

Preživljavanje bakterijskih izolata kompleksa *Burkholderia cepacia* u vodi

Eržen, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:020304>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Monika Eržen

**Preživljavanje kompleksa bakterija
Burkholderia cepacia u vodi**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Monika Eržen

**Survival of isolates of *Burkholderia cepacia*
complex in water**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasni Hrenović na pruženoj pomoći i podršci te mnogim korisnim savjetima i kritikama tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svim svojim prijateljima, posebno Anamariji, Dunji i Petri uz koje je studiranje bilo lakše i zabavnije.

Posebno hvala mojoj obitelji i dečku Ivanu koji su bili uz mene te me podupirali tijekom svih ovih godina studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Preživljavanje kompleksa bakterija *Burkholderia cepacia* u vodi

Monika Eržen

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kompleks bakterija *Burkholderia cepacia* (BCC) skupina je gram-negativnih nefermentativnih bakterija. Prisutne su u prirodnom okolišu, ali se pojavljuju i kao oportunistički patogen u imunokompromitiranih bolesnika. Predmet ovog istraživanja bio je utvrditi mogućnost njihova preživljavanja i eventualnog umnažanja u autoklaviranoj komercijalnoj izvorskoj vodi siromašnoj i obogaćenoj nutrijentima. Za provedbu istraživanja korištena su četiri okolišna BCC izolata prethodno izolirana s divljeg odlagališta otpada, sedimenta potoka kod grada Zaboka, vode rijeke Krapine, poljoprivrednog tla gnojenog gnojem peradi te jedan klinički BCC izolat. Pojedinačni izolati BCC suspendirani su u vodi siromašnoj i obogaćenoj nutrijentima te su inkubirani na 22 °C tijekom 50 dana. Broj vijabilnih izolata BCC prebrojavan je na početku pokusa i u određenim vremenskim intervalima te je izračunat postotak preživljavanja svakog izolata. Rezultati su pokazali da su u vodi s dodatkom nutrijenata svi izolati uspješno preživjeli i umnažali se. U vodi siromašnoj nutrijentima umnažanje izolata bilo je slabije, ali su bolje preživjeli u odnosu na vodu obogaćenu nutrijentima. S obzirom da bakterije BCC mogu dugo preživjeti i umnažati se u vodi, okoliš se treba smatrati glavnim izvorom ovih patogena.

(41 stranica, 11 slika, 7 tablica, 101 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Burkholderia cepacia*, preživljavanje, voda, okoliš

Voditelj: prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Jasna Hrenović, izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner, izv. prof. dr. sc. Neven Bočić, prof. dr. sc. Vlasta Čosović

Zamjena: prof. dr. sc. Damir Bucković

Rad prihvaćen: 04. studenog 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Survival of isolates of *Burkholderia cepacia* complex in water

Monika Eržen

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The *Burkholderia cepacia* (BCC) bacterial complex is a group of gram-negative nonfermentative bacteria. They are present in the natural environment, but also appear as an opportunistic pathogen in immunocompromised patients. The subject of this research was to determine the possibility of their survival and eventual multiplication in autoclaved commercial spring water poor and rich in nutrients. Four environmental BCC isolates previously isolated from wild landfill, stream sediment near the town of Zabok, Krapina river water, agricultural soil fertilized with poultry manure and one clinical BCC isolate were used for the research. The individual BCC isolates were suspended in nutrient-poor and nutrient-rich water and incubated at 22 °C for 50 days. The number of viable BCC isolates was counted at the beginning of the experiment and at certain time intervals, and the survival rate of each isolate was calculated. The results showed that in water with the addition of nutrients, all isolates successfully survived and multiplied. In nutrient-poor water, the multiplication of isolates was weaker, but they survived better than nutrient-rich water. Since BCC bacteria can survive and multiply in water for a long time, the environment should be considered the main source of these pathogens.

(41 pages, 11 figures, 7 tables, 101 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: *Burkholderia cepacia*, survival, water, environment

Supervisor: PhD Jasna Hrenović, Prof.

Reviewers: PhD Jasna Hrenović, Prof., PhD Jasna Lajtner, Assoc. Prof., PhD Neven Bočić,
Assoc. Prof., PhD Vlasta Čosović, Prof.

Replacement: PhD Damir Bucković, Prof.

Thesis accepted: 4 November 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Opća obilježja kompleksa bakterija <i>Burkholderia cepacia</i>	1
1.1.1. O kompleksu bakterija <i>Burkholderia cepacia</i>	1
1.1.2. Taksonomija i nomenklatura.....	2
1.1.3. Rasprostranjenost i ekološki utjecaj.....	4
1.1.4. BCC u farmaciji.....	5
1.1.5. Osjetljivost na antibiotike.....	5
1.1.6. Širenje i načini prijenosa.....	6
1.2. Patogeneza kompleksa bakterija <i>Burkholderia cepacia</i>	7
1.2.1. Oportunistički patogen u ljudi.....	7
1.2.2. Cistična fibroza (CF).....	8
1.2.3. Kronična granulomatozna bolest (CGD).....	10
1.2.4. Infekcije izazvane bakterijama BCC.....	11
1.2.4.1. Respiratorne infekcije.....	11
1.2.4.2. Plućna bolest u pacijenata s CF.....	12
1.2.4.3. Ostale infekcije.....	14
1.3. Epidemiologija	14
1.3.1. MLST metoda u ispitivanju epidemiologije.....	15
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Prikupljanje uzoraka i izolacija BCC.....	18
3.2. Identifikacija i tipiziranje BCC izolata.....	18
3.3. Preživljavanje BCC izolata u vodi.....	19
4. REZULTATI	21
4.1. BCC izolati u vodi siromašnoj nutrijentima.....	21
4.2. BCC izolati u vodi obogaćenju nutrijentima.....	23
5. RASPRAVA	25
6. ZAKLJUČAK	29
7. LITERATURA	30
ŽIVOTOPIS	41

KRATICE

ATCC	američka kolekcija kultura sojeva (eng. <i>american type culture collection</i>)
BCC	kompleks bakterija <i>Burkholderia cepacia</i> (eng. <i>Burkholderia cepacia complex</i>)
BCESM	eng. <i>Burkholderia cepacia epidemic strain marker</i>
CF	cistična fibroza (eng. <i>cystic fibrosis</i>)
CFTR gen	transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu (eng. <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene</i>)
CFU	eng. <i>Colony Forming Units</i>
CGD	kronična granulomatozna bolest (eng. <i>chronic granulomatous disease</i>)
cm	centimetar
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
h	sat
KPK	kemijska potrošnja kisika (eng. COD, <i>chemical oxygen demand</i>)
LDC	lizin-dekarboksilaza
MALDI-TOF	eng. <i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
ml	mililitar
MLST	metoda tipiziranja višestrukih lokusa (eng. <i>multilocus sequence typing</i>)
ODC	ornitin-dekarboksilaza
PCR	reakcija lančanog umnožavanja (eng. <i>polimerase chain reaction</i>)
PHDC	eng. <i>Philadelphia-District Columbia</i>
RAPD	nasumično umnožavanje polimorfne DNK (eng. <i>randomly amplified of polymorphic DNA</i>)
RpoS	regulator odgovora na stres
ST	tip sekvence (eng. <i>sequence type</i>)

1. UVOD

1.1. Opća obilježja kompleksa bakterija *Burkholderia cepacia*

1.1.1. O kompleksu bakterija *Burkholderia cepacia*

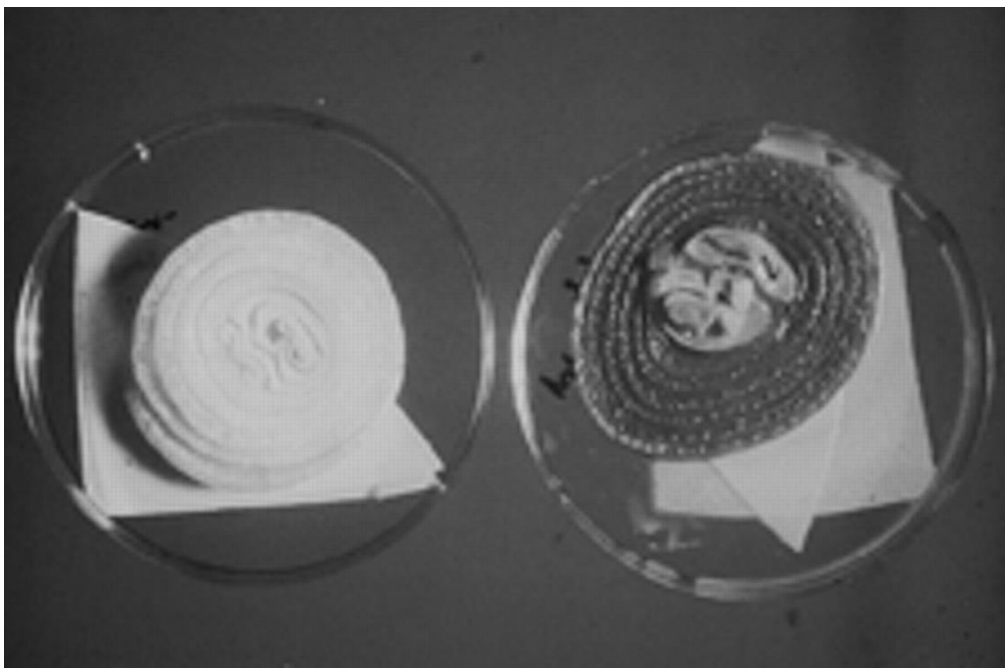
Kompleks bakterija *Burkholderia cepacia* (eng. *Burkholderia cepacia complex*, BCC) skupina je gram-negativnih nefermentativnih nesporogenih β -proteobakterija. Štapićastog su oblika te imaju sposobnost pokretanja jer posjeduju jedan ili više bičeva. Rastu u aerobnim uvjetima, odnosno uvjetima prisutnosti kisika na hranjivom agaru koji se koristi i za uzgoj drugih gram-negativnih bakterija, a za rast im je potrebna temperatura od 25 do 35 °C te inkubacija od 48 h. Boja bakterijskih kolonija BCC (**Slika 1.**) varira od sivobijele preko žute, crvenoljubičaste do smeđe (Vasiljević 2016). Bakterije BCC ne fermentiraju glukozu, ne produciraju amonijak iz aminokiseline arginina te su lizin-dekarboksilaza (LDC) i ornitin-dekarboksilaza (ODC) pozitivne (Palleroni i sur. 1984). S obzirom da su BCC vrste fenotipski veoma slične, ne mogu se razlikovati na temelju fenotipskih karakteristika (Planet i sur. 2010).



Slika 1. Bakterijske kolonije BCC na hranjivom agaru (izvor: Eržen 2021)

1.1.2. Taksonomija i nomenklatura

Bakteriju *B. cepacia*, tadašnjeg imena *Pseudomonas cepacia* prvi je opisao Walter H. Burkholder 1950. godine kao uzročnika bakterijske plijesni lukovice crvenog luka (lat. *Allium cepa*) (Slika 2.), dok se od 1980-tih godina pojavljuje kao oportunistički patogen koji uzrokuje brojne bolesti dišnog sustava (LiPuma 2010).



Slika 2. *B. cepacia* kao uzročnik bakterijske plijesni lukovice luka (izvor: Jones i sur. 2017)

Budući da se naziv *P. cepacia* prvotno nije nalazio na Odbrenom popisu imena bakterija, izgubio je položaj u bakterijskoj nomenklaturi. Međutim, popis su 1981. godine obnovili Palleroni i Holmes. *P. cepacia* te šest drugih vrsta, koje su se ubrajale u rod *Pseudomonas*, rRNA skupinu II, 1992. godine uvrštene su u rod *Burkholderia* (Yabuuchi i sur. 1992). Ovaj rod danas obuhvaća preko 90 *Burkholderia* vrsta otkrivenih tijekom mnogih istraživanja, a većina se njih nalazi u okolišu te ne uzrokuje bolest u zdravih ljudi (Vasiljević 2016).

Istraživanje, koje su sredinom 1990-ih godina proveli Vandamme i suradnici, pokazalo je veliku raznolikost između sojeva *B. cepacia*, odnosno da sojevi *B. cepacia*, koji su izolirani iz bolesnika s cističnom fibrozom (CF, eng. *cystic fibrosis*) te drugih izvora, pripadaju u nekoliko različitih vrsta (Vasiljević 2016). Te su se vrste zvale genomovar sve dok im nisu određena fenotipska obilježja. *B. cepacia* genomovar V opisana je kao vrsta *Burkholderia vietnamiensis*, dok

je *B. cepacia* genomovar II dobila naziv *Burkholderia multivorans*. Preostale grupe nazvane su *B. cepacia* genomovar I, III i IV. Pet navedenih genomskih vrsta nazvano je zajedničkim imenom kompleks *B. cepacia* (BCC) (**Tablica 1.**) (Coenye i sur. 2001).

