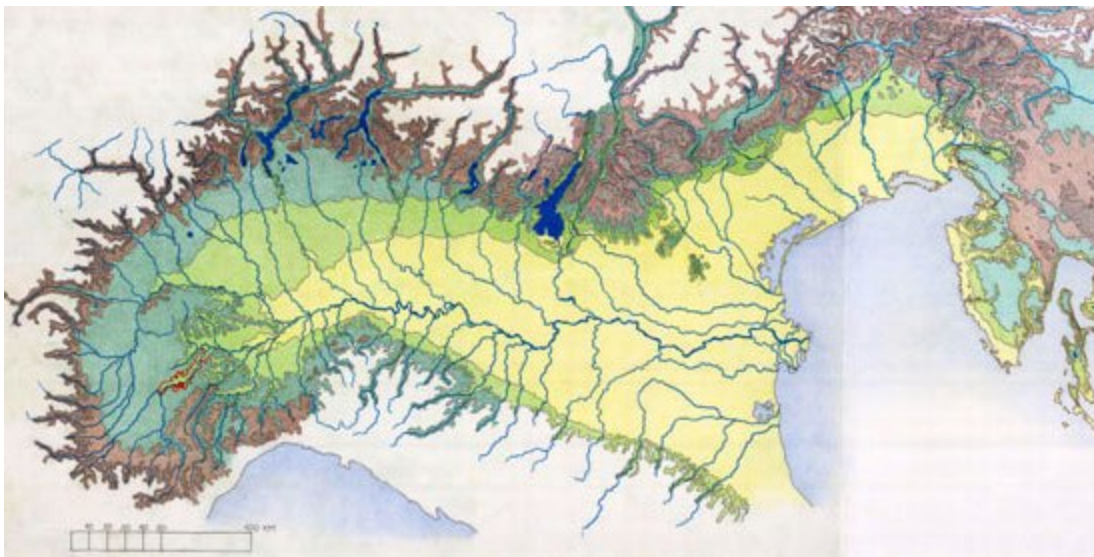
Školjke so organizmi, ki se hranijo s precejanjem vode in s tem potencialno kopičijo mikroorganizme, tudi patogene. Njihova kontaminacija je neposredno povezana z onesnaženjem morske vode. Školjke uvrščamo med živila z višjo stopnjo tveganja za zdravje, saj so pogost vzrok predvsem gastrointestinalnih obolenj ljudi. Školjke, ki se jedo surove, npr. ostrige, predstavljajo večje tveganje kot tiste, ki se uživajo toplotno obdelane, kot na primer klapavice, saj ob toplotni obdelavi večina patogenih mikrobov propade. Zaradi mikrobioloških dejavnikov, ki lahko negativno vplivajo na zdravje ljudi, ko školjke uporabljajo kot živilo, je potrebno njihovo stanje spremljati in školjke tudi prečiščevati, če je to potrebno.

V državah članicah Evropske skupnosti morajo školjke, ki so v prometu, izpolnjevati pogoje glede prisotnosti morskih biotoksinov, bakterij vrste *Salmonella* spp. in glede dovoljenega števila bakterij *E. coli* (Uredba (ES) št. 2073/2005, Uredba (ES) št. 854/2004). Glede zagotavljanja varne hrane na trgu je poleg naštetih preiskovanih parametrov pomembno tudi ugotavljanje prisotnosti bakterije *V. parahaemolyticus* in virusov; norovirusov in virusa hepatitisa A. Uredba (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila predvideva določitev meril za te parametre, ko bodo analitske metode ustrezno razvite.

Vsi naštetimi mikroorganizmi spadajo med povzročitelje nalezljivih črevesnih bolezni. Pri ljudeh se pojavljajo okužbe s patogenimi sevi *E. coli*, tudi tistimi, ki izločajo verotoksine (VTEC). Po podatkih Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni v Evropi ti sevi najpogosteje povzročajo hujša obolenja otrok. Pogostnost tovrstnih obolenj ostaja v zadnjih nekaj letih v Evropi nespremenjena, občasno pa prihaja do množičnih izbruhov, med katerimi so zabeležili tudi smrtne primere.

Norovirusi pri ljudeh povzročijo 90 % vseh nebakterijskih gastroenteritisov in so vzrok številnih izbruhov bolezni, povezanih s hrano. Do okužb z virusom hepatitisa A (VHA) prihaja redko. Slovenija je po podatkih ECDC država z nizko stopnjo obolevnosti (ECDC, 2014). Največkrat se virus prenese s stikom z obolelo osebo, redkeje pride do okužbe s hrano ali vodo.

Problematika mikrobiološke kontaminacije školjk, gojenih v naših vodah, še ni bila v celoti raziskana. Slovenski del Jadranskega morja predstavlja le manjši del severnega Jadrana. Severni Jadran je morje zalivskega tipa. Zanj so značilne slaba cirkulacija vodnih mas, plitvost, izdatni vplivi celinskih voda in izpiranje flišnega zaledja (Sotlar, 2000). Naštete značilnosti dajejo severnemu Jadranu in našemu delu obalnega morja pečat ekološke nestabilnosti, zato so negativni vplivi posameznih dejavnikov na njegovo kakovost bolj izraziti kot v globljih bolj odprtih morjih. Zaradi izdatnih vplivov celinskih voda na celotno območje severnega Jadrana (slika 1), je slovenski del Jadranskega morja pod velikim vplivom onesnaževanja sosednjih držav in torej lahko govorimo o regionalnem vplivu na stanje voda. Velike reke, ki pritekajo predvsem z italijanske obale s seboj prinašajo izdatne količine močno onesnaženih voda (Sotlar, 2000). Poleg regionalnega vpliva t.j. onesnaženja, ki ga v severni Jadran prinesejo reke (npr. Reno, Pad, Adiža, Tagliamento, Soča), je onesnaženost severnega Jadrana posledica tudi gospodarskega in urbanega razvoja severnojadranskih obalnih mest z zaledjem. Na stanje voda oz. izmerjene koncentracije onesnaževal v vodi poleg regionalnih virov vplivajo tudi lokalni viri onesnaženja. V nadaljevanju podajamo lokalne vire onesnaževanja in oceno količine onesnaževal na območju gojišča školjčič v slovenskem morju. Na podlagi rezultatov analize primerjave koncentracij izmerjenih vrednosti onesnaževal v vodi na območju gojišča školjčič, ki smo jih izvedli v okviru projekta v obdobju 2014–2015, podajamo oceno o možnem vplivu regionalnih in lokalnih virov onesnaženja.



Slika 1: Večje reke (modre črte) prispevnega območja severnega Jadrana. Vir: www.meteoweb.eu

Onesnaženje morja, katerega posledica so kontaminirane školjke, je posledica neurejenih komunalnih razmer ob morju, ob rekah, ki se zlivajo v morje ter tudi intenzivnega ladijskega prometa. Obala slovenskega morja je dolga 46 km in je precej naseljena, kar predstavlja še dodaten obremenilni dejavnik za morsko okolje. Iz občine Piran so izpusti fekalnih odpadkov napeljeni direktno v morje s tako imenovanim podmorskim izpustom. Tovrstni izpusti povzročajo fekalno onesnaženje voda ter posledično vplivajo tudi na mikrobiološko kvaliteto školjk, ki jih gojimo v slovenskih školjiščih.

Na mikrobiološko onesnaženost morja ob slovenski obali imajo lahko vpliv različni viri onesnaževanja ob slovenski obali ter izpusti odpadnih voda iz plovil. Vire onesnaževanja ob slovenski obali lahko razdelimo na:

- izpuste neočiščenih ali slabo očiščenih komunalnih odpadnih voda v morje,
- izpuste slabo očiščenih odpadnih voda iz komunalnih čistilnih naprav v reke, ki se izlivajo v morje,
- izpuste slabo očiščenih tehnoloških odpadnih voda iz kopnega v morje,
- izpuste odpadnih voda iz plovil v morje,
- disperzne vire onesnaževanja iz obale (kmetijstvo, gospodinjstva, meteorne odpadne vode),
- povečano obremenjenost voda v času turistične sezone,
- kontaminirano vodo, ki jo prinese morski tok in
- naravne vire onesnaževanja (ptičji iztrebki, poginule živali ...).

Gojišča užitne klapavice (*Mytilus galloprovincialis*) so v sečoveljskem zalivu (Seča), Strunjanu in na Debelem rtiču. Globina morja v tem področju je 5 do 13 metrov, dno je muljasto, delno pa je preraščeno z morskovo travo.

Zakonodaja na tem področju opredeljuje zahteve glede kakovosti morja za gojenje školjk (Direktiva

2006/113/ES o zahtevah glede kakovosti voda, primernih za lupinarje) ter opredeljuje spremljanja stanja teh voda s pravilnikom - »Pravilnik o monitoringu kakovosti površinske vode za življenje in rast morskih školjk in morskih polžev (Ur. l. RS, št. 71/2002)«. Kakovost odpadnih voda, ki lahko odtekajo v morje, opredeljuje »Uredba o emisiji snovi in toplote pri odvajanju odpadnih vod v vode in javno kanalizacijo (Ur. l. RS, št. 47/2005, 45/2007, 79/2009 in 64/2012)«. Izpusti odpadnih voda iz komunalnih čistilnih naprav imajo nižje kriterije glede kakovosti odpadne vode, v primerjavi s kriteriji iz zgoraj navedene uredbe. Na obali še vedno predstavljajo največji vir onesnaževanja morja prav komunalne odpadne vode, ki so relativno slabo očiščene. V naši raziskavi smo proučili povzročitelje onesnaževanja morskega okolja, predvsem tiste iz priobalnega pasu) ter mikrobiološko stanje školjk (*E. coli*, enterokoki, norovirusi, VHA). Ovrednotili smo kontaminacijo školjk na posameznih področjih, tako glede prisotnosti patogenih mikrobov (norovirusi, VHA) kakor tudi glede kvantitativne prisotnosti indikatorskih mikrobov (*E. coli*), ki so pokazatelj stopnje fekalne onesnaženosti. Bakterije *E. coli* so večinoma komezalni mikroorganizmi, nekateri pa so lahko patogeni. Pri nekaterih izoliranih sevih *E. coli* smo ugotovili prisotnost različnih genov, ki bakterijam omogočajo patogeno delovanje, pri nekaterih tudi odpornost na protimikrobna zdravila. Vzporedno z vzorčenjem školjk in vode smo spremljali tudi okoljske dejavnike, kot so padavine, plimovanje, vetrove in morske tokove na teh območjih.

Uredba (ES) št. 854/2004 določa, da so školjčičišča glede na stopnjo fekalne onesnaženosti lahko uvrščena v razred A, če je kontaminacija školjk ovrednotena z manj kot 230 bakterij *E. coli* v 100 gramih mesa in tekočine. Školjke iz teh školjčičišč so na trgu lahko neposredno namenjene za prehrano ljudi. Vrednosti bakterij *E. coli* iz področij, ki so uvrščena v kategorijo B, ne smejo presegati $4600 \pm 10\%$ v 100 g in so na tržišču lahko le po obdelavi v obratu za prečiščevanje ali po ponovni nasaditvi. Nova Uredba 2015/2285, ki začne veljati s 1. 1. 2017, namesto trenutne meje *E. coli* - 230 MPN/100g za školjke kategorije A za 20 % rezultatov dopušča vrednosti ≤ 700 MPN/100g.

V statistično vrednotenje rezultatov kontaminacije školjk z bakterijami *E. coli* smo vključili rezultate pridobljene v času študije ter rezultate pridobljene za namen Nacionalnega monitoringa školjk, ki se je izvajal v tem obdobju. Naročnik vsakoletnega Nacionalnega monitoringa školjk je Uprava Republika Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR), od katerega smo pridobili soglasje za vključitev teh dodatnih rezultatov v obdelavo. Proučili smo nihanja v stopnji fekalne onesnaženosti na posameznem školjčičišču glede na letni čas in vremenske razmere. Predvsem smo bili pozorni na občasno povišano koncentracijo indikatorskih mikrobov ter glede na ugotovljene vrednosti proučevali možnosti glede kategorizacije posameznih območij gojenja školjk.

V prvi fazi raziskovalnega projekta smo preučili podatke vsakoletnih monitoringov okolja in ocenili količine organskih onesnaževalcev. Analizirali smo tudi rezultate kontaminacije školjk v zadnjih letih, ki so bili pridobljeni z Nacionalnim monitoringom školjk, ki ga letno izvaja UVHVVR. Na podlagi že izvedenih preiskav smo ugotovili stanje mikrobiološke kontaminacije na posameznih odzemnih mestih v vsakem posameznem školjčičišču. Določili smo tudi kontrolno mesto za vzorčenje v naravnem rastišču klapavic. Sprva smo načrtovali ob piranski Punti, vendar je školjk tam premalo, nato smo se osredotočili na Ronek ob Izoli, vendar, ker je to mesto na meji naravnega parka in zavarovano ter logistično težavno smo se odločili, da bomo školjke pobirali ob svetilniku na Debelem rtiču.

Evidentirali smo povzročitelje oziroma vir onesnaženja, ki posledično predstavljajo vir (bakterijske in virusne) kontaminacije proizvodnega območja školjk. Proučili smo količine organskih onesnaževalcev, sproščenih v različnih letnih obdobjih glede na sezonska nihanja v območju ulova, vključujoč podatke o padavinah, čiščenju odpadnih voda ter opredelili stopnjo vira onesnaževanja.

V drugi fazi projekta smo izvajali vzorčenje in opravljali meritve v treh školjčiščih - Seči, Strunjanu, na Debelem rtiču ter v naravnem rastišču školjk svetilniku na Debelem rtiču. V obdobju 13 lunarnih mesecev smo trikrat mesečno odvzeli vzorce školjk in vode in ob tem spremljali oziroma merili več fizikalno - kemijskih parametrov. Opravljali smo mikrobiološke in kemijske preiskave školjk.

V tretji fazi smo interpretirali rezultate testiranja vzorcev v naši študiji. Zbrali in analizirali smo tudi podatke predhodnih študij glede kontaminacije školjk in izdelali oceno tveganja.

Analizirali smo podatke o gibanju koncentracije bakterij *E. coli* v školjkah in ovrednotili vplive vzporedno merjenih parametrov. Pri izoliranih bakterijah smo ugotavljali tudi njihovo odpornost proti protimikrobnim snovem in faktorje patogenosti. Z podrobno analizo že pridobljenih rezultatov in z rezultati tekom projekta smo pridobili natančen presek stanja posameznega školjčišča. Določili smo vplive cirkulacije onesnaževalcev s pomočjo vzorcev tokov, batimetrije in ciklusa plimovanja na proizvodnih območjih in območjih prostega nabiranja školjk. Proučili smo stopnjo kontaminacije školjk z norovirusi in VHA v vseh treh školjčiščih in enem naravnem rastišču klapavic. Zbrali in analizirali smo podatke predhodnih študij glede kontaminacije školjk in izdelali oceno tveganja. Proučili smo tudi pojavljanje virusov na posameznih lokacijah in ugotavljali morebiten vpliv bližnjih večjih izpustov fekalnih odplak. Z načrtovanimi raziskavami smo dobili vpogled v problematiko pojavljanja fekalnih onesnaževalcev pri gojenju školjk. S sistematično opravljenimi analizami v samih školjčiščih in ob sočasnih odvzemih vzorcev vode podajamo vzročne povezave med dogajanjem v morskem ekosistemu in v samih školjkah. Dobljeni rezultati bodo UVHVVR RS lahko v pomoč pri določitvi najustreznejše kategorizacije proizvodnje školjk v tem segmentu marikulture.

Kratek povzetek ključnih ugotovitev iz literature

Na slovenski obali so prisotna velika nihanja količin in obremenjenosti odpadnih voda na iztokih v morje. To je povezano predvsem s turistično dejavnostjo, zaradi katere se v turistični sezoni bistveno povečata količina in obremenjenost odpadnih voda. Medtem ko so nekateri veliki industrijski onesnaževalci svojo dejavnost zmanjšali oziroma so jo zaprli (Tomos, Delamaris, Iplas, itd.), je v zadnjem obdobju svojo dejavnost povečevala Luka Koper. Z aktivnostmi luke je povezano neposredno in posredno onesnaževanje. Največji delež temu prispevajo plovila, ki prihajajo v Luko Koper, saj na vsaki ladji nastajajo komunalne, tehnološke odpadne in tudi balastne vode, v katerih so lahko tudi mikroorganizmi ter rastlinske in živalske vrste, ki so našemu morskemu ekosistemu tuji.

Za obrate, ki se ukvarjajo s primarno pridelavo školjk – školjčišča, je obvezna registracija - postopek priglasitve nosilca živilske dejavnosti pri krajevno pristojnem območnem uradu Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR). Za pripravo uradnih programov klasifikacije pa so odgovorni pristojni organi, in glede na zahteve v Prilogi II k Uredbi (ES) št. 854/2004. V državah članicah Evropske skupnosti morajo školjke, ki so v prometu, izpolnjevati pogoje tudi glede dovoljenega števila bakterij *E. coli* (Uredba (ES) št. 2073/2005, Uredba (ES) št. 854/2004. Odstavek 2 poglavja II dela A Priloge II k Uredbi (ES) št. 854/2004 določa, da mora pristojni organ klasificirati proizvodno območje, iz katerega dovoli nabiranje živih školjk, kot eno od treh kategorij, glede na stopnjo fekalne onesnaženosti. V razred A so uvrščene školjke, ki vsebujejo manj kot 230 MPN *E. coli* v 100 gramih mesa in intravalvularne tekočine in so lahko na trgu neposredno za prehrano ljudi. Školjke iz področij, ki so uvrščene v kategorijo B, ne smejo presegati $4600 \pm 10\%$ *E. coli* v 100 g in so na tržišču za neposredno prehrano ljudi samo po obdelavi v obratu za prečiščevanje ali po ponovni nasaditvi. Kontaminacija školjk iz razreda C ne sme preseči 46.000 bakterij *E. coli* v 100 g. Školjke,

nabrane iz tega proizvodnega območja, lahko damo na trg po daljši ponovni nasaditvi. Nova Uredba 2015/2285, ki začne veljati s 1. 1. 2017, namesto sedanje mejne vrednosti za stopnjo kontaminacije z *E. coli*, ki je 230 MPN/100g školjk za kategorijo A, pri 20 % rezultatov dopušča vrednosti ≤ 700 MPN, če je preostalih 80 % rezultatov vrednosti ≤ 230 MPN v 100g.

Klasifikacija školjčičišč temelji na podlagi dolgoletnega spremljanja rezultatov o vsebnosti bakterij *E. coli* v školjkah. Trenutno so školjčičišča v slovenskem morju uvrščena v kategorijo B in se vse školjke pred prodajo na trg prečisti (depurira). Postopek depuracije pa ni učinkovit za odstranjevanje virusov.

V letih 2003 in 2004 je bilo število 230 MPN/100g preseženo v povprečno 10 % testiranih školjk, število 4600 /100 g pa le izjemoma (v manj kot 1 % vzorcev) (Biasizzo in sod., 2005). Tudi v Poročilu o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v letu 2012 (UVHVVR, 2013), ki povzema podatke o kontaminaciji školjk iz obdobja od 2007 do 2012, ugotavljajo, da je 91,2 % vzorcev ustrezalo pogojem za cono A, vsi vzorci pa pogojem za cono B.

O posamičnih povišanih vrednosti bakterij *E. coli* poročajo tudi iz drugih držav in opozarjajo na občasno povečanje kontaminacije v povezavi s kmetijstvom (Kay in sod., 2008). Crowther in sod. (2011) poročajo o vplivu industrijskih in komunalnih izpustov in odplak, ki so posledica kmetijske in živinorejske dejavnosti ter meteornih voda iz urbanih področij.

Večina sevov *E. coli* je komezalov, nekateri pa so patogeni in nosijo v svojem genomu zapise za virulencne dejavnike, kot so adhezini, enterohemolizini, avtotransporterji, toksini in dejavniki za izogibanje imunskemu sistemu. Dejavniki virulence ločujejo potencialno patogene seve od komezalnih črevesnih sevov (Johnson, 1991). Intimin je protein zunanje membrane in je edini črevesni kolonizacijski dejavnik, ki je bil doslej identificiran pri sevih EHEC. Ima gen *eae* za intimin in je izražen tako pri sevih EPEC kot tudi pri EHEC (Delahay in sod., 2001). Plazmidi, ki jih pogosto najdemo pri sevih O157:H7, kodirajo gen za enterohemolizin *ehxA* (Schmidt in sod., 1994). Verotoksini (VT) so podobni šigatoksinom, ki jih proizvaja bakterija *S. dysenteriae* tipa 1 (Karmali in sod., 2010). Poznamo dve glavni skupini verotoksinov VT1 in VT2 in dva podtipa VT2c in VT2d. Viri bakterij, ki sintetizirajo VT, so pogosto zdrave domače živali, zlasti govedo. Z iztrebki okuženih živali se širijo v okolje, v vodo, na zelenjavo in sadje (Trkov in sod., 2008). V prebavilu goveda je največkrat prisoten verotoksin tipa VT2c (Fröhlich in sod., 2009).

Seve *E. coli* delimo v štiri glavne filogenetske skupine: A, B1, B2 in D, po metodi, ki so jo opisali Clermont in sodelavci (2000). Gre za primerjavo nukleotidnih zaporedij kromosomskih odsekov različnih sevov *E. coli*, s pomnoževanjem genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta TspE4.C2. Gen *chuA* je odgovoren za transport železa v enterohemoragičnem sevu O157:H7, funkciji gena *yjaA* in fragmenta DNA TspE4.C2 pa trenutno še nista poznani.

Zaradi dolgotrajne in pogosto tudi neupravičene rabe protimikrobnih zdravil v humani in veterinarski medicini je privedlo do pridobljene odpornosti bakterij proti različnim skupinam antibiotikov (Livermore, 2009). Eden izmed pomembnih mehanizmov odpornosti je tvorba encimov za razgradnjo antibiotikov, geni za te encime pa se največkrat nahajajo na mobilnih genetskih elementih kot so plazmidi. V skupino bakterij, ki v zadnjih letih povzročajo največ težav v javnem zdravstvu, uvrščamo bakterije, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja - ESBL (angl. extended spectrum β lactamase) in/ali AmpC ter imajo mehanizme za odpornost proti kinolonom.

V tkivu školjk se prav tako lahko nahajajo norovirusi in virus hepatitisa A. Norovirusi so genetsko zelo raznolika skupina virusov iz družine *Caliciviridae*. Humani sevi spadajo v genske skupine I, II in IV. Znotraj genskih skupin razlikujemo številne genotipe. Največji del okužb z norovirusi povzročajo

sevi iz genske skupine II, predvsem genotip II.4. Za detekcijo norovirusov in HAV uporabljamo molekularne metode: verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) in RT-PCR v realnem času (real-time RT-PCR). Z norovirusi in virusom hepatitisa A se okužimo kontaktno oz. z zaužitjem kontaminirane hrane oz. vode. Izvor okužb so lahko tudi školjke. Norovirusi se v školjkah ne razmnožujejo, se pa v njih koncentrirajo. Na prebavne žleze školjk se vežejo aktivno, z ogljikovodikovimi vezmi. Tako vezani lahko ostajajo v školjkah več tednov kljub prečiščevanju, medtem ko lahko bakterije iz školjk uspešno odstranijo v krajšem času. Inkubacijska doba pri ljudeh traja 1–3 dni. Znaki okužbe so poslabšanje počutja, povišana telesna temperatura, pojavit se bruhanje in driska. Simptomi po dveh ali treh dneh izzvenijo. Raziskovalci ugotavljajo, da prične število norovirusnih okužb pri ljudeh naraščati v jesenskem obdobju (v oktobru in novembru). Vrh običajno dosežejo januarja, nato pa se število obolelih zmanjša (Vinjé in sod., 1997; Koopmans in sod., 2000).

Z raziskavami na področju prisotnosti norovirusov v školjkah smo v Sloveniji pričeli v letu 2004, aktivneje pa jih izvajamo od leta 2006 dalje. V raziskavi, ki je bila opravljena v Sloveniji v obdobju 2006–2008, je bila norovirusna RNA največkrat ugotovljena v klapavicah, nabranih v hladnejših mesecih, delež kontaminiranih klapavic pa je bil v povprečju 16,7 % (Henigman, 2012). Glede na lokacijo, je bila norovirusna RNA največkrat prisotna v klapavicah iz školjčišča na Debelem rtiču in v prosto živečih klapavicah iz okolice Pirana.

Virus hepatitisa A je brez ovojnice in vsebuje pozitivno polarno enovijačno RNA. Je eden izmed najmanjših virusov. Uvrščamo ga v rod Hepatovirus in družino Picornaviridae. Razlikujemo šest virusnih genotipov (Robertson in sod., 1992). Genotipi I, II, III so patogeni za ljudi, medtem ko so genotipe IV, V in VI ugotovili le pri opicah (Robertson in sod. 1992; Arauz-Ruiz, 2001). Pri ljudeh sta najpogostejša genotipa I (podtipa A in B) in III (podtipa A in B). Osemdeset odstotkov okužb predstavlja genotip I, precej manj genotip III. Genotip IA je bolj razširjen kot genotip IB in se pojavlja pri ljudeh po celem svetu, medtem ko se genotip IB pojavlja le v mediteranskih deželah. Viruse genotipa III so ugotovili pri ljudeh na Švedskem, Indiji in Nepal (Khanna in sod., 1992). Virus je zelo odporen na zamrzovanje, UV-žarke, pH (obstoje so v območju pH od 3–4 do 9–10) in razkužila (Siegl in sod., 1984). Tudi v organski snovi kot so fekalije, lahko virus ostane kljub sušenju infektiven še en mesec (McCaustland in sod., 1982). V vodi, vodnih usedlinah ali školjkah ostaja več tednov ali mesecev (Bosch, 1995). V Sloveniji je bilo v letu 2012 11 prijavljenih primerov, s tem je bila stopnja incidence 0,5 na 100.000 prebivalcev. Na podlagi dosedanjih raziskav, ki smo jih izvajali pri školjkah gojenih v slovenskih školjčiščih, VHA nismo ugotovili (Henigman, 2012).

Zaradi nevarnosti prenosljivih bolezni povezanih z uživanjem školjk je večina držav sprejela sanitarne ukrepe. V Evropski uniji so leta 1993 sprejeli predpise (European Directive 91/492/EEC), ki določajo testiranje školjk in vode, v kateri jih gojijo, na prisotnost določenih bakterij (*Salmonella* spp. in *Escherichia coli*) z bakteriološkimi analizami. Bakteriološki nadzor je dober pokazatelj fekalnega onesnaženja, vendar so lahko školjke, ki ustrezajo bakterijskim standardom, kljub temu kontaminirane z virusi. Virusi ostanejo v morskem okolju daljši čas kot bakterijski patogeni.

Po zahtevah uredbe je potrebno za kovine (kadmij, svinec, živo srebro) zagotoviti tudi dolgoročno analizo trenda njihove prisotnosti v sedimentu in/ali živih organizmih. Analize sedimenta in mesa školjk mediteranske klapavice se že vrsto let izvajajo v okviru Barcelonske konvencije (Sklep sveta z dne 22. oktobra 1999

o sklenitvi Protokola o posebej zavarovanih območjih in biotski raznovrstnosti v Sredozemlju ter o sprejetju prilog k navedenemu protokolu in v okviru izpolnjevanja zahtev direktive o kakovosti vode za življenje in rast morskih školjk in morskih polžev (Ur. l. RS, št. 71/2002). Analize sedimenta se opravijo enkrat letno, analize mesa školjk pa dvakrat letno (kadmij in živo srebro).

Metode dela

Vzorčenje školjk

Vzorčenja smo opravljali od novembra 2014 do novembra 2015 v treh školjčiščih: v Seči, Strunjanu in na Debelem rtiču ter v enem naravnem rastišču klapavic (ob svetilniku na Debelem rtiču). V vsakem školjčišču smo ob posameznem vzorčenju odvzeli cca 1 kg školjk na določenih devetih odvzemnih točkah. V školjčiščih Strunjan na točkah 757, 817 in 818, v Seči na 752, 904 in 1021, iz školjčišča na Debelem rtiču na točki 996 in 819 ter iz ene točke prosto nabranih – ob svetilniku na Debelem rtiču.

Vzorčenje smo razdelili na 13 lunarnih mesecev. V vsakem lunarnem mesecu smo opravili tri vzorčenja: prvo ob največji plimi - ob polni luni (ščipu), drugo ob zadnjemu kraju in tretje ob največji oseki - prazni luni (mlaju). Skupno smo v vsakem območju v enoletnem obdobju opravili 34 vzorčenj klapavic in vode. V petih primerih smo zaradi močnega vetra namesto predvidenih terminov vzorčenje prestavili na prvi dan po ustreznih razmerah in tako zajeli tudi razmere po močnem vetru.

Vzorčenje je bilo opravljeno trikrat mesečno glede na lunine mene. Ob vsakem vzorčenju smo v morski vodi merili temperaturo, vsebnost kisika, pH, oksidoredukcijski potencial (ORP), prevodnost, tlak in hitrost morskega toka. Ob vsakem obisku smo odvzeli vzorce morske vode za kemijske analize ter školjke in morsko vodo iz tega območja za bakteriološke preiskave. Jemanje vzorcev je potekalo po načrtu, z vsakokratnim dogovarjanjem z gojitelji školjk, saj je bilo v primeru močnega vetra (>13kts) vzorčenje prestavljeno. Vzorce smo zaradi vetra morali prestaviti petkrat: namesto predvidenega 4. 2. smo vzorčili po burji 10. 2., namesto 5. 3. smo vzorčili 10. 3., namesto 4. 4. smo vzorčili 8. 4., iz 31. 7. smo prestavili na 3. 8., ter iz 28. 9. na 5. 10. 2015. Vzorce, ki je bilo načrtovano v soboto, smo prestavili na petek, vzorčenje, ki bi moralo biti v nedeljo pa na ponedeljek. V obdobju vzorčenja smo tako zajeli pogostejše tudi obdobje po močnih vetrovih, in tudi po močnih nevihtah.

Merjenje morskih tokov in kemijske analize morske vode

Vzorčenje smo izvajali tako, da smo poleg jemanja vzorcev morske vode in školjk merili tudi fizikalne parametre: temperaturo, pH, oksigenacijo, ORP, koncentracijo v vodi raztopljenega kisika, prevodnost in hitrost morskih tokov. Meritve splošnih fizikalno-kemijskih parametrov in vzorčenje vode za analize onesnaževal smo izvedli v 34 terenskih dneh v obdobju enega leta med 6. novembrom 2014 in 28. oktobrom 2015. Splošne fizikalno-kemijske parametre smo merili na devetih postajah - odvzemnih točkah. Meritve smo izvedli z multimetrično sondo (YSI, USA). Koncentracije onesnaževal smo analizirali iz vzorcev nabranih na štirih postajah: Debeli rtič 819, Debeli rtič svetilnik, Seča 904 in Strunjan 818. Analizirali smo vrednosti šest parametrov onesnaževal: prosti baker, celokupni baker, nikelj, cink, sulfat in 6-valentni krom. Analize smo izvedli z uporabo fotometra (YSI 9300, USA) in reagentov za predhodno pripravo vzorca (YPM281 Chromium, YPM186 Copper, YPM281 Nickel, YPM154 Sulfate, YPM148 Zinc). Vzorce so bili pred meritvijo pripravljeni v skladu s priloženimi protokoli.

Razlike med vzorčnimi mesti v vrednosti onesnaževal smo ugotavljali na podlagi neparametričnih testov več odvisnih vzorcev. Izvedli smo Friedmanov test z uporabo »post-hoc« Wilcoxonovega testa predznačenih rangov. Rezultate smo grafično prikazali z uporabo linijskih diagramov in grafiknov kvartilov. Statistične analize smo izvedli s pomočjo SPSS 21 (IBM, 2012).

Kemijske analize v školjkah

V klapavicah smo enkrat mesečno v obdobju od januarja do oktobra 2015 določili vsebnosti Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Hg in As. Za analizo smo uporabili deset školjk s posameznega školjčičišča podobne velikosti. Školjke smo pred homogenizacijo izmerili in stehtali ter po odprtju določili maso mehkega tkiva. Meso vseh deset školjk smo združili in homogenizirali ter razklopili s pomočjo mikrovalov. V teflonsko posodo smo odtehtali 0,5 g vzorca dodali 4,5 ml Milli-Q vode, 3 ml 65 % HNO₃ ter 0,5 ml H₂O₂ ter jih razklopili v zaprtem mikrovalovnem sistemu Milestone Start D. Vzorce smo segreli na 200 °C in nato vzdrževali to temperaturo še 30 minut. Po razklopu smo vzorce razredčili z Milli-Q vodo do volumna 20 ml. Pred meritvijo smo vzorce dodatno razredčili in sicer smo 2 ml vzorca dodali 5 ml Milli-Q vode. Vsak vzorec smo razklopili in analizirali dvakrat. Vsebnost elementov v raztopini smo določili z induktivno sklopljeno plazmo masno spektrometrijo (ICP-MS) z inštrumentom Varian 820-MS (Mulgrave, Australia). Določevanje arzena z ICP-MS moti nastajanje poliatomskih ionov, ki imajo enako maso kot arzenov izotop. Da bi odstranili omenjene interference, smo pri določevanju arzena uporabili kolizijsko reakcijsko celico (CRI) v katero smo uvajali vodik s pretokom 70 ml/min. Merili smo sledeče izotope (m/z): Cr: 53, Mn: 55, Fe: 57, Co: 59, Ni: 60, Cu: 63, Zn: 66, , Cd: 111, Pb: 206+207+208, Hg: 202 in As: 75 (CRI plin). Rezultate smo ovrednotili s pomočjo eksterne umeritvene krivulje, ki smo si jo pripravili z razredčitvijo multi elementnega standarda (Merck), ki vsebuje As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, V in Zn, v koncentraciji 100 mg/l. Skupaj z vzorci smo analizirali certificiran referenčni material (ERM – CE278k mussel tissue), in po potrebi korigirali rezultate z izkoristkom.

Ugotavljanje števila bakterij *E. coli* v vzorcih školjk

V vzorcih klapavic smo ugotavljali število *E. coli* z metodo MPN (most probable number) ISO/TS 16649-3, ki je referenčna metoda za ta namen. Sterilno smo odvzeli 50 g celotne vsebine školjk, jo homogenizirali z devetkratno količino fiziološke slane raztopine, nasadili v štirih različnih razredčitvah na gojišče MMB (Mineral modified medium broth) ter inkubirali 24 ur pri 37 °C±1 . Glede na spremembo barve gojišča smo z zanko vsebino epruvete sterilno precepili na gojišče Tryptone bile-glucuronic medium (TBX), inkubirali 18 do 24 ur pri 44 °C±1 in pregledali plošče ter rezultate interpretirali.

Ugotavljanje bakterij *E. coli* in fekalnih enterokokov v morski vodi

Ugotavljanje števila bakterij *E. coli* in fekalnih enterokokov v morski vodi smo izvedli z uporabo metode MPN s 5 epruvetami in dvema razredčitvama. Uporabili smo obogatitveno gojišče Andrade lactose peptone water v epruvetah z vstavljenjo Durchamovo cevko. V primeru spremembe barve po inkubaciji 48 ur pri 37°C, ki kaže na prisotnost bakterijskih onesnaževalcev, smo vzorec iz vsake spremenjene epruvete precepili na gojišče Slanetz bartley agar ter ga inkubirali 48 ur pri 37 °C. Značilne kolonije za fekalne enterokoke so na gojišču višnjevo rdeče barve. Ko se je poleg spremenjene barve gojišča v cevki pojavil zračni mehurček, smo iz teh epruvet vzorec precepili na kromogeno selektivno gojišče Trypton bile glucuronide agar ter plošče inkubirali pri 44 °C 24 ur. Rezultate smo ovrednotili glede na število uporabljenih in pozitivnih enot, skladno z načinom interpretacije za MPN metode (ISO 7218).

Ugotavljanje bakterij *E. coli* z razširjenim spektrom beta laktamaz

Vzorke za preiskavo smo združili iz posameznih točk školjčičišča v en vzorec, tako, da smo ob vsakem vzorčenju iz vseh treh školjčičišč ter prostih nabranih, pripravili štiri vzorce. Te smo preiskali na tekočih in trdnih selektivnih in diferencialnih gojiščih za diagnostiko odpornih bakterij, v skladu s protokolom, ki ga predpisuje Evropski referenčni laboratorij za ugotavljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom (EU-RL AMR, EU Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance). Pred preiskavo smo klapavicam odstranili pesek in alge, za izolacijo bakterij pa smo uporabili celotno vsebino školjk brez lupine. Sterilno smo odvzeli 25 g vzorca, mu dodali 225 mL peptonske vode (Buffered Peptone Water, Biolife) in ga homogenizirali. Tako pripravljen vzorec smo nato inkubirali 20 ur pri 37°C in ga naslednji dan precepili na trdno selektivno gojišče (ESBL agar, BioMerieux, Francija). Po 24-urni inkubaciji pri 37°C, smo porasle kolonije, ki so morfološko ustrezale bakterijam *E. coli*, precepili na osnovno trdno gojišče krvni agar (blood agar base, Oxoid) za čisto kulturo in jih nato identificirali do vrste s pomočjo sistema MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry - Bruker, MALDI Biotyper, Bruker Daltonics, ZDA), ki temelji na principu masne spektrometrije.

Pri vseh izolatih *E. coli* smo prisotnost ESBL/AmpC določili fenotipsko na osnovi testiranja občutljivosti za indikatorske antibiotike z določanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Testiranje smo opravili na komercialno pripravljenih mikrotitrskih ploščah EUVSEC, ki vsebuje 14 različnih antibiotikov in ploščah EUVSEC2, ki vsebujejo 10 različnih antibiotikov (Sensititre® TREK, Thermo scientific). S ploščo EUVSEC smo testirali naslednje antibiotike: ampicilin (AMP), azitromicin (AZI), cefotaksim (FOT), ceftazidim (TAZ), kloramfenikol (CHL), ciprofloksacin (CIP), kolistin (COL), gentamicin (GEN), meropenem (MERO), nalidiksinska kislina (NAL), sulfametoksazol (SMX), tetraciklin (TET), tigeciklin (TGC) in trimetoprim (TMP). S ploščo EUVSEC2 pa še dodatne indikatorske antibiotike za določevanje sevov z razširjenim delovanjem betalaktamaz in karbapenemaze: ertapenem (ETP), cefepim (FEP), cefotaksim (FOT), cefotaksim / klavulanska kislina (F/C), cefoksitin (FOX), imipenem (IMI), meropenem (MERO), ceftazidim (TAZ), ceftazidim / klavulanska kislina (T/C) in temocilin (TRM). Rezultate smo interpretirali v skladu s standardom EUCAST in priporočili EU-RL AMR ter na podlagi rezultatov EUSEC2 fenotipsko razlikovali med izolati *E. coli* tipov ESBL in AmpC.

Preverjanje prisotnosti genov bakterije *E. coli* na dejavnike virulence

Iz vsakega gojišča TBX, s katero smo ugotavljali število *E. coli*, smo vzeli po eno značilno kolonijo. Iz te smo izolirali celokupno genomsko DNA in jo uporabili v verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Za reakcije pomnoževanja smo uporabili Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA). Reakcijske mešanice za pomnoževanje odsekov DNA, ki določajo filogenetske (pod)skupine (*chuA*, *yjaA* in fragment *TspE4.C2*) smo pripravili tako, da smo sestavili multiplo reakcijo PCR (Clermont in sod. 2000), prav tako mešanico za pomnoževanje genov *vtx1* in *vtx2* ter za pomnoževanje genov *eae* (DEC Primer Mix" (Statens Serum Institut (SSI), Denmark) in *ehxA* (Trkov in sod., 2014).

Ugotavljanje norovirusov in virusa hepatitisa A

Noroviruse in VHA smo ugotavljali po metodi, ki je predpisana po ISO/TS 15216-1:2013 (Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR). Vzorce za analizo smo združili iz posameznih točk

školjčiča v en vzorec, tako, da smo ob vsakem vzorčenju iz vseh treh školjčič ter prosto nabrane pripravili štiri vzorce za analizo. Viruse smo sprostili iz školjčnega tkiva (prebavnih žlez), izolirali virusno RNA in jo potrjevali z verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) ter RT-PCR v realnem času. Školjkam smo sterilno odstranili prebavne žleze, jih homogenizirali in za preiskavo uporabili 2 g tako pripravljenega tkiva. Dodali smo 2 ml encima proteinaze K (30U/mg) in za ugotavljanje uspešnosti ekstrakcije uporabili mengo virus (10 µl). Po inkubaciji in centrifugiranju smo uporabili supernatant za izolacijo nukleinskih kislin s komercialnim testom NucliSENS miniMAG (Biomérieux). Postopek smo izvajali po navodilih proizvajalca. Izolirano RNA smo do uporabe za qRT-PCR in RT-PCR v realnem času hranili pri -70 °C. Za dokazovanje norovirusov smo uporabili metodo RT-PCR v realnem času, z oligonukleotidnimi začetniki, ki nalegajo na stiku ORF1-ORF2 (Kageyama in sod., 2003), ki je najbolj ohranjen del norovirusnega genoma (Katayama in sod., 2002). Za ugotavljanje norovirusov iz genske skupine I smo uporabili začetne oligonukleotide COG1-F in COG1-R ter sondo RING1 (Kageyama in sod., 2003), za ugotavljanje norovirusov iz genske skupine II začetne oligonukleotide COG2-F in COG2-R ter sondo RING 2-TP (Kageyama in sod., 2003). Za ugotavljanje stopnje kontaminacije vzorca smo ugotavljali tudi število virusnih kopij. Število virusnih kopij smo preračunali glede na standardno krivuljo in izkoristek mengo virusa ter eksterne kontrole dsDNA.

Za RT-PCR smo uporabili oligonukleotidne začetnike JV12Y/JV13I (Vennema in sod., 2002), ki nalegajo v polimerazni regiji. Z njimi smo potrjevali noroviruse obeh genskih skupin.

HAV smo prav tako ugotavljali z metodo RT-PCR v realnem času. Uporabili smo oligonukleotidne začetnike HAV68 in HAV240, ter sondo HAV150 (Costafreda in sod., 2006) ki nalegajo v genomu najbolj ohranjene regije (5' NCR) (Weitz in sod., 1986).

Sevom, ki smo jih lahko pomnožili s klasično RT-PCR smo tudi določili nukleotidna zaporedja, jih obdelali s programsko aplikacijo DNASTAR in jih tudi preverili. Nukleotidna zaporedja smo primerjali s podatki v genski bazi preko medmreznega servisa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) z bazo NCBI (angl. National Centre for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Statistična analiza mikrobioloških parametrov školjk in vode

Pridobljene podatke smo zbirali in urejali v programu MS Excel. Zaradi nepravilnega delovanja merilne aparature smo izločili podatke za vsebnost kisika v vodi od novembra 2014 do sredine marca 2015. Vsebnost *E. coli* v školjkah je izračunana z metodo MPN, pri čemer je najnižja vsebnost podana kot < 20 oziroma < 18 (po novejšem izračunu, ki smo ga uporabljali od 11. 4. 2016) *E. coli*

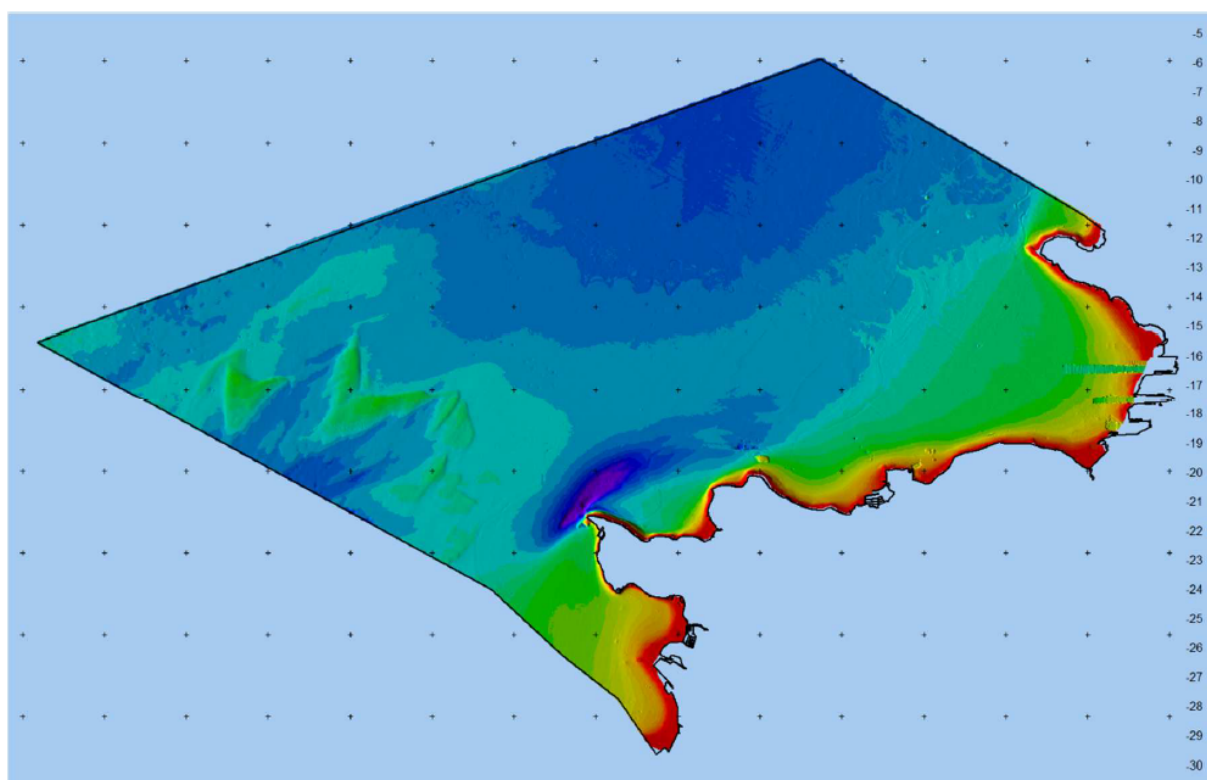
MPN/100 g školjk. Za potrebe analize smo vzorcem pripisali vrednosti 10 oziroma 9 *E. coli* MPN/100 g, ki predstavljata polovico vrednosti meje detekcije. Z enako metodo je izračunana vsebnost *E. coli* v vodi in enterokokov v vodi. Vzorcem, ki so imeli vsebnost podano kot < 3 *E. coli* MPN/100 ml smo pripisali vrednost 1,5 *E. coli* MPN/100 ml (polovica vrednosti meje detekcije). Enemu vzorcu, ki je imel vsebnost podano kot > 110 *E. coli* MPN/100 ml pa smo pripisali vrednost 120 *E. coli* MPN/100 ml (ekspertna ocena). Vsebnost virusov v školjkah je prav tako izračunana. Za potrebe analize smo vzorcem, pri katerih virusi niso bili zaznani, pripisali vrednost 20 kopij/g (polovica vrednosti meje detekcije). Vzorcem, ki so imeli vrednost podano kot < 100 kopij/g smo pripisali vrednost 50 kopij/g (polovica vrednosti meje kvantifikacije).

Za statistične analize smo uporabili program R 3.3.0. Testirali smo razlike med školjčišči in med meseci oziroma obdobji. Preliminarni test homogenosti varianc je pokazal, da se variance med skupinami razlikujejo. Razlike v vsebnosti *E. coli* v školjkah med školjčišči in med obdobji smo zato primerjali z neparametrično Kruskal-Wallisovo analizo variance na vsoti rangov. V primeru statistično značilne razlike med skupinami smo pare skupin med seboj primerjali na osnovi post hoc testa mnogoterih primerjav. Korelacije med parametri mikrobiološke kontaminacije školjk in vode ter fizikalnimi parametri vode smo ugotavljali z neparametričnim Spearmanov koeficientom korelacije na rangih. Koeficiente smo izračunani s pomočjo korelacijske matrike, pri čemer smo za določanje statistične značilnosti upoštevali po Holmovi metodi prilagojene p vrednosti. Prisotnost norovirusov v školjkah smo ugotavljali z analizo kontingenčne tabele. Primerjali smo razlike v prisotnosti norovirusov med zimskimi (oktober–marec) in poletnimi (april–september) meseci z uporabo Fisherjevega eksaktnega testa. Pri vseh testih je bilo uporabljeno merilo za statistično značilnost p vrednost $< 0,05$. Rezultate smo grafično prikazali z razsevnimi in linijskimi diagrami, okvirji z ročaji in naloženimi stolpci.

Rezultati

1. Vpliv cirkulacije onesnaževalcev s pomočjo vzorcev tokov, batimetrije in ciklusa plimovanja

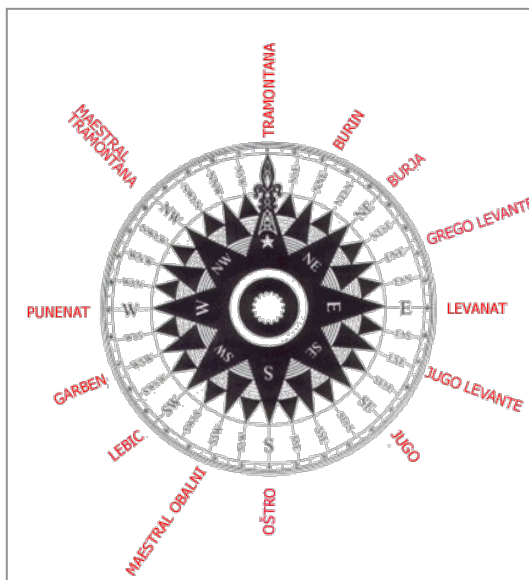
Slovensko morje je del Tržaškega zaliva, ki spada s komaj 16,4 m povprečne globine med plitve zalive. Tretjina je plitvejša od 15 m, petina od 10 m, globin več kot 25 m je zelo malo. Pred Piranom je obsežna kotanja z doslej največjo izmerjeno globino 37,25 m, najnižjo točko Slovenije. Posledica tega je majhna relativna prostornina vodnega telesa 9 km³, ki omogoča atmosferskim dejavnikom hiter in močan vpliv na slanost in temperaturo. Ena od značilnosti severno jadranskih voda (vključno s Tržaškim zalivom) je, da so praviloma bogatejše s hranilnimi solmi kot drugi deli Jadrana. Pomemben vir so rečni vnosi. Površinska oslajena voda reke Soče se običajno giblje ob italijanski obali proti jugu, ob konicah pretoka seže njen vpliv do osrednjega dela zaliva, ob posebnih meteoroloških razmerah pa pride do površinskega razlivanja sladke vode skoraj do piranske obale. Morsko dno se v celotni dolžini obrežne črte spušča v blagi strmini proti osrednji uravnavi Tržaškega zaliva. Ob relativno enolični izoblikovanosti reliefa slovenskega obrežnega pasu se morsko dno mestoma spušča zelo strmo, kar je posledica podvodnega roba, ki spremlja celotno slovensko obrežje od Debelega rtiča do vznožja Savudrijskega polotoka (slika 2). Ne glede na tako ali drugačno izoblikovanost pa je pas od obrežne linije navzdol, ko je še mogoče zasledovati apnenec oziroma fliš, tj. trdo morsko dno, relativno ozek. Slednje namreč kmalu preide v sedimentno dno, ki prekriva večji del podvodnega sveta Tržaškega zaliva. Osrednja uravnavna zaliva je bolj ali manj ravna in je do 25 metrov globoka. (Zupančič, 2016).



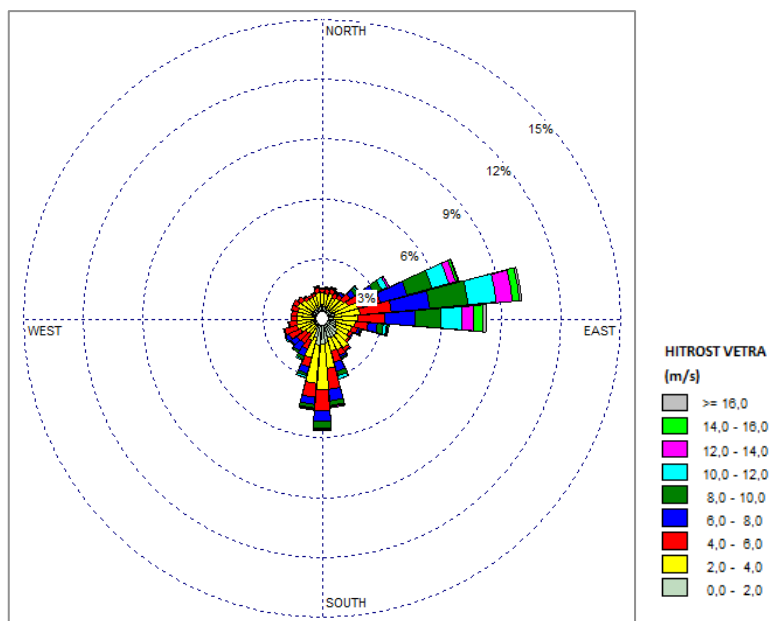
Slika 2: Celovit digitalni model reliefa slovenskega morja (HARPHA sea, 2014).

Vetrovi

Najpogostejši vetrovi slovenskega morja so vetrovi iz širšega intervala južnih in jugovzhodnih smeri ter burja (slika 3). Po jakosti burja močno prevladuje nad južnimi vetrovi na odprtem morju, saj srednja vrednost za obdobje obdelave (januar–avgust 2011, oceanografska boja) presega 7 m/s.



Slika 3: Imena in smeri vetrov.



Slika 4: Roža vetrov za obdobje meritev od 20. 6. 2008 do 9. 2. 2011 (36 smeri) (Hladnik in Malačič, 2011).

Na podlagi analiz podatkov, zbranih na oceanografski boji sledi, da je jakost najpogostejšega vetra nad morjem med 2 in 4 m/s. Najpogostejši so vetrovi iz širšega intervala južnih in jugovzhodnih

smeri (med 8 in 9 %), burja je drugi najpogostejši veter (12 %) (slika 4). Po jakosti burja močno prevladuje nad južnimi vetrovi (na odprtem morju), saj srednja vrednost (za določeno obdobje) presega 7 m/s.

Tokovne razmere v Tržaškem zalivu:

Glavni tok v Jadranskem morju teče vzdolž vzhodne obale iz juga proti severu s hitrostjo 3–4 navtične milje na dan in vzdolž italijanske obale nazaj proti jugu.

Poleg gradientnih tokov, ki so v slovenskem morju določeni s pozitivno smerjo od jugovzhoda proti severozahodu, sodelujejo v mešanju morskih mas tudi vetrovi, ki povzročajo zaradi plitvosti območja tokove, vzporedne s smerjo vetra. Na dinamiko vodnih mas priobalnega pasu, za katera je značilna relativna zaprtost in nepretočnost, imajo prevladujoč vpliv bivačica, veter in sladkovodni pritoki. Obalno morje Piranskega in Koprškega zaliva sprejema s celinskimi vodami velike količine suspendiranih delcev in hranilnih soli, kar povzroča ne samo razmeroma visoko stopnjo motnosti, ampak tudi visoko naravno bioproduktivnost.



Slika 5: Shematičen prikaz morskih tokov v Tržaškem zalivu. (Geodetski inštitut Slovenije, 2005)

Za morske tokove je značilna tudi vertikalna raznolikost. Analiza tokov, izmerjenih na oceanografski boji Vida, kaže, da je glavna os tokov pri dnu in v osrednjem delu vodnega stolpca usmerjena v notranjost Tržaškega zaliva vzdolž smeri osi zaliva, nekaj metrov pod gladino pa je najpogostejša smer tokov proti zahodu, t.j. iz zaliva. V tej plasti gre predvsem za vetrne in gostotne tokove, v notranjosti vodnega stolpca pa prevladujejo gostotni in plimski tokovi (slika 5).

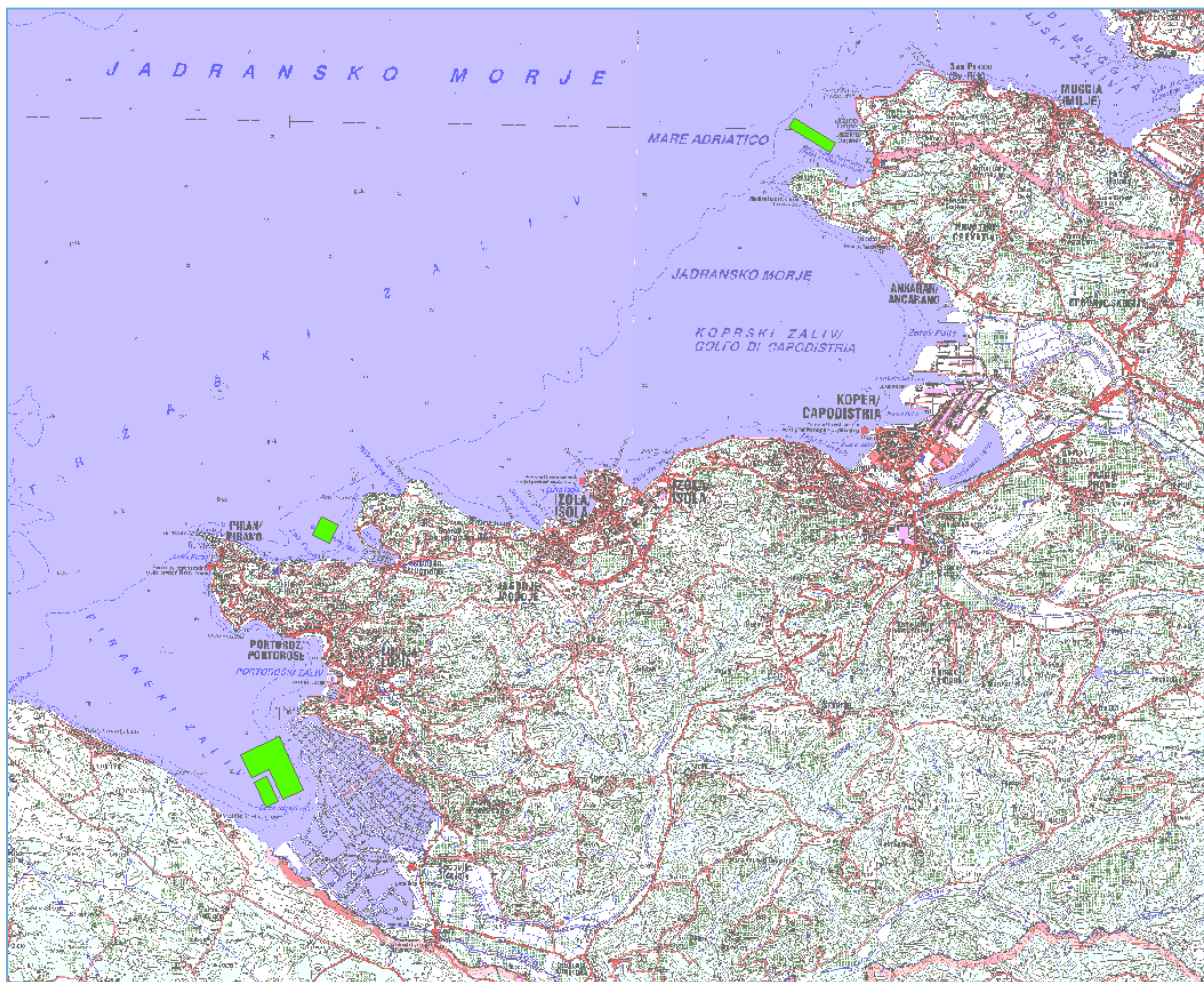
Stalnega toka v Koprskem zalivu (ali Semedelskem zalivu) ni mogoče ugotoviti, saj je pod vplivom spreminjajočih se meteoroloških in oceanografskih značilnosti. Primerjave smeri toka s smerjo vetra na lokacijah merskih točk v Koprskem zalivu in z upoštevanjem smeri obale so izkazale, da zgornji sloj vode, debel 4–7 m v glavnem sledi zakonitostim med vetrom in tokovi zaradi vetra. Ugotovljene so tudi obratne situacije, ko se sloj vode giblje v nasprotni smeri kot piha veter. Ti tokovi so bili zaznani tudi v Koprskem zalivu ob nastopu močnih vetrov iz smeri vzhod-severovzhod in jugozahod, vendar so takšne situacije del kratkotrajnega kroženja vode. Dolgotrajnejši močni vetrovi pa lahko

povzročijo stabilno cirkulacijo tokov. Dodatno pa lahko na tokovne razmere površinskih plasti tržaškega zaliva vplivajo visoki pretoki reke Soče in v izjemnih okoliščinah tudi Pad.

Tokovne razmere na obravnavanih lokacijah

Glede na raznolikost dejavnikov, ki določajo morske tokove in dejstvo, da je tokovanje morja izrazit tridimenzionalen pojav, je tako rekoč nemogoče enoznačno določiti tokovno sliko v slovenskem morju. Oceno tokovnih razmer na obravnavanih lokacijah pa lahko vendarle podamo na podlagi poznavanja glavnih tokov v slovenskem morju, katerih spremenljivost je manjša in poznavanju tokovanja pod vplivom bibavice, ki povzroča zelo spremenljive tokovne razmere na obravnavanih lokacijah.

Na podlagi modelnih izračunov tokovanja v Tržaškem zalivu pod vplivom bibavice (Zupančič s sod. 2016) lahko ocenimo vplive morskih tokov zaradi vpliva bibavice na prenos onesnažil na obravnavanih lokacijah (slika 6). Za tokove inducirane s spremembami morske gladine pod vplivom bibavice je značilno urno spreminjanje smeri toka. Tovrstni tokovi imajo največji vpliv v zaprtih zalivih, saj so v teh primerih zaradi reliefnih značilnosti vplivi vetra in gostotnih tokov navadno manjši.



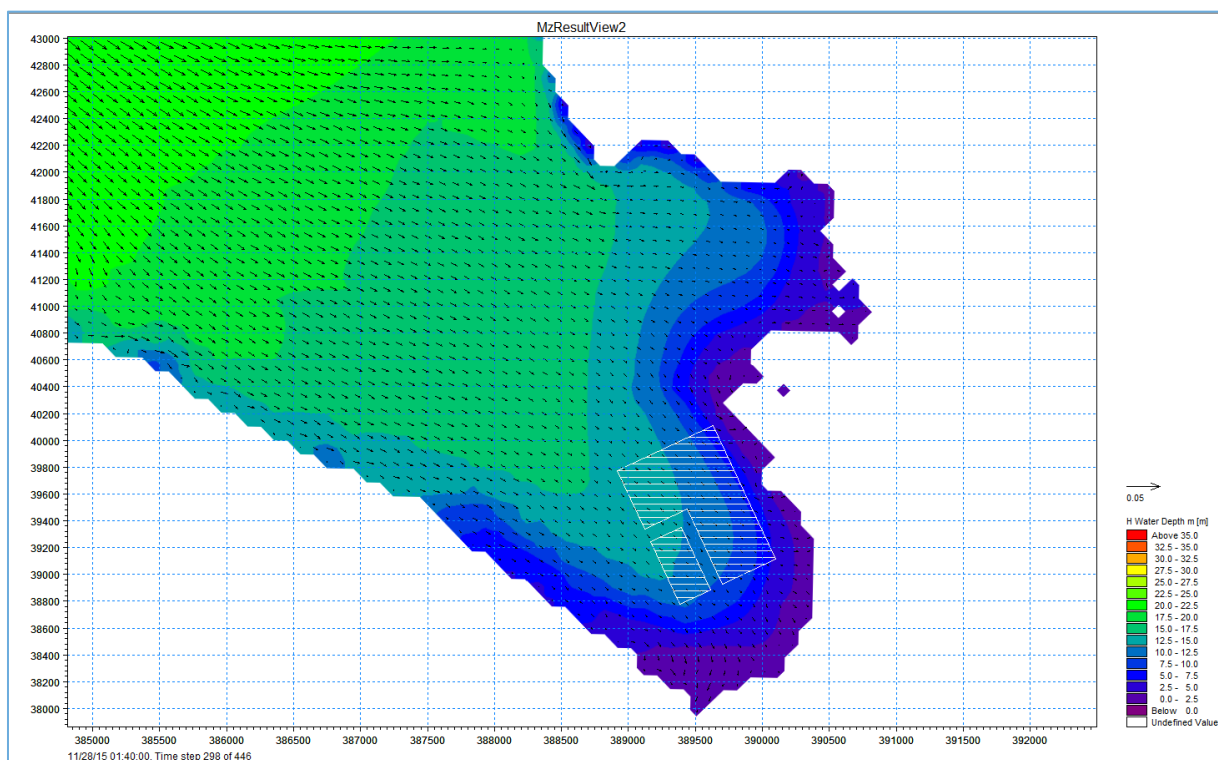
Slika 6: Prikaz obravnavanih lokacij školjčiči na območjih Sečoveljskega zaliva, Strunjanskega zaliva in Debelega rtiča.

Na slikah 7–11 so prikazani modelni izračuni toka morske vode pod vplivom bibavice s časovno periodo 12 h 25 min in amplitudo 33 cm. Prikazani so izračuni deloma umerjenega dvodimenzionalnega numeričnega hidravličnega modela z vertikalnim povprečenjem hitrosti vodnega

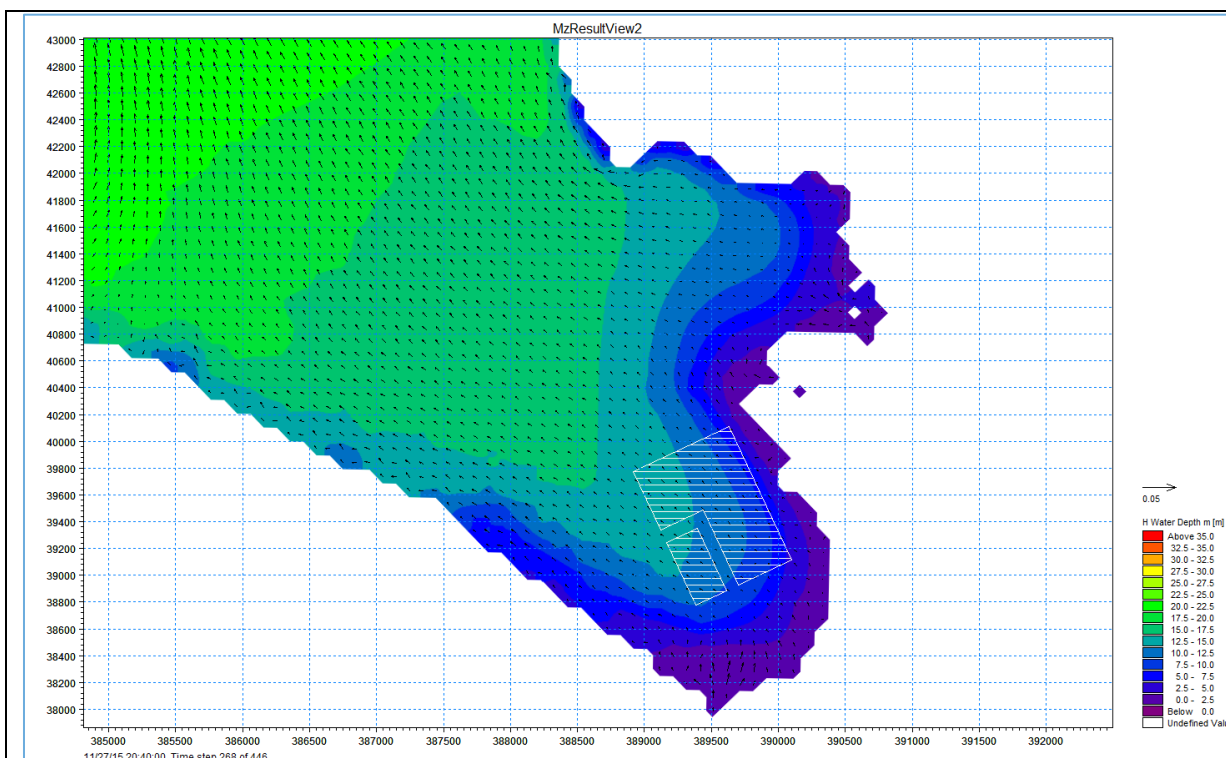
toka.

Sečoveljski zaliv

Školjčičišče v Sečoveljskem zalivu se nahaja globoko v zalivu izven pomembnega vpliva glavnih tokov v slovenskem morju. Tokovne razmere pod vplivom bibavice so na območju spremenljive. Tako potekajo tokovi zaradi vpliva bibavice v času dvigovanja gladine (prihod plime) v smeri JV, to je v zaliv (slika 7), ob času padanja gladine (prihod oseke) pa nasprotno v smeri SZ, to je iz zaliva (slika 8). Hitrosti toka pod vplivom bibavice na sami lokaciji školčičišča so majhne, saj redko presegajo 0,005 m/s. Zaradi nizkih hitrosti je lahko pričakovati nizko izmenjavo vode na območju.



Slika 7: Tokovne razmere ob času dvigovanja gladine (prihod plime) na lokaciji Seča.

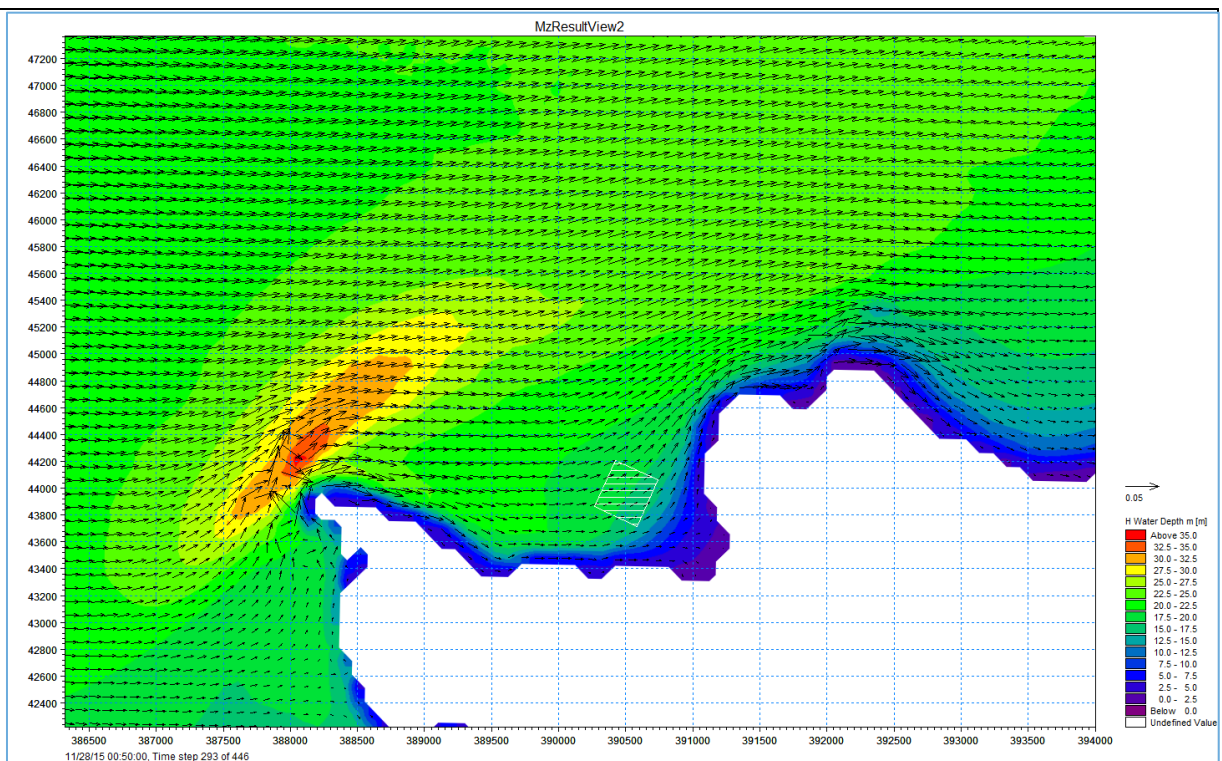


Slika 8: Tokovne razmere v času padanja gladine (prihod oseke) na lokaciji Seča.