B. cepacia smatra se službenim imenom za *B. cepacia* genomovar I, dok je *B. cepacia* genomovar IV klasificiran kao *Burkholderia stabilis*. Kasnijim su istraživanjima određene još dvije vrste bakterija koje pripadaju BCC. *B. cepacia* genomovar VI izoliran je iz pacijenta s CF u Sjedinjenim Američkim Državama i Velikoj Britaniji te je fenotipski sličan vrsti *B. multivorans*, dok je naziv *Burkholderia ambifaria* predložen za *B. cepacia* genomovar VII, a obuhvaća kliničke i okolišne izolate. Također, novijim je ispitivanjima ustanovljeno da BCC-u pripada i vrsta *Burkholderia pyrrocinia* (Coenye i sur. 2001). Najčešće se izoliraju vrste *Burkholderia cenocepacia* te *B. multivorans*, dok su najrjeđe izolirane vrste *Burkholderia anthina*, *B. ambifaria* i *B. pyrrocinia* (Planet i sur. 2010).

Neke od BCC vrsta uzrokuju kronične i vrlo teške infekcije respiratornog sustava u osoba koje boluju od CF, dok je za preostale vrste roda *Burkholderia* potvrđeno da nisu uzročnici infekcija. Izuzetak su vrste *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia fungorum* te *Burkholderia pseudomallei* (LiPuma 2010). *B. pseudomallei* smatra se uzročnikom melioidoze u ljudi i životinja. Nalazi se u obliku saprofita, odnosno organizma koji se hrani mrtvom organskom tvari u zemlji i vodi na području Jugoistočne Azije te sjevera Australije (Pitt i sur. 2006), a *B. gladioli* filogenetski se ne ubraja u BCC, no prema fenotipskim je obilježjima slična BCC vrstama (LiPuma 2010).

Tablica 1. Kompleks *B. cepacia* (izvor: Saiman i sur. 2014)

Vrsta	Genomovar klasifikacija	Godina identifikacije
<i>B. cepacia</i>	I	1950, 1997
<i>B. multivorans</i>	II	1997
<i>B. cenocepacia</i>	III	1997, 2003
<i>B. stabilis</i>	IV	1997, 2000
<i>B. vietnamiensis</i>	V	1995, 1997
<i>B. dolosa</i>	VI	2001, 2004
<i>B. ambifaria</i>	VII	2001
<i>B. anthina</i>	VIII	2002
<i>B. pyrrocinia</i>	IX	2002

Nastavak tablice 1.

<i>B. ubonensis</i>	...	2000, 2008
<i>B. latens</i>	...	2008
<i>B. diffusa</i>	...	2008
<i>B. arboris</i>	...	2008
<i>B. seminalis</i>	...	2008
<i>B. metallica</i>	...	2008
<i>B. contaminans</i>	...	2009
<i>B. lata</i>	...	2009
<i>B. pseudomultivorans</i>	...	2013
<i>B. stagnalis</i>	...	2015
<i>B. territorii</i>	...	2015

1.1.3. Rasprostranjenost i ekološki utjecaj

Zahvaljujući genotipskoj i fenotipskoj plastičnosti, sposobnosti brze mutacije i adaptacije na nova staništa, BCC široko je rasprostranjen u okolišu te nastanjuje mnoge prirodne i antropogene niše (Coenye i sur. 2001).

Bakterije BCC najčešće su prisutne u prirodnom okolišu poput tla, vode te biljne rizosfere (Muller i sur. 2002; Tavares i sur. 2020). Međutim, raspodjela ovih bakterija između staništa nije jednolika. Primjerice, *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis* i *B. ambifaria* karakteristične su za biljnu rizosferu, dok *B. vietnamiensis*, *B. anthina* i *B. seminalis* najčešće nastanjuju vodene okoliše. No, ekološko podrijetlo nekih vrsta BCC nije potpuno određeno. Recimo, neki izvori navode da je najčešće stanište bakterije *B. multivorans* voda, dok drugi smatraju da je tlo njihova najčešća niša (Tavares i sur. 2020). Osim navedenih ekosistema, mogu biti izolirane iz industrijskih područja, bolnica te inficiranih ljudi i životinja (Mahenthiralingam i sur. 2008; Vial i sur. 2011).

Iako se BCC vrste ne ističu kao patogen biljaka, najznačajnije su kao fitopatogen crvenog luka u kojeg izazivaju truljenje lukovice (Vasiljević 2016). Zbog metaboličke raznolikosti te sposobnosti stvaranja simbioze s biljkama, ove bakterije imaju značajnu ulogu u poticanju rasta biljaka, bioremedijaciji te biološkoj kontroli (**Tablica 2.**) (Tavares i sur. 2020). Neke od bakterija BCC mogu fiksirati dušik te time pospješiti rast i razvoj biljaka, a kao biopesticidi upotrebljavaju se za zaštitu poljoprivrednih kultura od gljivičnih oboljenja (Vasiljević 2016). Budući da posjeduju

sposobnost razlaganja mnogih toksičnih tvari poput toulena, organskih otapala koja sadrže klor te aromatskih spojeva klora u pesticidima i herbicidima, bakterije BCC mogu provoditi bioremedijaciju tla (Mahenthiralingam i sur. 2005). No, s obzirom da ovi mikroorganizmi uzrokuju brojne bolesti respiratornog sustava u ljudi, njihova je primjena u biologiji minimalna (Chiarini i sur. 2006; Holmes i sur. 1998).

Tablica 2. Pozitivni i negativni utjecaji prisutnosti bakterija BCC (Tavares i sur. 2020)

Kompleks bakterija <i>Burkholderia cepacia</i>	
Pozitivni utjecaji	Negativni utjecaji
sredstva za bioremedijaciju: razgradnja zagađivača koje je stvorio čovjek	zagađivač sterilnih i nesterilnih farmaceutskih proizvoda i proizvoda za osobnu njegu
poticanje rasta biljaka (fiksacija N ₂ , uklanjanje željeza, proizvodnja fitohormona)	oportunistički patogen (CF, CGD, imunokompromitirani pacijenti, starije osobe, novorođenčad)
proizvodnja antimikrobnih spojeva koji štite usjeve od drugih bakterija i gljivičnih bolesti	uzročnik biljnih bolesti (npr. trulež luka)

1.1.4. BCC u farmaciji

Osim u prirodi, bakterije BCC nalaze se i u sterilnim te nesterilnim farmaceutskim proizvodima. Najčešće su prisutne u nesterilnim vodenim farmaceutskim proizvodima namijenjenim pacijentima koji su najosjetljiviji na infekciju bakterijama BCC. Među glavnim uzročnicima onečišćenja spomenutih proizvoda ističu se neodgovarajući postupci čišćenja, korištenje vode iz slavine za ispiranje laboratorijske opreme, nepravilna kontrola sustava za proizvodnju vode, neadekvatna mikrobiološka ispitivanja, kontaminacija početnih materijala i pribora, neodgovarajuće skladištenje i sterilizacija. Bakterije BCC mogu se razviti i u otopinama s konzervansima. Koncentracija ovih bakterija u početku je vrlo niska, međutim u nekoliko tjedana farmaceutski proizvod postaje potpuno kontaminiran (Carlotti 2018).

1.1.5. Osjetljivost na antibiotike

Zahvaljujući različitim mehanizmima poput enzimske inaktivacije, promjene ciljnog mjesta te nepropusnosti stanične stijenke, BCC vrste pokazuju urođenu rezistenciju na polimiksine, aminoglikozide te većinu beta-laktamskih antibiotika. Međutim, u prirodnim životnim uvjetima iliti uvjetima „*in vivo*“ mogu razviti otpornost na gotovo sve antimikrobne lijekove (Drevinek i Mahenthiralingam 2010).

Zbog odsutnosti vezujućeg mjesta na lipopolisaharidu, bakterije BCC urođeno su rezistentne na polimiksine i aminoglikozide, dok je otpornost na beta-laktamske antibiotike posljedica niske permeabilnosti unutarnje membrane i inducibilnih beta-laktamaza (Cox i Wilkinson 1991; Paap-Wallace i sur. 2013; Poirel i sur. 2009). Iako su spomenute bakterije otporne na gotovo sve antibiotike, na njih još uvijek uspješno djeluju antibiotici poput meropenema, ceftazidima, minociklina, sulfametoksatola te kloramfenikola (CLSI 2019; EUCAST 2021).

1.1.6. Širenje i načini prijenosa

Postoji sve više potvrda da BCC vrste, koje su prisutne u prirodi, mogu uzrokovati infekcije u pacijenata s CF. Primjerice, soj bakterije *B. cepacia* ATCC 25416T, koji je dobiven iz lukovice crvenog luka, pronađen je i u pacijenata s CF u Velikoj Britaniji, dok je soj bakterije *B. cenocepacia* PHDC, koji se najčešće izolira iz bolesnika s CF u Sjedinjenim Američkim Državama, nađen na poljoprivrednom zemljištu na istom području gdje i klinički izolat (Govan i sur. 2000; LiPuma i sur. 2002). Analizom okolišnih te kliničkih izolata dobivenih iz 28 zemalja potvrđeno je da oko 22 % kliničkih izolata ima ista obilježja kao i izolat iz prirode (Baldwin i sur. 2007).

S obzirom da bakterije BCC nisu sastavni dio fiziološke flore čovjeka, većina se pacijenata pozitivnih na BCC, posebice onih koji nisu u kontaktu s pacijentima koji imaju CF, može zaraziti u prirodnom okolišu (Nørskov-Lauritsen i sur. 2010). No, najveći broj infekcija u pacijenata s CF nastaje kao posljedica međuljudskog prijenosa. Takvim se načinom prijenosa najčešće prenosi bakterija *B. cenocepacia*. Infekcija BCC vrstama može se prenijeti između pacijenata koji imaju CF u bolničkom okruženju, ali i izvan njega te s pacijenata koji imaju CF na one koji je nemaju (Govan i sur. 1993; Holmes i sur. 1999).

Zbog kontaminiranih površina i direktnog kontakta sa zaraženim pacijentima te zdravstvenim radnicima, smještaj bolesnika u bolnicu predstavlja najveći izvor zaraze BCC vrstama. Izvor zaraze čini i kontaminirana oprema poput respiratora i raspršivača te boravak u sobi sa zaraženim pacijentom. Veliku ulogu u širenju bakterija BCC ima i socijalni kontakt poput plesanja i rukovanja (Fung i sur. 1998). To dokazuju i istraživanja provedena 1990. godine u ljetnim kampovima na pacijentima s CF. Ukupno 6 % kampera postalo je pozitivno na BCC vrste nakon boravka u kampovima te su svi imali isti soj (Pegues i sur. 1994).

Budući da se tzv. transatlantski klon ET12 (elektroforetski tip ili Edinburgh/Toronto tip), koji pripada vrsti *B. cenocepacia*, vrlo brzo i lako prenosi, smatra se najštetnijim sojem BCC vrsta. 1970-ih godina ovaj soj prenio se između Sjeverne Amerike i Europe kada su u ljetnom kampu u

Kanadi boravili i pacijenti iz Velike Britanije (Fung i sur. 1998). U prošlosti se smatralo da se brzi prijenos ovog soja temelji na postojanju dva markera prenosivosti – „*cable*“ pilusa koji je kodiran genom *cblA* te BCESM (*Burkholderia cepacia epidemic strain marker*) kodiranog genom *esmR*. Zbog prisutnosti tih markera, soj ET12 se smatrao specifičnim. Međutim, daljnjim su istraživanjima markeri *cblA* i BCESM otkriveni i u ostalim BCC vrstama. Isto tako, i sojevi bez tih markera mogli su uzrokovati infekcije (De Soyza i sur. 2004; Turton i sur. 2009). Stoga, dokazano je da *cblA* i BCESM nisu dovoljno točni pokazatelji brzine prijenosa zaraze (Govan i sur. 2007).

1.2. Patogeneza kompleksa bakterija *Burkholderia cepacia*

1.2.1. Oportunistički patogen u ljudi

Iako BCC vrste pozitivno utječu na proces bioremedijacije, biološku kontrolu te biljni rast, njihovo ispuštanje u okoliš predstavlja problem (Tavares i sur. 2020). Kao problematični patogen pojavile su se prije tridesetak godina (Mahenthiralingam i sur. 2008). Istraživanja o ljudskim infekcijama, koje su uzrokovane BCC vrstama, prije 1980-ih godina bila su ograničena samo na hospitalizirane pacijente koji su bili izloženi kontaminiranim površinama i otopinama, a uključivala su infekcije mekih tkiva, respiratornog i mokraćnog sustava te bakterijemije povezane s infekcijama endokarda i septičkim šokom (Govan i sur. 1996).

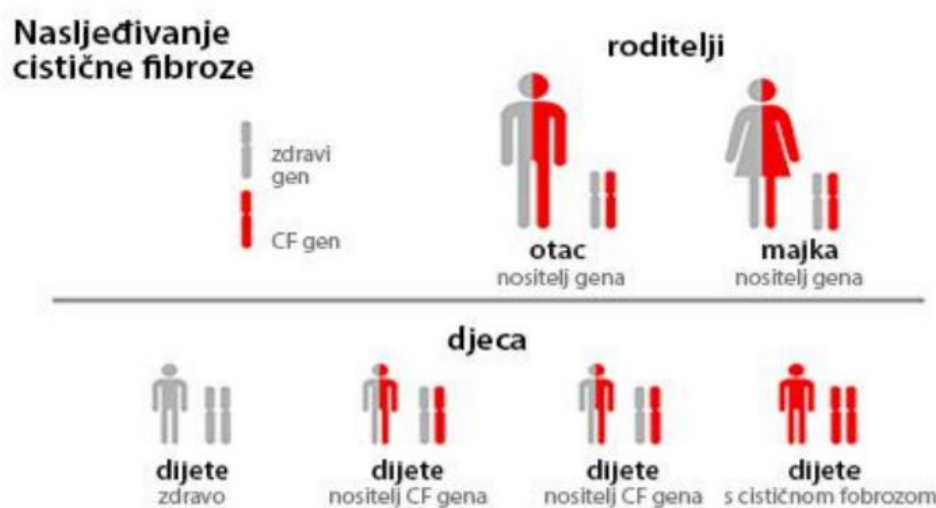
Velik broj bakterija BCC može uzrokovati vrlo teške infekcije respiratornog sustava u pacijenata koji boluju od CF i kronične granulomatozne bolesti (CGD, eng. *chronic granulomatous disease*), a osim njih, obolijevaju i imunokompromitirani pojedinci, novorođenčad te starije i slabije osobe. BCC vrste rijetko uzrokuju infekcije u zdravih, odnosno imunokompetentnih osoba, budući da se odstranjuju normalnom mukocilijarnom aktivnošću iz dišnih puteva, dok se u pacijenata koji nemaju CF, ali su pozitivni na BCC, razvijaju teški simptomi koji zahtijevaju upotrebu venskih i urinarnih katetera, endotrahealnih cijevi, hemodijalize te ostale hospitalizacije (Tavares i sur. 2020).