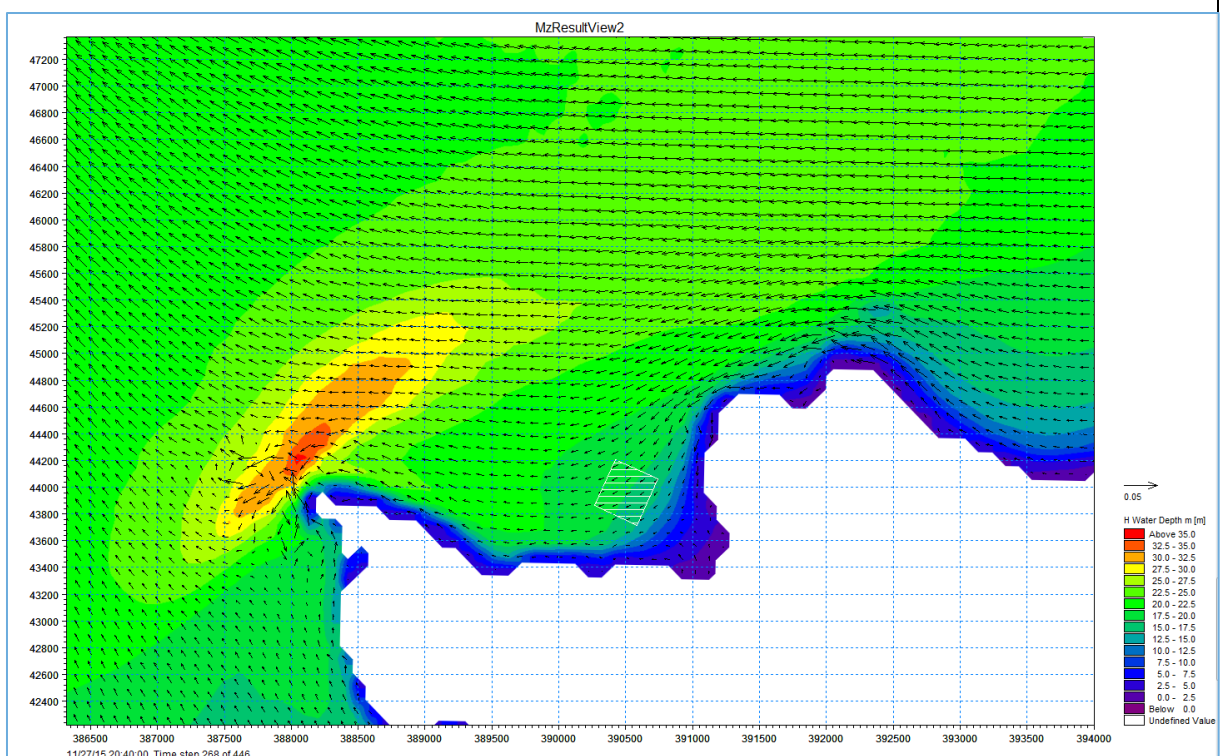
V Sečoveljskem zalivu in njegovi okolici ni znatih virov onesnaževanja. Južna obala Piranskega zaliva je redko poseljena. Na njej se nahajata dve turistični naselji (Kanegra ter Lavra – Crveni vrh), ki predstavljata obremenitev predvsem v letnih mesecih. Severna obala Piranskega zaliva je gosto poseljena z naselji Lucija in Portorož. Naselji sta komunalno opremljeni z odpadnimi vodami očiščenimi na komunalni čistilni napravi. Kljub temu se na tem območju nahaja nekaj direktnih izpustov v morje. Na vzhodni obali zaliva se nahajajo sečoveljske soline, ki ne predstavljajo vira onesnaževal, ter zaledna naselja Seča, Sečovelje, Parecag in Korte. Naselja so opremljena s komunalnimi čistilnimi napravami, ki se izlivajo v zaledju zaliva, bodisi v tla, bodisi v vodotoke (Drnica in Jernejev kanal). Čeprav so območja v zaledju obravnavane lokacije komunalno urejena pa lahko tudi ti urejeni vnosi predstavljajo problem ob nezadostni izmenjavi vode zaradi zaprtosti zaliva.

Strunjanski zaliv

Školjčičišča v Strunjanskem zalivu se nahajajo na bolj odprtem območju morja od lokacije Sečovelje, a vendar znotraj Strunjanskega zaliva. Glede na bolj odprto lokacijo je na območju pričakovati manjši vpliv bibavice na lokalne tokovne razmere. V času dviganja gladine (prihod plime) so tokovi zaradi bibavice usmerjeni proti vzhodu, oziroma SV (slika 9). V času spuščanja gladine (prihod oseke) pa so tokovi nasprotni v smeri JZ oziroma Z (slika 10). Hitrosti toka znašajo v obeh primerih med 0,010 in 0,015 m/s.



Slika 9: Tokovne razmere v času dviganja gladine (prihod plime) na lokaciji Strunjan.



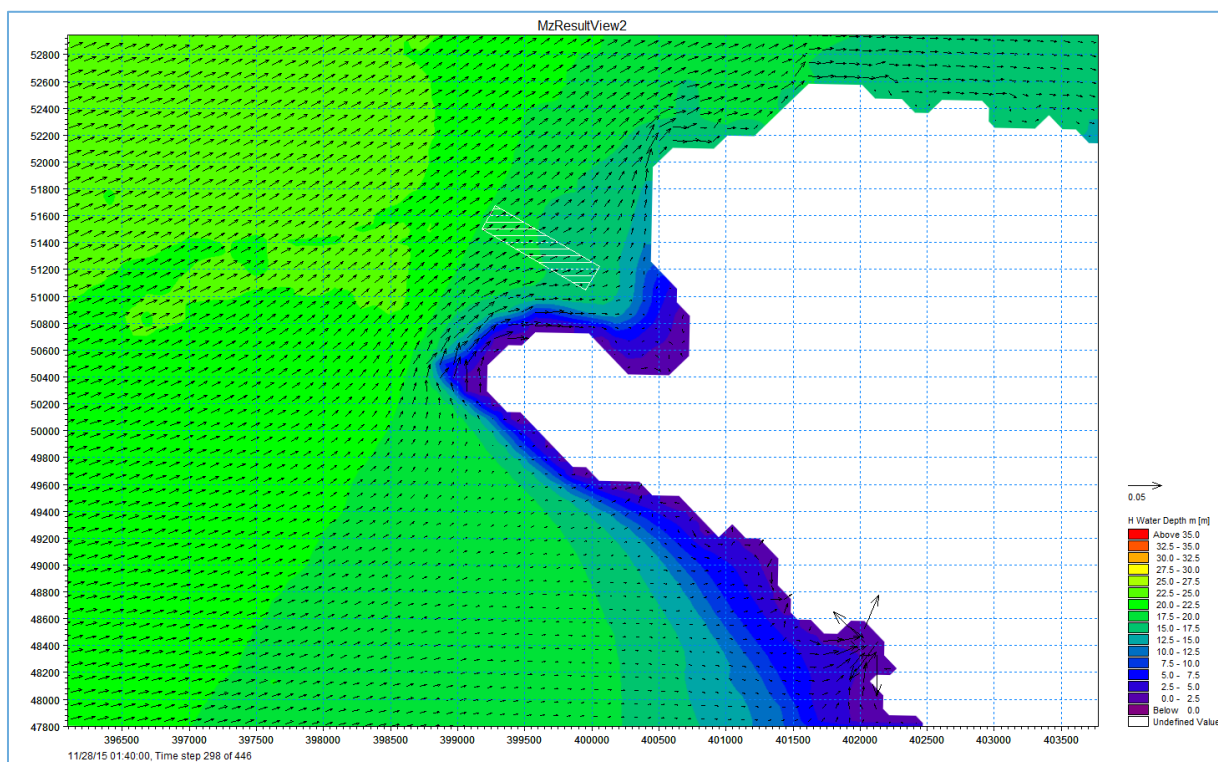
Slika 10: Tokovne razmere v času padajoče gladine (prihod oseke) na lokaciji Strunjan.

Na območju Strunjanskega zaliva prav tako ni zaznati večjih onesnaževalcev. Naselja na obalah zaliva (Piran, Fiesa, Pacug in Strunjan) imajo urejen odvod komunalne odpadne vode na čistilno

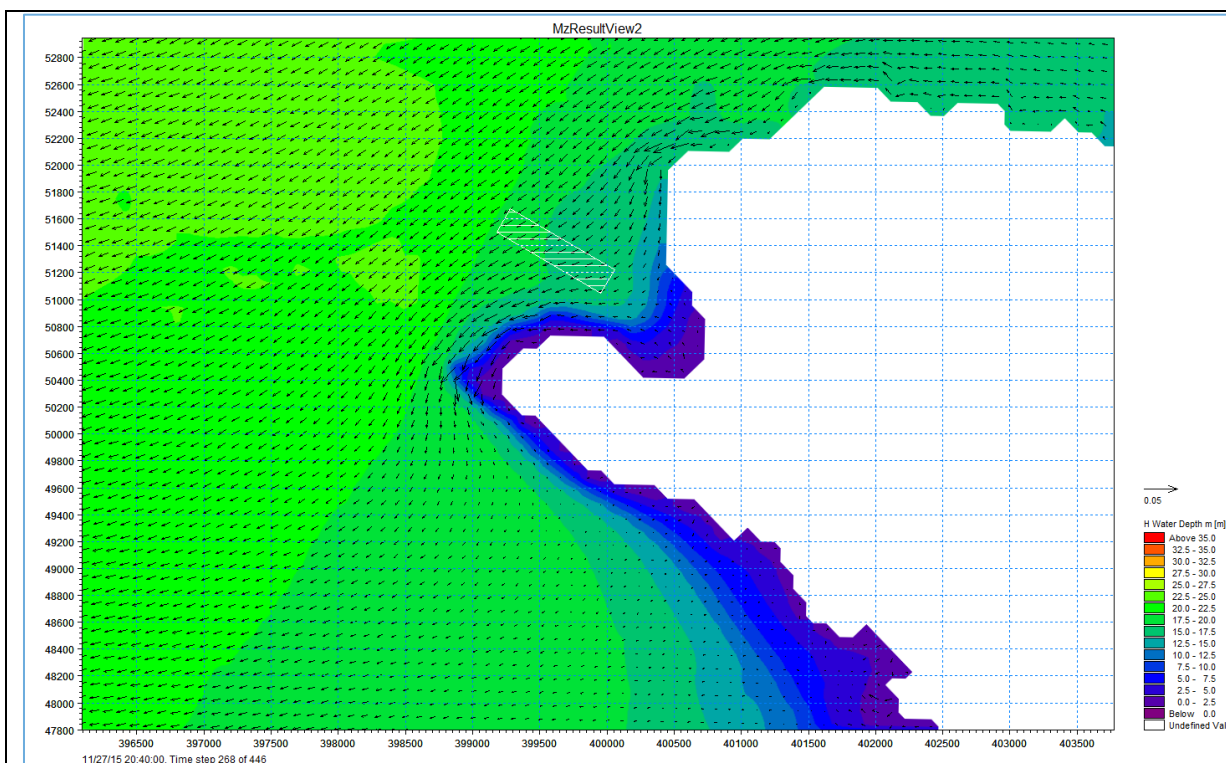
napravo Piran. Prav tako se predvideva, da manjši lokalni vnosi zaradi zadostnih tokov pod vplivom bibavice in s tem zadostne izmenjave vode na območju školjčišča ne predstavljajo znatnih problemov. Potencialno problematično pa je dejstvo, da lahko glavni morski tok, ki poteka v smeri vzhoda s seboj prinaša onesnažila iz izpusta komunalne čistilne naprave Piran, ki se nahaja zahodno od obravnavanega območja.

Debeli rtič

Školjčišče na lokaciji Debeli rtič se nahaja na razmeroma odprti lokaciji, saj se le vzhodni del območja nahaja v nekoliko bolj zaprtem območju Zaliva svetega Jerneja. Tokovi na tem območju zaradi vpliva bibavice potekajo ob času dvigovanja gladine (prihod plime) v smeri SV, to je v splošni smeri glavnih tokov v slovenskem morju (slika 11). V času padanja gladine (prihod oseke) pa tokovi lokalno potekajo v nasprotni smeri, to je proti JZ (slika 12). Hitrosti morskega toka se v obeh primerih gibljejo med 0,010 in 0,015 m/s.



Slika 11: Tokovne razmere v času dvigovanja gladine (prihod plime) za lokacijo Debeli rtič.



Slika 12: Tokovne razmere v času padajoče gladine (prihod oseke) na lokaciji Debeli rtič.

Zaliv svetega Jerneja ni gosto poseljen. Na slovenski strani meje se nahaja le naselje Debeli rtič s turističnim kampom. Na Italijanski strani zaliva pa se nahaja naselje Lazaret. Glede na to, da modelni izračuni plimovanja nakazujejo razmeroma dobro dnevno izmenjavo vode, se pričakuje, da lokalni viri onesnaženja ne predstavljajo večje nevarnosti. Ob upoštevanju glavnega toka ob slovenski obali pa lahko le-ta prinese onesnažila iz Koprškega zaliva na katerega obalah prebiva preko 35.000 prebivalcev in kjer se nahajajo tako pomembni industrijski kot infrastrukturni obrati. Dodatno se v Koprskem zalivu odvija znaten pomorski promet, v zalivu pa se nahaja tudi sidrišče tovornih ladij (Zupančič, 2016).

2. Evidentiranja virov onesnaževanja in ocena količine onesnaževal

Na območjih gojišča školjk prihaja iz kopnega onesnaževanje iz različnih virov. Iz kopnega prihaja največ onesnaževanja iz izpustov kanalizacij meteornih, tehnoloških ali komunalnih odpadnih voda (slike 13–17). Velik delež onesnaževanje prinesejo tudi reke, če se v njih izpuščajo različna onesnaževala. Zanimariti ne smemo tudi onesnaževanja iz kmetijstva in direktnega onesnaževanja iz kopalnih območij. Na kopalnih območjih vnašajo kopalci onesnaževala v vodo neposredno. Manjši delež onesnaževanja se vrši tudi neposredno na morju, z izpusti iz plovil.

Na slikah 13–17 imajo znaki naslednji pomen:

-  tehnološki viri
-  komunalne čistilne naprave
-  gojenje rib in školjk
-  odlagališče



Slika 13: Gojenje školjk in rib (modro pobarvani krogi) ter bližnje kopalne vode (modro pobarvani pasovi) ter tehnološki viri onesnaževanja (vijolični znaki) na območju severnega dela obale slovenskega morja.



Slika 14: Gojenje školjk in rib (modro pobarvani krogi) ter bližnje kopalne vode (modro pobarvani pasovi) ter tehnološki viri onesnaževanja (vijolični znaki) na območju osrednjega dela obale slovenskega morja.



Slika 15: Gojenje školjk in rib (modro pobarvani krogi) ter bližnje kopalne vode (modro pobarvani pasovi) ter tehnološki viri onesnaževanja (vijolični znaki) na območju južnega dela obale slovenskega morja.

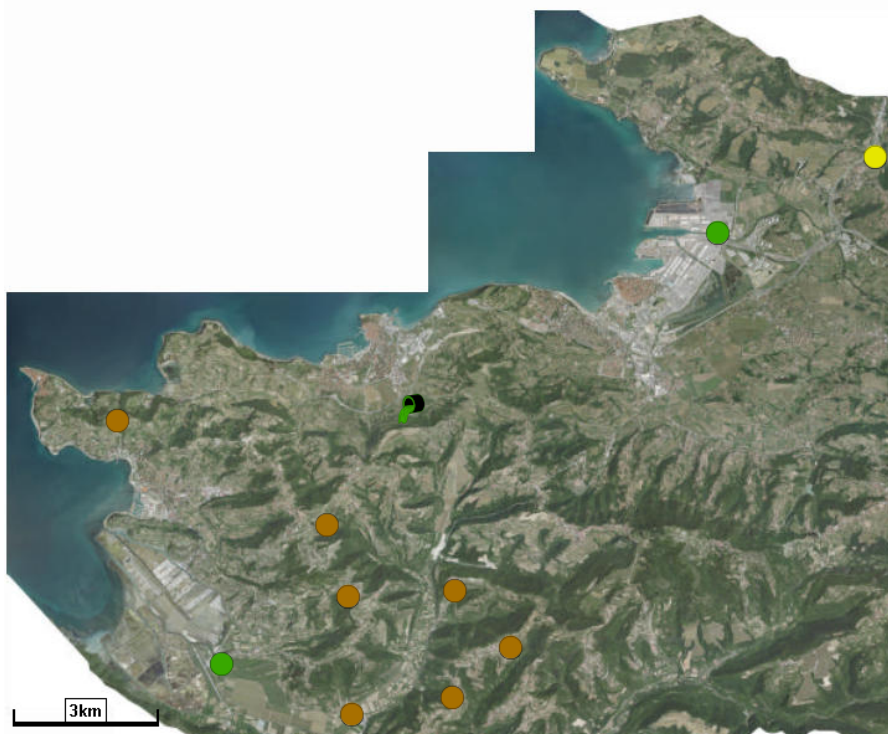
Na sliki 16 so prikazane lokacije vseh komunalnih čistilnih naprav ob obali. Prikazana je tudi lokacija komunalne deponije v bližini Izole. Neposredne izpuste v morje imata le dve komunalni čistilni napravi: KČN Koper in KČN Piran. Obe komunalni čistilni napravi pomenita največja točkovna vira onesnaževanja morja. Nobena od obeh komunalnih čistilnih naprav nima ustreznega mikrobiološkega čiščenja odpadnih voda, zato predstavljata največja vira mikrobiološkega onesnaženja morja na območju školjčišč.

Tehnoloških virov onesnaževanja je ob obali nekaj deset (tabela 2). Največji vir tehnološkega onesnaževanja predstavlja Luka Koper. V preteklosti so predstavljali velike vire onesnaževanja tudi: Droga, Tomos, Kemiplas, itd. Veliko teh gospodarskih družb je bistveno zmanjšalo proizvodnjo, nekatere pa so prenehale s proizvodnjo (Kemiplas, Delamaris, itd.).

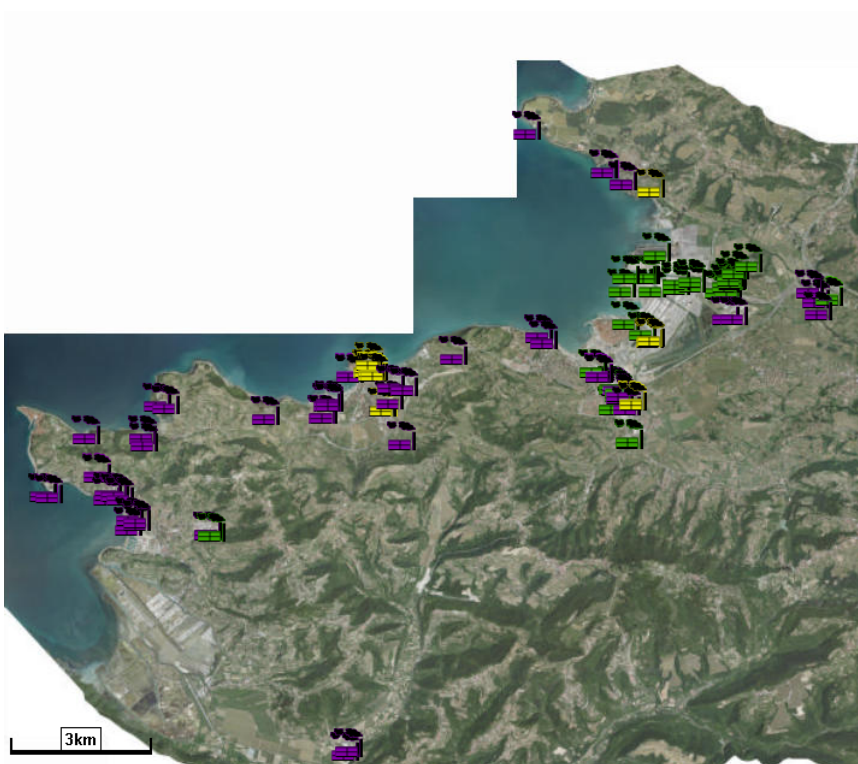
V okviru obratovalnih monitoringov se od leta 2012 na podlagi »Uredbe o emisiji snovi in toplote pri odvajanju odpadnih vod v vode in javno kanalizacijo (Uradni list RS, št. 64/12)« merijo mikrobiološki parametri, ki so podani v tabeli 1.

Tabela 1: Mikrobiološki parametri iz splošne emisijske uredbe (Uradni list RS, št. 64/12)

Parameter	enota	izpust v reke	izpust v morje
intestinalni enterokoki	cfu/100 ml	400	200
<i>Escherichia coli</i>	cfu/100 ml	1000	500



Slika 16: Komunalne čistilne naprave (pobarvani krogi) in odlagališče.



Slika 17: Tehnološki viri onesnaževanja.

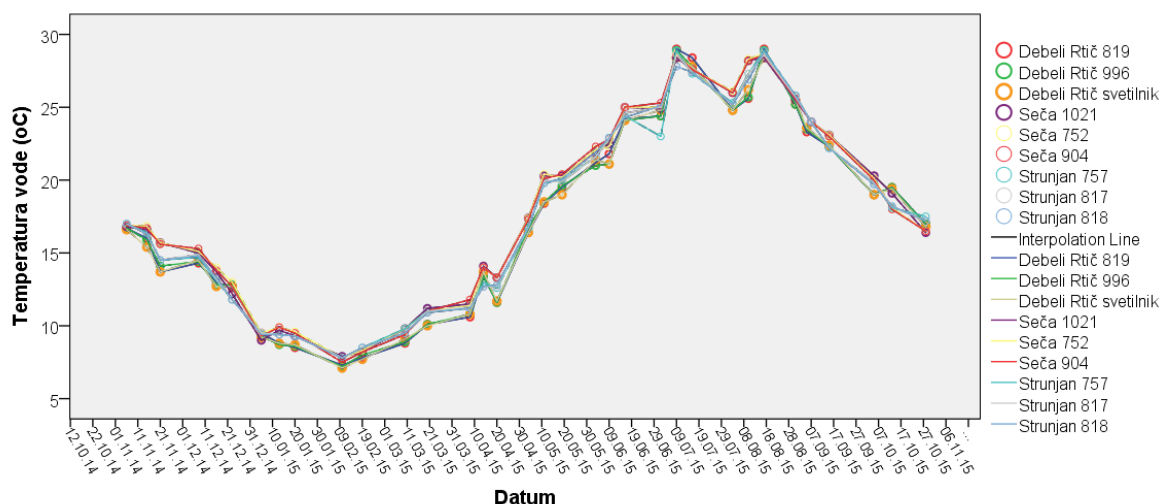
Tabela 2: Spisek tehnoloških zavezancev za izvajanje obratovalnega monitoringa odpadnih voda na Obali

Ime naprave	Izpust v občini	Tip iztoka	Vodotok	Ime čistilne naprave
AUTOSAN PLUS D.O.O.	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
AVTOPLUS D.O.O. KOPER PE LUCIJA	PIRAN	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		PIRAN
AVTOPRALNICA MUŽENIČ VINKO S.P.	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
BELVEDERE HOTELI IN TURIZEM D.O.O. IZOLA	IZOLA	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
DELAMARIS D.O.O. IZOLA	IZOLA	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
DELFIN HOTEL ZDUS D.O.O. IZOLA	IZOLA	Iztok neposredno v okolje	morje	
FRIGOMAR IZOLA	IZOLA	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
DINOS D.D. - SKLADIŠČE KOPER	KOPER	Iztok neposredno v okolje	melioracijski javni kanal	
DROGA KOLINSKA D.D. PC NOVA TOVARNA	IZOLA	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
HIDRIA ROTOMATIKA D.O.O. - PODRUŽNICA KOPER	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
HIDRIA ROTOMATIKA D.O.O.	IDRIJA	Iztok neposredno v okolje	Kanomljica	
HIDRIA ROTOMATIKA D.O.O. - PODRUŽNICA KOPER	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
HIDRIA ROTOMATIKA D.O.O.	IDRIJA	Iztok neposredno v okolje	Kanomljica	
HIDRIA ROTOMATIKA D.O.O. - PODRUŽNICA KOPER	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
HOTEL MARINA D.O.O.	IZOLA	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
HOTELI BERNARDIN - PE METROPOL RESORT	PIRAN	Iztok neposredno v okolje	morje	
HOTELI BERNARDIN - PE METROPOL RESORT	PIRAN	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		PIRAN
HOTELI BERNARDIN D.D. LAGUNA BERNARDIN	PIRAN	Iztok neposredno v okolje	morje	
HOTELI BERNARDIN, D.D. PORTOROŽ - PE SAN SIMON RESORT	IZOLA	Iztok neposredno v okolje	morje	
INSTALACIJA D.O.O. KOPER	KOPER	Iztok neposredno v okolje	Ankaranski depresijski kanal	
INSTALACIJA D.O.O. KOPER	KOPER	Iztok neposredno v okolje	Rižana	
INSTALACIJA D.O.O. KOPER	KOPER	Iztok neposredno v okolje	Rižana	
INSTALACIJA D.O.O. KOPER	KOPER	Iztok neposredno v okolje	Ankaranski depresijski kanal	
INSTALACIJA D.O.O. KOPER	KOPER	Iztok neposredno v okolje	morje	
INSTALACIJA D.O.O. KOPER	KOPER	Iztok neposredno v okolje	Rižana	
INSTALACIJA D.O.O. KOPER	KOPER	Iztok neposredno v okolje	Rižana	
INTEREUROPA - AVTOPRALNICA IN SERVISNE DELAVNICE	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
HOTEL KEMPINSKI PALACE PORTOROŽ	PIRAN	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		PIRAN
ISTRABENZ PLINI D.O.O. - LOKACIJA KOPER	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
ISTRABENZ TURIZEM D.D. KOMUNALA IZOLA -	PIRAN	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		PIRAN
ODLAGALIŠČE IZOLA	IZOLA	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
JZ ZA ŠPORT MOK - POKRITI BAZEN ŽUSTERNA	KOPER	Iztok neposredno v okolje	morje	
ODLAGALIŠČE NENEVARNIH ODPADKOV DVORI	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER
ODLAGALIŠČE NENEVARNIH ODPADKOV DVORI	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN		KOPER

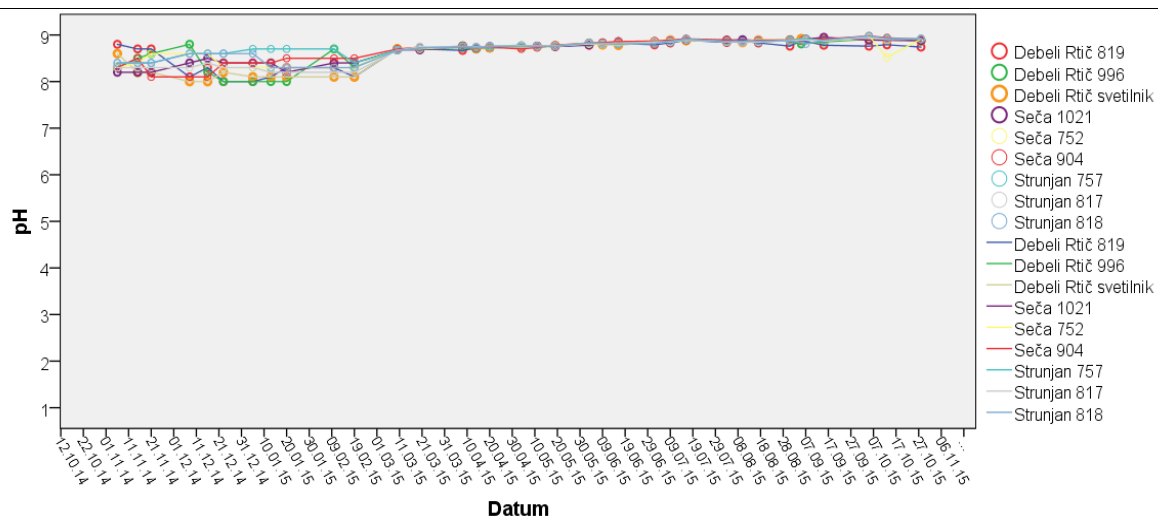
ODLAGALIŠČE NENEVARNIH ODPADKOV DRAGONJA	PIRAN	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	DRAGONJA
LAMA D.D. DEKANI	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	
LUKA KOPER D.D.	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	KOPER
LUKA KOPER D.D.	KOPER	Iztok neposredno v okolje morje	
MLINOTEST KRUH KOPER D.O.O.	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	KOPER
OMV BS & AP IZOLA	IZOLA	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	KOPER
OMV BS KOPER BONIFIKA	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	KOPER
OMV BS & AP IZOLA	IZOLA	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	KOPER
OMV BS KOPER BONIFIKA	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	KOPER
ORTOPEDSKA BOLNIŠNICA VALDOLTRA	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	ANKARAN
PRALNICA IVANČIČ	IZOLA	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	KOPER
PRALNICA LUCIJA D.O.O.	PIRAN	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	PIRAN
VODARNA RIŽANA	KOPER	Iztok neposredno v okolje Rižana Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	
SPLOŠNA BOLNIŠNICA IZOLA STAVBENIK - BETONARNE, TOVARNA BETONSKIH IZDELKOV	IZOLA	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	KOPER
TERME ČATEŽ, D.D.- AQUAPARK ŽUSTERNA	IZOLA	Iztok neposredno v okolje morje	
PE TALASO STRUNJAN	PIRAN	Iztok neposredno v okolje morje	
TOMOS INVEST	KOPER	Iztok v kanalizacijo, ki se zaključi s KČN	KOPER

3. Splošni fizikalno-kemijski parametri in onesnaževala v morski vodi

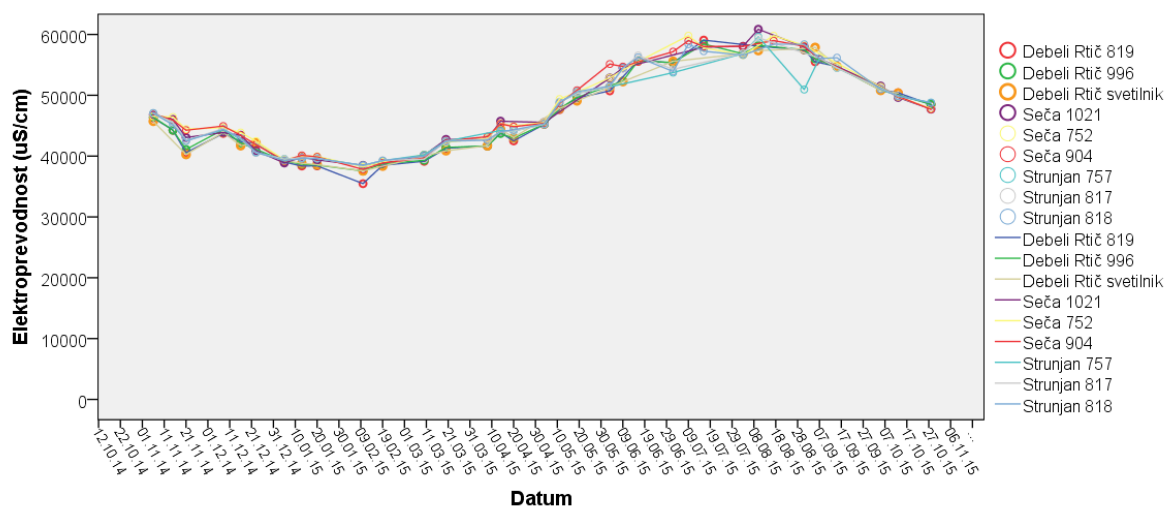
V vrednostih splošnih fizikalno-kemijskih parametrov med vzorčnimi mesti nismo ugotovili statistično značilnih razlik ($p < 0,05$) (slike 18–30).



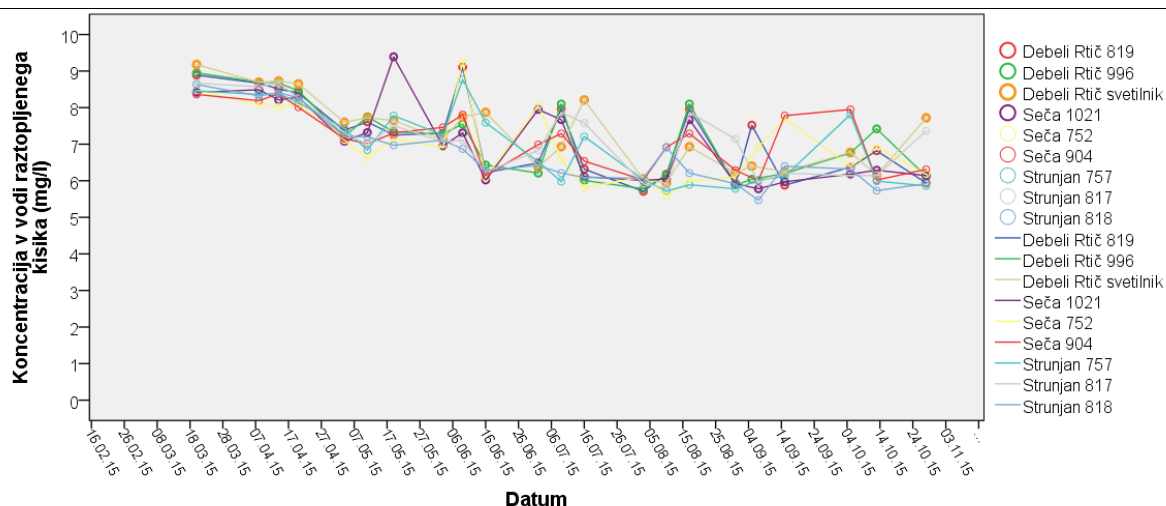
Slika 18: Spreminjanje temperature vode na posameznih vzorčnih mestih med novembrom 2014 in oktobrom 2015.



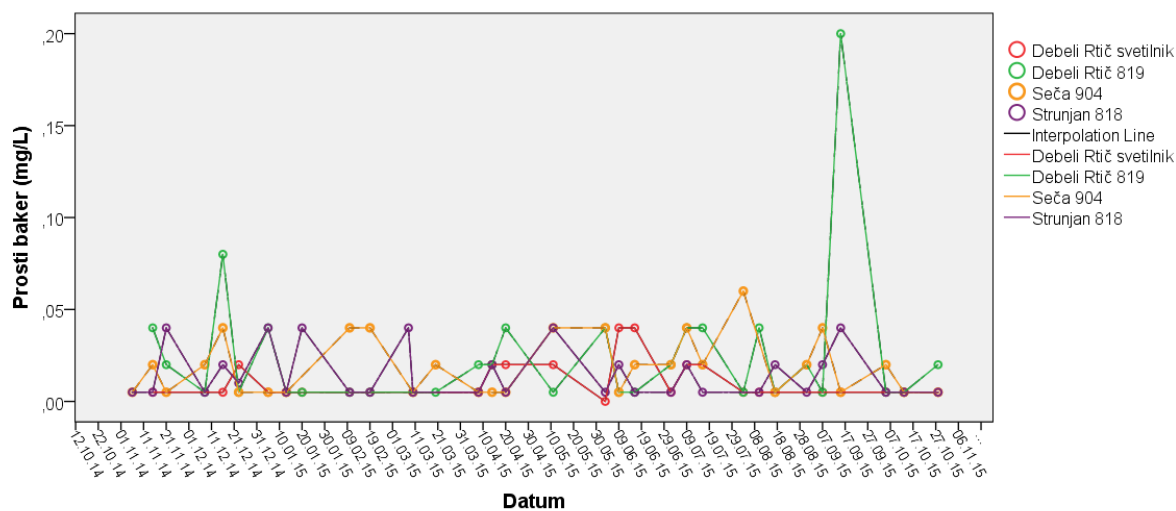
Slika 19: Spreminjanje pH na posameznih vzorčnih mestih med novembrom 2014 in oktobrom 2015.



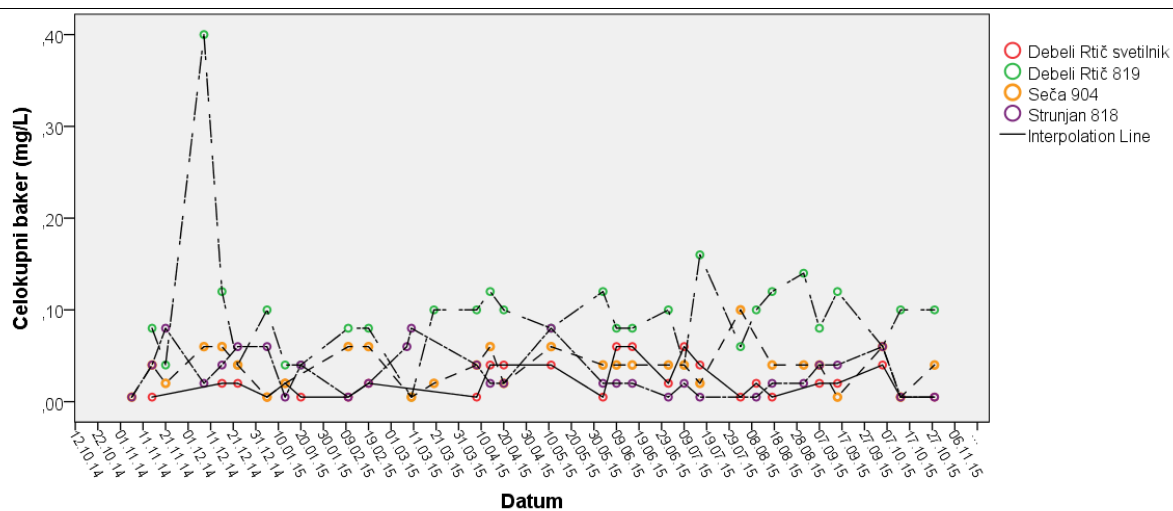
Slika 20: Spreminjanje elektroprevodnosti na posameznih vzorčnih mestih med novembrom 2014 in oktobrom 2015.



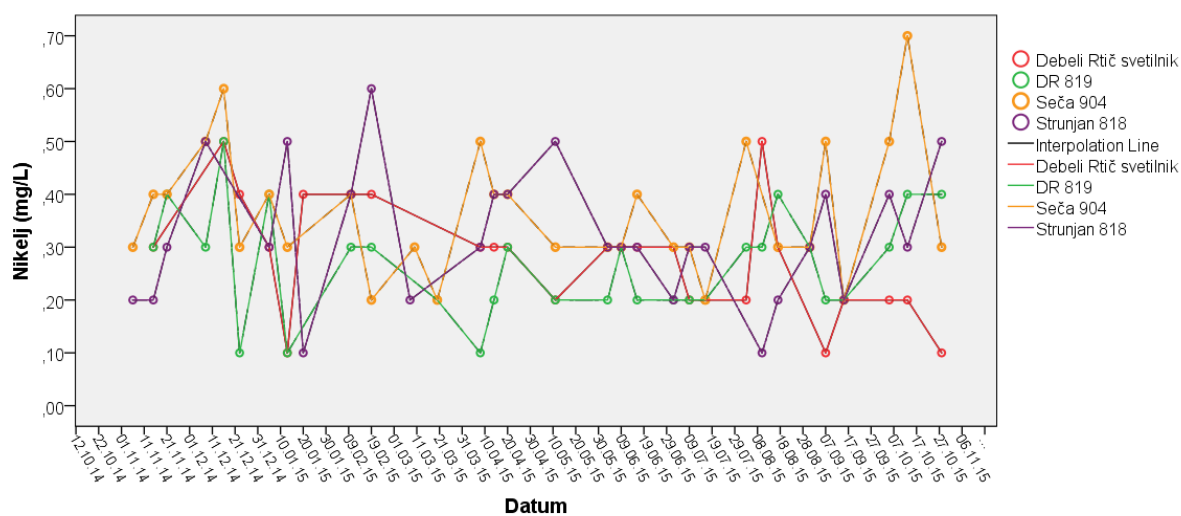
Slika 21: Spreminjanje koncentracije v vodi raztopljenega kisika na posameznih vzorčnih mestih med novembrom 2014 in oktobrom 2015.



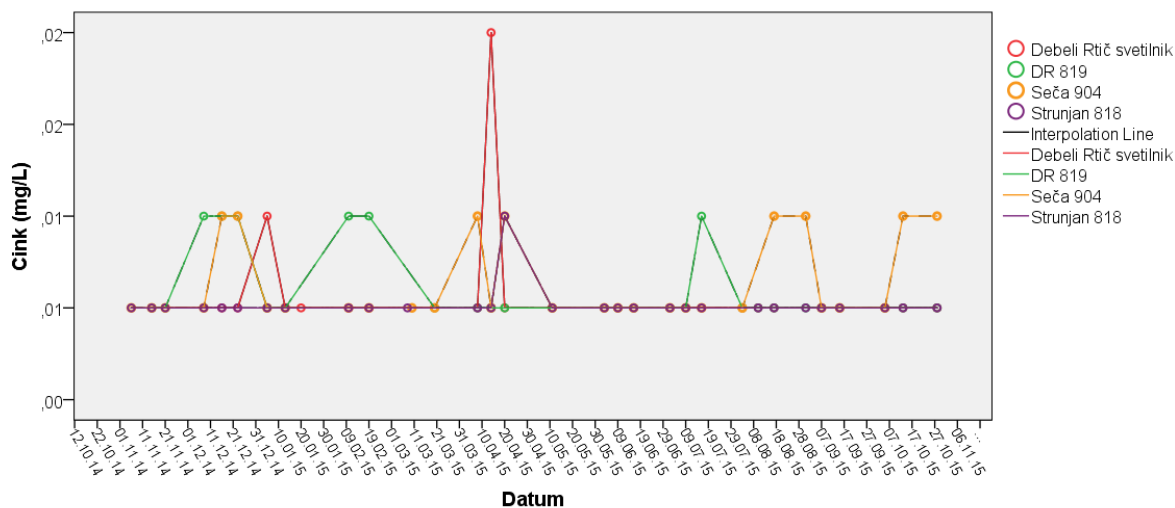
Slika 22: Spreminjanje koncentracij prostega bakra na posameznih vzorčnih mestih med novembrom 2014 in oktobrom 2015.



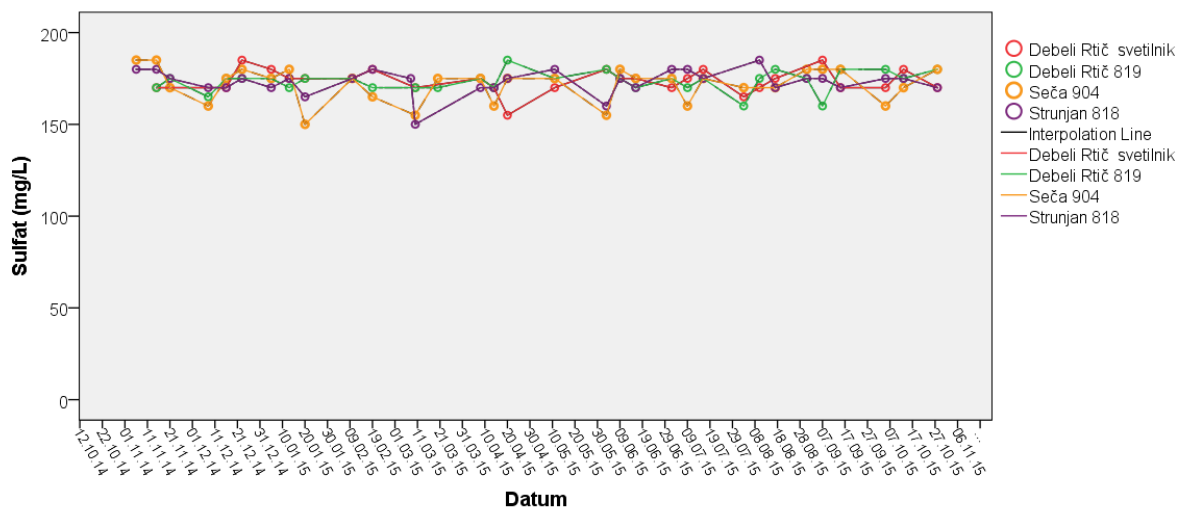
Slika 23: Spreminjanje koncentracij celotnega bakra na posameznih vzorčnih mestih med novembrom 2014 in oktobrom 2015.



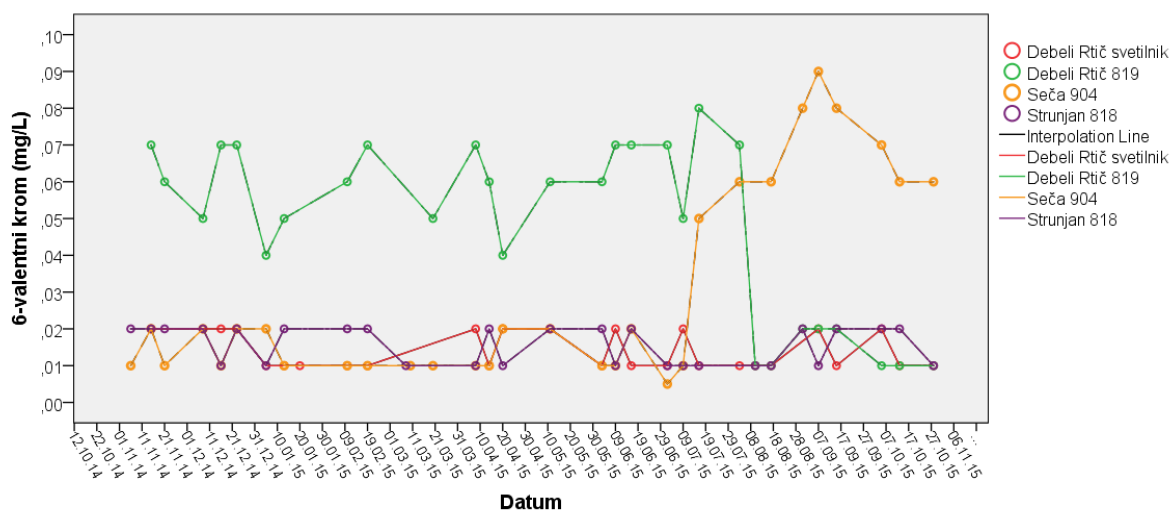
Slika 24: Spreminjanje koncentracij niklja na posameznih vzorčnih mestih med novembrom 2014 in oktobrom 2015.



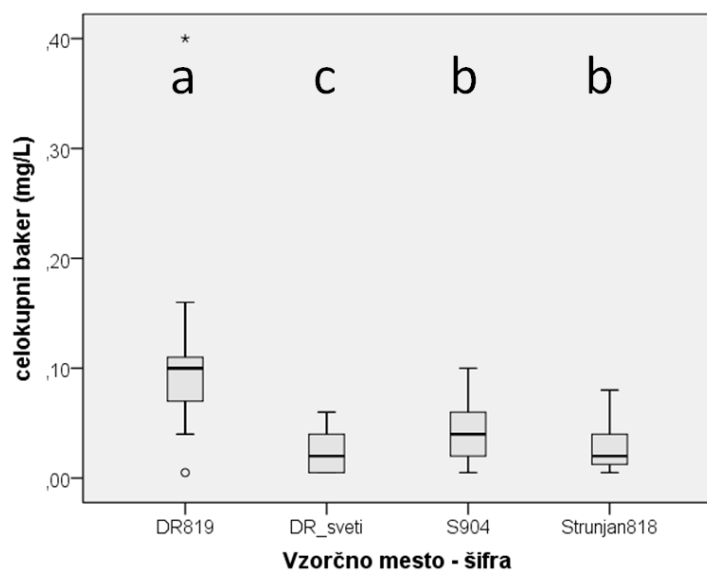
Slika 25: Spreminjanje koncentracij cinka na posameznih vzorčnih mestih med novembrom 2014 in oktobrom 2015.



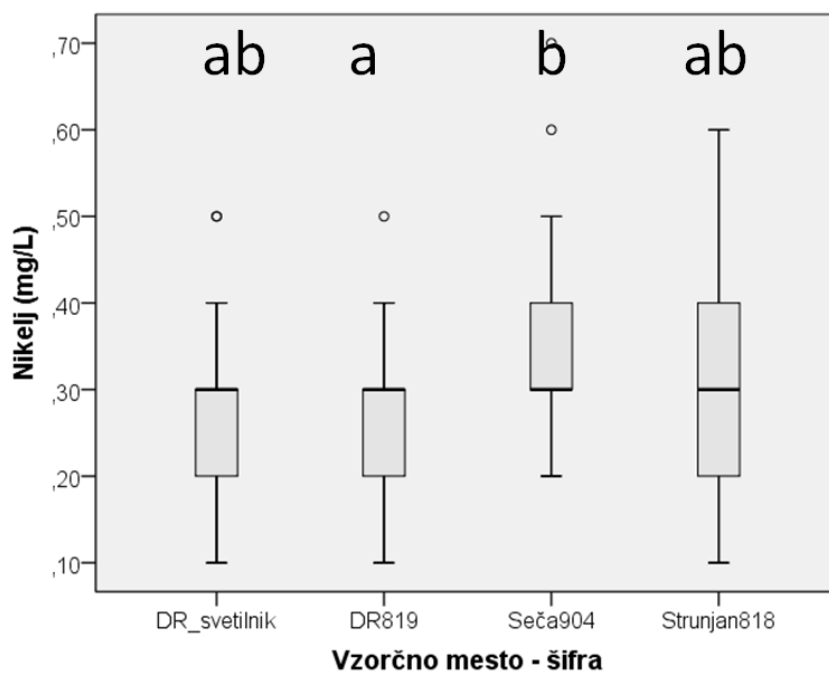
Slika 26: Spreminjanje koncentracij sulfata na posameznih vzorčnih mestih med novembrom 2014 in oktobrom 2015.



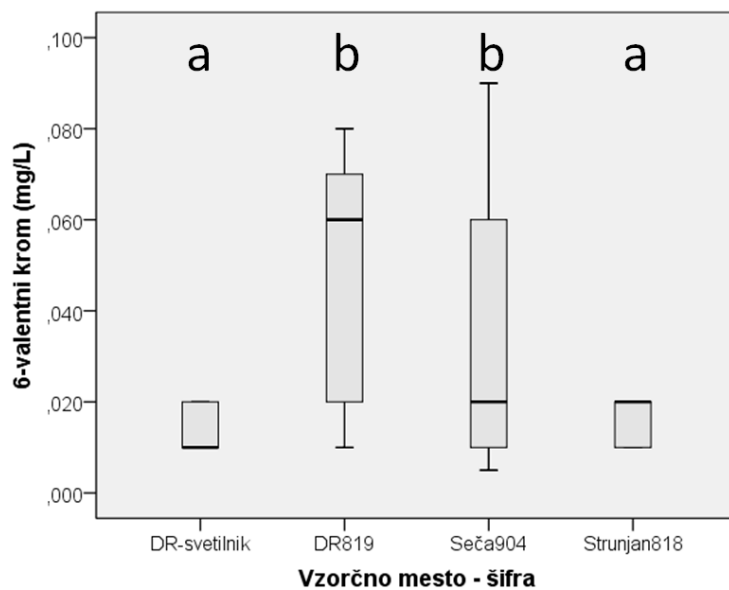
Slika 27: Spreminjanje koncentracij 6-valentnega kroma na posameznih vzorčnih mestih med novembrom 2014 in oktobrom 2015.



Slika 28: Koncentracije celokupnega bakra na štirih vzorčnih mestih. DR – Debeli rtič. Vzorčna mesta označena z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo (paired Wilcoxon test, $p < 0,05$) v koncentracijah.



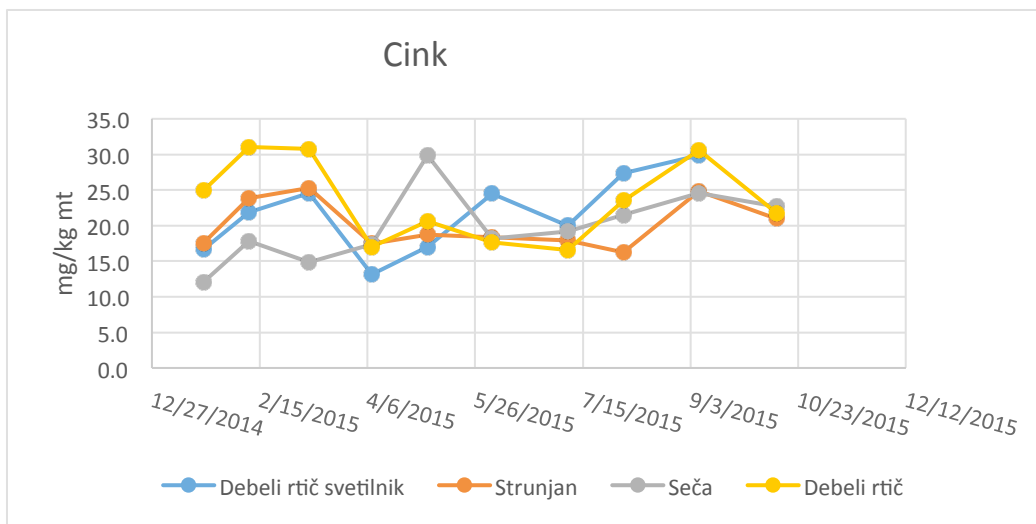
Slika 29: Koncentracije niklja na štirih vzorčnih mestih. DR – Debeli rtič. Vzorčna mesta označena z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo (paired Wilcoxon test, $p < 0,05$) v koncentracijah.



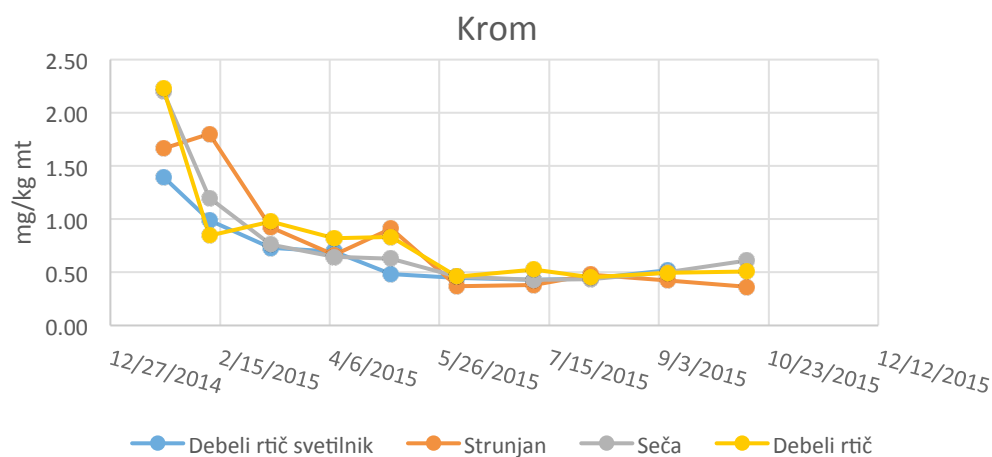
Slika 30: Koncentracije 6-valentnega kroma na štirih vzorčnih mestih. DR – Debeli rtič. Vzorčna mesta označena z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo (paired Wilcoxon test, $p < 0,05$) v koncentracijah.

4. Vsebnosti elementov v mesu školjk

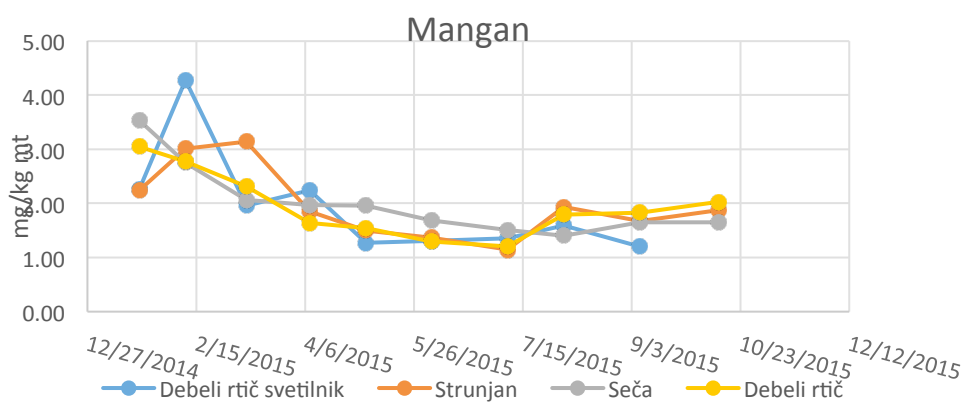
Meso školjk je vsebovalo največ železa in najmanj živega srebra, vsebnost ostalih elementov si je sledila v naslednjem vrstnem redu $\text{Fe} > \text{Zn} > \text{As} > \text{Mn} > \text{Cu} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Cd} > \text{Pb} > \text{Hg}$ (slike 31–41).



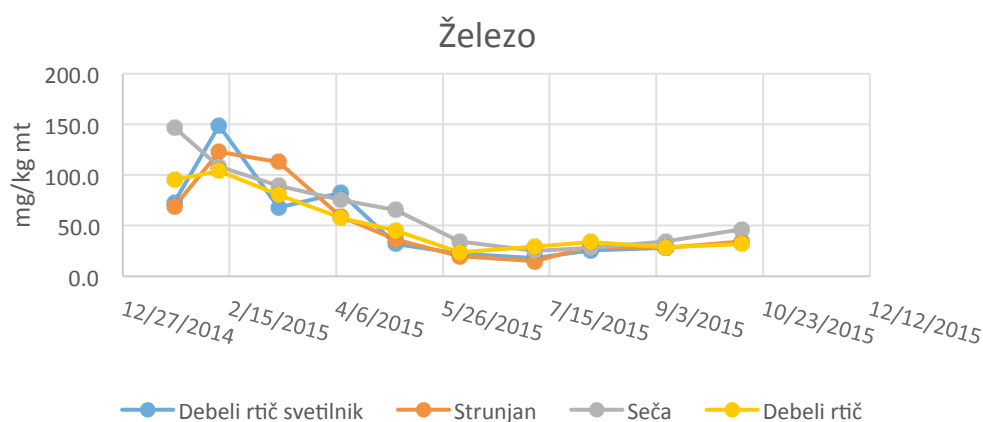
Slika 31: Vsebnosti cinka v mesu školjk (mg/kg mokre teže) v obdobju med januarjem in oktobrom 2015.



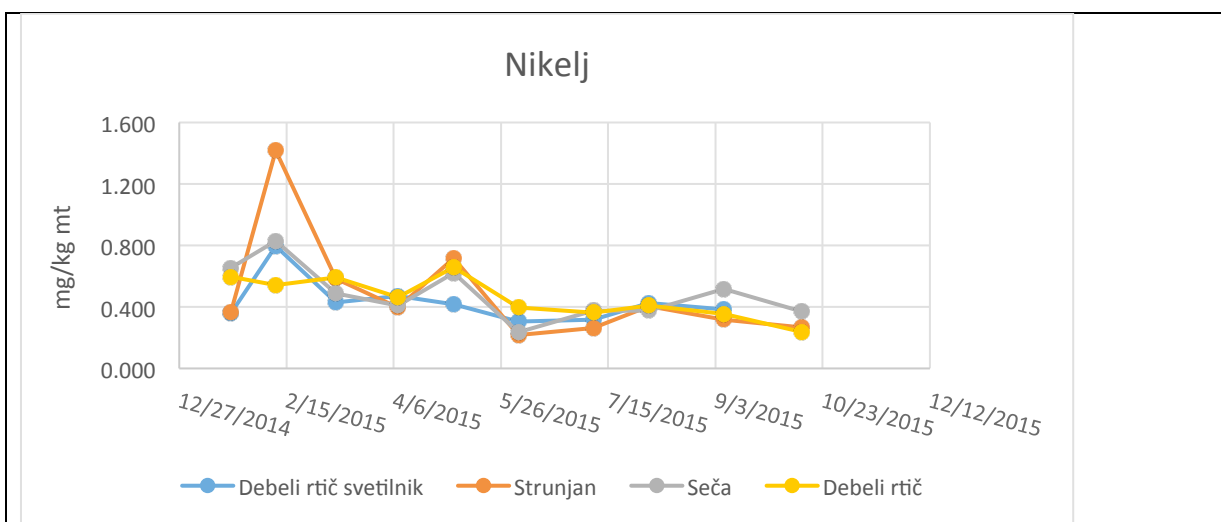
Slika 32: Vsebnosti kroma v mesu školjk (mg/kg mokre teže) v obdobju med januarjem in oktobrom 2015.



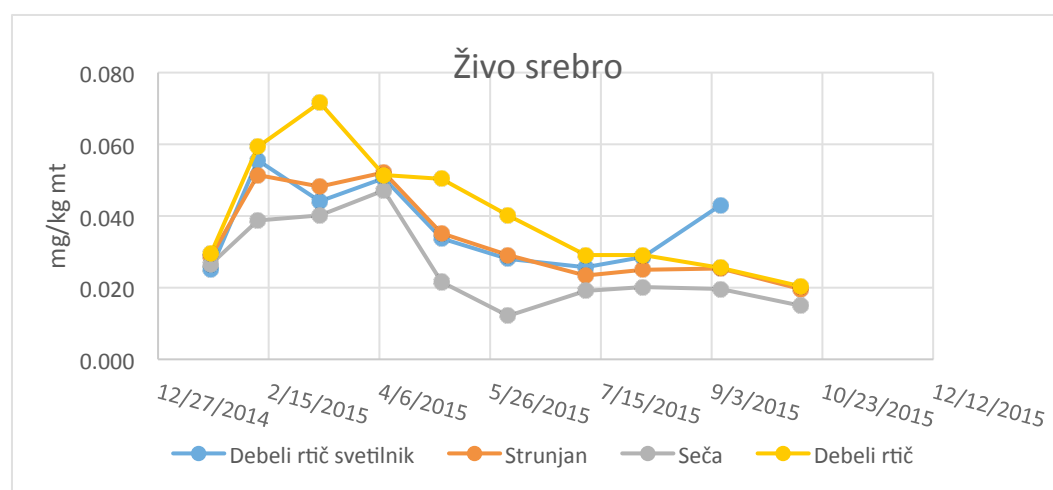
Slika 33: Vsebnosti mangana v mesu školjk (mg/kg mokre teže) v obdobju med januarjem in oktobrom 2015.



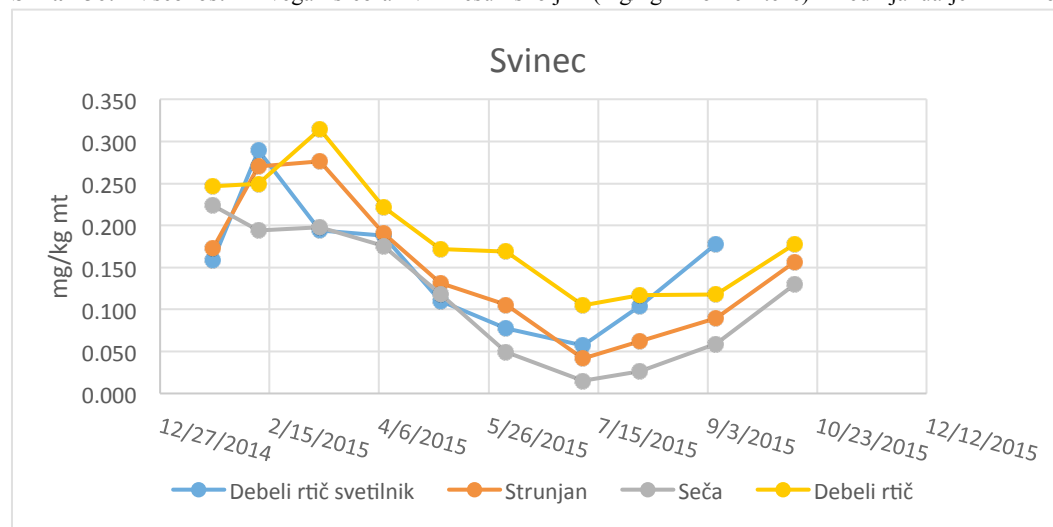
Slika 34: Vsebnosti železa v mesu školjk (mg/kg mokre teže) v obdobju med januarjem in oktobrom 2015.



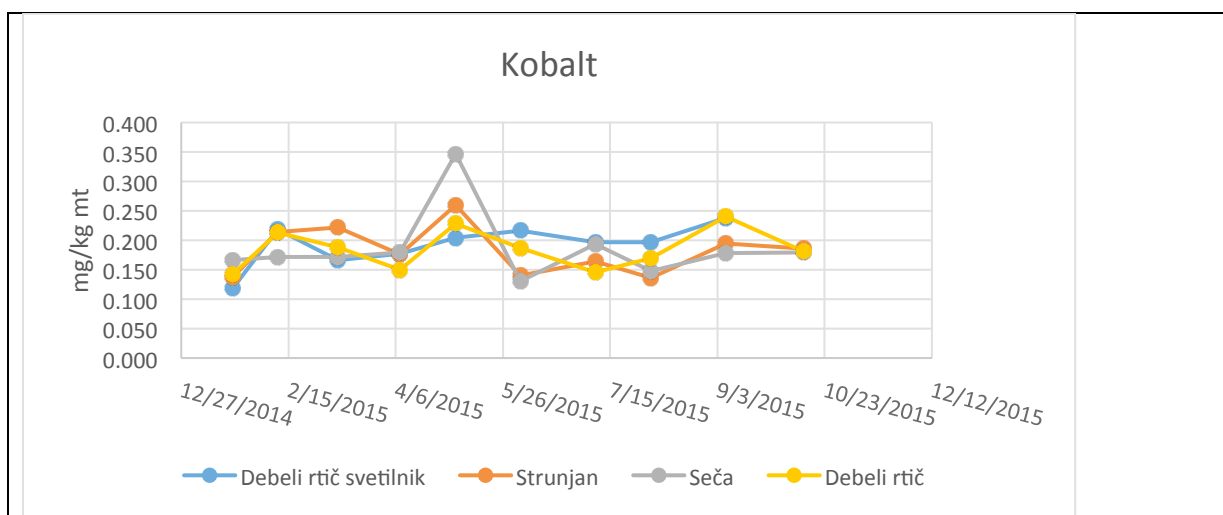
Slika 35: Vsebnosti niklja v mesu školjk (mg/kg mokre teže) v obdobju med januarjem in oktobrom 2015.



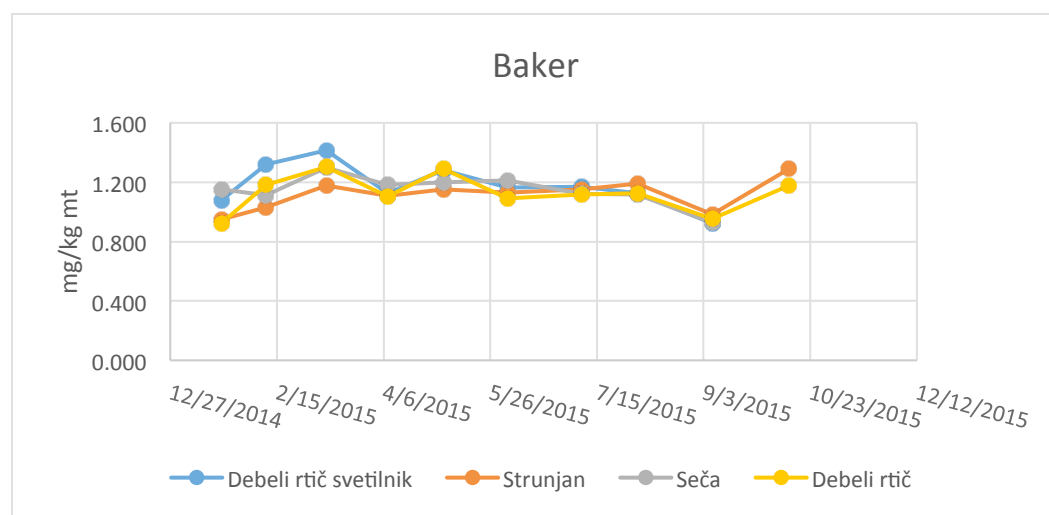
Slika 36: Vsebnosti živega srebra v mesu školjk (mg/kg mokre teže) med januarjem in oktobrom 2015.



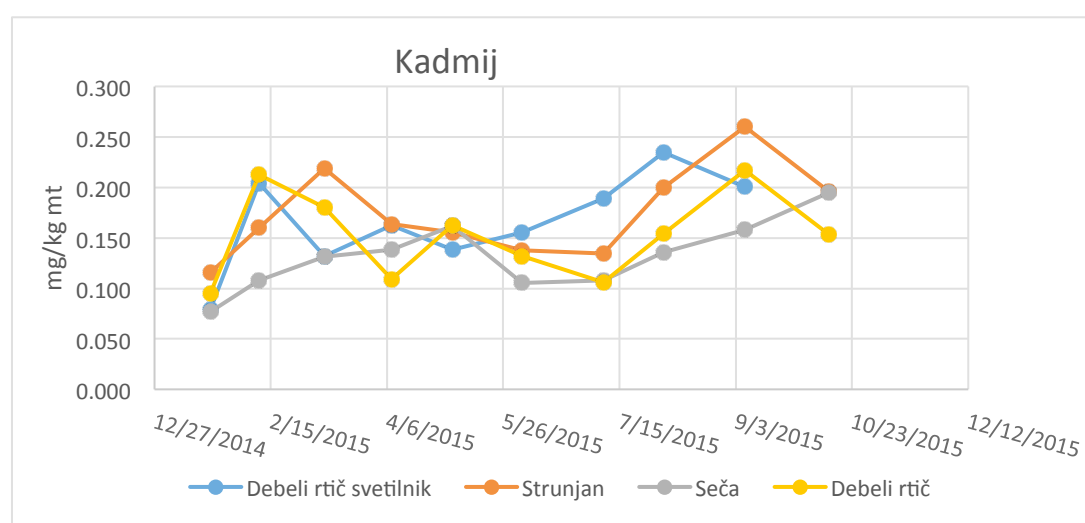
Slika 37: Vsebnosti svineca v mesu školjk (mg/kg mokre teže) v obdobju med januarjem in oktobrom 2015.



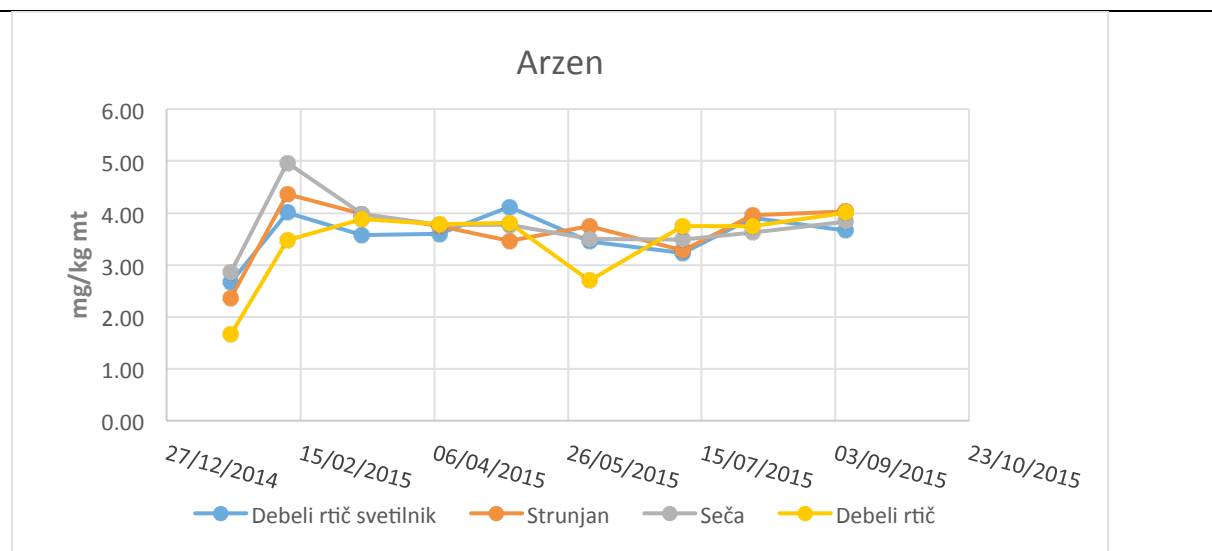
Slika 38: Vsebnosti kobalta v mesu školjk (mg/kg mokre teže) v obdobju med januarjem in oktobrom 2015.



Slika 39: Vsebnosti bakra v mesu školjk (mg/kg mokre teže) v obdobju med januarjem in oktobrom 2015.



Slika 40: Vsebnosti kadmija v mesu školjk (mg/kg mokre teže) v obdobju med januarjem in oktobrom 2015.



Slika 41: Vsebnosti arzena v mesu školjk (mg/kg mokre teže) v obdobju med januarjem in oktobrom 2015.

5. Podatki o številu bakterij *E. coli* v školjkah

V enoletnem obdobju od novembra 2014 do oktobra 2015 smo v okviru projekta izvedli po 34 testiranj školjk iz 9 posameznih odvzemnih točk na školjčičiščih in na območju prostega nabiranja. V okviru projekta je bilo izvedenih 306 preiskav. V obdelavo podatkov smo dodatno vključili 88 rezultatov (11 rezultatov za posamezno točko školjčičišča) vzorčenja za namen Nacionalnega monitoringa školjk, pridobljenih v obdobju poteka našega vzorčenja. Skupno smo obdelali 394 rezultatov, ki so bili pridobljeni v tem obdobju, od tega je 360 rezultatov pridobljenih iz školjčičišč, 34 pa iz področja prostega nabiranja.

Rezultati kontaminacije školjk z *E. coli* za posamezne točke na školjčičiščih in na točki prostega nabiranja, pridobljeni v okviru projekta in uradnega vzorčenja za namen Nacionalnega monitoringa školjk v testnem obdobju, so prikazani v tabeli 3.

Za oceno ustreznosti kategorizacije školjčičišč glede kontaminacije in določitev morebitnega sezonskega vpliva na kontaminacijo školjk z *E. coli* je potrebno večletno spremljanje rezultatov. Z dovoljenjem naročnika testiranj (UVHVVR) smo v obdelavo dodatno vključili tudi rezultate vzorčenj za namen Nacionalnega monitoringa školjk v letu 2013 in rezultate pridobljene do novembra 2014 (tabela 4). V obdelavo je bilo dodatno zajetih 131 rezultatov. Na nekaterih testnih točkah se v tem obdobju vzorčenje ni izvajalo. Število rezultatov za posamezne točke školjčičišč vzorčenih v tem obdobju za namen Nacionalnega monitoringa školjk je prikazan v tabeli 5.