Iako je broj pacijenata oboljelih od CF i zaraženih bakterijom *Pseudomonas aeruginosa* mnogo veći u odnosu na one koji su zaraženi BCC vrstama, klinička slika onih s BCC vrstama mnogo je ozbiljnija. Najčešće se prenose *B. cepacia* te *B. multivorans*, dok su *B. dolosa*, *B. stabilis*, *B. cepacia* i *B. contaminans* manje zastupljene te uzrokuju lakšu kliničku sliku. Isto tako, bakterija *B. gladioli*, iako nije član BCC, usko je povezana s kompleksom i također se smatra uzročnikom

respiratornih infekcija u pacijenata s CF, ali je pronađena i u pacijenata s CGD te pacijenata koji nemaju CF (Tavares i sur. 2020).

1.2.2. Cistična fibroza (CF)

Cistična fibroza, drugog imena mukoviscidoza, prvi je puta opisana 1938. godine (Andersen 1938). Autosomalno je recesivno nasljedna bolest u pripadnika bijele rase, odnosno dijete od svakog roditelja nasljeđuje jednu kopiju „bolesnog gena“, međutim roditelji ne pokazuju nikakve simptome navedene bolesti (**Slika 3.**). Ukoliko dijete naslijedi „zdravi gen“ od jednog roditelja, a „bolesni gen“ od drugog roditelja, ono neće biti bolesno, no bit će nositelj bolesti, odnosno prenijet će ju na potomstvo (Čović 2020). CF najčešće zahvaća egzokrine žlijezde, ali i brojne druge epitelne organe (Andersen 1938). Godine 1989. otkriven je gen CF koji uzrokuje mutacije, međutim još uvijek nije poznato kako taj gen može uzrokovati razne aspekte bolesti (Rommens i sur. 1989).



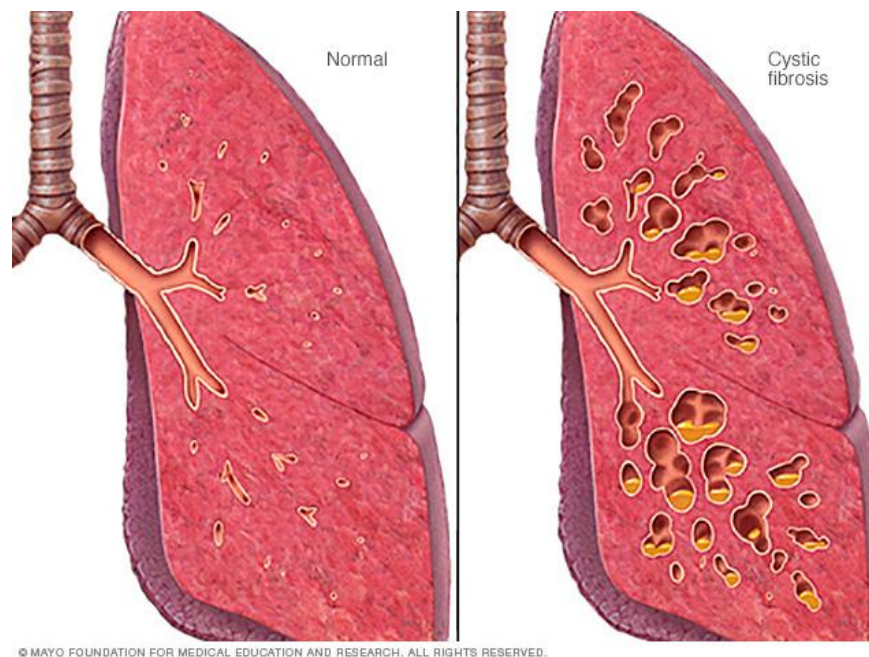
Slika 3. Nasljeđivanje cistične fibroze (CF) (izvor: Čović 2020)

U prošlosti su bolesnici umirali već u prvoj godini života od malapsorpcije i proljeva, no napretkom medicine danas prosječno žive oko četrdesetak godina, a novorođeni bolesnici i 50 godina (Ratjen i sur. 2003). U Republici Hrvatskoj životni vijek oboljelih od CF je također dulji nego je bio prije dvadesetak godina (Čović 2020). CF se smatra najčešćom recesivno nasljednom bolesti u sjeverozapadnoj Europi i Sjedinjenim Američkim Državama s učestalošću od oko 1:3 000 živorođenih i postotkom od 4-5 % heterozigotnih prenositelja u općoj populaciji (Ratjen i sur.

2003). Podaci Europskog društva za cističnu fibrozu pokazuju da je 2010. godine u Europi registrirano više od 32 000 oboljelih od ove bolesti (Zolin i sur. 2014). U drugim je rasama incidencija CF puno manja – u crnoj rasi iznosi 1:15 000, a u žutoj 1:32 000 (Ratjen i sur. 2003).

Oboljenje nastaje kao posljedica jedne ili više mutacija CFTR gena (eng. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene*) koji je lociran na dugom kraku sedmog kromosoma, a kao produkt gena nastaje CFTR-protein koji ima ulogu kloridnog kanala reguliranog cAMP-om (Childers i sur. 2007; Vasiljević 2016). Osim što provodi regulaciju membranskih kloridnih kanala, kontrolira i transport iona natrija (ENaC), bikarbonata te drugih kloridnih kanala (Davis i sur. 1996; Ratjen i sur. 2003). Nastalim mutacijama u genu proteina CFTR dolazi do promjena u regulaciji transporta iona natrija i klora, a time i do dehidracije sekreta koji oblaže površinu dišnih puteva. Budući da sekret postaje gust i žilav, vrlo se teško odstranjuje prirodnim putem te dolazi do začepjenja, cistične promjene žljezdanih kanalića te razaranja žljezdanog tkiva (**Slika 4.**). Otuda i potječe naziv cistična fibroza ili mukoviscidoza (Ratjen i sur. 2003). U osoba s CF često se javljaju infekcije dišnih puteva koje se ne mogu izliječiti antibioticima te su pluća tih pacijenata puna bakterija. Jedan od mikroorganizama, koji uzrokuje brojne probleme osobama koje boluju od CF, jest i kompleks BCC, budući da se teško liječi te utječe na brzinu pogoršanja plućne bolesti (Regan i sur. 2016).

Poznate su brojne varijacije u fenotipskim ekspresijama ove bolesti. Primjerice, većina homozigota s mutacijom phe508del ima tešku plućnu bolest s difuznim bronhiektazijama i insuficijenciju gušterače, a muškarci su i neplodni. No, oboljele osobe s tom mutacijom mogu imati različito težak stupanj plućne bolesti. Otuda proizlazi činjenica da ekspresija CF, osim o mutaciji CFTR gena, ovisi i o modificirajućim genima te vanjskim čimbenicima (Sliker i sur. 2005).



Slika 4. Pluća zdrave osobe i osobe s cističnom fibrozom (CF) (izvor: Petrović 2018)

1.2.3. Kronična granulomatozna bolest (CGD)

Kronična granulomatozna bolest je poremećaj koji oštećuje imunološki sustav. Nastaje zbog nemogućnosti leukocita da stvore aktivne spojeve kisika poput vodikova peroksida, superoksida i ostalih kemijskih tvari koji ubijaju patogene te zbog poremećene baktericidne funkcije fagocita. Prvi je puta otkrivena 1950. godine u četiri dječaka iz američke države Minnesota. U više od 50 % slučajeva bolest se nasljeđuje kao spolno vezana ili X-vezana, odnosno prenosi se s majke na djecu, dok se u preostalim slučajevima prenosi autosomno recesivno. Većinom se pojavljuje u ranom djetinjstvu, a u manjem se broju javlja tek u pubertetskom razdoblju. Najčešće pogađa dječake, a u djevojaka se javlja tek u 20 % njih. Najvažniji znak bolesti su granulomi koji se javljaju kao rezultat teških infekcija poput kronične infekcije kože, pluća, limfnih čvorova, usta, nosa i crijeva (**Slika 5.**) (MSD 2014).



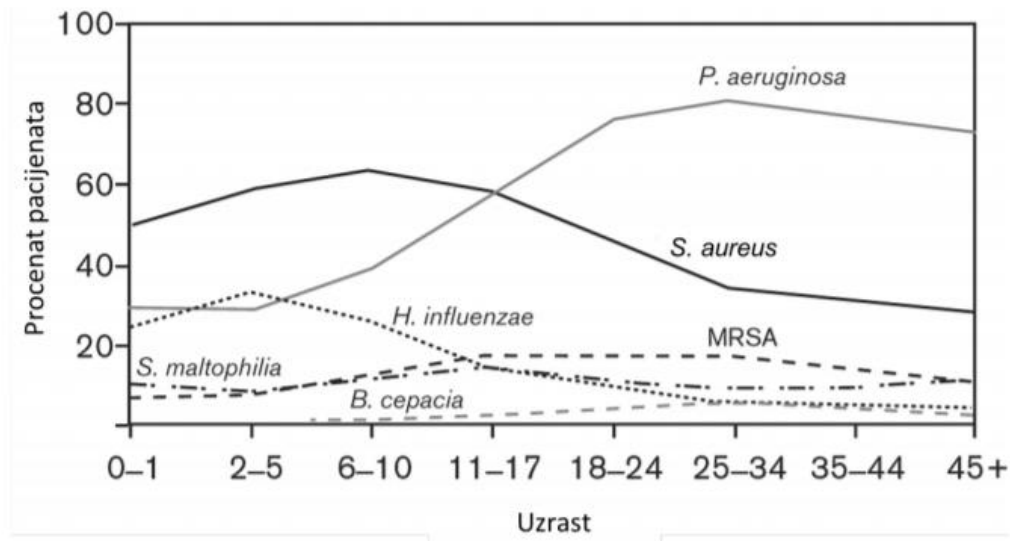
Slika 5. Kronična granulomatозна bolest (CGD) (izvor: <https://hr.plantscienceoou.com/chronic-granulomatous-disease-pathology>)

1.2.4. Infekcije izazvane bakterijama BCC

1.2.4.1. Respiratorne infekcije

Oštećenje dišnog sustava posljedica je nakupljanja mikroorganizama i pojave infekcije, a smatra se glavnim uzročnikom morbiditeta i mortaliteta u pacijenata s CF. Istraživanjima je dokazano da preko 80 % osoba oboljelih od CF umire od upale pluća direktnim ili indirektnim putem (Hauser i sur. 2011). Iako je raspon uzročnika respiratornih infekcija vrlo uzak, upale su najčešće polimikrobne (Rabin i Surette 2012). Jedan od uzročnika su i bakterije BCC, međutim rijetko izazivaju upale u zdravih osoba, već su češća pojava u pacijenata s CF (**Slika 6.**) (LiPuma 2010).

Plućne su infekcije u BCC-pozitivnih osoba rezultat nemogućnosti mukocilijarnog sustava da odstrani mikroorganizme koji imaju sposobnost prodiranja u donje dišne puteve. Budući da je aktivnost proteina surfaktanta, prirodnih peptida i defenzina smanjena, olakšano je bakterijsko umnažanje i infekcija te je umanjena učinkovitost prirodnih obrambenih mehanizama (Cantón i sur. 2010). Također, mutacije u genu uzrokuju hiperinflamatorno stanje u dišnim putevima pacijenata s CF s mnoštvom neutrofila i citokina čime dolazi do oštećenja stanica i smanjene mogućnosti odstranjivanja mikroorganizama (Hauser i sur. 2011).



Slika 6. Grafički prikaz distribucije pacijenata s respiratornim infekcijama prema starosnim kategorijama (izvor: Vasiljević 2016)

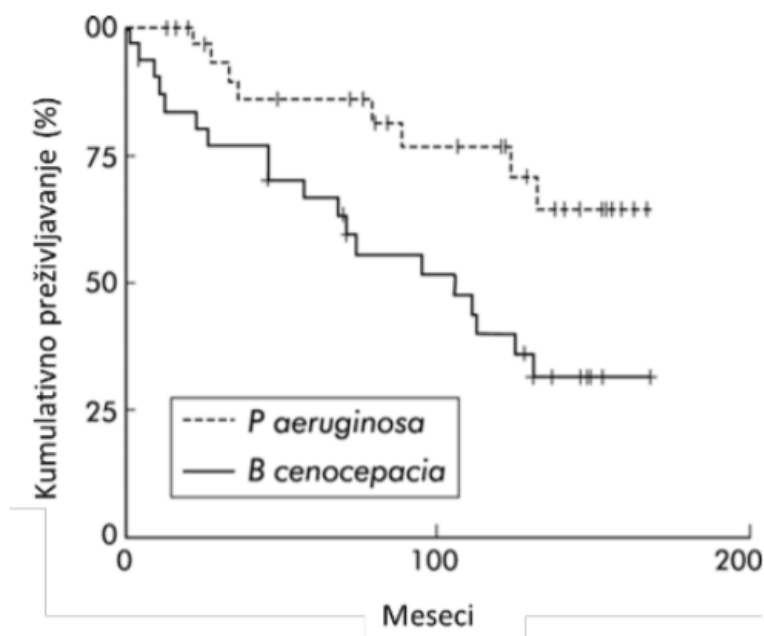
1.2.4.2. Plućna bolest u pacijenata s CF

Plućna je bolest prisutna u gotovo svih osoba oboljelih od CF, međutim početak bolesti jest različit. U nekim bolest započinje odmah nakon rođenja, dok se kod ostalih pojavljuje kasnije (Koch i sur. 1993; Ratjen 2009). S obzirom na rezistentnost na antibiotike te sposobnost brzog i lakog prijenosa među ljudima, *B. cepacia* smatra se jednom od najčešćih bakterijskih skupina koja uzrokuje plućne infekcije u osoba koje boluju od CF. Takva infekcija može trajati mjesecima, ali i godinama te naposljetku završiti smrću (Isles i sur. 1984; Ledson i sur. 2002).

Istraživanje, koje su 1984. godine proveli Isles i suradnici, pokazalo je ubrzano pogoršanje respiratorne funkcije popraćeno nekrotizirajućom upalom pluća te sepsom. Smatralo se da je pogoršanje uzrokovano bakterijom *B. cepacia* koja pripada BCC, međutim kasnije je otkriveno da je uzrok bolesti vrsta *B. cenocepacia* koja također pripada istoj skupini (Vasiljević 2016). BCC vrste imaju sposobnost prilagođavanja stresnim uvjetima kakvi su prisutni u plućima pacijenata oboljelih od CF te ih je odatle gotovo nemoguće iskorijeniti što na kraju dovodi do smrtonosne nekrotizirajuće upale pluća, odnosno sindroma cepacije (Tavares i sur. 2020). Godine 2001. Sajjan i suradnici proveli su istraživanje kojim su utvrdili ponašanje bakterije *B. cenocepacia* u plućima pacijenata s CF oboljelih od sindroma cepacije. Bakterijske su stanice nađene u eksudatu u lumenu bronha te između stanica respiratornog epitela. U bolesnika s kroničnom infekcijom bakterije su

bile difuzno raspoređene, dok su se u onih s akutnom infekcijom nalazile na oštećenim epitelnim površinama te u gnojnim upalama. Kako je infekcija napredovala, tako je *B. cenocepacia* migrirala kroz epitelnu barijeru te zahvatila plućni parenhim i kapilare uzrokujući septikemiju, odnosno sepsu kod koje je dokazano postojanje bakterija u krvi (Sajjan i sur. 2001).

Ovaj je sindrom zamijećen u više od 20 % inficiranih pacijenata, dok je u ostalih plućna funkcija bila prilično stabilna ili je dolazilo do njenog postupnog pogoršanja. Njime je dokazano da vrsta *B. cepacia* posjeduje sposobnost izazivanja infekcija kakve nisu primijećene kod drugih uzročnika CF. Primjerice, u pacijenata zaraženih vrstom *B. cepacia* smrtnost je bila veća nego u pacijenata zaraženih *P. aeruginosa* (Slika 7.) (Jones i sur. 2004; Thomassen i sur. 1985). Infekcije su često bile popraćene psihosocijalnim problemima te osjećajem izoliranosti i straha. No, klinički se ishod bolesnika zaraženih *B. cepacia* nije mogao predvidjeti (Duff 2002). Povećana prisutnost bakterija BCC otežavala je odluku o transplantaciji pluća, budući da je o količini bakterija ovisilo preživljavanje. Međutim, neka istraživanja tvrde da je preživljavanje nakon transplantacije bilo veće od 75 %, dok druga pokazuju da je smrtnost iznosila od 50 do 100 %. Najveći postotak smrtnosti uzrokovala je bakterija *B. cenocepacia* (Chaparro i sur. 2001; De Soya i sur. 2001).



Slika 7. Grafički prikaz stope preživljavanja pacijenata s CF zaraženih bakterijom *B. cenocepacia* i pacijenata s CF zaraženih bakterijom *P. aeruginosa* (izvor: Vasiljević 2016)

1.2.4.3. Ostale infekcije

Bolničke infekcije, među kojima se najčešćom smatra bakterijemija, također su uzrokovane bakterijama BCC. Nastaju kao rezultat onečišćenja antiseptika ili dezinficijensa, fiziološke otopine te mnogih drugih farmaceutskih, higijenskih i kozmetičkih proizvoda (Kim i sur. 2015; Magalhães i sur. 2003; Mahenthiranlingam i sur. 2008; Sousa i sur. 2011). Simptomi ovih infekcija veoma su teški te zahtijevaju boravak na odjelu intenzivne njege, hemodijalizu, pričvršćivanje središnjeg venskog katetera, upotrebu stalnog urinarnog katetera i mehaničku ventilaciju (Bressler i sur. 2007; Hanulik i sur. 2013; Mann i sur. 2010).

1.3. Epidemiologija

Epidemiologija bakterija BCC vrlo je kompleksan problem (Govan i sur. 2007). Već 1970-ih godina pojavili su se povremeni zapisi o infekcijama koje su uzrokovane bakterijom *B. cepacia* u pacijenata s CF na području Kanade. Nakon istraživanja provedenog 1984. godine potaknuta je sve češća izolacija ove bakterije iz izlučevina respiratornog sustava BCC-pozitivnih osoba, s obzirom da je u razdoblju od 1970. do 1981. godine uočena povećana stopa smrtnosti od 18 % koja je posljedica infekcije izazvane vrstom *B. cepacia* (Isles i sur. 1984). Velik porast smrtnosti uzrokovan identičnom infekcijom uočen je i u bolesnika s CF u Sjevernoj Americi, Irskoj te Velikoj Britaniji (Pitt i sur. 1996; Thomassen i sur. 1985). Međutim, daljnim taksonomskim analizama utvrđeno je da je uzročnik infekcije vrsta *B. cenocepacia* koja se smatra najraširenijim patogenom BCC u gotovo svih bolesnika koji boluju od CF (LiPuma i sur. 2001; Mahenthiralingam i sur. 2001). U odnosu na prošlo stoljeće, stopa smrtnosti danas se znatno smanjila na području Sjeverne Amerike te zapadne Europe, a kreće se od 1,4 % do 6 % (CFF 2014; CFC 2015; Zolin i sur. 2014).

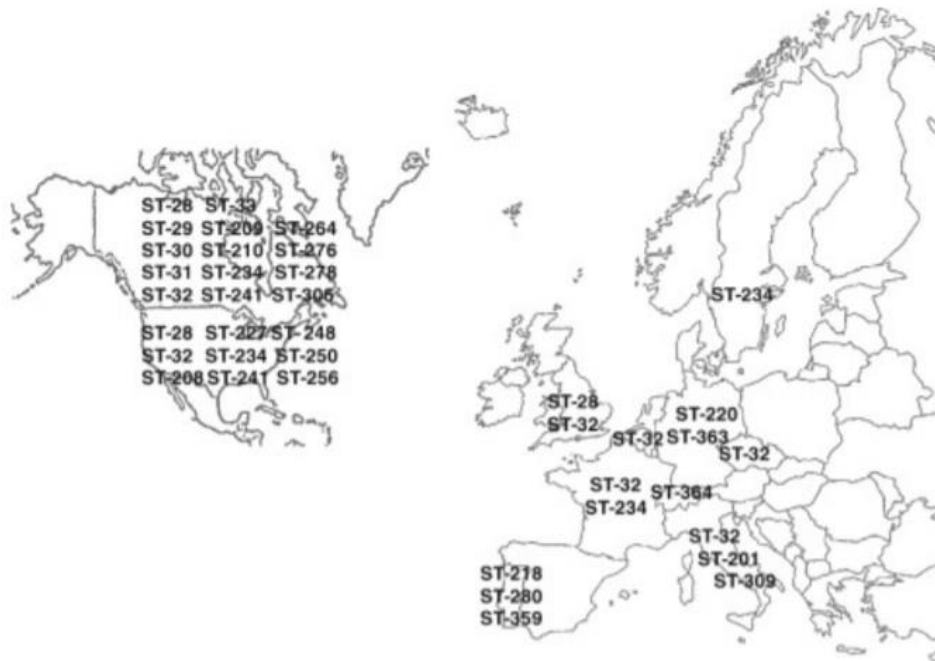
Soj ET12 jedan je od najštetnijih sojeva bakterije *B. cenocepacia* i uzročnik je mnogih vrlo teških infekcija. 1990-ih godina pronađen je u više od jedne trećine zaraženih pacijenata u Velikoj Britaniji i Irskoj (Pitt i sur. 1996). Spomenuti soj ET12 te ostali kanadski epidemijski sojevi (eng. *random amplified polymorphic DNA* ili RAPD tipovi 01, 04 i 06), češki epidemijski klon CZ1 te sicilijanski epidemijski klon pripadaju *B. cenocepacia* IIIA podskupini, dok dominantni epidemijski klonovi bakterije *B. cenocepacia* u Sjedinjenim Američkim Državama obuhvaćaju Midwest klon i PHDC soj te se ubrajaju u IIIB podskupinu (Agodi i sur. 2001; Chen i sur. 2001; Coenye i sur. 2002; Drevinek i sur. 2005; Speert i sur. 2002).

Najštetnijim BCC vrstama smatraju se *B. cenocepacia* i *B. multivorans* koje uzrokuju više od 85 % infekcija (Drevinek i sur. 2010). Međutim, udio infekcija izazvanih bakterijom *B. cenocepacia* te bakterijom *B. multivorans* je različit (Føweraker 2009; Nørskov-Lauritsen i sur. 2010). Primjerice, u Češkoj i Italiji najveći broj infekcija uzrokuje bakterija *B. cenocepacia*, dok je u Kanadi, Velikoj Britaniji, Sjedinjenim Američkim Državama, Francuskoj, Belgiji i mnogim drugim državama najznačajnija *B. multivorans* (Baldwin i sur. 2008; Drevinek i sur. 2005; Golini i sur. 2006; Govan i sur. 2007). Ostale BCC vrste zastupljene su u manjoj brojnosti, npr. u Sjedinjenim Američkim Državama, osim navedenih vrsta, prisutne su i *B. cepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* te *B. dolosa* i uzrokuju više od 16 % infekcija, dok su u Portugalu zastupljene *B. cepacia* (36,4 %) i *B. stabilis* (18,2 %). U Brazilu velik postotak infekcija uzrokuje *B. vietnamiensis* (15,2 %), dok se u Argentini i Španjolskoj dominantnom smatra *B. contaminans* (58 %) (Carvalho i sur. 2007; Cunha i sur. 2003; Martina i sur. 2013; Medina-Pascual 2015; Reik i sur. 2005).

S obzirom da *B. cenocepacia* najčešće uzrokuje plućnu infekciju te izaziva smrt nakon transplantacije, smatra se najpatogenijom bakterijom (Planet i sur. 2010). Primjerice, u Velikoj Britaniji u pacijenata oboljelih od CF, a zaraženih bakterijom *B. cenocepacia* postotak preživljavanja iznosi 66,6 %, dok je u osoba zaraženih bakterijom *P. aeruginosa* 85,3 % (Jones i sur. 2004). Međutim, udio preživjelih osoba nije jednak u svim zemljama, npr. u Češkoj postotak preživjelih pacijenata iznosi oko 91,4 %. Smatra se da su različiti udjeli preživjelih osoba rezultat razlika između sojeva bakterije *B. cenocepacia*. Dok su češki pacijenti bili zaraženi sojem CZ1, soj ET12 bio je odgovoran za infekciju u Velikoj Britaniji (Drevinek i sur. 2005; Jones i sur. 2004). Međutim, iako se oba soja ubrajaju u *B. cenocepacia* podskupinu IIIA, imaju različit stupanj patogenosti na što ukazuju i rezultati dobiveni provedenim istraživanjem.

1.3.1. MLST metoda u ispitivanju epidemiologije

Primjenom MLST metode, odnosno metode tipizacije sekvencioniranjem više lokusa utvrđeno je da postoji razlika u stupnjevima genetske povezanosti između i unutar pojedinačne epidemijske linije. Iako poneki klonovi ET12 soja pripadaju istom tipu nukleotidnog slijeda (ST, eng. *sequence type*), mnogi drugi imaju i po nekoliko različitih ST-ova. Otkriveno je da izolati ET12 soja pripadaju u najmanje pet različitih ST-ova, dok je samo ST28 klon ET12 soja te je upravo on uzročnik širenja epidemije između Kanade i Velike Britanije. Međutim, *B. cenocepacia* i dalje se smatra jednim od najopasnijih patogena (**Slika 8.**) (Vasiljević 2016).