Tabela 3: Rezultati testiranja školjk na *E. coli* (MPN/100g) v obdobju od 1.11. 2014 do 28.10. 2015 za namen CRP in uradnega monitoringa školjk

datum	Seča 752	Seča904	Seča1021	Strunjan817	Strunjan818	Strunjan757	Debeli rtič 819	Debeli rtič 996	prosto
6.11.2014	110	20	130	170	130	20	170	170	11000
14.11.2014	68	110	230	230	270	170	270	78	3500
20.11.2014				5400	1700	3500	490	220	
21.11.2014	790	1100	170	790	330	1300	3500	230	1300
27.11.2014	20	230	20	78	140	330	78	20	
7.12.2014	130	45	130	20	230	78	20	20	<18
16.12.2014	<18	790	330	20	230	<18	<18	20	330
23.12.2014	130	130	110	790	1300	330	45	45	20
31.12.2014	220	330	330						
5.1.2015	130	230	330	20	20	45	20	<18	20
8.1.2015				68	20	45	20	<18	
13.1.2015	<18	20	45	45	<18	<18	<18	<18	110
20.1.2015	45	130	170	61	20	<18	170	220	490
28.1.2015	<18	20	<18	<18	<18	45	<18	<18	78
10.2.2015	<18	20	78	130	130	40	20	45	780
19.2.2015	20	45	78	78	78	78	20	<18	230
26.2.2015	40	<18	<18	78	20	40			
4.3.2015							<18	<18	
10.3.2015	<18	20	<18	<18	<18	45	<18	<18	<18
20.3.2015	20	45	330	20	45	20	330	68	45
25.3.2015	130	20	130				20	20	
8.4.2015	45	170	780	<18	45	<18	<18	20	45
14.4.2015	170	130	780	<18	78	<18	20	<18	78
20.4.2015	20	78	20	20	20	<18	<18	<18	<18
22.4.2015	<18	45	68	<18	20	<18	<18	<18	<18
4.5.2015	45	<18	130	<18	18	<18	<18	<18	45
11.5.2015	<18	20	45	45	18	45	<18	<18	<18
19.5.2015	68	20	<18	<18	20	<18	<18	<18	<18
26.5.2015				20	110	40	<18	<18	
28.5.2015	20	<18	45						
3.6.2015	18	130	68	18	18	18	<18	<18	<18
9.6.2015	45	45	<18	20	<18	20	<18	<18	<18
16.6.2015	<18	20	<18	<18	<18	<18	<18	20	<18
23.6.2015	20	<18	20	78	<18	<18	<18	<18	
2.7.2015	<18	110	<18	20	20	<18	<18	<18	<18
8.7.2015	<18	<18	<18	<18	<18	<18	<18	<18	<18
16.7.2015	<18	<18	78	<18	<18	<18	<18	<18	<18
29.7.2015	<18	130	330	780	330	330	78	45	
3.8.2015	78	45	40	230	130	45	<18	<18	<18
10.8.2015	20	<18	<18	20	20	45	<18	<18	<18
17.8.2015	330	230	230	130	<18	78	78	<18	17000
27.8.2015	230	78	78	450	78	490	<18	78	
31.8.2015	68	45	<18	<18	230	20	<18	20	<18
7.9.2015	<18	<18	<18	20	45	20	45	20	<18
15.9.2015	<18	20	<18	<18	<18	<18	45	780	330
5.10.2015	780	78	20	1300	330	4900	<18	<18	110
13.10.2015	780	230	450	45	78	130	45	<18	<18
22.10.2015	20	20	68	78	<18	<18			
28.10.2015	2100	230	780	330	220	45	45	230	4900

	Uradni nadzor (UVHVVR)
	Vrednosti rezultatov: 230 – 700 MPN <i>E. coli</i> /100 g
	Vrednosti rezultatov: 700 – 4600 MPN <i>E. coli</i> /100 g

Tabela 4: Zbrani rezultati kontaminacije školjk v letih 2013 in 2014, ki so bile vzorčene za namen Nacionalnega monitoringa školjk (MPN *E. coli*/ 100 g)

leto	mesec	Seča 752	Seča 904	Seča 1021	Strunjan 817	Strunjan 818	Strunjan 757	Debeli rtič 819	Debeli rtič 996
2013	januar	20	50				330	< 20	80
	februar		50		< 20	< 20	< 20	170	490
	marec		260		< 20	20		< 20	20
	april		50		< 20	20		230	70
	maj	< 20	< 20		< 20	< 20		20	< 20
	junij		< 20		50	130		20	50
	julij		< 20		20	< 20		80	20
	avgust		50		20	< 20		80	80
	avgust		80		< 20	< 20		130	130
	september		20		< 20	< 20		1700	1800
	oktober		220		< 20	20			
	november		60		< 20	50			
	december		130		< 20	< 20			
2014	januar		140		< 20	130		< 20	50
	februar		130		80	790		170	110
	marec	20	45		20	20	18	20	< 18
	april	18	78	20	630	20	130	< 18	< 18
	maj	150	230	230	230	78	78	40	20
	junij		< 18	< 18	< 18	< 18	40	< 18	< 18
	julij		20	45	< 18	20	20	< 18	20
	avgust	18	45	20	20	18	78	20	18
	september	40	20	20	330	790		18	18
	oktober	78	330	40	78	78	490	< 18	< 18

	Vzorčenja ni bilo
	Vrednosti rezultatov: 230 – 700 MPN <i>E. coli</i> /100 g
	Vrednosti rezultatov: 700 – 4600 MPN <i>E. coli</i> /100 g

Tabela 5: Število vzorčenj za namen Nacionalnega monitoringa školjk v letih 2013 in 2014 (do novembra)

lokacija	Seča 752	Seča 904	Seča 1021	Strunjan 817	Strunjan 818	Strunjan 757	Debeli rtič 819	Debeli rtič 996
število vzorčenj	8	23	7	22	22	9	20	20

6. Rezultati vsebnosti bakterij *E. coli* in enterokokov v morski vodi

Ob vzorčenju školjk skladno s programom Projekta smo na posameznih odvzemnih točkah na vseh štirih lokacijah vzporedno izvedli tudi odvzem vzorcev vode za mikrobiološko preiskavo na *E. coli* in enterokoke. Na vsaki odzemni točki je bilo v tem enoletnem obdobju odvzetih 34 vzorcev. Rezultati obeh preiskav (izraženi v vrednosti MPN/100ml vzorca) so ob hkratnih podatkih za vrednosti bakterij *E. coli* v vzorcih školjk na tistem mestu po datumih odvzema predstavljeni za gojišče Strunjan v tabeli 6, za gojišče Seča v tabeli 7 in za gojišče Debeli rtič ter iz področja prostega nabiranja v tabeli

8. Rezultati števila *E. coli* in enterokokov v morski vodi so barvno označeni v tistih terminih, ko je število *E. coli* v školjkah preseglo mejo 230 MPN/100 g.

Tabela 6: Rezultati testiranja morske vode in školjk na vsebnost bakterij *E. coli* na območju školjčišča v Strunjanu v obdobju od 1. 11. 2014 do 28. 10. 2015 za namen CRP

školjčišče/točka	Strunjan 817			Strunjan 818			Strunjan 757		
matriks	školjke	voda	voda	školjke	voda	voda	školjke	voda	voda
preiskava	E. coli		enterokoki	E. coli		enterokoki	E. coli		enterokoki
6.11.2014	170	<3	<3	130	<3	<3	20	<3	<3
14.11.2014	230	38	8,8	270	15	38	170	15	8,8
21.11.2014	790	<3	<3	330	8,8	5	1300	<3	<3
8.12.2014	20	<3	<3	230	<3	<3	78	<3	<3
16.12.2014	20	9,3	9,3	230	9,3	24	<18	3,6	9,3
23.12.2014	790	9,3	15	1300	24	24	330	9,3	15
5.1.2015	20	<3	<3	20	<3	3,6	45	<3	<3
13.1.2015	45	<3	4	<18	<3	<3	<18	<3	4
20.1.2015	61	3,6	<3	20	<3	<3	<18	<3	<3
10.2.2015	130	<3	<3	130	<3	>110	40	<3	<3
19.2.2015	78	<3	3,6	78	<3	<3	78	<3	3,6
10.3.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	45	<3	<3
20.3.2015	20	<3	<3	45	<3	<3	20	<3	<3
8.4.2015	<18	<3	<3	45	<3	<3	<18	<3	<3
14.4.2015	<18	<3	3,6	78	<3	3,6	<18	<3	3,6
20.4.2015	20	<3	<3	20	<3	<3	<18	<3	<3
4.5.2015	<18	<3	<3	18	<3	3,6	<18	<3	<3
11.5.2015	45	<3	<3	18	<3	<3	45	<3	<3
19.5.2015	<18	<3	3,6	20	<3	<3	<18	<3	3,6
3.6.2015	18	<3	<3	18	<3	<3	18	<3	<3
9.6.2015	20	<3	<3	<18	<3	<3	20	<3	<3
16.6.2015	<18	3,6	<3	<18	3,1	<3	<18	<3	<3
2.7.2015	20	<3	<3	20	<3	<3	<18	<3	<3
8.7.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	<3	<3
16.7.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	<3	<3
3.8.2015	230	<3	<3	130	3,6	<3	45	3,1	<3
10.8.2015	20	<3	<3	20	<3	<3	45	<3	<3
17.8.2015	130	15	<3	<18	<3	<3	78	<3	<3
31.8.2015	<18	<3	<3	230	<3	3,6	20	<3	<3
7.9.2015	20	<3	<3	45	<3	<3	20	<3	<3
15.9.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	<3	<3
5.10.2015	1300	<3	24	330	3,6	<3	4900	9,3	24
13.10.2015	45	<3	<3	78	7,4	<3	130	<3	<3
28.10.2015	330	3,6	<3	220	<3	<3	45	3,6	<3

- Vrednosti rezultatov školjk: 230 – 700 MPN *E. coli* /100 g
- Vrednosti rezultatov školjk: 700 – 4600 MPN *E. coli* /100 g
- Vrednosti rezultatov vode MPN *E. coli* /100 ml
- Vrednosti rezultatov vode MPN enterokoki /100 ml

Tabela 7: Rezultati testiranja školjk in morske vode na vsebnost bakterij *E. coli* in enterokokov na območju školjčišča v Seči v obdobju od 1. 11. 2014 do 28. 10. 2015 za namen CRP.

školjčišče/točka	Seča 752			Seča 904			Seča 1021		
	školjke	voda	voda	školjke	voda	voda	školjke	voda	voda
	E. coli	E. coli	enterokoki	E. coli	E. coli	enterokoki	E. coli	E. coli	enterokoki
6.11.2014	110	15	8,8	20	8,8	<3	130	5	15
14.11.2014	68	15	5	110	38	38	230	38	15
21.11.2014	790	5	<3	1100	<3	15	170	<3	4,4
8.12.2014	130	<3	5	45	<3	<3	130	33	2
16.12.2014	<18	3,6	9,3	790	9,3	24	330	7,4	9,3
23.12.2014	130	7,4	<3	130	3,6	3,6	110	7,4	3,6
5.1.2015	130	46	<3	230	24	24	330	3,6	9,3
13.1.2015	<18	9	<3	20	<3	<3	45	9	9
20.1.2015	45	3,6	9,3	130	<3	<3	170	46	36
10.2.2015	<18	<3	9,3	20	<3	24	78	<3	9,3
19.2.2015	20	<3	3,6	45	<3	<3	78	3,6	3,6
10.3.2015	<18	<3	<3	20	<3	<3	<18	<3	<3
20.3.2015	20	<3	3,1	45	<3	<3	330	3,6	24
8.4.2015	45	7,4	9,3	170	<3	<3	780	<3	3,6
14.4.2015	170	<3	<3	130	<3	<3	780	<3	<3
20.4.2015	20	<3	<3	78	<3	<3	20	15	<3
4.5.2015	45	3,1	12	<18	<3	3,6	130	9,3	3,6
11.5.2015	<18	<3	3,6	20	<3	<3	45	<3	3,6
19.5.2015	68	3,6	<3	20	9,3	3,6	<18	24	15
3.6.2015	18	<3	<3	130	3,6	<3	68	<3	<3
9.6.2015	45	<3	3,6	45	<3	3,6	<18	<3	<3
16.6.2015	<18	<3	<3	20	<3	<3	<18	3,6	<3
2.7.2015	<18	<3	<3	110	<3	<3	<18	<3	<3
8.7.2015	<18	<3	<3	<18	3,6	<3	<18	<3	3,1
16.7.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	78	<3	<3
3.8.2015	78	<3	9,3	45	<3	<3	40	<3	<3
10.8.2015	20	<3	<3	<18	<3	<3	<18	<3	<3
17.8.2015	330	<3	3,6	230	3,1	3,6	230	9,3	<3
31.8.2015	68	<3	<3	45	<3	9,3	<18	<3	<3
7.9.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	<3	<3
15.9.2015	<18	<3	<3	20	<3	<3	<18	<3	<3
5.10.2015	780	<3	<3	78	<3	3,6	20	7,4	3,6
13.10.2015	780	12	46	230	<3	15	450	15	9,3
28.10.2015	2100	3,6	24	230	<3	3,6	780	9,3	24

- Vrednosti rezultatov školjk: 230 – 700 MPN *E. coli* /100 g
- Vrednosti rezultatov školjk: 700 – 4600 MPN *E. coli* /100 g
- Vrednosti rezultatov vode MPN *E. coli* /100 ml
- Vrednosti rezultatov vode MPN enterokoki /100 ml

Tabela 8: Rezultati testiranja školjk in morske vode na vsebnost bakterij *E. coli* in enterokokov na območju školjčišča na Debelem rtiču in območju prostega nabiranja v obdobju od 1.11. 2014 do 28.10. 2015 za namen CRP.

školjčišče/točka	D. RTIČ 819			D. RTIČ 996			PROSTO		
	školjke	voda	voda	školjke	voda	voda	školjke	voda	voda
	E. coli		enterokoki	E. coli		enterokoki	E. coli		enterokoki
6.11.2014	170	8,8	<3	170	5	5	11000	38	38
14.11.2014	270	38	38	78	38	38	3500	38	38
21.11.2014	3500	38	8,8	230	49	<3	1300	110	15
8.12.2014	20	<3	<3	20	2	<3	<18	<3	<3
16.12.2014	<18	<3	<3	20	<3	<3	330	24	7,4
23.12.2014	45	<3	<3	45	3,6	<3	20	24	3,6
5.1.2015	20	<3	<3	<18	<3	3,6	20	<3	3,6
13.1.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	110	9	4
20.1.2015	170	15	3,6	220	3,6	3,6	490	46	9,3
10.2.2015	20	<3	<3	45	<3	3,1	780	<3	<3
19.2.2015	20	<3	<3	<18	3,6	3,6	230	9	3,6
10.3.2015	<18	<3	<3	<18	<3	3,6	<18	<3	<3
20.3.2015	330	46	7,4	68	46	<3	45	110	3,1
8.4.2015	<18	<3	<3	20	<3	3,6	45	<3	<3
14.4.2015	20	<3	<3	<18	<3	<3	78	<3	<3
20.4.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	<3	<3
4.5.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	45	9,3	<3
11.5.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	<3	3,6
19.5.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	9,3	<3
3.6.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	<3	<3
9.6.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	<3	<3
16.6.2015	<18	<3	<3	20	<3	<3	<18	<3	<3
2.7.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	<3	<3
8.7.2015	<18	24	<3	<18	<3	<3	<18	<3	<3
16.7.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	<3	<3
3.8.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	<3	<3
10.8.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	<18	3,6	<3
17.8.2015	78	3,1	3,6	<18	9,3	3,6	17000	>110	>110
31.8.2015	<18	<3	<3	20	<3	<3	<18	<3	3,6
7.9.2015	45	<3	<3	20	<3	<3	<18	<3	<3
15.9.2015	45	<3	<3	780	<3	<3	330	<3	<3
5.10.2015	<18	<3	<3	<18	<3	<3	110	<3	<3
13.10.2015	45	46	<3	<18	<3	<3	<18	<3	3,1
28.10.2015	45	<3	<3	230	3,1	<3	4900	110	>110

- Vrednosti rezultatov školjk: 230 – 700 MPN *E. coli* /100 g
- Vrednosti rezultatov školjk: 700 – 4600 MPN *E. coli* /100 g
- Vrednosti rezultatov vode MPN *E. coli* /100 ml
- Vrednosti rezultatov vode MPN enterokoki /100 ml

7. Prisotnost sevov *E. coli*, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja

Skupno smo preiskali 136 vzorcev in seve *E. coli*, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL) in jih ugotovili pri 5,9 % klapavic (2/34) iz gojišča Seča, pri enakem odstotku tudi v Strunjanu, ne pa tudi na Debelem rtiču. Delež ESBL iz prosto nabranih klapavic ob svetilniku je bil 14,7 % (5/34). Sevov *E. coli*, ki izločajo AmpC nismo ugotovili.

8. Ugotavljanje virulenčnih faktorjev

Iz školjčičišča Strunjan je bilo izmed 61 preiskanih sevov *E. coli* 44 (72,1 %) komezalnih (skupine A₀, A₁, B₁), ostalih 17 (27,9 %) pa potencialno patogenih (skupine B₂, B₂, D₁, D₂) (tabela 9). V vzorcih iz Strunjana smo pri treh sevih (4,9 %) ugotovili tudi gen *eae* in pri enem (1,6 %) pa tudi enterohemolizin *hly*. Verotoksinov nismo ugotovili.

Med vzorci iz Seče smo od preiskanih 71 sevov *E. coli*, 61 (85,9 %) uvrstili med komezalne, 10 (14,1 %) pa med patogene (tabela 10).

Od 26 preiskanih sevov iz Debelega rtiča jih je bilo 19 (73,1 %) komezalnih in 7 (26,9 %) patogenih (tabela 11).

12 sevov od skupno 16 (75,0 %), izoliranih iz prosto nabranih klapavic ob svetilniku na Debelem rtiču je bilo komezalnih, štirje (25,0 %) pa patogeni (tabela 12).

Geni *eae*, *hly*, *vtx1* in *vtx2* niso bili prisotni pri nobenem izoliranem sevu *E. coli* iz Seče, Debelega rtiča in pri prosto nabranih klapavicah.

Tabela 9: Pregled ugotovljenih filogenetskih skupin bakterij *E. coli* izoliranih iz klapavic, gojišče Strunjan.

Filogenetska skupina	A ₀	A ₁	B ₁	B ₂	B ₂	D ₁	D ₂	Skupaj
Strunjan/ odvzemna točka								
818	8	2	7	0	5	1	0	23
817	4	2	8	1	2	2	1	20
757	6	1	6	0	4	1	0	18
Skupaj	18 (29,5 %)	5 (8,2 %)	21 (34,4 %)	1 (1,6 %)	11 (18,0 %)	4 (6,6 %)	1 (1,6 %)	61 (100 %)
	Komezalne bakterije 44 (72,1 %)			Patogene bakterije 17 (27,9 %)				

Tabela 10: Pregled ugotovljenih filogenetskih skupin bakterij *E. coli* izoliranih iz klapavic, gojišče Seča.

Filogenetska skupina	A ₀	A ₁	B ₁	B ₂	B ₂	D ₁	D ₂	Skupaj
Seča/odvzemna točka								
752	9	3	7	0	0	0	2	
904	8	9	7	0	1	1	1	
1021	10	3	8	0	1	4	1	
Skupaj	27 (36,0 %)	15 (20,0 %)	22 (29,3 %)	0 (0 %)	2 (2,7 %)	5 (6,7 %)	4 (5,3 %)	75 (100 %)
	Komezalne bakterije 64 (85,3 %)			Patogene bakterije 11 (14,7 %)				

Tabela 11: Pregled ugotovljenih filogenetskih skupin bakterij *E. coli* izoliranih iz klapavic, gojišče Debeli rtič.

Filogenetska skupina	A ₀	A ₁	B ₁	B ₂	B ₂	D ₁	D ₂	Skupaj
----------------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	--------

Debeli rtič/odvzemna točka								
996	5	2	5	0	0	0	1	
819	1	4	2	0	0	4	2	
Skupaj	6 (38,0 %)	6 (16,9 %)	7 (31,0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	4 (5,6 %)	3 (5,6 %)	26 (100 %)
	Komenzalne bakterije 19 (73,1 %)			Patogene bakterije 7 (26,9 %)				

Tabela 12: Pregled ugotovljenih filogenetskih skupin bakterij E. coli izoliranih iz prosto nabranih klapavic.

Filogenetska skupina	A ₀	A ₁	B ₁	B ₂	B ₂ ₃	D ₁	D ₂	Skupaj
Prosto nabrane - Svetilnik								
	2	3	7	0	4	0	0	
Skupaj	2 (38,0 %)	3 (16,9 %)	7 (31,0 %)	0 (0 %)	4 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	16 (100 %)
	Komenzalne bakterije 12 (75,0 %)			Patogene bakterije 4 (25,0 %)				

9. Kontaminacija školjk z norovirusi in virusom hepatitisa A

Stopnja kontaminacije klapavic z norovirusi je bila v gojišču Seča 29,4 % (10/34), na Debelem rtiču 48,5 % (16/33), v Strunjanu 54,5 % (18/33), pri prosto nabranih klapavicah ob svetilniku na Debelem rtiču 67,7 % (21/31) (tabela 13).

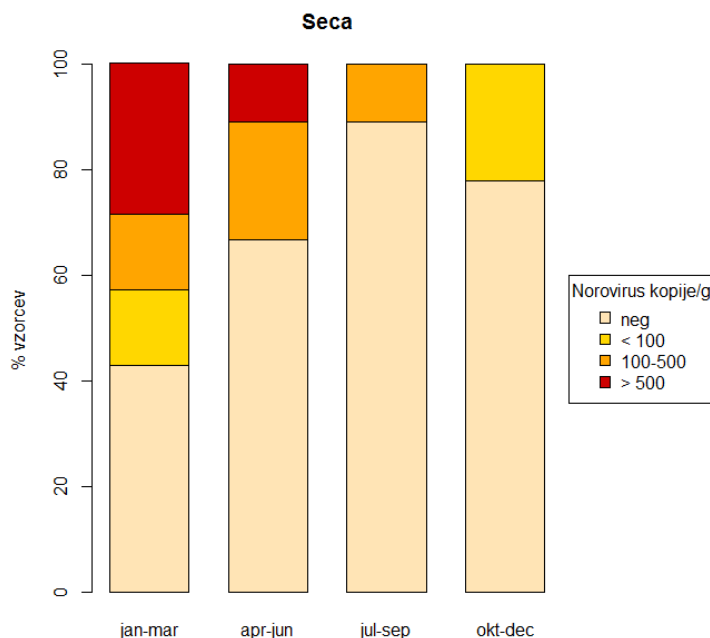
Tabela 13: Pregled kontaminiranih vzorcev po lokacijah in skupinah norovirusov

Školjčišče	Pozitivni vzorci po skupinah			Skupno pozitivni	Število pregledanih vzorcev po školjčišču
	GI	GII	GI+GII		
Seča	1/10 (10,0 %)	8/10 (80,0 %)	1/10 (10,0 %)	10/34 (29,4 %)	34
Strunjan	5/18 (27,8 %)	7/18 (38,9 %)	6/18 (33,3 %)	18/33 (54,5 %)	33
Debeli rtič	2/16 (12,5 %)	4/16 (25,0 %)	10/16 (62,5 %)	16/33 (48,5 %)	33
prosto	3/21 (14,3 %)	6/21 (28,6 %)	12/21 (57,1 %)	21/31 (67,7 %)	31

Med školjčišči je od 100 testiranih, 44 vzorcev klapavic vsebovalo norovirusno RNA: 18,2 % (8/44) genske skupine GI, 43,2 % (19/44) genske skupine GII ter 38,6 % (17/44) obe genski skupini. Pri prosto nabranih klapavicah je 14,3 % (3/21) pozitivnih vzorcev vsebovalo GI, 28,6 % (6/21) GII in 57,1 % (12/21) obe skupini (tabela 13).

V obdobju od konca decembra do sredine januarja so bila vsa školjčišča kontaminirana z norovirusno RNA ter tudi vsi vzorci pri obeh februarjskih vzorčenjih. V drugi polovici vzorčenj – od maja do konca oktobra se je stopnja kontaminacije v školjčiščih znižala – število kopij je bilo od manj kot 100 do največ 360. Najvišje število virusnih kopij za GI smo ugotovili pri prosto nabranih klapavicah v novembru (1190 kopij/g), medtem ko je bilo najvišje določeno število za GII 8114 kopij/g v decembrskem vzorcu iz školjčišča Strunjan. Med vzorci je bilo tudi 36,2 % (34/94) rezultatov, ko je vzorec vseboval manj kot 100 virusnih kopij/g tkiva.

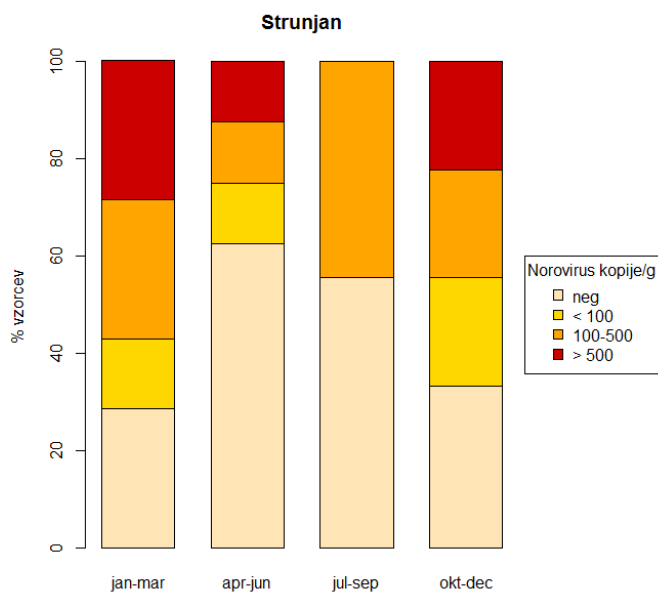
V gojišču Seča smo ugotovili noroviruse pri zadnjem decembrskem vzorčenju, ko sta bili prisotni obe genski skupini, nato pri prvih dveh vzorcih januarja s približno enako stopnjo kontaminacije GII, pri vzorcih iz zadnjega januarskega vzorčenja ne, nato pa pri obeh februarjskih vzorcih. Prva dva aprilska vzorca sta vsebovala nekoliko manj kopij GII kot zadnji aprilski vzorec (927 kopij/g) GII kar je tudi najvišja število kopij virusnih kopij v tem školjčišču. Zadnji vzorec v avgustu je edini iz Seče, ki je vseboval le GI (tabela 14).



Slika 42: Delež in stopnja kontaminiranih klapavic iz gojišča Seča.

Najvišji delež kontaminiranih vzorcev in tudi najvišjo stopnjo kontaminacije v Seči je bil v prvem tromesečju leta, najmanj kontaminiranih je bilo v obdobju julij–september, medtem ko je bila najnižja stopnja kontaminacije med oktobrom in decembrom. Na sliki 42 je upoštevan seštevek GI in GII.

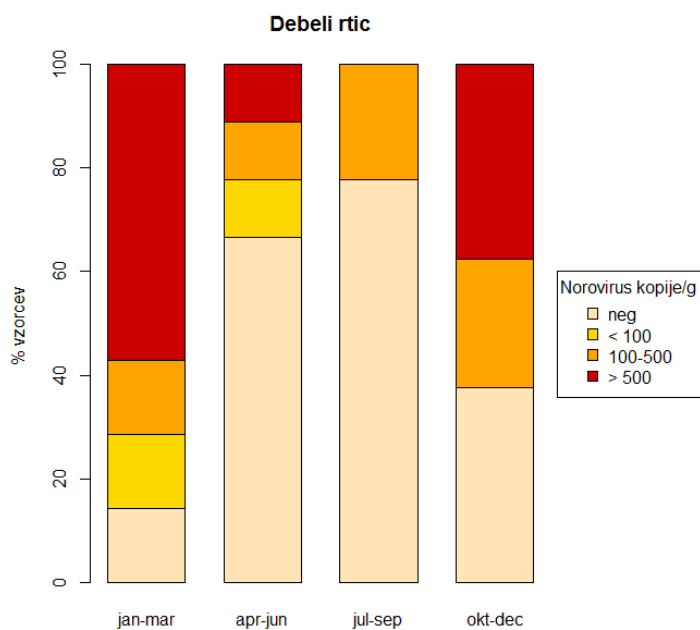
V gojišču Strunjan smo norovirusno RNA detektirali že pri drugem novembrskem vzorcu; vseboval je obe genski skupini, zadnji novembrski le GI, v začetku decembra in pri predzadnjem decembrskem vzorcu sta bili prisotni GI in GII. Takrat je bilo število norovirusov GII tudi najvišje (8114 kopij/g), nato se je število pri januarskih vzorcih zmanjšalo. V marcu je bila pri enem vzorcu prisotna le GII, prav tako pri enem vzorcu aprila in maja. V enem junijskem in julijskem vzorcu le GI, v avgustu obe skupini, septembra le GI, zadnja dva oktobra le GII (tabela 14).



Slika 43: Delež in stopnja kontaminiranih klapavic iz gojišča Strunjan.

V Strunjanu sta bila deleža kontaminiranih klapavic podobna v prvem in zadnjem tromesečju leta, najnižji delež pa od aprila do junija (slika 43) upoštevan je seštevek virusnih kopij obeh genskih skupin.

Na Debelem rtiču sta bili od zadnjega novembrskega vzorčenja do konca januarja prisotni obe genski skupini – najvišje število kopij datumsko sovпада kot pri Strunjanu – zadnji teden decembra. Februarja je bila prisotna le GII, začetek marca norovirusi obeh genskih skupin, nato pa zadnja dva vzorca aprila le GII, en junijski in avgustovski vzorec sta vsebovala le GI, prvi septembrski in zadnji oktobrski pa obe skupini (tabela 14).



Slika 44: Delež in stopnja kontaminiranih klapavic iz školjčičišča na Debelem rtiču.

V školjčičišču na Debelem rtiču je bilo v prvem tromesečju več kot 80 % vzorcev kontaminiranih in tudi z najvišjim številom virusnih kopij, medtem ko je bilo med julijem in septembrom delež in stopnja kontaminacije najnižja (slika 44 prikazuje seštevek obeh genskih skupin).

Pri prosto nabranih klapavicah smo viruse ugotovili že pri prvem vzorčenju, nato pa podobno kot na školjčičišču Debeli rtič, obe genski skupini, od zadnjega novembrskega vzorčenja do sredine marca. Prva aprilskih vzorca sta bila z nižjo stopnjo kontaminacije z obema genskima skupinama, maja in junija je bila prisotna le GII, sredi junija le GI. Avgusta je bila istočasno kot v Strunjanu in na Debelem rtiču prisotna le GII, v sredini avgusta, ko je bilo število bakterij *E. coli* najvišje, obe genski skupini, nato pa je število GII padlo sredi septembra in se zopet zvišalo pri zadnjem oktobrske vzorcu. Takrat smo noroviruse ugotovili na vseh lokacijah. Pri zadnjem vzorcu, ki je bil prosto nabran, sta bili prisotni obe skupini, število bakterij *E. coli* pa je bilo takrat močno preseženo (4900 MPN/100g).

Nekateri vzorci, ki smo jih pomnožili s qRT-PCR smo za ugotavljanje nukleotidnih zaporedij pomnožili tudi z RT-PCR, so vsebovali norovirusno RNA večih sevov. Nekatere reakcije sekvenciranja zaradi premajhne vsebnosti RNA niso uspele. Sevih, ki smo jih uspeli pomnožiti, so večinoma pripadali genski skupini GII.P4.

Med preiskovanimi vzorci virusa hepatitisa A nismo ugotovili.

Tabela 14: Pregled stopnje kontaminacije norovirusov in VHA po vzorčenjih

Školjčičišče /točka	Seča	Seča	Strunjan	Strunjan	D. rtič	D. rtič	Prosto	Prosto
preiskava	NOV	VHA	NOV	VHA	NOV	VHA	NOV	VHA
6.11.2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	GI: 225	neg
14.11.2014	neg	neg	GI: <100 GII: 330	neg	NA	NA	NA	NA
21.11.2014	neg	neg	GI: 130	neg	GI: < 100 GII: 820	neg	GI:1190 GII:970	neg
8.12.2014	neg	neg	GI: 616 GII: 1196	neg	GI: 197 GII: 128	neg	GI: 531 GII: 675	neg
16.12.2014	neg	neg	neg	neg	GI: 823 GII: 1340	neg	GI: 655 GII: 622	neg
23.12.2014	GI: < 100 GII: < 100	neg	GI:475 GII: 8114	neg	GI: 300 GII: 5908	neg	GI: < 100 GII: < 100	neg
5.1.2015	GII: 671	neg	GI:< 100 GII: 900	neg	GI: < 100 GII: 935	neg	GI: < 100 GII: 1257	neg
13.1.2015	GII: 681	neg	GI: < 100 GII: 1670	neg	GI: < 100 GII: 987	neg	GI: < 100 GII: 1567	neg
20.1.2015	neg	neg	neg	neg	GI: < 100 GII: 3769	neg	GI: < 100 GII: 1097	neg
10.2.2015	GII: 117	neg	GII: < 100	neg	GII: 350	neg	GII: < 100	neg
19.2.2015	GII: < 100	neg	GII: 441	neg	GII: < 100	neg	GII: 238	neg

10.3.2015	neg	neg	GII: 186	neg	GI: < 100 GII: 1222	neg	GI: < 100 GII: 938	neg
20.3.2015	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
8.4.2015	GII: 314	neg	neg	neg	neg	neg	NA	NA
14.4.2015	GII: 101	neg	neg	neg	GII: 1302	neg	GI: 263 GII: 316	neg
20.4.2015	GII: 927	neg	GII: 211	neg	GII: 353	neg	neg	neg
4.5.2015	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
11.5.2015	neg	neg	GII: 1320	neg	neg	neg	neg	neg
19.5.2015	neg	neg	neg	neg	neg	neg	GII: 312	neg
3.6.2015	neg	neg	NA	NA	GI: < 100	neg	GII: < 100	neg
9.6.2015	neg	neg	GI: < 100	neg	neg	neg	neg	neg
16.6.2015	neg	neg	neg	neg	neg	neg	GI: < 100	neg
2.7.2015	neg	neg	GI: 101	neg	neg	neg	NA	NA
8.7.2015	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
16.7.2015	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3.8.2015	neg	neg	GI: < 100 GII: 148	neg	GI: 107	neg	GII: 339	neg
10.8.2015	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
17.8.2015	neg	neg	neg	neg	neg	neg	GI: 868 GII: < 100	neg
31.8.2015	GI: 300	neg	GI: 359	neg	neg	neg	GI: 291	neg
7.9.2015	neg	neg	GI: 289	neg	GI: < 100 GII: 259	neg	GI: 866 GII: < 100	neg
15.9.2015	neg	neg	neg	neg	neg	neg	GII: < 100	neg
5.10.2015	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13.10.2015	neg	neg	GII: < 100	neg	neg	neg	neg	neg
28.10.2015	GII: < 100	neg	GII: < 100	neg	GI: < 100 GII: 138	neg	GI: < 100 GII: 709	neg

Razprava

Slovenski del Jadranskega morja predstavlja le manjši del severnega Jadrana. Severni Jadran je morje zalivskega tipa. Zanj so značilne slaba cirkulacija vodnih mas, plitvost, izdatni vplivi celinskih voda in izpiranje flišnega zaledja (Sotlar, 2000). Naštete značilnosti dajejo severnemu Jadranu in našemu delu obalnega morja pečat ekološke nestabilnosti, zato so negativni vplivi posameznih dejavnikov na njegovo kakovost bolj izraziti kot v globljih bolj odprtih morjih. Zaradi izdatnih vplivov celinskih voda na celotno območje severnega Jadrana (slika 1), je slovenski del Jadranskega morja pod velikim vplivom onesnaževanja sosednjih držav in torej lahko govorimo o regionalnem vplivu na stanje voda. Velike reke, ki pritekajo predvsem z italijanske obale s seboj prinašajo izdatne količine močno onesnaženih voda (Sotlar, 2000). Poleg regionalnega vpliva t.j. onesnaženja, ki ga v severni Jadran prinesejo reke, je onesnaženost severnega Jadrana posledica tudi gospodarskega in urbanega razvoja severno jadranskih obalnih mest z zaledjem. Na stanje voda oz. izmerjene koncentracije onesnaževal v vodi poleg regionalnih virov vplivajo tudi lokalni viri onesnaženja.

Kemijske meritve vode

Od šest merjenih parametrov onesnaževal (slike 22–27) smo statistično značilne razlike ($p < 0,05$) med vzorčnimi mesti ugotovili za koncentracije celotnega bakra ($N = 26$, Friedmanov test $\chi^2 = 38,206$, $p < 0,001$), niklja ($N = 25$, Friedmanov test $\chi^2 = 12,328$, $p < 0,01$) in 6-valentnega kroma ($N =$

25, Friedmanov test $\chi^2 = 23,478$, $p < 0,001$). Na podlagi rezultatov sklepamo, da imajo na koncentracije teh spojin večji vpliv lokalni viri onesnaženja kot regionalni. Na podlagi post-hoc Wilcoxonovega testa predznačenih rangov smo ugotovili, da se v primeru celotnega bakra koncentracije razlikujejo na vseh vzorčnih mestih razen med vzorčnima mestoma Strunjan 904 in Seča 818 (slika 28). Tako najvišje kot najnižje koncentracije smo izmerili ob Debelem rtiču, vendar prve na točki 819 v zalivu Sv. Jerneja, druge pa ob svetilniku. V zalivu Sv. Jerneja ni nobenega uradno evidentiranega vira onesnaževanja, vendar so bile izmerjene višje koncentracije, kot ob svetilniku nedaleč stran. Možen vzrok je v neevidentiranem lokalnem viru onesnaženja, lahko tudi iz bližine v Italiji. Vpliv lokalnih virov onesnaževanja na koncentracije celokupnega bakra potrjuje tudi dejstvo, da smo v Seči in Strunjanu izmerili višje koncentracije kot na Debelem rtiču ob svetilniku, vendar nižje kot v zalivu Sv. Jerneja ob Debelem rtiču. Za nikelj smo statistično značilne razlike ($p < 0,05$) ugotovili le med vzorčnima mestoma Seča 904 (višje vrednosti) in Debeli rtič 819 (nižje vrednosti) (slika 29). Na vzorčnih mestih Debeli rtič 819 in Seča 904 smo izmerili višje koncentracije 6-valentnega kroma kot na vzorčnih mestih Debeli rtič svetilnik in Strunjan 818 (slika 30). Višje izmerjene koncentracije v Seči bi lahko bile posledica vnosa snovi z reko Dragonjo, ki se izliva v Piranski zaliv. Neposredno ob tem delu obalnega morja ni evidentiranih virov onesnaženja, ki pa so prisotni ob drugih delih obale, kjer so bile zabeležene nižje koncentracije. Za potrditev domneve bi morali izvajati meritve tudi na reki Dragonji. Statistično značilnih razlik med vzorčnimi mesti nismo ugotovili za prosti baker, cink in sulfat ($N = 24-27$, Friedmanov test $\chi^2 = 1,17-4,92$, $p > 0,05$). Enake koncentracije teh parametrov na vseh vzorčnih mestih nakazujejo, da ima pomemben vir onesnaženja dokaj podoben vpliv na celotno območje slovenskega morja na območju školjčič in je verjetno regionalne narave.

Elementi v školjkah

Poleg kemijskih meritev v morski vodi smo izvedli tudi nekatere kemijske analize v školjkah. Opazili smo, da je na vsebnost kadmija, svinca in živega srebra v školjkah statistično vplivalo mesto vzorčenja, medtem ko na vsebnost cinka nista signifikantno vplivala ne čas vzorčenja in ne lokacija vzorčenja (two-way ANOVA). Vsebnosti Cr, Mn, Fe, Ni, Hg in Pb v mesu školjk so bile najvišje v zimskih mesecih od januarja do marca, kar je lahko povezano s hitrostjo rasti školjk. Vsebnost ostalih elementov v meso školjk se ni bistveno spreminjala z letnimi časi, smo pa posamezen mesec opazili nekoliko višje ali nižje vsebnosti, ki pa najverjetneje niso povezane s sezonskimi variacijami. Najnižje vsebnosti težkih kovin smo določili v Seči. Najvišje vsebnosti živega srebra in svinca smo določili v klapavicah iz Debelega rtiča. Višje vsebnosti živega srebra povezujemo z višjo vsebnostjo v sedimentu na Debelem rtiču (ARSO, 2015). Meso školjk je bilo primerno za prehrano ljudi in skladno z Uredbo komisije št 1881/2006 saj so vsi vzorci mesa školjk vsebovali manj živega srebra kot 0,50 mg/kg mokre teže, manj Cd kot 1,0 mg/kg ter manj Pb kot 1,5 mg/kg mokre teže. Leta 2010 je bil v Uredbi o stanju površinskih voda določen okoljski standard za tkiva mediteranske klapavice, v katerem je navedeno, da lahko meso klapavic vsebuje 0,02 mg Hg/kg mokre teže (Ur. l RS, št. 14/09, 98/10). Na sliki 6 vidimo, da je bila vsebnost Hg v večini vzorcev višja od omenjene vrednosti, vendar pod mejo Uredbe 1881/2006. O višjih vsebnostih Hg v mesu školjk, kot ga določa okoljski standard, poroča tudi ARSO (2015), ki v okviru monitoringa opravlja analize vsebnosti nekaterih onesnaževal v mesu školjk dvakrat letno. Tudi oni poročajo o najvišjih vsebnostih v školjkah iz Debelega rtiča.

Kontaminacija školjk z indikatorskimi mikroorganizmi

Školjke za prodajo lahko izhajajo le iz proizvodnih območij z določenimi lokacijami in razmejitvami, ki jim pristojni organ opredeli v eno od treh kategorij, glede na stopnjo fekalne onesnaženosti.

Vse žive školjke, ki gredo na trg za neposredno prehrano ljudi, morajo biti skladne z mikrobiološkimi merili, določenimi z Uredbo (ES) 2073/2015 in zdravstvenimi standardi za žive školjke, ki so opredeljeni v Poglavju V oddelka VII Priloge III Uredbe (ES) št. 853/2007 glede organoleptičnih lastnosti in vsebnosti morskih biotoksinov.

Školjke razreda A se lahko nabirajo za neposredno prodajo na trgu brez dodatne obdelave. Te školjke morajo ustrezati pogojem Uredbe (ES) 2073/2015, torej koncentracija bakterij *E. coli* ne sme presegati 230 MPN *E. coli* v 100 g (mesa školjk in intervalvularne tekočine).

Kontaminacija školjk iz področij, ki so uvrščena v kategorijo B, v 90 % vzorcev ne sme presegati meje 4600 *E. coli* v 100 g. V preostalih 10 % vzorcev žive školjke ne smejo presegati 46 000 *E. coli* v 100 g mesa in tekočine. Iz teh področij se školjke lahko dajejo v promet za prehrano ljudi šele po obdelavi v centru za prečiščevanje ali po ponovni nasaditvi, ko izpolnjujejo zdravstvene standarde.

Uredba (ES) 2285/2015 dopolnjuje oziroma spreminja Uredbo (ES) 854/2004 in Uredbo (ES) 2073/2015, njena določila pa bodo stopila v veljavo 1. 1. 2017. Uredba za klasifikacijo v razred A navaja, da vsaj 80 % vzorcev ne sme presegati meje 230 *E. coli* na 100 g mesa in intervalvularne tekočine, preostalih 20 % vzorcev pa ne sme presegati meje 700 *E. coli* na 100 g. Uredba dopušča, da pristojni organ na podlagi ocene tveganja, ki temelji na raziskavi odloči da ne upošteva anomalnih rezultatov. Uredba določa tudi spremembo Poglavja 1 v Prilogi k Uredbi (ES) 2073/2005 in sicer v Merilih varnosti, ki v točki 1.25 določajo zahteve za žive školjke, iglokožce, plaščarje in polže. Predvideno je vzorčenje petih enot za vzorec in določene so sledeče zahteve:

„1.25 Žive školjke in živi iglokožci, plaščarji in morski polži	<i>E. coli</i> ⁽¹⁵⁾	5 ⁽¹⁶⁾	1	230 MPN/100 g mesa in intravalvularne tekočine	700 MPN/100 g mesa in intravalvularne tekočine	EN/ISO 16649-3	Proizvodi, dani v promet med rokom uporabe
---	--------------------------------	-------------------	---	--	--	----------------	--

E. coli v živih školjkah in živih iglokožcih, plaščarjih in morskih polžih:

- rezultat je zadovoljiv, če je vseh pet ugotovljenih vrednosti ≤ 230 MPN/100 g mesa in intravalvularne tekočine ali če je ena izmed petih ugotovljenih vrednosti > 230 MPN/100 g mesa in intravalvularne tekočine, vendar ≤ 700 MPN/100 g mesa in intravalvularne tekočine,
- rezultat je nezadovoljiv, če je katera koli izmed petih ugotovljenih vrednostih > 700 MPN/100 g mesa in intravalvularne tekočine ali če sta vsaj dve izmed petih ugotovljenih vrednosti > 230 MPN/100 g mesa in intravalvularne tekočine.“

V Uredbi (ES) 854/2004 tudi navaja, da je klasificirana območja ponovne nasaditve in proizvodna območja treba občasno spremljati. Za izvajanje je treba narediti načrte vzorčenja, tako da se predvidi redno preverjanje ali za vsak primer posebej, če so obdobja pobiranja neredna. Geografska razporeditev odzemnih mest in pogostnost vzorčenja morata zagotavljati, da so rezultati analize za zadevno območje čim bolj reprezentativni. Tudi Vodnik Skupnosti dobre prakse za mikrobiološko klasifikacijo školjišč (The Community Guide to the Principles of Good Practice for the Microbiological Classification and Monitoring of Bivalve Mollusc Production and Relaying Areas with regard to Regulation 854/2004, 2016) priporoča, da je za primere, ko ne gre za celoletno komercialno aktivnost vzorčenje izvedeno manjši del leta, vendar pred in med sezono, na podlagi katerega se ugotovi mikrobiološki status področja.

Vsa slovenska školjišča so uvrščena v razred B, zato morajo školjke pred odpremo na trg v prečiščevanje. Poznani so podatki o kontaminaciji školjk z bakterijami *E. coli* v Sloveniji v letih 2003 in 2004 (Biasizzo in sod., 2005), ko je bilo število 230 *E. coli*/100g preseženo v povprečno 10

% testiranih školjk, število 4600 pa le izjemoma (manj kot 1 % vzorcev). Tudi v Poročilu o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v letu 2012 (UVHVVR, 2013), ki povzema podatke o kontaminaciji školjk iz obdobja od 2007 do 2012 ugotavljajo, da je 91,2 % vzorcev ustrezalo pogojem za cono A, oziroma 100 % vzorcev za cono B. V Poročilu za leto 2013 (UVHVVR, 2014) je razvidno, da je v letih od 2008 in 2009 le po en vzorec iz Strunjanskega zaliva (školjčiče Strunjan) presegel vrednost 4600, v letu 2010 le en vzorec iz Piranskega zaliva (Seča), v letu 2011 pa dva vzorca iz Seče in en vzorec iz Strunjana. V letih 2012 in 2013 ta vrednost ni bila presežena v nobenem školjčiču. Vzorci iz Debelega rtiča v obdobju od 2008 do 2013 vrednosti 4600 MPN *E. coli* niso nikoli presegli.

V obdobju raziskovalnega projekta smo proučevali rezultate kontaminacije klapavic (mesečno vzorčenje) v letih 2013, 2014 in 2015 za namen uradnega nadzora ter rezultate pogostejšega vzorčenja pridobljene v obdobju od novembra 2014 do oktobra 2015 za namen te študije.

V obdobju enega leta (od novembra 2014 do oktobra 2015) smo testirali 306 vzorcev školjk, nabranih na osmih točkah treh školjčič ter točki prostega nabiranja pri svetilniku na Debelem rtiču (tabela 15). Pri 270 (88,2 %) vzorcih, rezultati kontaminacije niso presegli mejne vrednosti 230 MPN *E. coli*/100 g, pri 36 (11,8 %) vzorcih pa je bila ta vrednost presežena. Od skupno 36 preseženih vrednosti jih je bilo 14 (38,9 %) v območju med 230 in 700 MPN/100g, 18 (50,0 %) rezultatov lahko uvrstimo v območje med 700 in 4600 MPN/100g, 4 (11,1 %) rezultati, od tega trije iz območja prostega nabiranja, pa so vrednost 4600 presegli (tabela 15). Med vzorčnimi točkami je bila najpogosteje mejna vrednost presežena na območju prostega nabiranja, kar 8-krat, tudi vrednosti kontaminacije so bile tu najvišje (tabela 15).

Če področje prostega nabiranja izvzamemo iz obsega obdelave, ker ni območje gojenja školjk, so bili rezultati kvantifikacije *E. coli* v območju do mejne vrednosti 230 MPN *E. coli*/100 g v 89,7 % (244/272), preseženih pa je bilo 10,2 % (28/272) rezultatov. Delež teh rezultatov je v skladu s spremembo določil Uredbe 854/2004, ki bo začela veljati v letu 2017. Tudi ob pregledu stanja na posameznih točkah v tem obdobju, ugotavljamo delež rezultatov, ki so bili uvrščeni do mejne vrednosti 230 MPN *E. coli*/100 g na vseh vzorčnih točkah vseh treh školjčič nad 80 % (tabela 15).

Tabela 15: Uvrstitev rezultatov testiranja školjk posameznih tečk v školjčičih in na prostem nabirališču, glede na nivoje kontaminacije z *E. coli* - vzorčenje za namen projekta.

Odvz. točka MPN/100 g	Seča 752	Seča 904	Seča 1021	Strunja n 817	Strunja n 818	Strunja n 757	Debeli rtič 819	Debeli rtič 996	Prosto	Σ
≤ 230	29	32	28	30	30	31	31	33	26	270
230-700	1	0	3	1	3	1	2	0	3	14
700-4600	4	2	3	3	1	1	1	1	2	18
> 4600	0	0	0	0	0	1	0	0	3	4
> 230	5	2	6	4	4	3	3	1	8	36
% (> 230)	14,7	5,9	17,6	11,7	11,7	8,8	8,8	2,9	23,5	11,8
Št. testiranih	34	34	34	34	34	34	34	34	34	306

V obdelavo podatkov smo dodatno vključili 88 rezultatov (11 rezultatov za posamezno točko školjčiča) vzorčenja za namen Nacionalnega monitoringa školjk (tabela 4). Skupno smo analizirali 394 rezultatov, ki so bili pridobljeni v tem obdobju, od tega je 360 rezultatov pridobljenih iz

školjčičišč. Ob vključitvi dodatnih rezultatov, se slika glede kontaminacije ni bistveno spremenila. Na školjčičiščih 88,3 % (318/360) rezultatov ni presegalo mejne vrednosti 230 MPN *E. coli*/100 g, v 42 (11,7 %) testiranih pa je bila ta vrednost presežena (tabela 16).

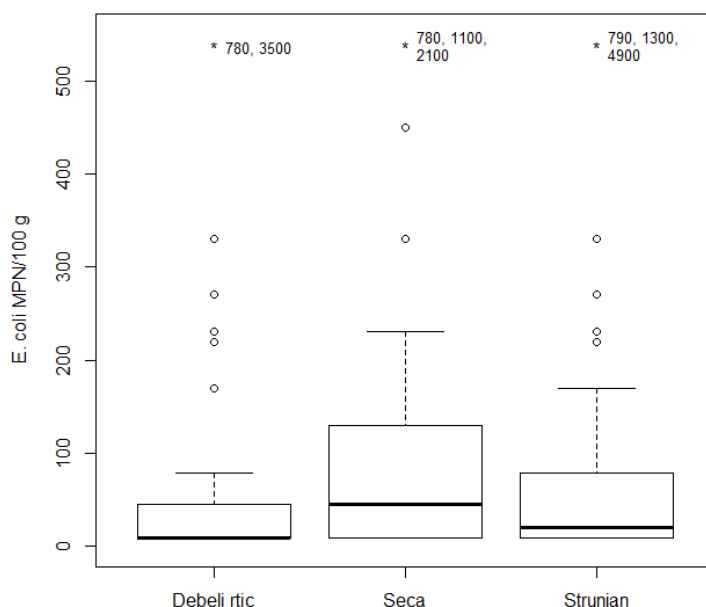
Tabela 16: Uvrstitev rezultatov testiranja školjk posameznih tečk v školjčičiščih glede na nivoje kontaminacije z *E. coli* - vzorčenje za namen projekta in nacionalnega monitoringa školjk v obdobju od novembra 2014 do oktobra 2015.

Odvz. točka MPN/100g	Seča 752	Seča 904	Seča 1021	Strunjan 817	Strunjan 818	Strunjan 757	Debeli rtič 819	Debeli rtič 996	Σ
≤ 230	40	42	37	38	40	38	41	44	318
230 - 700	1	1	6	2	4	4	3	0	21
700 - 4600	4	2	3	4	2	2	1	1	19
> 4600	0	0	0	1	0	1	0	0	2
> 230	5	3	9	7	6	7	4	1	42
% (> 230)	11,1	6,7	20,0	15,6	13,3	15,6	8,9	2,2	11,7
testiranih	45	45	45	45	45	45	45	45	360

Glede na trenutno veljavno zakonodajo in prikazane rezultate (tabela 16), zaradi vrednosti, ki so presegale mejno vrednost 230 MPN *E. coli*/100 g, nobenega od školjčičišč ni mogoče direktno uvrstiti v razred A. Posnetek stanja v posameznih školjčičiščih smo skušali ovrednotiti še glede na spremenjena določila opredeljena z Uredbo 2285/2015, ki bo stopila v veljavo v letu 2017.

Glede na predstavljeno stanje v letu 2015 lahko vidimo, da je delež rezultatov v školjčičiščih skupno, ki so pod nivojem 230 MPN *E. coli*/100 g velik (88,9 %), kar je v skladu z Uredbo (ES) 2285/2015 (≥ 80 %) in velja tudi za posamezne točke v školjčičiščih. Vendar pa so koncentracije v 22 (7,1 %) vzorcih presegale mejo 700 MPN *E. coli*/100g, od tega sta dva rezultata v Strunjanu pa sta presegala mejo 4600, ki predstavlja spodnjo mejno vrednost klasifikacije školjčičišč razreda B. Primerjava teh rezultatov med školjčičišči je prikazana na sliki 45.

Najnižjo mediano ima školjčičišče Debeli rtič (9) in se statistično značilno razlikuje od ostalih dveh školjčičišč. Med Sečo, ki ima najvišjo vrednost mediane (45) in Strunjanom (20) ni statistično značilne razlike.

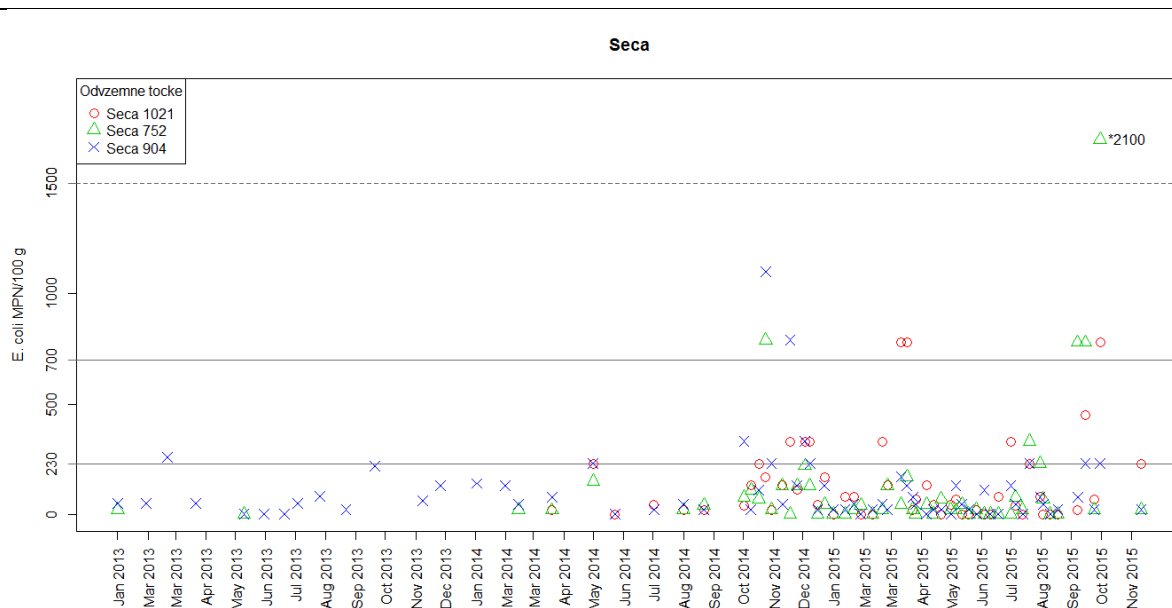


Slika 45: Prikaz rezultatov kontaminacije školk na posameznih školjčiščih, vzorčenih od novembra 2014 do oktobra 2015
 * osamelci izven območja grafikona z dopisanimi vrednostmi (*E. coli* MPN/100 g)

Školjčišče Seča

V školjčišču Seča so vzorci v obdobju pogostega vzorčenja, glede na vzorčne točke, v 80,0–93,3 % ustrezali zahtevam veljavne Uredbe. V vseh treh vzorčnih točkah skupaj smo v enoletnem obdobju (od novembra 2014 do oktobra 2015) vzorčenja zabeležili 17 presežnikov, kar znaša 12,6 % (tabela 16). Osem vrednosti je bilo v območju 230–700 MPN *E. coli*/100 g, 9 pa v območje 700–4600 MPN *E. coli*/100 g. Noben rezultat vrednosti 4600 MPN *E. coli*/100 g ni presegel (tabela 16). Rezultati za vzorce iz točke odvzema 904 so presegli vrednost 230 MPN *E. coli*/100 g v 6,7 % (3/45), v točki 752 v 11,1% (5/45), v točki 1021 pa v 20% (9/45).

Rezultati uradnega vzorčenja v letu 2013 in vse do deževja v novembru 2014 (tabela 4), niso presegali nivoja 700 MPN *E. coli*/100 g. V času pogostega vzorčenja, so rezultati školk točke Seča 904 presegali to vrednost v času ekstremnega deževja v novembru 2014 in v sredini decembra, v letu 2015 pa vrednost ni bila presežena. Za točko Seča 752 razpolagamo le z 8 rezultati iz let 2013 in 2014 pred pričetkom vzorčenja za namen projekta. Vsi rezultati v tem obdobju so bili pod mejo 230 MPN *E. coli*/100 g. Tudi na tej točki je opazno povišanje kontaminacije po deževju v novembru 2014 ter tudi v oktobru 2015, ko zopet beležimo visoko količino padavin (slika 52). Na sliki 46 so prikazane vrednosti MPN po odvzemnih točkah od januarja 2013 do novembra 2015.



Slika 46: Grafični prikaz nihanja kontaminacije školjk z *E. coli* na območju školjčišča Seča.

*ni v merilu, dopisana vrednost *E. coli* MPN/100 g

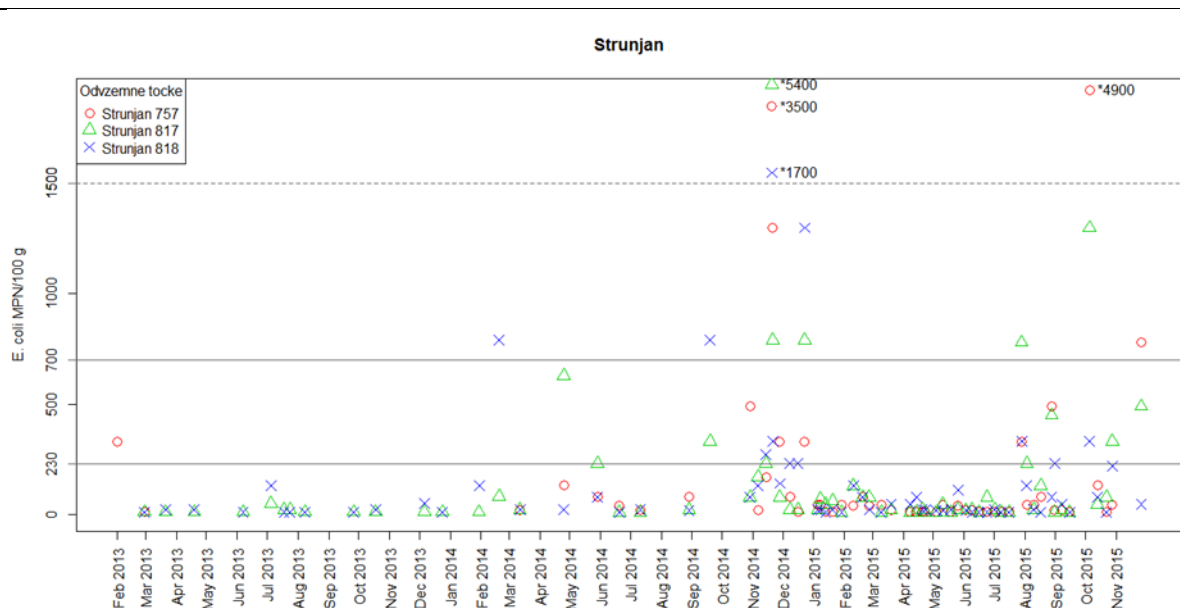
Školjčiče Strunjan

V obdobju pogostega vzorčenja, od novembra 2014 do oktobra 2015, so bili rezultati kontaminacije školjk v točkah celotnega školjčišča pod mejno vrednostjo 230 MPN *E. coli*/100 g v 84,4 do 86,7 %. Preseženo je bilo skupno 20 (14,8 %) vzorcev, od tega 10 v območju 230 – 700 MPN, 8 v nivojskem območju 700 – 4600 MPN, 2 pa sta presegla vrednost 4600 MPN *E. coli* /100g.

V novembru 2014, v obdobju ekstremnega deževja in tik po njem, beležimo visok porast kontaminacije školjk. Na točki Strunjan 817 so bile zelo visoke vrednosti 20. novembra, najvišja je celo presegla mejo 4600 MPN *E. coli* /100g. Že pri vzorčenju naslednjega dne pa opazamo znaten upad kontaminacije. Na tej točki je bila vrednost 700 MPN *E. coli* /100 g presežena še v decembru 2014, konec julija 2015 in oktobru 2015. Dvig koncentracije *E. coli* v školjkah smo v juliju 2015 zaznali tudi v drugih školjčičih, vendar tam rezultati niso presegli vrednosti 700 MPN *E. coli* /100 g. Za obdobje od januarja 2013 do novembra 2014 razpolagamo z 22 rezultati uradnega vzorčenja, ki niso presegali meje 700 MPN *E. coli* /100 g.

Podobna slika kot v točki 817 je v obdobju pogostega vzorčenja razvidna tudi na točki Strunjan 818. Porast koncentracije *E. coli* v školjkah je opazen v deževni periodi v novembru 2014, vendar vrednosti niso tako visoke kot na točki 817 ter tudi v decembru 2015, ko je koncentracija dosegla 1300 MPN. V oktobru 2015, ko je bila količina padavin visoka, je bila edino na tej točki školjčiča Strunjan vrednost kontaminacije pod 700 MPN *E. coli* /100 g. Za obdobje 2013 in do novembra 2014 razpolagamo z 22 rezultati uradnega vzorčenja, med katerimi so vrednosti dvakrat presegale mejo 700 MPN *E. coli* /100 g, v obeh primerih je bila ta vrednost 790 MPN *E. coli* /100 g.

Pri pregledu rezultatov iz točke Strunjan 757 opazamo prekoračitev nivoja 700 MPN *E. coli* /100 g ob deževju v novembru 2014 in tudi visok porast koncentracije v oktobru 2015 (4900 MPN *E. coli* /100 g). Vrednosti tekom celega vzorčnega obdobja, razen v obdobjih deževja, so bile pod nivojem 700 MPN *E. coli* /100 g (tabela 16). Za obdobje od januarja 2013 do novembra 2014 razpolagamo z 9 rezultati uradnega vzorčenja, ki niso presegali meje 700 MPN *E. coli* /100 g (tabela 4). Na sliki 47 so prikazane vrednosti MPN po odvzemnih točkah od januarja 2013 do novembra 2015.



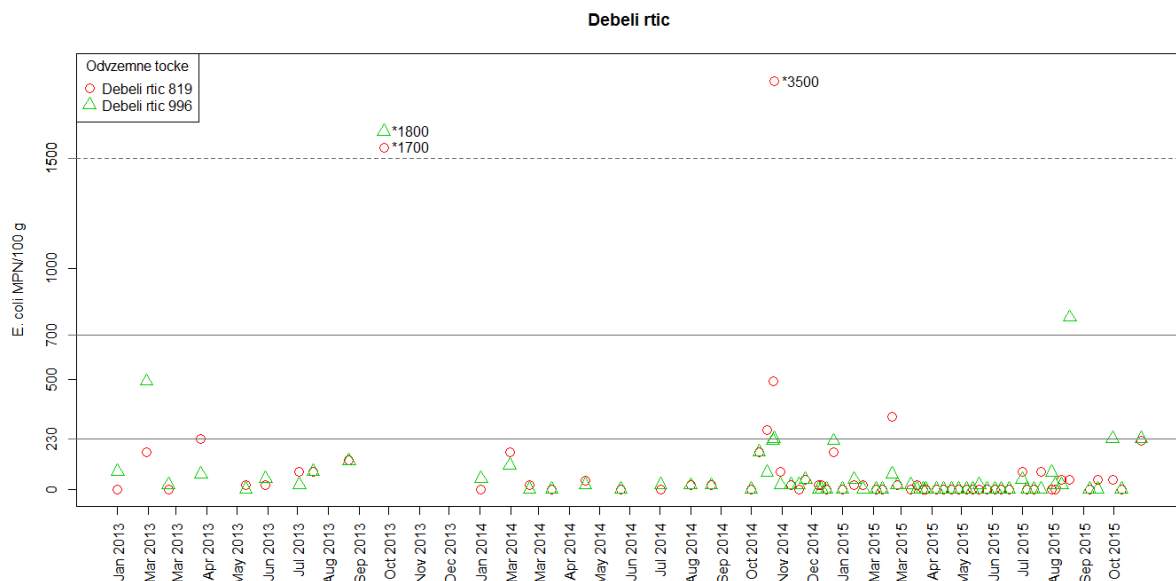
Slika 47: Grafični prikaz nihanja kontaminacije školjk z bakterijami *E. coli* na območju školjčišča Strunjan
*ni v merilu, dopisana vrednost *E. coli* MPN/100 g

Školjčišče Debeli rtič

V obdobju od novembra 2014 do oktobra 2015 so bili na posameznih točkah vzorčenja na školjčišču Debeli rtič rezultati kontaminacije v območju do mejne vrednosti 230 MPN *E. coli*/100 g v 91,1 % oziroma 97,8 % glede na vzorčno točko, ta mejo pa je bila skupno presežena v 5 (5,6 %) primerih. Na točki 996 je bila mejna vrednost presežena le enkrat (2,2 %), na točki 819 pa štirikrat (8,9 %). Vrednosti presežnikov pa so bile pri dveh vzorcih (po enem iz vsake točke) uvrščeni v območje 700–4600 MPN *E. coli*/100 g (tabela 16).

Med školjčišči je bilo stanje glede števila presežnikov na školjčišču Debeli rtič najugodnejše. Le en rezultat na točki 996 je v obdobju intenzivnega vzorčenja presegel vrednost 700 MPN *E. coli*/100g. Tudi v letu 2014 so bili vsi rezultati uradnega nadzora na tej točki ugodni (< 230 MPN *E. coli*/100 g) (tabela 16). Rezultati monitoringa iz leta 2013 kažejo na enkratni nepojasnen porast kontaminacije v septembru.

Na točki 819 so štiri vzorci presegali mejno vrednost 230 MPN *E. coli*/100 g, od teh le ena tudi vrednost 700 MPN *E. coli*/100 g. Trije vzorci s preseženimi vrednostmi, vključno z najvišjo vrednostjo (3500 MPN *E. coli*/100 g), so bili vzorčeni med in takoj po močnem deževju s poplavami, ki je trajalo 14 dni. Dva vzorca, sta bila vzorčenja v zaporednih dneh (20. in 21. 11. 2014). To obilno deževje bi, glede na poročila ARSO (2014), lahko ovrednotili kot ekstremni vremenski dogodek. V letu 2013 se je v septembru, istočasno kot na točki 996, pojavila nepojasnjeno povišana stopnja kontaminacije, ter tudi v novembru 2014 v obdobju ekstremnega deževja. Drugi rezultati niso presegli vrednosti 700 MPN *E. coli*/100 g. Na sliki 48 prikazujemo vrednosti MPN po odvzemih na točkah od januarja 2013 do novembra 2015.



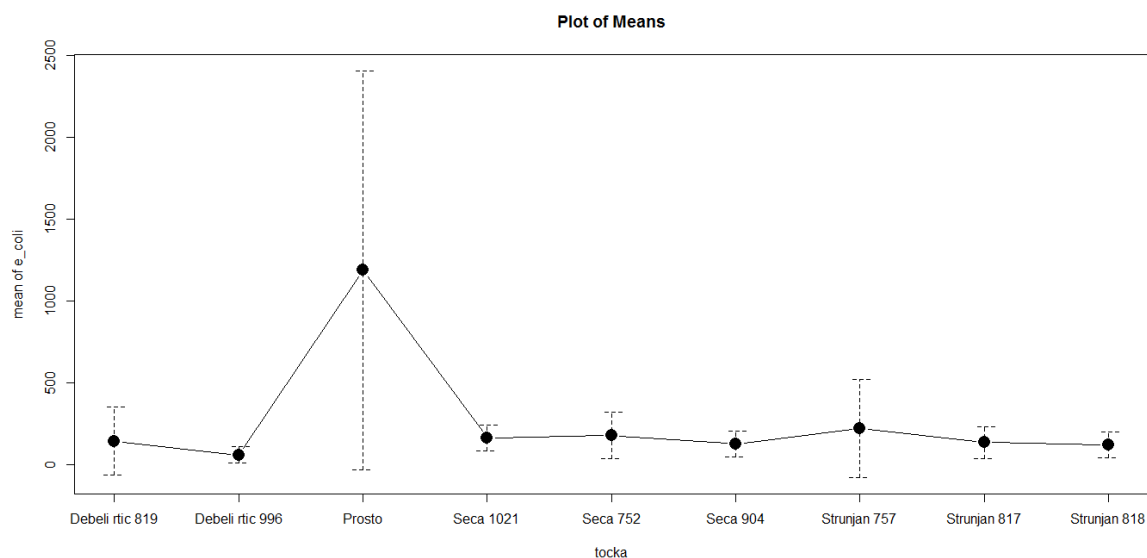
Slika 48: Grafični prikaz nihanja kontaminacije školjk z bakterijami *E. coli* na območju školjčišča Debeli rtič
 *ni v merilu, dopisana vrednost *E. coli* MPN/100 g

Točka prostega nabiranja

Rezultati kontaminacije školjk na tej točki so bili v primerjavi s točkami školjčišč slabši. V obdobju deževja v novembru 2014 se je koncentracija *E. coli* močno povečala (11000 MPN *E. coli* /100g) že v začetku meseca, ko na drugih točkah vrednosti še niso presegle 230 MPN *E. coli*/100g. Posamezna povišanja koncentracije *E. coli* opazamo tudi pri posameznih vzorčenjih, ki pa se na drugih vzorčnih točkah niso zaznale. Najvišjo vrednost je kontaminacija dosegla v avgustu 2015, ko je znašala 17000 MPN *E. coli*/100g. Visok porast koncentracije *E. coli* pa smo zaznali tudi v oktobru 2015, ki sovpada s povišanji v školjčišču Seča.

Ocenjujemo, da je ta točka izpostavljena dodatnim lokalnim vplivom, kot je bližina večjega mesta Koper, luke, obsežnemu ladijskemu prometu in tudi morskemu toku, ki prihaja iz južnega dela.

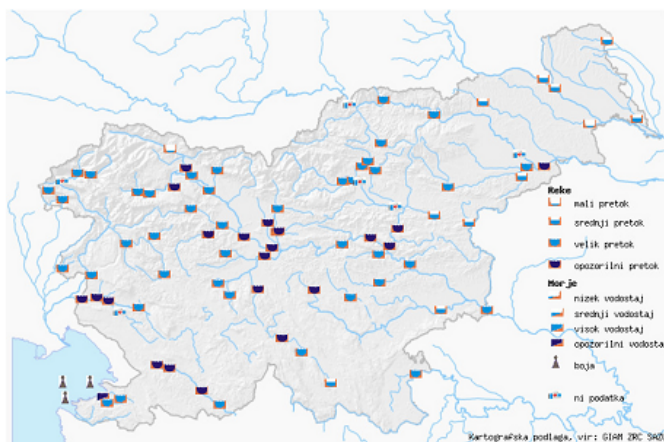
Na prikazu stopnje kontaminacije školjk z bakterijami *E. coli* (slika 49) na posameznih vzorčnih točkah vidimo, da v smeri višjih vrednosti odstopa le pri točki prostega nabiranja, za ostale točke školjčišč pa odstopanja niso značilna.



Slika 49: Kontaminacija školjk na posameznih vzorčnih točkah školjčišč (od novembra 2014 do oktobra 2015).

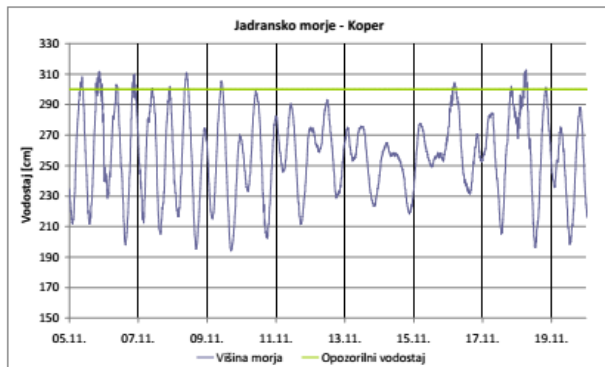
V deževnem obdobju od 5.11.2014 do 18.11.2014, so vrednosti rezultatov kontaminacije školjk postopno naraščale, ter dosegle najvišje vrednosti v dneh po koncu deževja, čemur pa je sledilo postopno upadanje (tabela 3).

ARSO v Hidrološkem poročilu o poplavih od 5. do 20. novembra 2014 (2014) poroča o več med seboj povezanih poplavnih dogodkih na področju večjega dela Slovenije. Izredne hidrološke razmere so se pričele 5. novembra zjutraj s poplavljanjem morja. Morje je do 7. novembra zvečer v času jutranje in večerne plime na mareografski postaji Koper vsakodnevno presegalo opozorilno višino 300 cm in ob tem poplavljal nižje predele obale. Najvišja višina morja je bila 312 cm. V času od 15. do 19. novembra je morje poplavlilo nižje predele obale še v štirih primerih. V teh dneh je imelo morje najvišjo višino 310 cm 18. novembra zjutraj (sliki 50 in 51).