Slika 8. Rasprostranjenost sojeva *Burkholderia cepacia* IIIA podskupine (izvor: Vasiljević 2016)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi hoće li četiri okolišna BCC izolata koji su prikupljeni na različitim područjima Hrvatske i jedan klinički BCC izolat dobiven iz brisa rane pacijenta u Općoj bolnici Karlovac preživjeti te se eventualno umnožiti u autoklaviranoj komercijalnoj vodi siromašnoj ili obogaćenj nutrijentima. Dobivene rezultate potrebno je usporediti s otprije poznatim podacima o preživljavanju i umnažanju kompleksa BCC u vodi te odrediti njihovo značenje za buduća istraživanja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Prikupljanje uzoraka i izolacija BCC

Za provedbu istraživanja koristili su se uzorci prikupljeni na pet različitih lokacija (**Tablica 3.**). Prvi je uzorak bio površinski sloj tla, a prikupljen je na divljem odlagalištu krutog otpada Lobarika 2 koje se nalazi u Istri. Sediment potoka koji prima gradsku otpadnu vodu predstavljao je drugi uzorak, a sakupljen je nizvodno od grada Zaboka koji se nalazi u Hrvatskom Zagorju. Treći je uzorak bila voda rijeke Krapine prikupljena nizvodno od ispuštanja nepročišćenih bolničkih voda Opće bolnice Zabok, dok je četvrti uzorak činilo poljoprivredno tlo gnojeno gnojem od peradi, a sakupljeno je s dubine od 30 do 60 cm.

pH vrijednost, odnosno mjera aciditeta/alkaliteta izmjerena je u suspenziji tla u destiliranoj vodi ili neposredno u uzorku vode. Kolonije BCC izolirane su na komercijalnom CHROMagar nakon inkubacije od 48 h na 42 °C (Hrenović i sur. 2021).

Klinički izolat izoliran je iz brisa rane 67-godišnjeg pacijenta muškog spola oboljelog od plazmocitoma u Općoj bolnici Karlovac (Hrenović i sur. 2021).

Tablica 3. Datum i mjesto sakupljanja BCC izolata s izmjerenom pH vrijednošću (izvor: Hrenović i sur. 2021)

Izolat	Datum sakupljanja okolišnog izolata	Podrijetlo	pH vrijednost okoliša
2/3	29. listopada 2016.	tlo na odlagalištu	6.77
9/5	07. travnja 2017.	talog potoka, nizvodno od grada	6.05
9/6	07. travnja 2017.	riječna voda, nizvodno od bolnice	7.72
4/4	05. srpnja 2017.	poljoprivredno tlo gnojeno gnojem peradi	4.91
5964	31. ožujka 2020.	bris rane, Opća bolnica Karlovac	/

3.2. Identifikacija i tipiziranje BCC izolata

Navedeni okolišni i klinički izolat identificirani su pomoću MALDI-TOF masenog spektrometra (maseni spektrometar Microflex LT i softver MALDI Biotyper 3.0, Bruker Daltonics, Njemačka) kao *Burkholderia* sp. (**Tablica 4.**). Njihova je identifikacija potvrđena PCR amplifikacijom 16S rRNA gena, a pritom su korištene već opisane početnice te uvjeti (Hrenović i

sur. 2021). Tipizacija BCC izolata provedena je pomoću MLST metode čija je zadaća tipiziranje višestrukih lokusa, odnosno koristi se za mjerenje varijacija u DNA sekvencama te karakterizaciju sojeva pomoću njegovih jedinstvenih profila alela (Hrenović i sur. 2021; Skender, 2012.).

Tablica 4. Identifikacija BCC izolata (izvor: Hrenović i sur. 2021)

Izolat	Vrsta (MALDI-TOF)	Vrsta (16S rRNA)	Sekvencijski tip (ST)
2/3	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>	19
9/5	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	1878
9/6	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	1879
4/4	<i>B. ambifaria</i>	<i>B. ambifaria</i>	927
5964	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	1876

3.3. Preživljavanje BCC izolata u vodi

Preživljavanje i mogućnost umnažanja BCC izolata u vodi ispitalo se na pet prethodno navedenih izolata: 2/3 izvađenog iz tla na odlagalištu otpada, 9/5 iz riječnog sedimenta, 9/6 iz vode rijeke Krapine, 4/4 iz tla gnojenog gnojem peradi te 5964 iz brisa rane pacijenta oboljelog od plazmocitoma. Budući da se provodilo istraživanje o preživljavanju i umnažanju BCC izolata u vodi siromašnoj ili obogaćenju nutrijentima, tijekom 50 dana pratilo se 10 sustava (**Slika 9.**).



Slika 9. Materijali i aparatura potrebni za eksperiment (izvor: Eržen 2021)

Svaka je prethodno navedena bakterijska kultura odvojeno dodana u 9 ml fiziološke otopine te promiješana na Vortex miješalici 3 minute na 45 Hz. Po 1 ml svake dobivene bakterijske

suspenzije dodan je zasebno u 100 ml autoklavirane komercijalne izvorske vode te u 99 ml autoklavirane izvorske vode u koju je dodan i 1 ml tekuće hranjive podloge nutrient broth – Biolife (Italija). Autoklavirana komercijalna izvorska voda siromašna nutrijentima predstavljala je nekontaminiranu, čistu vodu, a voda obogaćena nutrijentima kontaminirani medij poput otpadnih voda (Dekić i sur. 2018.). Kemijska potrošnja kisika (KPK/COD, eng. *chemical oxygen demand*) autoklavirane komercijalne izvorske vode koja je siromašna i vode koja je obogaćena nutrijentima, izmjerena je prema standardnim metodama ispitivanja vode i otpadne vode (APHA i sur. 2005). KPK izvorske vode iznosila je 3 mg/L, a u vodi obogaćenoj nutrijentima 99 mg/L (**Tablica 5.**) (Dekić i sur. 2018). Suspenzije bakterije, koje su se nalazile u napola napunjenim bocama zatvorenim čepom, inkubirane su na 22 °C bez miješanja tijekom 50 dana.

Tablica 5. Kemijski parametri vode siromašne i obogaćene nutrijentima (izvor: Dekić i sur. 2018)

Kemijski parametri	Voda siromašna nutrijentima	Voda obogaćena nutrijentima
pH	8,1	6,9
KPK	3	99
ukupni organski ugljik (mg/L)	<1	44
ukupni dušik (mg/L)	0,7	13,2
ukupni fosfor (mg/L)	0,1	1,1

Na početku pokusa i svakih nekoliko dana boce su se promućkale te su uzeti poduzorci od 1 ml koji su potom decimalno razrijeđeni u sterilnoj fiziološkoj otopini te je 0,1 ml svake razrijeđene bakterijske suspenzije inokuliran na Tryptic Soy Agar (Biolife – Italija). Nakon inkubacije od 48 h na 37 °C bakterijske kolonije su prebrojene.

Nakon prebrojavanja broj vijabilnih bakterija određen je kao broj bakterijskih kolonija (CFU – *Colony Forming Units*) te je izražen kao log CFU po 1 ml vode, dok je postotak preživljavanja bakterija izračunat prema formuli $((CFU_t / CFU_{t_0}) \times 100)$ gdje CFU_t označava koncentraciju bakterija u mjerenom vremenu, a CFU_{t_0} početnu koncentraciju bakterija.

4. REZULTATI

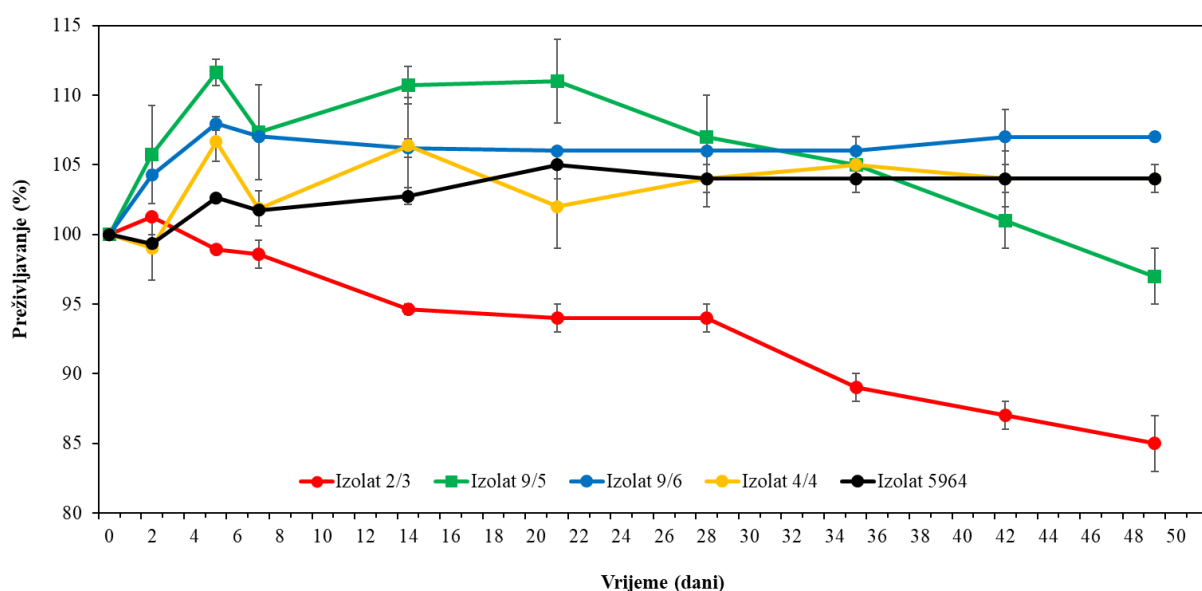
4.1. BCC izolati u vodi siromašnoj nutrijentima

Svih pet prethodno navedenih BCC izolata uspjelo je preživjeti u autoklaviranoj komercijalnoj izvorskoj vodi tijekom 50 dana praćenja (**Tablica 6.**, **Slika 16.**). Izolat *B. multivorans* 2/3, koji je izoliran iz površinskog sloja tla sakupljenog na divljem odlagalištu otpada Lobarika 2, nije se umnažao u komercijalnoj vodi. Početni je broj bakterija *B. multivorans* počeo padati već nakon petog dana, a nakon 50 dana inkubacije preživljavanje je iznosilo 85 %. Budući da je izolat *B. cenocepacia* 9/5 izoliran iz sedimenta potoka koji prima neočišćenu gradsku otpadnu vodu, uspio se umnažati zbog prisutnosti nutrijenata. Povećanje broja bakterija *B. cenocepacia* vidljivo je do 21. dana kad je broj bakterija počeo padati. Međutim, sve do završetka promatranja broj je i dalje ostao visok u odnosu na početni dan. U trećem je uzorku pronađena bakterija *B. cepacia* 9/6. S obzirom da je uzorak činila voda rijeke Krapine sakupljena nizvodno od ispuštanja nepročišćenih bolničkih voda, navedena bakterija imala je dovoljno nutrijenata za umnažanje. Broj bakterija rastao je do petog dana, a potom je ostao konstantan sve do zadnjeg dana promatranja kada je preživljavanje iznosilo 107 %. Broj bakterija četvrtog izolata *B. ambifaria* 4/4, izoliranog iz poljoprivrednog tla gnojenog gnojem od peradi, bio je skokovit. U prvih 28 dana broj bakterija *B. ambifaria* padao je i rastao, međutim nakon 28. dana broj je ostao konstantan te je bio veći od početnog broja, a preživljavanje je 50. dan iznosilo 104 %. Posljednji izolat *B. cenocepacia* 5964 bio je klinički. Broj bakterija *B. cenocepacia* povećavao se do 21. dana te je do završetka praćenja ostao konstantan. Preživljavanje je iznosilo 104 %.

Nakon 50 dana praćenja svi izolati, osim *B. multivorans* 2/3, uspjeli su se umnažati, a preživljavanje je iznosilo od 85 do 107 %. Najlošije je preživljavao prethodno spomenuti izolat.

Tablica 6. Broj bakterijskih kolonija BCC u vodi siromašnoj nutrijentima

		dani (log CFU/ml)										
		0	2	5	7	14	21	28	35	42	49	
sr. vrijednost	izolat 2/3	6,8	6,9	6,7	6,7	6,4	6,4	6,4	6,1	6,0	5,8	
stdev		0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
sr. vrijednost	izolat 9/5	6,6	7,0	7,4	7,1	7,3	7,3	7,1	6,9	6,7	6,4	
stdev		0,2	0,0	0,3	0,0	0,3	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	
sr. vrijednost	izolat 9/6	6,9	7,2	7,4	7,4	7,3	7,3	7,3	7,3	7,4	7,3	
stdev		0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	
sr. vrijednost	izolat 4/4	6,8	6,7	7,2	6,9	7,2	6,9	7,1	7,1	7,1	7,1	
stdev		0,0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	
sr. vrijednost	izolat 5964	6,8	6,8	7,0	6,9	7,0	7,2	7,1	7,1	7,1	7,1	
stdev		0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	



Slika 10. Preživljavanje BCC izolata u vodi siromašnoj nutrijentima. Postotak preživljavanja bakterija dobiven je prema formuli $((CFU_t / CFU_{t0}) \times 100)$ gdje CFU_t označava koncentraciju bakterija u mjerenom vremenu, a CFU_{t0} početnu koncentraciju bakterija. Na grafu su prikazane srednje vrijednosti i standardne devijacije svakog uzorka. Inicijalna koncentracija izolata 2/3 = 6,8 ± 0,0 log CFU/ml; 9/5 6,6 ± 0,2 log CFU/ml; 9/6 6,9 ± 0,1 log CFU/ml; 4/4 6,8 ± 0,0 log CFU/ml; 5964 6,8 ± 0,0 log CFU/ml.

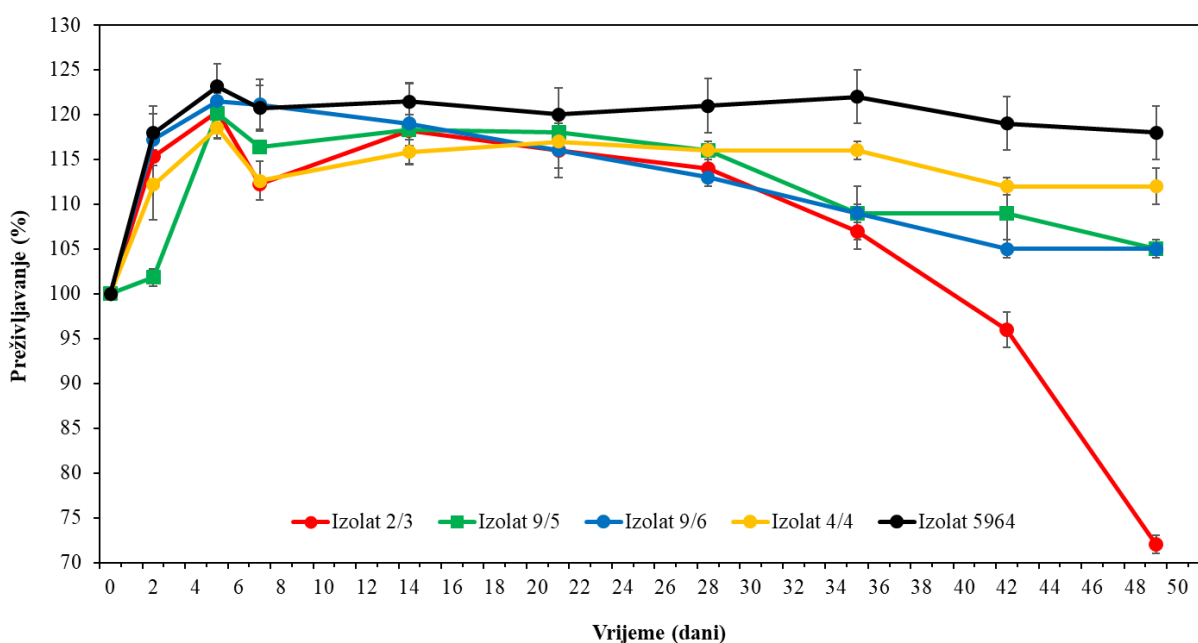
4.2. BCC izolati u vodi obogaćenoj nutrijentima

Okolišni izolati bakterija BCC izolirani s četiri različite lokacije te klinički izolat uspješno su preživjeli u autoklaviranoj komercijalnoj izvorskoj vodi s dodatkom hranjive podloge nutrient broth u razdoblju od 50 dana koliko je trajalo praćenje (**Tablica 7., Slika 11.**). Prvi izolat *B. multivorans* 2/3 izoliran je iz tla prikupljenog na divljem odlagalištu otpada Lobarika 2 u Istri. Zahvaljujući nutrijentima koji su dodani u komercijalnu vodu, uspio se umnažati te je početni broj bakterija *B. multivorans* bio u porastu do 21. dana praćenja kad je počeo polako padati. Nakon 50 dana praćenja preživljavanje *B. multivorans* iznosilo je 72 %. Izolat *B. cenocepacia* 9/5 izoliran je iz sedimenta potoka koji prima neočišćenu gradsku otpadnu vodu. Zahvaljujući prisustvu nutrijenata, broj bakterija bio je u porastu sve do 21. dana. Na kraju promatranja broj bakterija i dalje je bio visok u odnosu na početni dan te je preživljavanje iznosilo 105 %. Treći je izolat predstavljala bakterija *B. cepacia* 9/6, a izolirana je iz vode rijeke Krapine koja je sakupljena nizvodno od ispuštanja nepročišćenih bolničkih voda. Budući da je bakterija imala dovoljno nutrijenata za umnažanje, broj bakterija počeo je padati tek nakon 14. dana. Međutim, nakon 50 dana broj bakterija *B. cepacia* i dalje je bio velik, a preživljavanje je iznosilo 105 %. Broj bakterija četvrtog izolata *B. ambifaria* 4/4, koji je izoliran iz poljoprivrednog tla gnojenog gnojem od peradi, rastao je i padao tijekom promatranja. No, posljednjih sedam dana promatranja broj bakterija bio je konstantan, a preživljavanje je iznosilo 112 %. Izolat 5964 bio je klinički, a dobiven je u Općoj bolnici Karlovac. Zahvaljujući dovoljnoj količini nutrijenata, broj bakterija bio je konstantno u porastu te se i na samom kraju pokusa nije značajnije smanjio. Zadnjeg je dana promatranja preživljavanje iznosilo 118 %.

Nakon 50 dana praćenja svi su se izolati umnažali, a preživljavanje je iznosilo od 72 do 118 % pri čemu je najlošije preživljavao izolat *B. multivorans* 2/3.

Tablica 7. Broj bakterijskih kolonija BCC u vodi obogaćenoj nutrijentima

		dani (log CFU/ml)									
		0	2	5	7	14	21	28	35	42	49
sr. vrijednost	Izolat 2/3	7,1	8,1	8,5	7,9	8,4	8,2	8,1	7,6	6,8	5,1
stdev		0,2	0,2	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,3	0,2
sr. vrijednost	Izolat 9/5	7,0	7,1	8,4	8,1	8,2	8,2	8,1	7,6	7,6	7,3
stdev		0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,3	0,0
sr. vrijednost	Izolat 9/6	6,8	8,0	8,2	8,2	8,1	7,9	7,7	7,4	7,2	7,2
stdev		0,3	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2
sr. vrijednost	Izolat 4/4	7,0	7,9	8,3	7,9	8,1	8,2	8,1	8,1	7,9	7,9
stdev		0,0	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
sr. vrijednost	Izolat 5964	6,8	8,1	8,4	8,3	8,3	8,2	8,3	8,3	8,1	8,1
stdev		0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,0	0,1	0	0,0	0,0



Slika 11. Preživljavanje BCC izolata u vodi obogaćenoj nutrijentima. Postotak preživljavanja bakterija dobiven je prema formuli $((CFU_t / CFU_{t_0}) \times 100)$ gdje CFU_t označava koncentraciju bakterija u mjerenom vremenu, a CFU_{t_0} početnu koncentraciju bakterija. Na grafu su prikazane srednje vrijednosti i standardne devijacije svakog uzorka. Inicijalna koncentracija izolata 2/3 = 7,1 ± 0,2 log CFU/ml; 9/5 7,0 ± 0,1 log CFU/ml; 9/6 6,8 ± 0,3 log CFU/ml; 4/4 7,0 ± 0,0 log CFU/ml; 5964 6,8 ± 0,2 log CFU/ml.

5. RASPRAVA

Bakterije BCC skupina su gram-negativnih štapićastih bakterija koja najčešće nastanjuje prirodni okoliš poput tla, biljne rizosfere te vode (Miller i sur. 2002, Tavares i sur. 2020). S obzirom da navedene bakterije mogu preživjeti u uvjetima s vrlo malo nutrijenata, voda se smatra njihovim najčešćim staništem u kojem mogu uzrokovati zagađenje (Cundell 2019., Torbeck i sur. 2011). Ova se značajka pripisuje njihovoj genetskoj i nutritivnoj raznolikosti što pojedinim BCC vrstama omogućuje da metaboliziraju organske tvari u oligotrofnoj vodenoj sredini (Ahn i sur. 2014). Osim u prirodnoj sredini, 80-ih godina prošlog stoljeća otkriveno je da se bakterije BCC pojavljuju i kao oportunistički patogen u imunokompromitiranih bolesnika (Isles i sur. 1984). Za značaj ovog rada najvažnije se dotaknuti tvrdnji o sposobnosti preživljavanja bakterija BCC u vodi.

Izbor izolata bakterija BCC te medija u koji su inokulirani u ovom istraživanju pridonosi većem razumijevanju preživljavanja te širenja ovog patogena u prirodi. Jedan ispitivani izolat izoliran je iz tla na području divljeg odlagališta otpada. Procjednim vodama odlagališta otpada taj izolat iz tla može dospjeti u prirodne vode te tada predstavlja opasnost ukoliko ljudi i životinje dođu u doticaj s njima. BCC izolati izolirani iz gradske otpadne vode, nepročišćenih bolničkih voda te poljoprivrednog tla također mogu dospjeti u rijeku ili more te uzrokovati zagađenje (Dekić i sur. 2018). Klinički izolat dobiven je iz brisa rane oboljelog pacijenta (Hrenović i sur. 2021).

U ovom istraživanju, kojim se ispitalo preživljavanje i moguće umnažanje kompleksa bakterija *B. cepacia* u autoklaviranoj komercijalnoj izvorskoj vodi siromašnoj i obogaćenoj nutrijentima, korišteni su prethodno navedeni okolišni izolati izolirani iz uzoraka pronađenih na četiri različite lokacije i klinički izolat. Dobiveni rezultati pokazali su da je svih pet promatranih izolata uspješno preživjelo u autoklaviranoj komercijalnoj izvorskoj vodi siromašnoj i obogaćenoj nutrijentima tijekom 50 dana praćenja što je u skladu s izvješćem o šesnaestogodišnjem preživljavanju bakterije *B. pseudomallei* u destiliranoj vodi (Pumpuang i sur. 2011). Naime, u spomenutom izvješću navedeno je da bakterija *B. pseudomallei*, usprkos otežanim životnim uvjetima, može održati zadovoljavajući bakterijski broj u odsutnosti izvora ugljika te preživjeti nekoliko godina u destiliranoj vodi, nakon čega se kultivirane, odnosno uzgojene bakterijske stanice oporavljaju (Wuthiekanun i sur. 1995).

Bakterije BCC mogu preživjeti i u pogodnim te nepogodnim uvjetima u vodenom okolišu. Tijekom godina provedena su mnoga istraživanja kojim se nastojalo potvrditi njihovu prisutnost u vodi te otkriti mehanizme koji im omogućuju preživljavanje u vodenoj sredini. Istraživanjem u

talijanskoj pokrajini Bologna dokazana je prisutnost bakterije *B. cepacia* u 3,5 % od ukupno 85 uzoraka vode za piće koji su prikupljeni iz zgrada te privatnih kuća, a navedena bakterija najbrže je rasla na temperaturi od 24 °C (Zanetti i sur. 2000). Također, analizom 28 uzoraka vode iz europskih rijeka Schelde i Leie, u njih 10 potvrđena je prisutnost BCC vrsta – *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis* te *B. anthina* (Vermis i sur. 2003). Od 670 analiziranih uzoraka vode Zapadnog jezera u Kini bakterije BCC otkrivene su u 40% njih, a pripadale su vrstama *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* i *B. seminalis* (Fang i sur. 2011).

U ovom je pokusu, porast broja bakterijskih stanica zabilježen u svim promatranim izolatima izuzev izolata *B. multivorans* 2/3 koji se nalazio u vodi siromašnoj nutrijentima. S obzirom da su bakterije BCC, koje su se nalazile u vodi s dodatkom nutrijenata, imale izvor hrane, preživljavanje i povećanje njihove brojnosti je logično. Međutim, preostalih pet izolata nalazilo se u vodi siromašnoj nutrijentima te se pretpostavlja da je preživljavanje i povećanje biomase posljedica mrtvih stanica koje omogućuju dovoljno supstrata za nastavak replikacije preživjelih organizama (Wuthiekanun i sur. 1995). Bakterije često doživljavaju razdoblja tijekom kojih neometano rastu. Međutim, postoje i razdoblja propadanja, stoga moraju imati način kako da se održe na životu sve dok se ne pojave uvjeti koji im omogućuju rast (Avrani i sur. 2017). Ova je strategija preživljavanja dobila naziv „Bust and Boom“ gdje slabe bakterijske stanice umiru u nepovoljnim uvjetima, a preostale stanice preživljavaju na trošak mrtvih (Bravo i sur. 2016; Dekić i sur. 2018). Kada bakterije iscrpe sve resurse za život, one ulaze u kratku stacionarnu fazu, a potom u fazu brze smrti. No, ne umiru sve bakterijske stanice, već dio njih ulazi u fazu rasta, odnosno dugotrajnu stacionarnu fazu tijekom koje se uspijevaju replicirati reciklirajući ostatke mrtvih bakterijskih stanica. Primjerice, dokazano je da se stanice bakterije *Escherichia coli* dugi niz godina mogu održati u dugoj stacionarnoj fazi bez dodavanja nutrijenata. No, s vremenom se u toj fazi pojavljuju i novi fenotipovi bakterija koji su otporniji na stresne uvjete zahvaljujući specifičnim alelima koji su identificirani unutar gena koji kodira RpoS (regulator odgovora na stres) (Finkel i Kolter. 1999; Finkel 2006; Zambrano i sur. 1993). Unatoč dugogodišnjim istraživanjima, prilagodba bakterija na dugotrajnu stacionarnu fazu i dalje je nedovoljno istražena. Godine 2017. provedeno je istraživanje temeljeno na pristupu eksperimentalne evolucije. Ispitivala se prilagodba bakterije *Escherichia coli* na život uz nedostatak resursa tijekom prva četiri mjeseca, a pokus se odvijao u laboratoriju u kontroliranijim uvjetima nego inače. Istraživanje je pokazalo da su bakterije, koje se razvijaju

unatoč nedostatku resursa, podložne intenzivnoj selekciji što se očituje u brzom akumulaciji mutacija, bogaćenjem kategorija funkcionalnih mutacija te vrlo konvergentnom prilagodbom. Uočeno je da njihova prilagodba na nedostatak resursa nije ograničena mutacijskim ulazom, već se one prilagođavaju na vremenski precizan način uz fluktuacije frekvencija alela. S obzirom na postojanje antagonističke pleiotropije i nakupljanje mutacija, preživljavanje uz nedostatak resursa smanjuje sposobnost bakterije da raste eksponencijalno kada su resursi ponovno dostupni (Avrani i sur. 2017).