Slika 5: Opozorilni pretoki so bili 7. novembra 2014 ob 9. uri preseženi v večjem delu države.

Slika 50



Slika 19: Višina morja na mareografski postaji Koper v času poplav od 5. do 20. novembra.

Slika 51

Sliki 50 in 51: Prikaz stanja pretokov 7. novembra 2014 (50) in višine morja (51) v obdobju od 5. do 20. novembra 2014
VIR: ARSO, Hidrološko poročilo o poplavih od 5. do 20. novembra 2014 (2014)

V novembru 2014 je padla zelo velika količina padavin (sliki 50 in 51), mesečna količina v Strunjanu je bila 165 mm, kar je največ v tem letu. Vremenske razmere v novembru 2014 so imele verjeten vpliv na stanje v vseh školjčiščih, saj so bili rezultati stopnje kontaminacije z *E. coli* na večini vzorčnih točk školjčišč v tem obdobju višji od povprečne vrednosti rezultatov (tabela 3). Vpliva tega vremenskega dogajanja glede kontaminacije školjk v točkah Seča 1021 in Debeli rtič 996 nismo

zaznali, saj koncentracija *E. coli* ni presegla vrednosti 230 MPN/100 g.

Riou s sod. (2007) je na osnovi hidrodinamičnega modela potrdil vpliv deževja na mikrobiološko sliko školjk, ter potrdil, da se zaradi povišanega vodostaja poveča dotok fekalnih onesnažil na gojitvena področja. Velik vpliv naj bi imeli predvsem manjši pritoki, ki se zaradi močnega dežja prelivajo in v morje, tudi zaradi preobremenjenih komunalnih napeljav, prinašajo obsežne količine fekalnih onesnažil. Obremenjena so predvsem lokalna področja v bližini teh pritokov in dodatno v bližini obale. Stopnja kontaminacije je v teh obdobjih dodatno povezana tudi z gostoto naseljenosti v priobalnem pasu (Glasoe in Christy, 2004). Te trditve do neke mere in z upoštevanjem lokalnih deležnikov sovpadajo z rezultati v naši študiji, kjer smo po tem obilnem deževju zaznali povišano kontaminacijo školjk na vseh školjčičiščih.

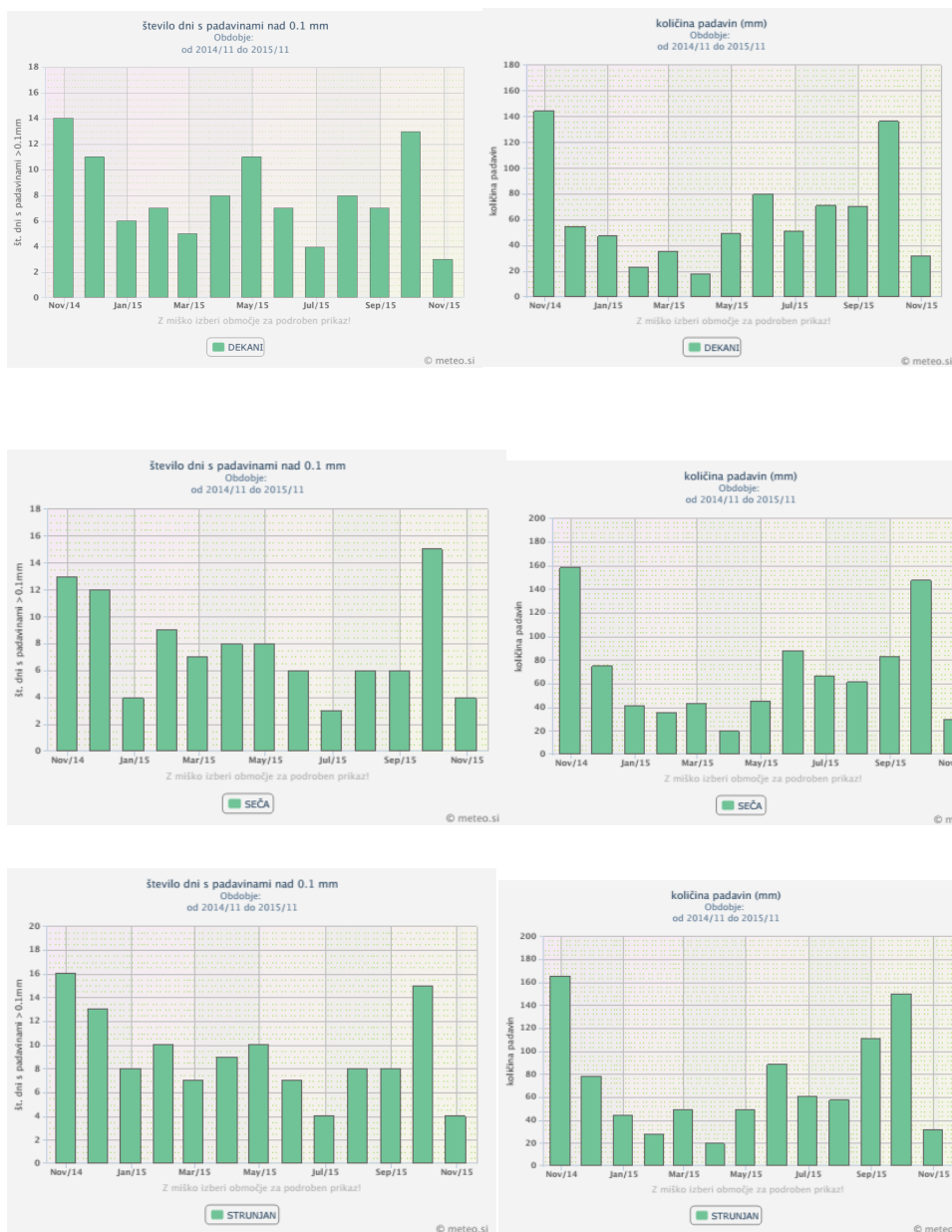
Na območju Seče je bilo povišanje občutno a ne ekstremno (do 1100 MPN/100 g) kar povezujemo z dotokom rek Drnice in Jernejevega kanala, ki sicer v običajnih pogojih nista zelo obremenjeni. Dodaten problem lahko na tej lokaciji predstavlja relativna zaprtost zaliva in je zato vpliv glavnih tokov v slovenskem morju, ki bi razredčil te negativne vnose, zelo omejen.

Školjčičišča v Strunjanskem zalivu se nahajajo na bolj odprtem predelu morja, a vendar znotraj Strunjanskega zaliva. Na območju Strunjanskega zaliva prav tako ni zaznati večjih onesnaževalcev. Naselja na obalah zaliva (Piran, Fiesa, Pacug in Strunjan) imajo sicer urejen odvod komunalne odpadne vode na čistilno napravo Piran, vendar glavni morski tok, ki poteka v smeri vzhoda s seboj prinaša onesnažila iz izpusta komunalne čistilne naprave, ki se nahaja zahodno od območja školjčičišča. Ob tem deževnem obdobju (20. 11. 2014) je bilo število indikatorjev fekalnega onesnaženja vode (14. 11. 2014 - do 38) in školjk (20. 11. 2014 do 5400 MPN *E. coli*/100 g) na tej lokaciji visoko vendar se je koncentracija že ob vzorčenju 21. 11. 2014 znatno zmanjšala (tabela 6).

Na točki Debeli rtič 819 smo močno povišanje indikatorjev fekalnega onesnaženja v vodi zaznali že 14. 11. 2014, ekstremni porast kontaminacije školjk pa dan kasneje kot v Strunjanu, verjetno zaradi kombiniranih vplivov tokov vzdolž slovenske obale in dodatno povratnih tokov iz Tržaškega zaliva, ki tudi sprejema večje količine celinskih voda (npr. reke Reno, Pad, Adiža, Tagliamento, Soča). Tok ob slovenski obali lahko prinese onesnažila iz Koprškega zaliva, ki je populacijsko, industrijsko in infrastruktarno, vključno z ladijskim prometom in sidrišči zelo obremenjen. V mesecu novembru je bilo poleg dežja tudi 10 dni z močnim vetrom (> 6bf) od tega en dan viharnega vetra (> 8bf), ki mu, vsaj v površinskih plasteh sledi tudi morski tok, kar je lahko imelo dodaten vpliv na gibanje morskih mas. Visokim vrednostim števila *E. coli* pri vzorčenjih 20. in 21. 11. 2014 je sledilo vzorčenje 27. 11. 2014, ko so bile vrednosti večinoma pod mejno vrednostjo 230 MPN.

Večdnevno deževje z veliko količino padavin (slika 52) in vetrom se je ponovilo tudi v oktobru 2015, ko prav tako opazamo zvišane koncentracije bakterij *E. coli* v školjkah, predvsem na lokaciji Strunjan in v nekoliko manjšem obsegu tudi v Seči. Povišane kontaminacije vode v tem obdobju nismo zaznali. Kontaminacija vode je lahko kratkotrajen pojav, ki ga pri tedenskem vzorčenju lahko ne zaznamo, odrazi pa se pri školjkah, ki te mikrobe zadržujejo. Na školjčičišču Debeli rtič so bile vrednosti kontaminacije školjk z bakterijami *E. coli* nizke (pod 230 MPN/100 g).

Primer dolgotrajnega deževja nakazuje vzročno posledično povezavo s povečanimi vrednostmi *E. coli* v školjkah. Glede na dva tovrstna dogodka v obdobju pogostega vzorčenja, povezave ni mogoče z gotovostjo predpostaviti, vendar tudi drugi avtorji (Almeida in Soares, 2012; Glasoe in Christy, 2004) opazajo značilno povezavo med obilnim deževjem in slabšo higiensko kakovostjo vode ter posledično tudi školjk (Bettencourt et al, 2013). Ugotavljajo, da se stopnja kontaminacije školjk ob pojavu obilnega deževja lahko poslabša tudi za več kategorijskih razredov.



Slika 52: Število dni s padavinami in količina padavin izmerjenih na meteoroloških postajah Dekani, Seča in Strunjan VIR: ARSO, <http://meteo.arso.gov.si/met/sl/archive/>

Avtorji poročajo tudi o pomembnem vplivu temperature, slanosti in sončnega sevanja na kontaminacijo vode in posledično školjk. Nižje vrednosti *E. coli* v školjkah povezujejo z obdobji z višjo temperaturo, višjo slanostjo in večjim sončnim sevanjem, višje pa s količinami padavin in

vlačnostjo (Bettencourt et al., 2013; Almeida in Soares, 2012).

Za vzorčno obdobje v našem projektu lahko opazimo, da se ob stanju povišanja koncentracije *E. coli*, le te pojavljajo sinhrono po vseh školjčičih vendar z različno intenzivnostjo. To je dobro razvidno v tabeli 3 (datumi 20. 11. 2014, 21. 11. 2014 ter 29. 7. 2015 in 5. 10. 2015). Večja ujemanja med koncentracijami v posameznih školjčičih ne moremo pričakovati, zaradi lokacij virov onesnaženja ter morskih tokov in drugih dejavnikov, ki vplivajo na gibanje onesnažil v morski vodi. Zaradi relativno majhne razdalje med školjčiči pa je v primeru večje obremenitve na nekem območju, posledice zaznati tudi na drugih lokacijah, npr. v primeru deževja, ko le to zajame celotno ozemlje slovenske obale. Takšno situacijo nakazujejo razmere 20. in 21. 11. 2014, ko je najvišja kontaminacija ugotovljena v Strunjanu točka 817, občutno povišanje pa smo zaznali tudi v drugih dveh točkah tega školjčiča ter na drugih školjčičih. Glede na kratkotrajno občutno poslabšanje stanja sklepamo, da je prišlo do večjega dotoka fekalnega vira, verjetno iz priobalnega pasu in s pritoki zaradi obilnega in dolgotrajnega deževja. Najvišjo stopnjo kontaminacije smo zaznali na točki prostega nabiranja, ki je lokacijsko zelo izpostavljena vplivom komunalnih in industrijskih odpadkov.

Rezultate kontaminacije školjk, ki smo jih vzorčili oziroma rezultate pridobili, smo ovrednotili tudi sezonsko (tabela 17). V obdelavi smo vzorčno leto razdelili na trimesečna obdobja in ugotovili, da je stanje glede kontaminacije najslabše v mesecih oktober, november in december, v katerih smo zaznali skoraj 70 % vseh presežnikov. V toplejših mesecih je bilo presežnikov malo, vendar so posamezne vrednosti presegale mejo 700 MPN /100 g, ki bo s 1. 1. 2017 veljala kot zgornja mejna vrednost kategorije A, dopustna za največ 20 % vzorcev (Uredba (ES) 2285/2015).

V obdobju izven opisanega tromesečja presežnikov (> 230 MPN/100 g) ni bilo na školjčiču Debeli rtič točka 819, v Strunjanu točki 757 pa vrednosti niso presegle meje 700 MPN/100 g.

Tabela 17: Prikaz razporeditve preseženih rezultatov v školjčičih (> 230 MPN *E. coli*/100 g) glede na posamezne mesece oziroma tromesečja v letu

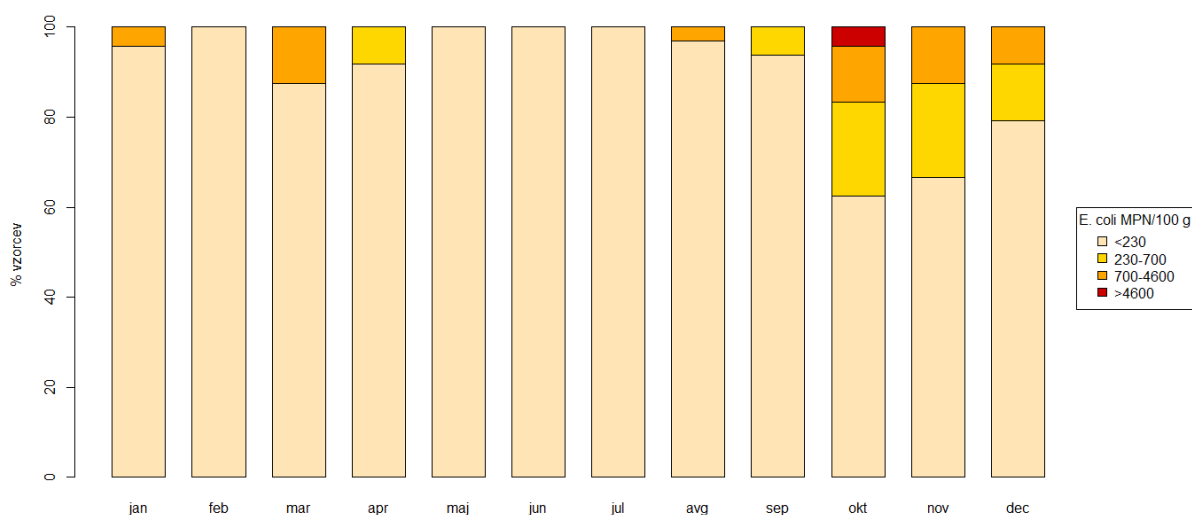
	2015										2014			
mesec	jan	feb	mar	apr	maj	jun	jul	avg	sept	okt	nov	dec	skupno	
število rez. > 230 / mesec	1	0	2	2	0	0	4	3	1	9	13	7	42	
število rez. > 230 / 3 mesece	3			2			8			29			42	
% rez. > 230 / 3 mesece	7,1			4,8			19,0			69,0			100	

Tabela 18: Prikaz razporeditve preseženih rezultatov v školjčičih (> 700 MPN *E. coli*/100 g) glede na posamezne mesece oziroma tromesečja v letu

	2015										2014			
mesec	jan	feb	mar	apr	maj	jun	jul	avg	sept	okt	nov	dec	skupno	
število rez. > 700 / mesec	0	0	0	2	0	0	1	0	1	6	8	3	21	
število rez. > 700/ 3 mesece	0			2			2			17				
% rez. > 700 / 3 mesece	0			9,5			9,5			81,0			100	

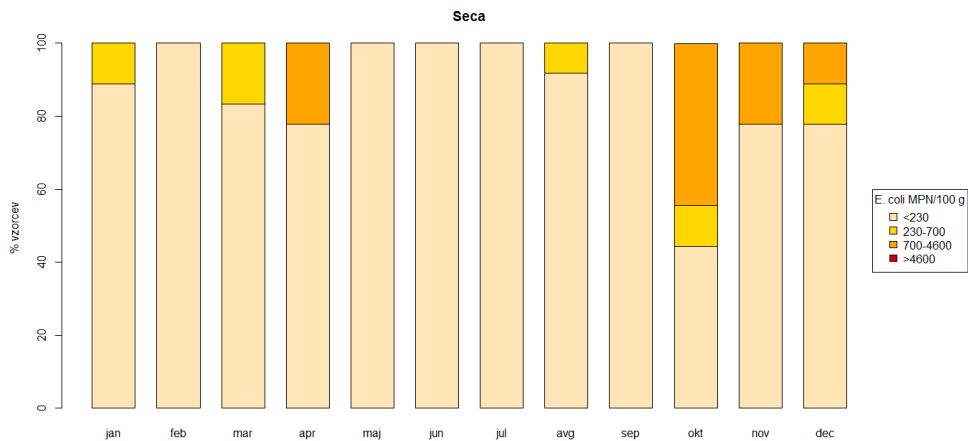
Porazdelitev rezultatov kontaminacije školjk z *E. coli* v školjčičih v vzorčnem letu, razdeljenem na tromesečja je prikazana v tabeli 17 in 18. Kontaminacija školjk v obdobju od oktobra do decembra je statistično višja glede na ostala trimesečja. V tem tromesečju je bilo visoko število deževnih dni in tudi količina padavin je bila višja v primerjavi z ostalimi obdobji vzorčnega leta (slika 55). Posnetek stanja velja za vzorčno obdobje CRP v povezavi s podnebnimi in ostalimi dogodki v tem času. Iz

grafičnih prikazov kontaminacije školjk v posameznih školjčiščih (slika 54 a-c), kjer je razvidna stopnja kontaminacije tudi iz leta 2013 in celotnega 2014, lahko opazimo, da se presežniki (> 700 MPN *E. coli*/100g) v obdobjih med januarjem in septembrom pojavljajo izjemoma. Na sliki 53 je prikazan delež rezultatov glede na nivo kontaminacije, po posameznih mesecih za vsa testirana školjčišča skupaj. Na tem prikazu je dobro vidna zgoščenost povišanih vrednosti predvsem v jesenskem času (oktober–december).

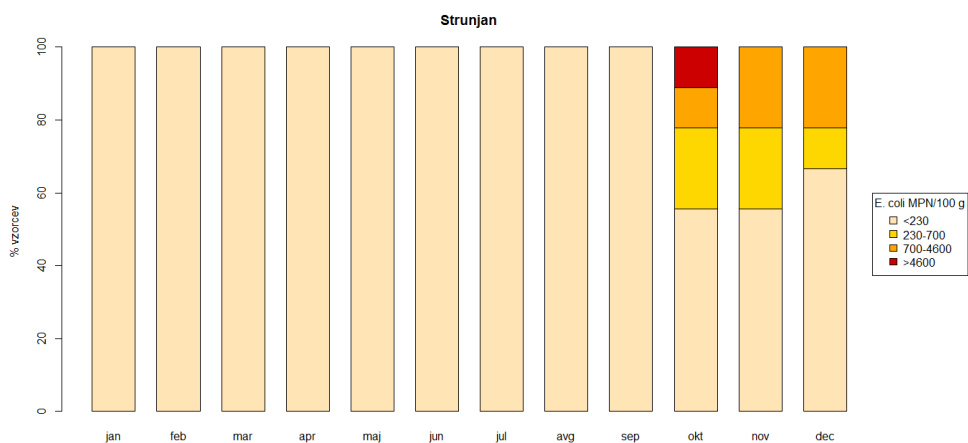


Slika 53: Prikaz deleža rezultatov kontaminacije školjk za vsa školjčišča skupaj, glede na nivo kontaminacije v posameznih mesecih vzorčnega leta.

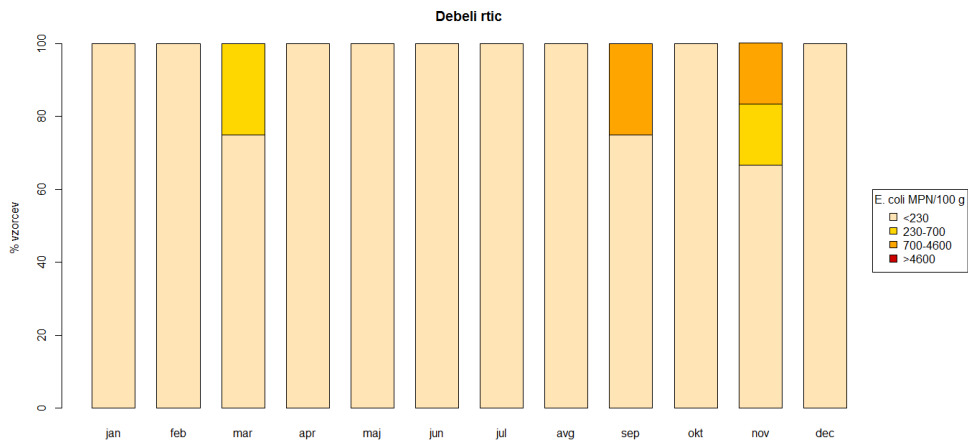
Pri prikazu stanja za vsa školjčišča na sliki 53, opazamo trend višjih vrednosti v tem obdobju tudi na posameznih školjčiščih (slike 54 a-c). Zaznamo lahko tudi težnjo po višjih vrednostih v spomladanskem obdobju, vendar z izrazito nižjo intenzivnostjo. Pomembno pa je poudariti, da gre za obdobje enoletnega spremljanja in je stanje v odvisnosti od vremenskih razmer v posameznem letu lahko drugačno. Glede na opisan močan vpliv deževja in količine padavin na kontaminacijo morske vode in školjk ocenjujemo, da sta kritični obdobji v jesenskem in spomladanskem času, lahko pa prihaja do onesnaženj v različnih mesecih teh obdobj, glede na vremenske razmere v posameznem letu.



Slika 54 a: Prikaz deleža rezultatov za šoljčišče Seča, glede na nivo kontaminacije šoljk z *E. coli*, v posameznih mesecih vzorčnega leta.



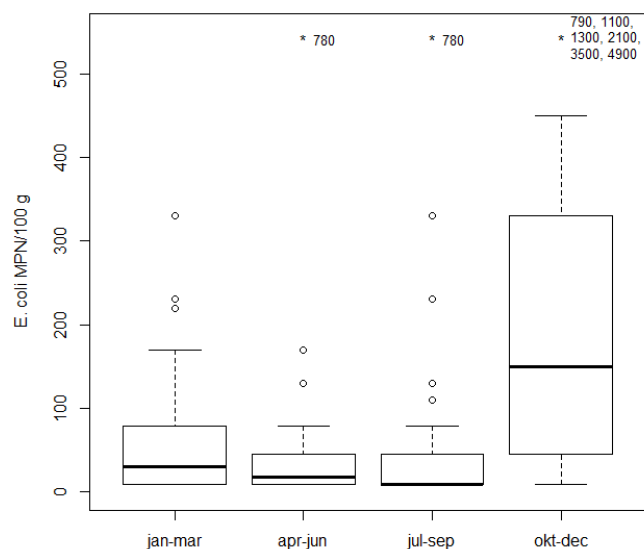
Slika 54 b: Prikaz deleža rezultatov za šoljčišče Strunjan, glede na nivo kontaminacije šoljk z *E. coli*, v posameznih mesecih vzorčnega leta.



Slika 54 c: prikaz deleža rezultatov za školjčišče Debeli rtič, glede na nivo kontaminacije školjk z bakterijami *E. coli*, v posameznih mesecih vzorčnega leta.

O razlikah v kontaminaciji školjk glede na letni čas poročajo tudi drugi avtorji (Riou in sod., 2007; Almeida in Soares, 2012; Betteccourt in sod., 2013), kjer ugotavljajo višje koncentracije jeseni in pozimi ter nižje poleti in spomladi ter opozarjajo na občasne poraste ob močnejših deževjih, predvsem jeseni in spomladi. V naši študiji smo zaznali ta sezonski vpliv, vendar je zaradi prekratkega obdobja spremljanja ne moremo potrditi. Seveda na kontaminacijo vplivajo številni dejavniki, kot so padavine, slanost, temperatura, količina kisika in drugi, samostojno ali v kombinaciji. V naši študiji je ugotovljena logična pozitivna korelacija med kontaminacijo školjk z *E. coli* in fekalnim onesnaženjem morske vode ($p < 0,0001$) (slike 57–59) ter tudi negativna korelacija z oksidacijsko redukcijskim potencialom in pH vode ($p < 0,05$), ter šibko negativna korelacija s temperaturo.

Poročajo o negativni korelaciji s temperaturo, slanostjo in količino padavin (Almeida in Soares, 2012; Betteccourt in sod., 2013). Sončno obsevanje, ki povzroča propad mikrobov, naj bi v poletnih mesecih imelo pomemben vpliv na zmanjšanje števila kontaminantov v vodi in posladično tudi v školjkah, še posebno v plitvejših zalivih (Almeida in Soares, 2012). Tudi okoljske obremenitve zaradi turizma v poletnih mesecih ni bilo zaznati.



Slika 55: Razporeditev rezultatov kontaminacije školjk z bakterijami *E. coli* iz školjčičišč v vzorčnem letu, glede na trimesečja.

Na kontaminacijo morske vode in posledično školjk vplivajo številni dejavniki, kot so padavine, slanost, temperatura, količina kisika in drugi, samostojno ali v kombinaciji. V naši študiji je ugotovljena logična pozitivna korelacija kontaminacije školjk z *E. coli* s fekalnim onesnaženjem morske vode ter tudi z oksidacijsko redukcijskim potencialom in pH vode. Poročajo o negativni korelaciji s temperaturo, slanostjo in količino padavin (Almeida in Soares, 2012; Betteccourt in sod., 2013), ki pa glede na naše rezultate ni bila potrjena. Sončno obsevanje, ki povzroča odmiranje mikrobov, naj bi v poletnih mesecih imelo pomemben vpliv na zmanjšanje števila kontaminantov v vodi in posladičo tudi v školjkah, še posebno pa se to odraža v plitvejših zalivih (Almeida in Soares, 2012). Tudi okoljske obremenitve zaradi turizma v poletnih mesecih ni bilo zaznati.

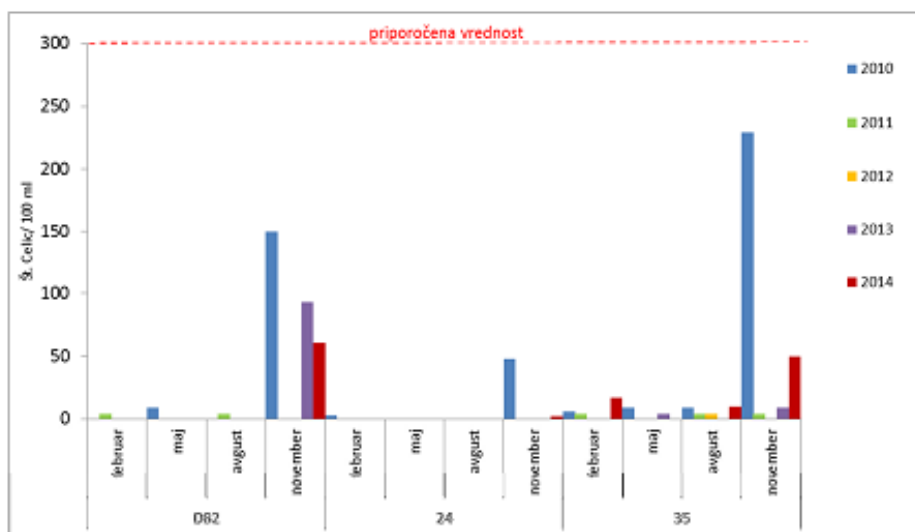
Mikrobiološka kakovost morske vode v školjčičiščih glede prisotnosti bakterij *E. coli* in enterokokov

Deli morja, v katerih poteka dejavnost gojenja školjk morajo poleg zahtev Vodne direktive (Vodna direktiva, 2010) izpolnjevati tudi zahteve, določene v Direktivi 2006/113/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 12. decembra 2006 o zahtevah glede kakovosti voda, primernih za lupinarje (Direktiva 2006/113). Uredba je bila na nivoju EU pred leti razveljavljena, pri nas pa še veljajo trije okoljski predpisi, s katerimi je bila omenjena direktiva prenesena v naš pravni red (MKO, 2014). Dele morja v Sloveniji, namenjene gojenju in nabiranju morskih školjk in morskih polžev določa Pravilnik o določitvi delov morja, kjer je kakovost vode primerna za življenje in rast morskih školjk in morskih polžev (Ur. l. RS št. 38/2015), zahteve za kakovost vode v teh območjih in monitoring pa določata Uredba o kakovosti vode za življenje in rast morskih školjk in morskih polžev (Ur. l. RS 52/2007) ter Pravilnik o monitoringu kakovosti površinske vode za življenje in rast morskih školjk in morskih polžev (Ur. l. RS 71/2002). V primeru, da rezultati spremljanja kakovosti teh pogojev pokažejo čezmerno obremenjevanje vode za morske školjke in morske polže dobi to okolje status degradiranega okolja in se vključi v program ukrepov za izboljšanje.

Uradne službe spremljajo kakovost vode skladno z zakonodajo namerilnih mestih s točno določenimi koordinatami. Merilna mesta so v: Seči – Piranski zaliv (X389234; Y39210, globina 12 m), Strunjanskem zalivu (X390 336; Y43716, globina 14 m) in na Debelem rtiču (X3339 244; Y51167, globina 17 m).

Pogostost spremljanja ter kriterije za oceno ustreznosti vode določa Uredba o kakovosti vode za življenje in rast morskih školjk in morskih polžev (Ur. l. RS 71/2002), ki podaja parametre kakovosti. Glede mikrobioloških kriterijev je letno določen odvzem 4 vzorcev za ugotavljanje števila koliformnih bakterij (MPN/100ml). Priporočena vrednost je 300 MPN/100 ml.

V Oceni kemijskega in ekološkega stanja morja ter kakovosti vode v gojiščih školjk v Sloveniji v letu 2014, ki ga je izdalo MKO (MKO, 2014) so ovrednoteni rezultati za parameter koliformnih bakterij v obdobju od leta 2010- 2014. V poročilu je navedeno, da izmerjene vrednosti koliformnih bakterij fekalnega izvora v letu 2014 ne kažejo mikrobiološkega onesnaženja vode, saj je bila večina vrednosti pod predpisano priporočeno vrednostjo oziroma večina pod mejo zaznavnosti metode. Podana je ocena, da se mikrobiološka kakovost vode z leti izboljšuje – glede na nizke vrednosti rezultatov v zadnjih treh letih. Pomembna je ugotovitev, da so bile vrednosti koliformnih bakterij nizke predvsem v poletnem času. Podatki so prikazani na sliki 56.



Slika 56: Vrednosti koliformnih bakterij fekalnega izvora v morski vodi v letih 2010 - 2014 (VIR: MKO, Kakovost vode v gojiščih školjk, 2014)

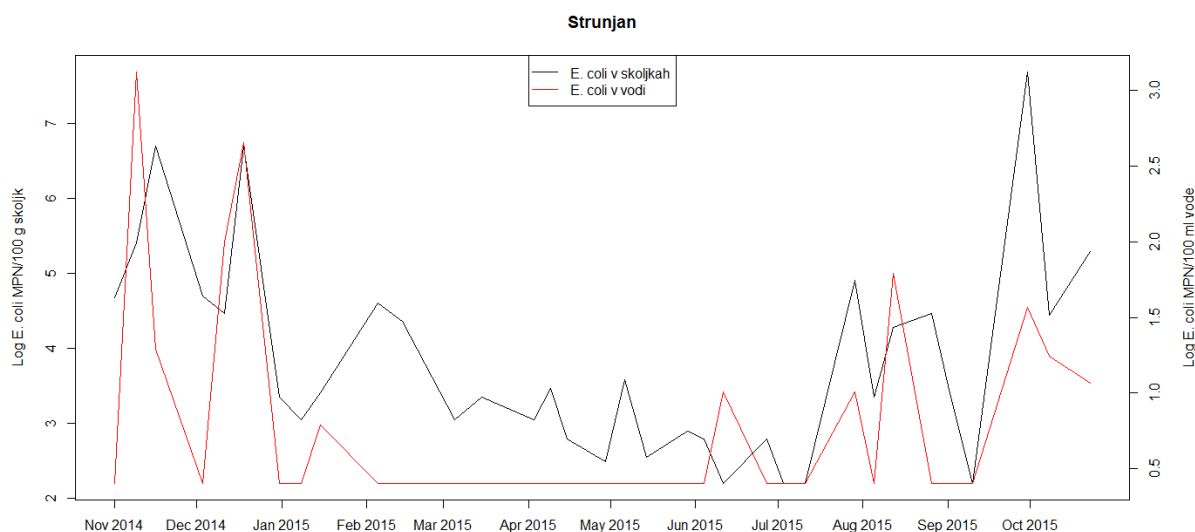
V raziskavi v okviru našega Ciljnega raziskovalnega projekta smo ob odvzemu vzorcev školjk po predvidenem programu vsakokrat odvzeli tudi vzorce vode. Poleg kemijskih parametrov smo v vzorcih vode ugotavljali število *E. coli* in enterokokov. Želeli smo spremljati število bakterij *E. coli* v vodi ob hkratnem ugotavljanju števila teh bakterij v školjkah. Prisotnost *E. coli* in enterokokov v vodah je znak fekalnega onesnaženja. Glede na to, da *E. coli* v vodi, zaradi večje občutljivosti na številne dejavnike v morski vodi, ne preživi dolgo, je njena prisotnost znak sveže kontaminacije vode, medtem ko za streptokoke velja, da v okolju preživijo dalj časa (NIJZ).

Rezultati onesnaženosti morske vode z indikatorskimi mikrobi *E. coli* in enterokoki ter kontaminacija školjk z *E. coli* so med seboj značilno povezani ($p < 0,0001$). Koncentracija indikatorskih mikroorganizmov je značilno negativno povezana z oksidacijsko redukcijskim potencialom vode in pH-jem vode. Korelacija je sicer šibka vendar statistično značilna ($p < 0,05$).

V Slikah 57-59 je povezanost med kontaminacijo vode in školjk na posameznih školjčičih dobro razvidna.

Školjčiče Strunjan

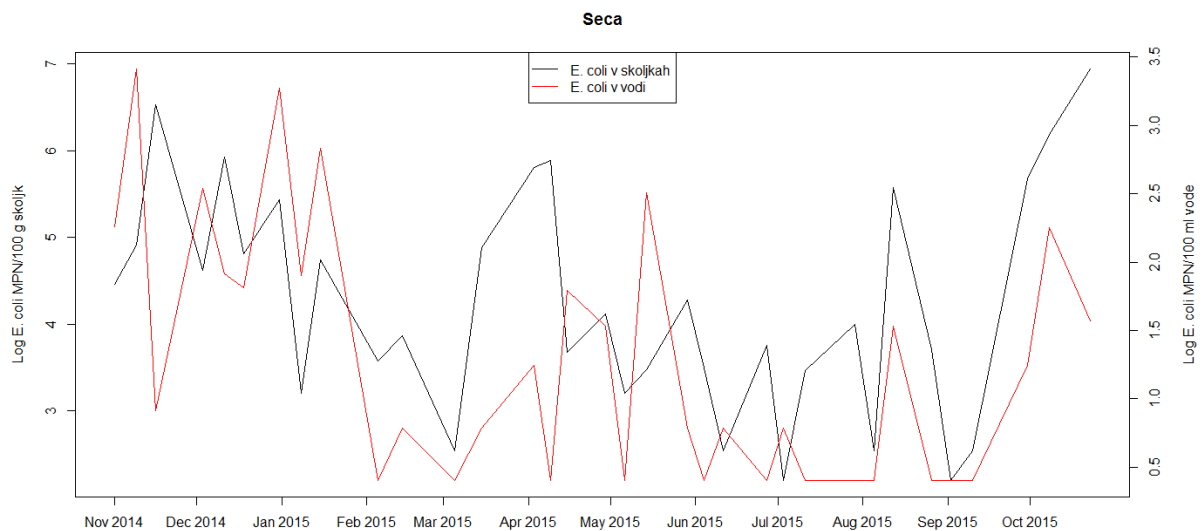
Ugotovljene vrednosti bakterije *E. coli* v morski vodi so v preiskovanem obdobju nizke. Na odvzemni točki 817 in 818 smo najvišje vrednosti ugotovili v mesecu novembru in decembru 2014 (tabela Strunjan). Na točki 817 je imelo od 34 preiskanih vzorcev vrednost *E. coli* pod mejo metode < 3 MPN/100 ml 27 vzorcev, kar predstavlja 79,4 % vseh vzorcev. Na točki 818 je bilo pod mejo detekcije 26 vzorcev (76,6 %) in na točki 757 28 vzorcev (82,4 %). Na sliki 57 so prikazane srednje vrednosti rezultatov vzorcev školjk in morske vode glede števila *E. coli* v tem školjčiču. Rezultati so zaradi grafičnega prikaza spremenjeni v logaritemsko vrednost ($\log_{10}$ *E. coli* MPN/100 ml).