Na preživljavanje i umnažanje bakterija u komercijalnoj izvorskoj vodi utječe nekoliko faktora među kojima se izdvajaju fiziološko stanje, tolerancija na nedostatak hranjivih tvari, interakcija s drugim bakterijama te temperatura (Ahn i sur. 2014). No, što se tiče bakterija BCC, još uvijek ne postoje objavljene studije koje objašnjavaju molekularne mehanizme preživljavanja bakterija BCC u vodi, stoga nisu ni poznati razlozi zašto spomenute bakterije mogu dulje vrijeme preživjeti u vodi. Jedine se naznake o preživljavanju bakterija BCC u vodi mogu pronaći u studijama o već spomenutoj bakteriji *B. pseudomallei* koja uzrokuje melioidozu u ljudi i životinja (Limmathurotsakul i sur. 2016). Što se tiče preživljavanja u vodenom okolišu, *B. pseudomallei*, iako ne pripada bakterijama BCC, najbolje je proučena vrsta roda *Burkholderia*, a rezultati svih provedenih istraživanja ukazuju da je sposobnost održavanja netaknute vanjske membrane glavni čimbenik koji omogućuje preživljavanje u vodi (Moore i sur. 2008).

Također, već spomenuta studija provedena na bakteriji *B. pseudomallei* pokazala je da njihovom šesnaestogodišnjem preživljavanju u destiliranoj vodi na temperaturi od 25 °C pridonosi i promjena oblika bakterijske stanice, odnosno prijelaz iz gram-negativnih štapićastih bakterija u kuglaste (Pumpuang i sur. 2011). Slične je rezultate o preživljavanju u vodi pokazalo i istraživanje na bakteriji *P. aeruginosa*. Utvrđeno je da bakterijske stanice mogu preživjeti u vodi dulje vrijeme, međutim smanjuje im se metabolička aktivnost za pretvaranje štapića u koke te pokazuju promjenu sastava lipida čime se smanjuje propusnost vanjske membrane i povećava tolerancija na polimiksin B. Iako se isprva smatralo da je većina gena potisnuta, neki od njih poput gena za metabolizam aminokiselina, masnih kiselina te fosfolipida povećali su svoju ekspresiju te su korišteni kao rezervni oblik ugljika i energije (Lewenza i sur. 2018).

Prema svemu navedenom može se uočiti da su dobiveni rezultati u skladu sa svim dosad provedenim istraživanjima o preživljavanju kompleksa bakterija BCC u vodi. S obzirom na povećani udio fosfora, koji se smatra limitirajućim čimbenikom prirodnih voda te povećanu

vrijednost KPK (99 mg/L), koja je važan pokazatelj onečišćenja voda, bakterijski izolati u početku pokazuju bolje stope preživljavanja u vodi obogaćenoj nutrijentima, no s vremenom se te stope značajno ne razlikuju od stopa preživljavanja u vodi siromašnoj nutrijentima, što dovodi do zaključka da njihovo preživljavanje u razdoblju od 50 dana ne ovisi o koncentraciji nutrijenata (Dekić i sur. 2018). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da bakterije BCC imaju sposobnost preživljavanja i u vodi siromašnoj i obogaćenoj nutrijentima. No, s obzirom na nedostatak nutrijenata u autoklaviranoj komercijalnoj izvorskoj vodi, u njoj nije došlo do značajnijeg umnažanja bakterija.

Sve navedeno upućuje na zaključak da su bakterije BCC vrlo otporne bakterije koje mogu preživjeti dulje vrijeme na različitim staništima. Premda se mogućnost preživljavanja u vodi smatra pokazateljem njihovih metaboličkih sposobnosti, predstavlja i veliku prijetnju ljudima te njihovom zdravlju (Tavares i sur. 2020). S obzirom da mogu dugo preživjeti te se umnažati i u vodi siromašnoj i u vodi obogaćenoj nutrijentima, okoliš se smatra njihovim primarnim izvorom te je potrebno uvesti dodatne mjere kontrole kako bi se spriječilo njihovo širenje u prirodi.

6. ZAKLJUČAK

S obzirom na dobro poznatu činjenicu da gram-negativne nesporogene bakterije BCC mogu dulje preživjeti u nepogodnim okolišnim uvjetima, provedeno je istraživanje kojim se ispitala njihova sposobnost preživljavanja u vodi siromašnoj i obogaćenoj nutrijentima.

Na osnovu dobivenih rezultata, zaključeno je sljedeće:

- svi ispitani izolati preživljavaju u vodi siromašnoj i obogaćenoj nutrijentima kroz 50 dana praćenja
- u vodi siromašnoj nutrijentima svi su se ispitani izolati umnažali, izuzev izolata *B. multivorans* 2/3 koji je najlošije preživljavao te se nije uspio umnažati
- u vodi obogaćenoj nutrijentima svi ispitani izolati bakterija BCC uspješno su preživjeli i umnažali se, stoga se ona smatra pogodnijim medijem za preživljavanje i umnažanje BCC
- iako su se izolati BCC slabije umnažali u vodi siromašnoj nutrijentima, bolje su preživljavali u odnosu na vodu obogaćenu nutrijentima
- preživljavanje bakterija BCC u vodi ne ovisi značajno o koncentraciji nutrijenata
- BCC su otporne bakterije koje mogu preživjeti dulje vrijeme u različitim okolišima
- s obzirom da se okoliš smatra glavnim izvorom bakterija BCC, potrebne su dodatne mjere kontrole kako bi se spriječilo njihovo širenje u prirodi.

7. LITERATURA

Agodi, A., Mahenthiralingam, E., Barchitta, M., Gianninò, V., Sciacca, A., Stefani, S. (2001): *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: prevalence, epidemiology, and genomovar status. *J. Clin. Microbiol.* 39:2891-2896.

Ahn, Y., Kim, J.M., Ahn, H., Lee, Y.J., LiPuma, J.J., Hussong, D., Cerniglia, C.E. (2014): Evaluation of liquid and solid culture media for the recovery and enrichment of *Burkholderia cenocepacia* from distilled water. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41:1109-1118.

Andersen, D.H. (1938): Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am. J. Dis. Child.* 56:344-399.

APHA, AWWA & WEF. (2005): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation.

Avrani, S., Bolotin, E., Katz, S., Hershberg, R. (2017): Rapid genetic adaptation during the first four months of survival under resource exhaustion. *Mol. Biol. Evol.* 34: 1758-1769.

Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Drevinek, P., Vandamme, P., Govan, J.R., Waive, D.J., LiPuma, J.J., Chiarini, L., Dalmastrì, C., Henry, D.A., Speert, D.P., Honeybourne, D., Maiden, M.C.J., Dowson, C.G. (2007): Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. *Emerg. Infect. Dis.* 13:458-461.

Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Drevinek, P., Pope, C., Waive, D.J., Henry, D.A., Speert, D.P., Carter, P., Vandamme, P., LiPuma, J.J., Dowson, C.G. (2008): Elucidating global epidemiology of *Burkholderia multivorans* in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 46:290-295.

Bravo, Z., Orruño, M., Parada, C., Kaberdin, V.R., Barcina, I., Arana, I. (2016): The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606t under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state. *Archives of Microbiology* 198: 399-407.

Bressler, A.M., Kaye, K.S., LiPuma, J.J., Alexander, B.D., Moore, C.M., Reller, L.B., Woods, C.W. (2007): Risk factors for *Burkholderia cepacia* complex bacteremia among intensive care unit patients without cystic fibrosis: a case-control study. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 28:951-958.

Cantón, R., del Campo, R. (2010): Cystic fibrosis: deciphering the complexity. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:793-797.

Carlotti, A. (2018): *Burkholderia cepacia* complex several absolutely-objectionable bacteria species. In *Contamination control in healthcare product manufacturing* 5.

CFC, The Canadian cystic fibrosis registry 2013 annual report. 2015. Toronto, Ontario: Cystic Fibrosis Canada.

CFF, Cystic fibrosis foundation patient registry 2013 annual data report. 2014. Bethesda, Maryland: Cystic Fibrosis Foundation.

Chaparro, C., Maurer, J., Gutierrez, C., Krajden, M., Chan, C., Winton, T., Keshavjee, S., Scavuzzo, M., Tullis, E., Hutcheon, M., Kesten, S. (2001): Infection with *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: outcome following lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 163:43–48.

Chen, J.S., Witzmann, K.A., Spilker, T., Fink, R.J., LiPuma, J.J. (2001): Endemicity and intercity spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 139:643–649.

Chiarini, L., Bevivino, A., Dalmastrì, C., Tabacchioni, S., Visca, P. (2006): *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends Microbiol.* 14:277-286.

Childers, M., Eckel, G., Himmel, A. (2007): A new model of cystic fibrosis pathology: lack of transport of glutathione and its thiocyanate conjugates. *Med. Hypotheses.* 68:101-112.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Document M100-ED29. 2019.

Coenye, T., Vandamme, V., Govan, J.R.W., LiPuma, J.J. (2001): Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3427- 3436.

Cox, A.D., Wilkinson, S.G. (1991): Ionizing groups in lipopolysaccharides of *Pseudomonas cepacia* in relation to antibiotic resistance. *Mol. Microbiol.* 5:641-646.

Cundell, T. (2019): Excluding *Burkholderia cepacia* complex from aqueous, non-sterile drug products. *Am. Pharm. Rev.*

Cunha, M.V., Leitão, J.H., Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Lito, L., Barreto, C., Salgado, M.J., Sá-Correia, I. (2003): Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a Portuguese cystic fibrosis center: a 7-year study. *J. Clin. Microbiol.* 41:4113–4120.

Čović, V. (2020): Cistična fibroza. Završni rad, Fakultet zdravstvenih studija, Rijeka.

Davis, P.B., Drumm, M., Konstan, M.W. (1996): Cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 154:1229-1156.

De Soyza, A., McDowell, A., Archer, L., Dark, J.H., Elborn, S.J., Mahenthiralingam, E., Gould, K., Corris, P.A. (2001): *Burkholderia cepacia* complex genomovars and pulmonary transplantation outcomes in patients with cystic fibrosis. *Lancet.* 358:1780-1781.

De Soyza, A., Morris, K., McDowell, A., Doherty, C., Archer, L., Perry, J., Govan, J.R.W., Corris, P.A., Gould, K. (2004): Prevalence and clonality of *Burkholderia cepacia* complex genomovars in UK patients with cystic fibrosis referred for lung transplantation. *Thorax.* 59:526-528.

Dekić, S., Hrenović, J. (2018): Preživljavanje bakterije *Acinetobacter baumannii* u različitim tipovima vode. *Hrvatske vode* 26:35-38.

Dekić, S., Hrenović, J., Ivanković, T., van Wilpe, E. (2018): Survival of ESKAPE pathogen *Acinetobacter baumannii* in water of different temperatures and pH. *Water science & technology* 78:1370-1376.

Drevinek, P., Vosahlikova, S., Cinek, O., Vavrova, V., Bartosova, J., Pohunek P., Mahenthiralingam, E. (2005): Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. *J. Med. Microbiol.* 54:655-659.

Drevinek, P., Mahenthiralingam, E. (2010): *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:821-830.

Duff, A.J. (2002): Psychological consequences of segregation resulting from chronic *Burkholderia cepacia* infection in adults with CF. *Thorax*. 57:756-758.

EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 11.0. 2021.

Fang, Y., Xie, G.L., Lou, M.M., Li, B., Muhammad, I. (2011): Diversity analysis of *Burkholderia cepacia* complex in the water bodies of West Lake, Hangzhou, China. *J. Microbiol.* 49:309-314.

Finkel, S.E. (2006): Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nature Rev. Microbiol.* 4:113–120.

Finkel, S.E., Kolter, R. (1999): Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96:4023–4027.

Foweraker, J. (2009): Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Br. Med. Bull.* 89:93-110.

Fung, S.K., Dick, H., Devlin, H., Tullis, E. (1998): Transmissibility and infection control implications of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis. *Can. J. Infect. Dis.* 9:177-182.

Golini, G., Cazzola, G., Fontana, R. (2006): Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex isolates from an Italian cystic fibrosis centre. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25:175-180.

Govan, J.R.W., Brown, P.H., Maddison, J., Doherty, C.J., Nelson, J.W., Dodd, M., Greening, A.P., Webb, A.K. (1993): Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet.* 342:15-19.

Govan, J.R.W., Deretic, V. (1996): Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60:539-574.