Slika 57: Vrednosti bakterij *E. coli* v vzorcih školjk in morske vode v obdobju november 2014 - oktober 2015 (Strunjan).

Školjčiče Seča

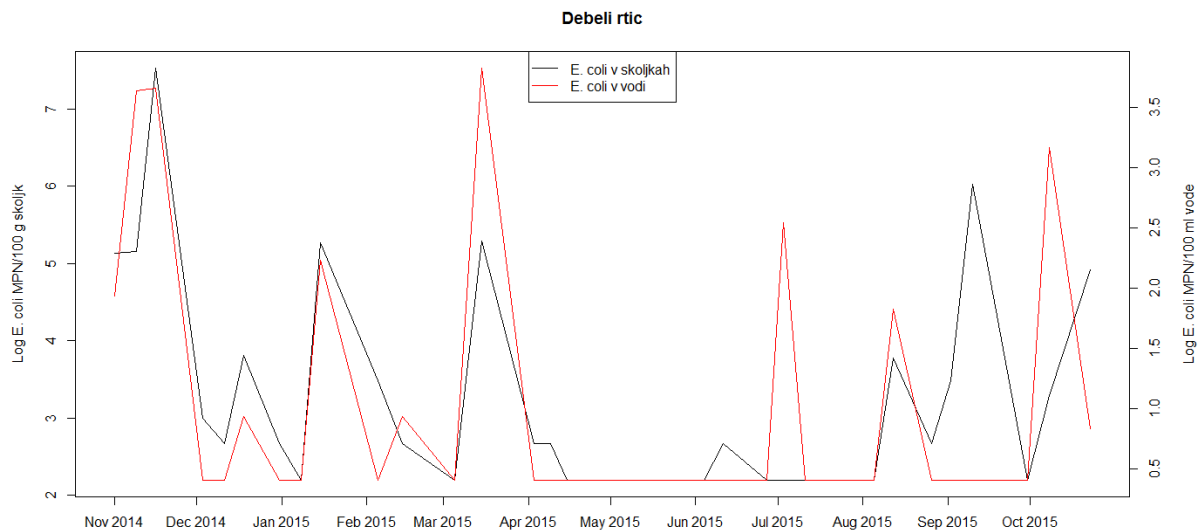
Najvišje ugotovljene vrednosti *E. coli* v gojišču Seča so bile ugotovljene v mesecu novembru in decembru 2014 in v januarju 2015. Na točki 752 je imelo od 34 preiskanih vzorcev vrednost *E. coli* pod mejo metode < 3 MPN/100 ml 21 vzorcev, kar predstavlja 61,8 % vseh vzorcev. Na točki 907 je bilo pod mejo detekcije 25 vzorcev (73,5 %), na točki 1021 pa 16 vzorcev (47,0 %). Na sliki 58 so prikazane srednje vrednosti rezultatov vzorcev školjk in morske vode glede števila *E. coli* v tem školjčiču. Rezultati so zaradi grafičnega prikaza spremenjeni v logaritemsko vrednost ($\log_{10}$ *E. coli* MPN/100 ml).



Slika 58: Vrednosti bakterij *E. coli* v vzorcih školjk in morske vode v obdobju november 2014 - oktober 2015 na vseh odvzemnih mestih (Seča).

Školjišče Debeli rtič

Najvišje ugotovljene vrednosti bakterij *E. coli* v gojišču Debeli rtič so bile prav tako ugotovljene v mesecu novembru 2014. Na točki 819 je imelo od 34 preiskanih vzorcev vrednost *E. coli* pod mejo metode < 3 MPN/100 ml 26 vzorcev, kar predstavlja 76,6 % vseh vzorcev, na točki 996 pa 24 vzorcev (70,6 %). Na sliki 59 so prikazane srednje vrednosti rezultatov vzorcev školjk in morske vode glede števila *E. coli* v tem školjišču. Rezultati so zaradi grafičnega prikaza spremenjeni v logaritemsko vrednost ($\log_{10}$ *E. coli* MPN/100 ml).



Slika 59: Vrednosti bakterij *E. coli* v vzorcih školjk in morske vode v obdobju november 2014 - oktober 2015 (Debeli rtič).

Bakterije *E. coli* in odpornost proti antibiotikom

Bakterije vrste *E. coli* so normalno prisotne v črevesni mikrobioti ljudi in toplokrvnih živali, vendar pa so tudi pogosti povzročitelji črevesnih in zunaj-črevesnih okužb ljudi in živali. Še posebej problematični so večkratno odporni sevi z genskimi zapisi za betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL) iz skupin CTX-M, SHV, TEM, AmpC ter karbapenemaze. Vir za človeka patogenih in odpornih sevov lahko tudi hrana. V Sloveniji se vsako leto izvaja monitoring z namenom spremljanja odpornosti indikatorskih in patogenih mikroorganizmov proti protimikrobnim zdravilom. V zadnjih nekaj letih je bilo izvedenih tudi več usmerjenih raziskav glede pojavnosti bakterij *E. coli* ESBL, tako pri živalih kot pri živilih živalskega izvora. Rezultati so pokazali, da so pri živalih in v mesu ter mesnih izdelkih v Sloveniji prisotni sevi *E. coli*, ki so večkratno odporni in/ali imajo genske zapise za pomembne dejavnike virulence. V raziskavi iz leta 2010 je bilo testiranih 105 sevov *E. coli*, osamljenih iz vzorcev surovega mesa zdravih rejnih živali (goveje, svinjsko in puranje meso in ugotovili, da je bilo več kot 55 % vseh izolatov odpornih proti vsaj enemu antibiotiku. V takratni raziskavi je izmed 105 izolatov *E. coli* samo v enem primeru osamljen sev *E. coli* z razširjenim delovanjem betalaktamaz ESBL (iz svinjine) (Golob in sod., 2011). V zadnjih letih je bilo tudi v Sloveniji opravljenih več študij o prevalenci sevov ESBL. V okviru monitoringa in raziskovalnega projekta je bila od novembra leta 2011 do maja leta 2012 opravljena raziskava ugotavljanja prisotnosti teh sevov v piščančjem mesu v klavnicah in na prodajnih policah. V letu 2011 je bilo bil delež izoliranih bakterij *E. coli* tipa ESBL/AmpC 76,3 %, v letu 2012 pa še več - 80,7 % (Zdovc in sod., 2013). Poleg fenotipske analize so v študiji določili tudi posamezne alele genov za β -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja ESBL in AmpC. Problematična je lahko prisotnost velikega števila odpornih izolatov iz filogenetske skupine D. Takšni sevi, opremljeni z dodatnimi geni povezanimi z virulenco, so namreč pogosto povzročitelji izven-črevesnih obolenj pri človeku (Ambrožič in sod., 2014). Školjke kot vir genov za odpornost so bile do sedaj manj raziskane. V raziskavi med koncem leta 2010 in v letu 2011 je bilo iz školjk, ki so bile gojene v slovenskem morju, izoliranih in genetsko opredeljenih 85 izolatov *E. coli*. V raziskavi so avtorji potrdili prisotnost odpornih in potencialno patogenih sevov *E. coli* v školjkah (Križman in sod., 2014).

Z našo študijo smo ugotovili, da je velik delež izoliranih bakterij *E. coli* spada med komenzalne bakterije; v filogenetski skupini A (46,0 %) in B1 (32,0 %) je bilo skupno 79 % sevov. Naši rezultati sovpadajo z rezultatom študije, ki so jo opravili v Sloveniji Trkov in sod. (2014), kjer je bilo med sevi *E. coli* iz živil v filogenetski skupini A 50 % in v B1 35,7 %, v skupino D je bilo uvrščeno 11,9 %, v B2 pa 2,4 % sevov.

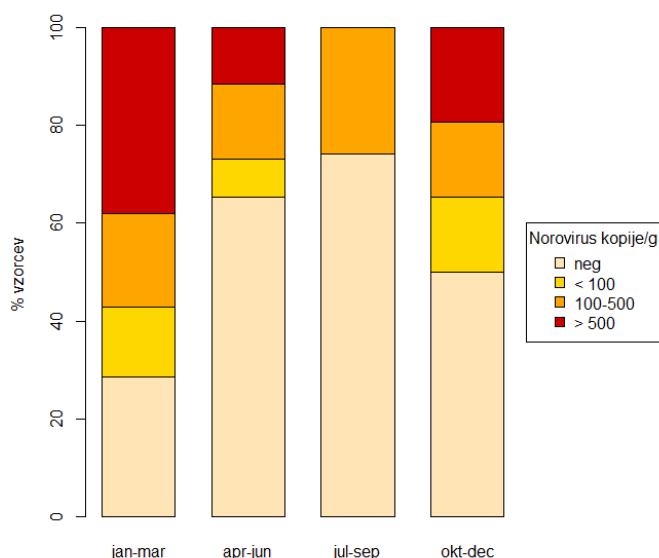
Seve *E. coli*, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja – ESBL, smo ugotovili pri 14,7 % (5/34) vzorcih prosto nabranih klapavicah ob svetilniku na Debelem rtiču, pri 5,9 % (2/34) iz gojišča Seča, pri enakem odstotku tudi v Strunjanu, medtem ko na Debelem rtiču ni bili prisotni. Glede na zelo visok delež prisotnih sevov ESBL v perutninskem mesu so školjke iz školjčič s tovrstnimi sevi kontaminirane v zelo nizkem deležu – v 3,9 % (4/102). Na obali ni registriranih večjih perutninskih obratov, ki bi pripomogli k višjem deležu ESBL. Vendar glede na rezultate naše študije lahko omenimo, da je večja verjetnost za prisotnost sevov, ko je število indikatorskih bakterij povišano - v vseh primerih, ko so bili prisotni sevi ESBL, je bilo tudi število bakterij *E. coli* povišano nad 230 MPN/100g.

Virusi

Uredba komisije (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila ne določa kriterijev za viruse v živih školjkah, kljub tem pa uvodoma poudarja, da je le-ta izredno pomembna.

V obdobju od konca decembra do sredine januarja ter v februarju so bili vsi preiskovani vzorci kontaminirani. V drugi polovici vzorčenj - od maja do konca oktobra se je stopnja kontaminacije v školjčičih znižala – število kopij/g je bilo manj kot 100 oz. do največ 360. Najvišje število virusnih kopij GI smo ugotovili pri prosto nabranih klapavicah v novembru (1190 kopij/g), medtem ko je bilo najvišje določeno število za GII (8114 kopij/g) v decembrskem vzorcu iz gojišča Strunjan. Med vzorci iz školjčič je bilo tudi 31,8 % (14/44) takih, ki so vsebovali manj kot 100 virusnih kopij/g tkiva, oz. 14 % vseh preiskanih. Pri prosto nabranih je bil ta delež 23,8 (5/21) oz. 16,1 % (5/31) vseh.

Po mesecih je bil najvišji delež kontaminiranih vzorcev iz gojišč februarja - 100 % (6/6), januarja sicer nekoliko manj 77,7 % (7/9), vendar je bila vsota virusnih kopij višja kot januarja. Najmanj kontaminiranih je bilo julija 11,1 % (1/9). V vseh gojiščih je bilo v obdobju od januarja do marca največji delež kontaminiranih vzorcev in tudi stopnja kontaminacije je bila najvišja. Najnižji delež kontaminiranih školjk je bil med julijem in septembrom (slika 60).



Slika 60: Celotno število virusnih kopij/g tkiva (GI + GII) po školjčičih glede na tromesečja.

Delež kontaminiranih klapavic v naši študiji je bil v Seči 29,4 % (10/34), v Strunjanu 54,5 % (18/33), na Debelem rtiču 48,5 % (16/33) in pri prosto nabranih klapavicah ob svetilniku na Debelem rtiču 67,7 % (21/31).

Najvišji delež kontaminiranih vzorcev in tudi najvišja stopnja kontaminacije v Seči je bila v prvem tromesečju leta, najmanj kontaminiranih je bilo v obdobju od julija do septembra, medtem ko je bila najnižja stopnja kontaminacije med oktobrom in decembrom.

V Strunjanu sta bila deleža kontaminiranih klapavic podobna v prvem in zadnjem tromesečju leta, najmanj kontaminiranih je bilo od aprila do junija.

V školjčiču na Debelem rtiču je bilo v prvem tromesečju več kot 80 % vzorcev kontaminiranih in tudi z najvišjim številom virusnih kopij, medtem ko je bilo med julijem in septembrom delež in stopnja kontaminacije najnižja.

Glede na prejšnje študije - v raziskavi 2006–2008, ko je bil delež kontaminiranih klapavic v

slovenskih školjčičih povprečno 16,7 %, smo v tej študiji ugotovili bistveno višji delež. Norovirusna RNA je bila v obdobju 2006–2008 največkrat prisotna v školjkah iz gojišča na Debelem rtiču (v 27,5 %), manj pogosto v školjkah iz Strunjana (19,6 %) in najmanj v školjkah iz Seče (7,0 %). V prostoživečih klapavicah je bila kontaminacija 33 % (2/6). Na Debelem rtiču in v prosto živečih klapavicah iz okolice Pirana je bil tudi najpestrejši nabor norovirusnih sevov (Henigman in sod., 2012). V letih 2010, 2011, do marca 2012, je bila izvedena še ena študija v okviru CRP-a. Norovirusna RNA je bila prisotna v 13 od 70 analiziranih vzorcev (18,6 %). Najmanjši odstotek kontaminiranih klapavic je bil v Seči (11,1 %), nekoliko več na Debelem rtiču (21,4 %) in največ v Strunjanu (24,1 %). Dokazani norovirusi so pripadali obema genskima skupinama - I in II. (UVHVVR,2014).

Najmanjši delež kontaminacije klapavic smo tudi v tej študiji potrdili v Seči (29,4 %). Za to lokacijo - Sečoveljski zaliv so ocenjene količine onesnažil nizke, vendar pa lahko tudi te nizke količine predstavljajo nevarnost ob premajhni izmenjavi vode zaradi zaprtosti zaliva. Modelni izračuni morskega toka pod vplivom bibavice namreč nakazujejo zelo nizke hitrosti vodnega toka, kar predstavlja nizko stopnjo izmenjave vode na lokaciji školjčičišča.

V Strunjanu smo potrdili najvišji delež kontaminiranih klapavic - 54,5 %, na Debelim rtiču 48,5 %. Ti dve lokaciji sta z vidika izmenjave vode manj problematični, obstaja pa predvsem pri lokaciji Strunjanski zaliv možnost prinosa onesnažil iz izpusta komunalne čistilne naprave Piran z glavnim tokom v slovenskem morju. Na lokaciji Debeli rtič pa prav tako obstaja možnost prenosa onesnažil iz močno obremenjenega Koprškega zaliva. Natančnejša ocena prenosov onesnažil je možna ob podrobnejšem poznavanju virov onesnaženja in z numeričnimi izračuni hidrodinamike ob upoštevanju advekcije in disperzije obravnavanih onesnažil (Zupančič, 2016).

V primerjavi s podatki prejšnjih študij (Henigman in sod., 2012, UVHVVR 2014) je stopnja kontaminacije precej višja glede na prejšnja leta. V tej študiji smo odvzeli tudi večje število vzorcev in dobili boljši vpogled v stanje kontaminacije v školjčičiščih po letnih časih, lokacijah ter vzporedno še z drugimi fizikalnimi parametri: temperaturo vode, slanostjo, pH, oksigenacijo.

Pomemben dejavnik, ki je pripomogel k boljši detekciji, je tudi razvoj metode. Pred objavo mednarodnega standarda so bile razširjene različne metode detekcije. Trenutno je v veljavi mednarodni standard ISO/TS 15216-1/2013 za ugotavljanje norovirusov in virusa hepatitisa A, ki predpisuje tudi postopke za kvantifikacijo – ugotavljanje števila virusnih delcev v vzorcih in vključuje tudi upoštevanje izkoristka ekstrakcije s kontrolnim mengovirusom.

Za noroviruse trenutno še nimamo na voljo metod, ki bi dokazovale viabilnost virusov, dokažemo jih lahko le z molekularnimi metodami (RT-PCR in qRT-PCR). Pri tem pomnožimo del njihovega genoma, vendar nimamo podatka ali je virus dejansko infektiven ali ne. Virusi se v školjkah ne razmnožujejo, v njihovem tkivu pa lahko ostanejo še določen čas kot infektivni delci. Višje kot je ugotovljeno število virusnih kopij, večje tveganje predstavlja za zdrave ljudi. Študije, ki so bile narejene v Evropi navajajo, da so školjke z norovirusi kontaminirane v 30–60 %, občasno tudi nad 70 %. Običajno je število virusnih kopij nizko (< 100 /g). Primeri, ko je v vzorcu več kot 10^4 kopij/g se pojavijo v manj kot 15 % (EFSA, 2015).

Kvantitativni podatki za virus hepatitisa A so redkejši, navadno je število kopij nizko, vzorcev z več kot 10^4 virusnih delcev je manj kot 3 % (EFSA, 2015).

Letna incidenca virusa hepatitisa A se v Sloveniji od leta 1997 znižuje. V letu 2014 je bila 0,5/100 000 prebivalcev. Običajno gre za primere, ko se potniki okužijo v tujini. (UVHVVR,2014).

Glavni vir okužb z norovirusi predstavlja prenos iz osebe na osebo (EFSA, 2011). Školjke, ki se uživajo surove (ostrige), predstavljajo večje tveganje kot školjke, ki jih toplotno obdelamo (na pr. klapavice). Do kontaminacije lahko pride tekom proizvodnje ali pa naknadne kontaminacije. Zelo je pomembno, da so gojene v okolju, ki ni onesnažen s fekalnimi odplakami. V Sloveniji do sedaj nismo zasledili podatkov o okužbi ljudi z norovirusi in VHA, katerim vzrok bi bile školjke. V Sloveniji se

navadno jedo klapavice s predhodno toplotno obdelavo. Temperatura in čas obdelave običajno ni tolikšen kot ga predpisuje priporočilo EFA (2015), ki predvideva za uničenje norovirusov in virusa hepatitisa A 90 °C za 90 sekund. Glede na dobljene podatke iz te in prejšnjih študij ocenjujemo, da je nevarnost kontaminacije za VHA zelo majhna. Nevarnost za okužbe z norovirusi j predvsem v zimskih zimskih mesecih. Višje temperature vode povezujejo z višjo metabolno aktivnostjo školjk in zato hitrejšo stopnja odstranitve virusov (EFSA, 2015).

Trenutno zakonodaja še ne prepisuje mej za noroviruse, Centralni referenčni laboratorij za (EURL, 2015) priporoča mejo 200 kopij/g tkiva ter da se število virusni kopij obeh genskih skupin sešteje, saj je vsebnost 100 virusnih kopij/g blizu meje kvantifikacije laboratorijev (LOQ). Glede na podatke o stopnji kontaminacije, ki jih imamo ob izbruhov bolezni, je predlog EURL, da se kot absolutno zgornjo mejo proizvodnih območij postavi mejo 1000 kopij/g. Bistvenega pomena je okolje gojišč. Kljub temu, da so školjke iz cone A, ki so glede bakterijske kontaminacije ustrezne občasno tudi prihaja do okužb z norovirusi (EURL, 2015). Tudi v naši študiji je prisotnost norovirusov sovpadala s povišanim številom bakterij *E. coli* (> 230 MPN/100g) pri slabi polovici (46,1 %) vzorcev. Uredba Komisije (ES) št. 2073/2005 prav tako navaja, da običajni fekalni kazalci niso zanesljivi za dokazovanje prisotnosti ali odsotnosti norovirusov in da je zanašanje na kazalce za odstranitev fekalnih bakterij pri določanju časov prečiščevanja za lupinarje nevarna praksa. Tudi postopek depuracije, ki školjke učinkovito očisti bakterij, ni tako učinkovit za viruse (EFSA, 2012).

Zaključki in priporočila naročniku

- Glede na trenutno veljavno zakonodajo in prikazane rezultate zaradi vrednosti, ki so presegale mejno vrednost 230 MPN *E. coli*/100 g, nobenega od školjčič ni mogoče direktno uvrstiti v razred A.
- Glede na predstavljeno stanje v vzorčnem obdobju CRP lahko vidimo, da je delež rezultatov (školjčičišča skupno), ki so pod 230 MPN *E. coli*/100 g školjk visok (88,3 %), kar je v skladu z Uredbo (ES) 2285/2015 (≥ 80 %) in to velja tudi za posamezne točke v školjčičiščih. Vendar pa so koncentracije v 21 (5,8 %) vzorcih presegale mejo 700 MPN *E. coli*/100 g, dva rezultata v Strunjanu pa sta presegala mejo 4600, ki predstavlja spodnjo mejno vrednost klasifikacije školjčičišč razreda B.
- V vzorčnem letu CRP ugotavljamo izrazito povišanje bakterij *E. coli* v jesenskem času in manj spomladi, vendar ocenjujemo, da se glede na variabilnost pojavljanja padavin v našem okolju povišane koncentracije lahko pojavljajo tudi spomladi. V poletnih mesecih, ko je opaziti nižjo pojavnost mikrobov in virusov, praviloma tudi ni obilnih, predvsem pa dolgotrajnih poslabšanj vremena.
- Glede na številne izsledke iz literature in rezultate enoletnega vzorčenja ugotavljamo sezonsko odvisnost kontaminacije školjk z bakterijami *E. coli*, to je pojavljanje višjih koncentracij v spomladanskem in jesenskem času. V raziskavi je sezonski vpliv zelo očiten, vendar ga zaradi prekratkega obdobja spremljanja ne moremo z gotovostjo potrditi oz. natančno opredeliti glede na mesece v letu.

- V obdelavi smo rezultate za školjke pridobljene v vzorčnem letu razdelili na tromesečna obdobja in ugotovili, da je stanje glede kontaminacije najslabše v mesecih oktober, november in december. V tem obdobju je bilo 81 % rezultatov, kjer so vrednosti presegle 700 MPN *E. coli*/100 g.
- Norovirusi so pogostejše prisotni v mesecih od oktobra do marca, najvišja stopnja kontaminacije je bila med januarjem in marcem. V našem obdobju vzorčenja je bila najnižja stopnja kontaminacije školjčič v Seči - 29,4 %, na Debelem rtiču 48,5 % in največ v Strunjanu - 54,5 %. Izdelati bi bilo potrebno priporočila za pravilno (varno) pripravo školjk, ko se le-te pred zaužitjem toplotno obdela. Ravno priprava predstavlja najpomembnejšo kritično točko pri okužbah z virusi.
- Virus hepatitisa A v naši študiji nismo ugotovili. Tudi po podatkih predhodnih študij je stanje v gojiščih školjk glede virusa hepatitisa A ugodno, vendar možnosti kontaminacij ne smemo izključiti.
- Uredba Komisije (ES) št. 2073/2005 še ne predpisuje mej glede vsebnosti norovirusov in virusa hepatitisa A v školjkah, omenja pa, da je potrebno določiti merila, ko so analitične metode dovolj razvite. V zadnjih letih je bil narejen temeljit razvoj metode, ki so opisane v ISO/TS 15216-1:2013 in so tudi že v uporabi.
- Potrdili smo logično pozitivno korelacijo med fekalno onesnaženostjo vode in kontaminacijo školjk ter negativno korelacijo med kontaminacije vode in školjk z oksidacijsko redukcijskim potencialom, pH vode in temperaturo.
- Seve *E. coli*, ki izločajo beta laktamaze z razširjenim spektrom delovanja, smo ugotovili le pri dveh vzorcih iz Seče in dveh iz Strunjana (5,9 %), ne pa tudi na gojišču Debeli rtič. Pri prosto nabranih klapavicah je bil delež nekoliko višji - 14,7 %.
- Glede stopnje kontaminacije školjk z bakterijami *E. coli* v obdobju izvajanja projekta, je imel najnižjo mediano školjčič Debeli rtič (9) in se statistično značilno razlikuje od ostalih dveh školjčič. Med školjčiči Seča, ki ima najvišjo vrednost mediane (45) in Strunjanom (20) ni statistično značilne razlike.
- Ugotavljamo, da imajo ekstremni vremenski pogoji, predvsem obilna deževja močan vpliv na onesnaženje morske vode in posledičen porast vrednosti bakterij *E. coli* v školjkah. Te podatke lahko pristojen organ po direktivi EU 2015/2285 upošteva pri kategorizaciji školjčič.
- Toplejši del leta kaže na manjšo kontaminacijo školjk z virusi, kakor tudi s številom indikatorskih mikrobov *E. coli*, zato ocenjujemo, da je v poletnih mesecih mikrobiološka slika školjk najugodnejša. Dokument EU dobre prakse za mikrobiološko klasifikacijo v skladu z Uredbo (ES) 854/2004 priporoča, da se lahko v primeru, ko gre za čisto sezonsko komercialno aktivnost, vzorčenje izvaja manjši del leta, vendar še pred sezono prodaje, tako da se preveri mikrobiološki status školjčiča.
- Glede na zgoraj omenjena priporočila menimo, da je stanje mikrobiološke kontaminacije

školjk v obdobju, ko so le-te prodajne velikosti tudi najbolj primeren parameter za presojo glede kategorizacije posameznega školjčičišča.

Viri

1. Almeida C., Soares F. Microbiological monitoring of bivalves from the Ria Formosa Lagoon (south coast of Portugal): a 20 years of sanitary survey Mar. Pollut. Bull., 64 (2) (2012), pp. 252–262.
2. Ambrožič J, Golob M, Zdovc I. [beta]-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja pri

- bakterijah vrste *Escherichia coli* v mesu piščancev. V: KUŠAR, Darja (ur.), OCEPEK, Matjaž (ur.). Knjiga povzetkov : kongres SMD 2014, 6. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva, 24.-26. september 2014, Bled, Slovenija. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2014, str. 111.
3. Anonymous. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. EFSA Journal 2012;10 (1):2500. [39 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2500. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.
 4. Anonymous. Poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v letu 2012 (UVHVVR, 2013).
 5. Anonymus. Annual epidemiological report 2014 – food- and waterborne diseases and zoonoses ECDC.
http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1210#sthash.5VvQN109.dpuf.
 6. Anonymus. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses EFSA Journal 2011;9(7):2190 [96 pp.]. 10.2903/j.efsa.2011.2190.
 7. Anonymus. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Evaluation of heat treatments, different from those currently established in the EU legislation, that could be applied to live bivalve molluscs from B and C production areas, that have not been submitted to purification or relaying, in order to eliminate pathogenic microorganisms. EFSA Journal 2015;13(12):4332. 76 pp. 10.2903/j.efsa.2015.4332.
 8. Anonymus. EURL, Discussion paper on live bivalve molluscs (LBM) and human enteric virus contamination: options for improving risk management in EU food hygiene package. 2015. https://eur.cef.eu/media/13637/ws12_15.pdf 27.6.2016.
 9. Anonymus. Microbiological Monitoring of Bivalve Mollusc Harvesting Areas - Guide to Good Practice: Technical Application. Issue 5. The Community Guide to the Principles of Good Practice for the Microbiological Classification and Monitoring of Bivalve Mollusc Production and Relaying Areas with regard to Regulation 854/2004. 2014.
http://ec.europa.eu/food/safety/docs/biosafety-food_hygiene-guidance-community_guide_bivalve_mollusc_monitoring_en.pdf.
 10. Anonymus. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz 2014 (UVHVVR, 2014). Uprava za varno hrano, varstvo živali in rastlin, Ministrstvo za kmetijstvo in okolje v sodelovanju z Nacionalnim Inštitutom za javno zdravje RS, ter Zdravstvenim inšpektoratom RS, Ministrstvo za zdravje Ljubljana, 2015.
 11. Arauz-Ruiz P, Sundqvist L, Garcia Z, et al. Presumed common source outbreaks of hepatitis A in an endemic area confirmed by limited sequencing within the VP1 region. J Med Virol 2001; 3: 449–56.
 12. ARSO. Ocena kemijskega in ekološkega stanja morja ter kakovosti vode v gojiščih školjk v Sloveniji v letu 2014, Agencija republike Slovenije za okolje in prostor, september 2015.
 13. Biasizzo M., Andrej K, Marinšek J. Bacterial contamination of shellfish in Slovenia. Slov Vet Res, 2005; 42: 83-7.

14. Bosch A. The survival of enteric viruses in the water environment. *Microbiologia* 1995; 11: 393–6.
15. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherhia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(supl. 10): 4555–8.
16. Costafreda MI, Bosch A, Pinto RM. Development, evaluation, and standardization of a realtime TaqMan reverse transcription–PCR assay for quantifi cation of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 3846–55.
17. Crowther J , Hampson Danyel I., Bateman Ian J., Kay David, Posen Paulette E., Stapleton C. M., Wyer. Mark D. 2011. Generic Modelling of Faecal Indicator Organism Concentrations in the UK. *Water* 2011, 3(2), 682-701; doi:10.3390/w3020682.
18. Delahay RM, Frankel G, Knutton S. Intimate interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* at the host cell surface. *Infec Dis* 2001; 14: 559-65.
19. Direktiva 2006/113/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 12. decembra 2006 o zahtevah glede kakovosti voda, primernih za lupinarje.
20. ECDC, Annual epidemiological report 2014 – food- and waterborne diseases and zoonoses http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1210#sthash.5VvQN109.dpuf.
21. EURL, Discussion paper on live bivalve molluscs (LBM) and human enteric virus contamination: options for improving risk management in EU food hygiene package. 2015. https://eur1cefas.org/media/13637/ws12_15.pdf 27.6.2016.
22. Evropska direktiva 91/492/EEC o zdravstvenih pogojih za proizvodnjo in dajanje na trg ribiških proizvodov.
23. Fröhlich J, Baljer G, Menge C. Maternally and naturally acquired antibodies to shiga toxins in a chort of calves shedding shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(supl. 11): 3695–704.
24. Geodetski inštitut Slovenije. Navtični vodnik slovenskega morja in obale, 2005. Ministrstvo za promet Republike Slovenije. (<http://www.hidrografija.si/index.php>).
25. Glasoe , Christy A. 2004. Coastal urbanization and microbial contamination of shellfish growing areas. Washington, pp 1-28.
26. Golob M, Krt B, Mićunović J, Biasizzo M, Zdovec I. Antimicrobial resistance of *E. coli* strains isolated from raw meat in Slovenia in 2010. V: MITROV, Dine (ur.). Proceedings, Days of veterinary medicine 2011, Skopje, Ohrid. Ohrid: Faculty of veterinary medicine - Skopje, 2011, str. 98-99.
27. Harpha Sea d.o.o. Izboljšana batimetrija in topografija morja vključno s 3D posnetkom obale ter določitvijo obalnih linij za potrebe izvajanja Morske direktive, Koper, 2014, 22 str.
28. Henigman U, Ugotavljanje patogenih bakterij in virusov v školjkah slovenskega morja in njihova genetska karakterizacija. Doktorska disertacija, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani 2012.
29. Hladnik, V., Malačič, V. (2011). Roža vetrov in roža valov – kateri valovi se pojavljajo pri

- določenih vetrovih. Zbirka zaključenih raziskovalnih poročil. Piran. NIB-MBP Poročila MBP – Morska biološka postaja: št. 129, 20 str.
30. IBM (2012) IBM SPSS Statistics 21 Core System user's guide. IBM Corporation 1989:2012.
 31. ISO/TS 15216-1:2013 Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR Part 1: Method for quantification.
 32. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. Clin Microbiol Rev 1991; 4(suppl. 1): 80-128.
 33. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on realtime quantitative reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 2003; 41: 1548–57.
 34. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). Vet Microbiol 2010; 140: 360–70.
 35. Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima HS, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Z, Gojobori T, Takeda N. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk- like viruses. Virology 2002; 299: 225–39.
 36. Kay D, Kershaw S, Lee R, Wyer MD, Watkins J, Francis C. 2008. Results of field investigations into the impact of intermittent sewage discharges on the microbiological quality of wild mussels (*Mytilus edulis*) in a tidal estuary. Water Res. 42(12): 3033-3046.
 37. Khanna B, Spelbring JE, Innis BL, et al. Characterization of a genetic variant of human hepatitis A virus. J Med Virol 1992; 36: 118–24.
 38. Koopmans M, Vinjé J, de Wit M, et al. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. J Infect Dis 2000; 181 (Suppl 2): S262–9.
 39. Križman M, Biasizzo M, Zdovec I, Golob M, Ambrožič J, Molan K, Kirbiš A. Dejavniki virulence in odpornost izolatov *Escherichie coli* iz mesa in mesnih izdelkov. V: MAJDIČ, Gregor (ur.). 5. slovenski veterinarski kongres 2014 = 5th Slovenian Veterinary Congress 2014, Portorož, 14.-15. November 2014, (Slovenian veterinary research, ISSN 1580-4003, 2014, suppl. 16). Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2014, str. 126-127.
 40. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? J Antimicrob Chemother 2009; 64 (suppl. 1): 29-36.
 41. McCaustland KA, Bond WW, Bradley DW, Ebert JW, Maynard JE. Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month. J Clin Microbiol 1982; 16: 957–8.
 42. MKO, Ocena kemijskega in ekološkega stanja morja ter kakovosti vode v gojiščih školjk v Sloveniji v letu 2014
 43. Pravilnik o monitoringu kakovosti površinske vode za življenje in rast morskih školjk in morskih polžev (Ur. l. RS, št. 71/2002).
 44. Pravilnik o določitvi območij za gojenje morskih organizmov (Ur. l. RS št. 38/2015).

45. Uredba o kakovosti vode za življenje in rast morskih školjk in morskih polžev (Ur. l. RS 52/2007).
46. Riou, P., Le Saux, J.C., Dumas, F., Caprais, M.P., Le Guyader, F., Pommepuy, M. (2007) Microbial impact of small tributaries on water and shellfish quality in shallow coastal areas. *Water Research* 41, 2774-2786.
47. Robertson, B. H., R. W. Jansen, B. Khanna, A. Totsuka, O. V. Nainan, G. Siegl, A. Widell, H. S. Margolis, S. Isomura, K. Ito, et al. 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J. Gen. Virol.* 73:1365-1377.
48. Schmidt H, Karch H, Beutin L. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* α -hemolysin family. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 117: 189-96.
49. Siegl G, Weitz M, Kronauer G. Stability of hepatitis A virus. *Intervirology* 1984; 22: 218-26.
50. Sotlar Z. (2000) Skrb za kakovost slovenskega morja. *Slovenski vodar* 10. 11-15.
51. Trkov M, Berce I, Dovečar D, Grilc E, Bujko M, Kraigher A. Odkrivanje nekaterih genov, povezanih z virulenco, pri sevih *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe. *Zdravstveno varstvo* 2008; 47: 81-8.
52. Trkov M, Rupel T, Žgur Bertok D, Trontelj S, Avguštin G, Ambrožič-Avguštin J. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from different food sources. *Food Technol Biotechnol* 2014; 52(suppl. 2): 255-62.
53. Uredba (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila. UR l RS 2005; 338.
54. Uredba (ES) št. 854/2004 o določitvi posebnih predpisov za organizacijo uradnega nadzora proizvodov živalskega izvora, namenjenih za prehrano ljudi. UR L 2004; 139.
55. UREDBA KOMISIJE (ES) št. 1881/2006 z dne 19. decembra 2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih (UL L 364 20.12.2006, str. 5).
56. Uredba o emisiji Ur.l. RS, št. 47/2005, 45/2007, 79/2009 in 64/2012 o emisiji snovi in toplote pri odvajanju odpadnih vod v vode in javno kanalizacijo.
57. Uredba o stanju površinskih voda (Uradni list RS, št. [14/09](#), [98/10](#), [96/13](#) in [24/16](#)).
58. Vennema H, de Briun E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol* 2002; 25: 233-5.
59. Vodna direktiva 2000/60/EC (Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for community action in the field of water policy).
60. Vinjé J, Altena SA, Koopmans MP. The incidence and genetic variability of small roundstructured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* 1997; 176: 1374-8.
61. Weitz M, Baroudy BM, Maloy WL, et al. Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *J Virol* 1986; 60: 124-30.

62. Zdovc I, Golob M, Pirš T, Ambrožič J. Occurrence of ESBL-and AmpC-producing *Escherichia coli* isolates in poultry meat. V: Zbornik = Proceedings, X Simpozij Peradarski dani 2013 s mednarodnim sodelovanjem, Hrvatska, Šibenik, 15. - 18. svibnja 2013. Zagreb: Hrvatski veterinarski institut, Centar za peradarstvo, 2013, str. 39-44.
63. Zupančič G. Poročilo za potrebe CRP. Tokovne razmere in cirkulacija onesnažil na treh lokacijah školjčič v slovenskem morju. IZVRS, junij 2016. Str.1-12.
64. Zupančič, G., Peterlin, M., Gosar, L., Centa, M., Krajčič, J., Battelino, L. 2016. Maritima študija za podaljšanje pomola ter strokovne podlage za obalne ureditve. Inštitut za vode Republike Slovenije, 98 str.