Govan, J.R.W., Balendreau, J., and P. Vandamme. (2000): *Burkholderia cepacia* – friend and foe. *ASM News.* 66:124-125.

Govan, J.R., A.R. Brown, and A.M. Jones. (2007): Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol* 2:153-164.

Hanulik, V., Webber, M.A., Chroma, M., Uvizlo, R., Holy, O., Whitehead, R.N., Baugh, S., Matouskova, I., Kolar, M. (2013): An outbreak of *Burkholderia multivorans* beyond cystic fibrosis patients. *J. Hosp. Infect.* 84:248-251.

Hauser, A.R., Jain, M., Bar-Meir, M., McColley, S.A. (2011): Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24:29-70.

Holmes, A., Govan, J.R.W., Goldstein, R. (1998): Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health?. *Emerg. Infect. Dis.* 4:221-227.

Holmes, A., Nolan, R., Taylor, R., Finley, R., Riley, M., Jiang, R.Z., Steinbach, S., Goldstein, R. (1999): An epidemic of *Burkholderia cepacia* transmitted between patients with and without cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* 179:1197-1205.

Hrenović, J., Durn, G., Kazazić, S., Dekić, S., Šeruga Musić, M. (2019): Untreated wastewater as a source of carbapenem-resistant bacteria to the riverine ecosystem. *Water SA* 45:55-62.

Hrenović, J., Šeruga Musić, M., Drmić, M., Pešorda, L., Bedenić, B. (2021): Characterization of *Burkholderia cepacia* complex from environment influenced by human waste. *International Journal of Environmental Health Research*, in print.

Isles, A., Machlusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P., Levison, H. (1984): *Pseudomonas cepacia* infections in cystic fibrosis: an emerging problem. *J. Pediatr.* 104:206-210.

Jones, A.M., Dodd, M.E., Govan, J.R.W., Barcus, V., Doherty, C.J., Morris, J., Webb, A.K. (2004): *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax.* 59:948-951.

Kim, J.M., Ahn, Y., LiPuma, J.J., Hussong, D., Cerniglia, C.E. (2015): Survival and susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex in chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42:905-913.

- Koch, C., Hoiby, N. (1993): Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet*. 341:1065-1090.
- Ledson, M.J., Gallagher, M.J., Jackson, M., Hart, C.A., Walshaw, M.J. (2002): Outcome *Burkholderia cepacia* colonisation in an adult cystic fibrosis centre. *Thorax* 57:142–145.
- Lewenza, S., Abboud, J., Poon, K., Kobryn, M., Humplik, I., Bell, J.R., Mardan, L., Reckseidler-Zenteno, S. (2018): *Pseudomonas aeruginosa* displays a dormancy phenotype during long-term survival in water. *PLoS. One* 13:198-384.
- Limmathurotsakul, D., Golding, N., Ab Dance, D., Messina, J.P., Pigott, D.M., Moyes, C.L., Rolim, D.B., Bertherat E., Pj Day, N., Peacock, S.J., Hay, S.I. (2016): Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.* 1:1-5.
- LiPuma, J.J., Spilker, T., Gill, L.H., Campbell, P.W.3rd, Liu, L., Mahenthiralingam, E. (2001): Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 164:92-96.
- LiPuma, J.J., Spilker, T., Coenye, T., Gonzalez, C.F. (2002): An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *Lancet*. 359:2002-2003.
- LiPuma, J.J. (2010): The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 23:299-323.
- Magalhães, M., Doherty, C., Govan, J.R.W., Vandamme, P. (2003): Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. *J. Hosp. Infect.* 54:120-123.
- Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Campbell, M.E., Henry, D.A., Gravelle, A.M., Wong, L.T., Davidson, A.G., Wilcox, P.G., Nakielna, B., Speert, D.P. (2001): Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. *Clin. Infect. Dis.* 33:1469-1475.
- Mahenthiralingam E., Urban, T.A., Goldberg, J.B. (2005): The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:144-156.

Mahenthiralingam, E., Baldwin, A., Dowson, C.G. (2008): *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. J. Appl. Microbiol. 104:1539-1551.

Mann, T., Ben-David, D., Zlotkin, A., Shachar, D., Keller, N., Toren, A., Nagler, A., Smollan, G., Barzilai, A., Rahav, G. (2010): An outbreak of *Burkholderia cenocepacia* bacteremia in immunocompromised oncology patients. Infection 38:187-194.

Martina, P., Bettioli, M., Vescina, C., Montanaro, P., Mannino, M.C., Prieto, C.I., Vay, C., Naumann, D., Schmitt, J., Yantorno, O., Lagares, A., Bosch, A. (2013): Genetic diversity of *Burkholderia contaminans* isolates from cystic fibrosis patients in Argentina. J. Clin. Microbiol. 51:339-344.

Medina-Pascual, M.J., Valdezate, S., Carrasco, G., Villalón, P., Garrido, N., Saéz-Nieto, J.A. (2015): Increase in isolation of *Burkholderia contaminans* from Spanish patients with cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Infect. 21:150-156.

Miller, S.C.M., LiPuma, J.J., Parke, J.L. (2002): Culture-based and non-growth-dependent detection of the *Burkholderia cepacia* complex in soil environments. Appl. Environ. Microbiol. 68:3750-3758.

Moore, R.A., Tuanyok, A., Woods, D.E. (2008): Survival of *Burkholderia pseudomallei* in water. BMC. Res. Notes. 1:11.

Nørskov-Lauritsen, N., Johansen, H.K., Fenger, M.G., Nielsen, X.C., Pressler, T., Olesen, H.V., Høiby, N. (2010): Unusual distribution of *Burkholderia cepacia* complex species in Danish cystic fibrosis clinics may stem from restricted transmission between patients. J. Clin. Microbiol. 48:2981-2983.

Palleroni, N.J., Genus, I. (1984): *Pseudomonas*. Bergey's Manual of systemic bacteriology. 1:141-159.

Papp-Wallace, K.M., Taracila, M.A., Gatta, J.A., Ohuchi, N., Bonomo, R.A., Nukaga, M. (2013): Insights into β -lactamases from *Burkholderia* species, two phylogenetically related yet distinct resistance determinants. J. Biol. Chem. 288:19090-19102.

Pegues, D.A., Carson, L.A., Tablan, O.C., FitzSimmons, S.C., Roman, S.B., Miller, J.M., Jarvis, W.R. (1994): Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis. Summer Camp Study Group. J. Pediatr. 124:694-702.

Pitt, T.L., Kaufmann, M., Patel, P.S., Bengel, L.C., Gaskin, S., Livermore, D.M. (1996): Type characterisation and antibiotic susceptibility of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland. J. Med. Microbiol. 44:203-210.

Pitt, T.L., Simpson, A.J.H. (2006): *Pseudomonas* and *Burkholderia spp.* Principles and practice of clinical bacteriology. Pp:427-443.

Planet, P.J., Saiman, L. (2010): Microbiology in cystic fibrosis. Cystic fibrosis. Informa Healthcare. Pp: 36-56.

Poirel, L., Rodriguez-Martinez, J.M., Plésiat, P., Nordmann, P. (2009): Naturally occurring class A beta-lactamases from the *Burkholderia cepacia* complex. Antimicrob. Agents. Chemother. 53:876-882.

Pumpuang, A., Chantratita, N., Wikraiphat, C., Saiprom, N., Day, N.P.J., Peacock, S.J., Wuthiekanun, V. (2011): Survival of *Burkholderia pseudomallei* in distilled water for 16 years. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 105: 598-600.

Rabin, H.R., Surette, M.G. (2012): The cystic fibrosis airway microbiome. Curr. Opin. Pulm. Med. 18:622-627.

Ratjen, F.A., Doring, G. (2003): Cystic fibrosis. Lancet. 361:681-690.

Ratjen, F.A. (2009): Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. Respir. Care. 54:595-605.

Regan, K.H., Bhatt, J. (2016): Eradication therapy for complex in people with cystic fibrosis. Cochrane Database of Systematic Reviews. 11.

Reik, R., Spilker, T., LiPuma, J.J. (2005): Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 43:2926-2928.

Rommens, J.M., Iannuzzi, M.C., Kerem, B. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 245:1059-1065.

Sajjan, U., Corey, M., Humar, A., Tullis, E., Cutz, E., Ackerley, C., Forstner, J. (2001): Immunolocalisation of *Burkholderia cepacia* in the lungs of cystic fibrosis patients. *J. Med. Microbiol.* 50:535-546.

Skender, B. (2012): Mehanizmi rezistencije na antibiotike u bakterije *Acinetobacter baumannii*. Završni rad, PMF, Zagreb.

Slieker, M.G., Sanders, E.A., Rijekers, G.T. (2005): Disease modifying genes in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 4:7-13.

Sousa, S.A., C.G., Leitão, J.H. (2011): *Burkholderia cepacia* complex: emerging multihost pathogens equipped with a wide range of virulence factors and determinants. *Int. J. Microbiol.* 11:607-675.

Speert, D.P., Henry, D., Vandamme, P., Corey, M., Mahenthiralingam, E. (2002): Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 8:181-187.

Tavares, M., Kozak, M., Balola, A., Sá-Correia, I. (2020): *Burkholderia cepacia* complex bacteria: a feared contamination risk in waterbased pharmaceutical products. *Clin. Microbiol.* 33:139-190.

Thomassen, M.J., Demko, C.A., Klinger, J.D., Stern, R.C. (1985): *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis. A new opportunist. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131:791-796.

Torbeck, L., Raccasi, D., Guilfoyle, D.E., Friedman, R.L. Hussong, D. (2011): *Burkholderia cepacia*: this decision is overdue. *J. Pharm. Sci. Technol.* 65:535-543.

Turton, J.F., O'Brien, E., Megson, B., Kaufmann, M.E., Pitt, T.L. (2009): Strains of *Burkholderia cenocepacia* genomovar IIIA possessing the *cblA* gene that are distinct from ET12. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64:94-97.

Vasiljević, Z.V., Novović, K., Kojić, M., Minić, P., Sovtić, A., Đukić, S., Jovčić, B. (2016): *Burkholderia cepacia* complex in Serbian patients with cystic fibrosis: prevalence and molecular epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35:1277-1284.

Vermis, K., Brachkova, M., Vandamme, P., Nelis, H. (2003): Isolation of *Burkholderia cepacia* complex genomovars from waters. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:595-600.

Vial, L., Chapalain, A., Groleau, M.C., Déziel, E. (2011): The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. *Environ. Microbiol.* 13:1-12.

Wuthiekanun, V., Smith, M.D., White, N.J. (1995): Survival of *Burkholderia pseudomallei* in the absence of nutrients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89:491.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Arakawa, M. (1992): Proposal of *Burkholderia* gen. nov.; and transfer of seven species of the *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36:1251-1275.

Young, K.D. (2006): The selective value of bacterial shape. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:660-703.

Zambrano, M.M., Siegele, D.A., Almiron, M., Tormo, A., Kolter, R. (1993): Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science* 259: 1757–1760.

Zanetti, F., De Luca, G., Stampi, S. (2000): Recovery of *Burkholderia pseudomallei* and *B. cepacia* from drinking water. *Int. J. Food. Microbiol.* 59:67-72.

Zolin, A., McKone, E.F., van Rens, J., Fox, A., Iansa, P., Prefitsi, A., Gulmans, V., Jung, A., Mehta, A., Viviani, L., Vebert Olesen H. (2014): Contributing country managers and national representatives. ECFSPR. Annual Report 2010.

[http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/immunologija-i-alergije/immunodeficijencije/kronicna-granulomatozna-bolest](http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/imunologija-i-alergije/immunodeficijencije/kronicna-granulomatozna-bolest) (pristupljeno 8.6.2021.)

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 22. svibnja 1996. u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu Ksavera Šandora Gjalskog u Zaboku te ju završila s odličnim uspjehom. Tijekom osnovnoškolskog obrazovanja bavila sam se plivanjem u plivačkom klubu „Olimp“. Obrazovanje sam nastavila u Gimnaziji Antuna Gustava Matoša u Zaboku gdje sam također prolazila s odličnim uspjehom. 2016. godine upisala sam preddiplomski studij znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. 2017. i 2018. godine sudjelovala sam na manifestaciji Noć biologije. Preddiplomski studij završila sam 2019. godine s vrlo dobrim uspjehom te uz obranu završnog rada na temu „Rezistencija na antibiotike u okolišnih izolata bakterije *Klebsiella pneumoniae*“ stekla zvanje prvostupnice struke znanosti o okolišu. Studiranje sam nastavila na diplomskom smjeru znanosti o okolišu.

Još u osnovnoj školi u meni se probudilo veliko zanimanje za biologiju, dok se tijekom srednjoškolskog obrazovanja zainteresiranost samo povećavala. Stoga sam odlučila proširiti svoje znanje o biologiji upisavši navedeni fakultet. Sve do tada područje mog interesa bilo je podosta široko. Zanimalo me sve, počevši od bakterija koje su vidljive samo pod mikroskopom, najmanje istraženih organizama – gljiva, mekušaca pa sve do najkompleksnijih organizama – sisavaca. Međutim, već na prvoj godini fakulteta znala sam kojim bih se područjem biologije željela baviti u budućnosti. Kolegij mikrobiologija, prvenstveno njegov bakteriološki dio, probudio je u meni istraživača i nametnuo pitanje na koji način tako mikroskopski sitni, jednostavni organizmi mogu imati toliko mnogo utjecaja na okoliš, ali i na čovjeka.