

Preživljavanje okolišnih izolata bakterije *Acinetobacter baumannii* u vodenim medijima

Tomašin, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:605130>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Iva Tomašin

**Preživljavanje okolišnih izolata bakterije *Acinetobacter*
baumanni u vodenim medijima**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecana zvanja mag. oecol. et prot. nat.

Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom broj IP-2014-09-5656
„Prirodno stanište klinički značajnih *Acinetobacter baumannii*“

Zahvaljujem se profesorici Jasni Hrenović na predloženoj temi, pomoći i savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam na ukazanom povjerenju.

Zahvaljujem se asistentici Svjetlani Dekić na brojnim savjetima, nesebičnoj pomoći i podršci. Hvala što ste uvijek našli vremena za moja brojna pitanja.

Zahvaljujem se svojim roditeljima što su mi omogućili da ostvarim svoje snove. Hvala Vam što ste uvijek vjerovali u mene i bili mi podrška.

Zahvaljujem se obitelji i prijateljima što su u svakom trenu ovog puta bili uz mene, davali savjete i bili podrška u teškim trenucima.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

PREŽIVLJAVANJE OKOLIŠNIH IZOLATA BAKTERIJE *ACINETOBACTER BAUMANNII* U VODENIM MEDIJIMA

Iva Tomašin

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Bakterija *Acinetobacter baumannii* oportunistički je patogen i vodeći uzročnik bolničkih infekcija na svijetu. Nedavni nalazi *A. baumannii* u bolničkim vodama, urbanoj kanalizaciji i rijekama ukazuju na prisustvo ove bakterije u prirodnom okolišu, što predstavlja javnozdravstveni rizik. Cilj ovog rada bio je proučiti sposobnosti preživljavanja okolišnih izolata bakterije *A. baumannii* u različitim vodenim medijima na 4, 22 i 44 °C kroz 50 dana praćenja kako bi se moglo predvidjeti njeno ponašanje u okolišu. Najbolju sposobnost preživljavanja bakterija pokazuje na sobnoj temperaturi (22 °C) u destiliranoj vodi obogaćenoj hranjivima. Najlošije preživljavanje od 57 % zabilježeno je u izvorskoj vodi na 44 °C. Na 4 °C u izvorskoj vodi i hranjivima bogatim vodenim medijima (destilirana voda i izvorska voda) bakterija ne pokazuje mogućnost razmnožavanja. Istraživanjem je zaključeno da bakterija *A. baumannii* ima sposobnost preživljavanja svih 50 dana u svim testiranim uvjetima.

(stranice 26, slike 7, tablice 5, literatura 48, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u: Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: bakterija, patogen, ekološki čimbenici, temperatura, voda

Mentor: Dr. sc. Jasna Hrenović, red. prof.

Neposredni voditelj: Svjetlana Dekić, mag. oecol.

Ocjenitelji: Dr. sc. Jasna Hrenović, red. prof.

Dr. sc. Marko Miliša, izv. prof.

Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. Prof.

Rad prihvaćen: 13.02.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

SURVIVAL OF ENVIRONMENTAL ISOLATES OF BACTERIUM *ACINETOBACTER BAUMANNII* IN WATER MEDIA

Iva Tomašin

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Acinetobacter baumannii is considered to be an opportunistic pathogen and one of the leading causes of hospital infections in the world. Recent findings of *A. baumannii* in hospital wastewaters, urban sewage and natural recipients shows presence of this bacteria in natural environment, which presents a potential threat to public health. The aim of this thesis is to determine the time of survival of environmental isolates of *A. baumannii* in different water media at 4, 22 and 44 °C for up to 50 days of monitoring in order to predict its environmental behaviour. The highest survival rate was at room temperature (22 °C) in distilled water with nutrient broth. The worst survival (57 %) was observed in spring water at 44 °C. At 4 °C in spring water and nutrient enriched waters (spring and distilled water), the bacterium did not show the possibility of multiplication. The results show that *A. baumannii* is able to survive during 50 days of monitoring in all tested conditions.

(pages 26, figures 7, tables 5, references 48, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological library

Keywords: bacteria, pathogen, ecological factors, temperature, water

Supervisor: PhD. Jasna Hrenović, Prof.

Auxiliary supervisor: MS.Svjetlana Dekić

Rewiewers: PhD Jasna Hrenović, prof.

PhD Marko Miliša, prof.

PhD Ivana Ivančić Baće, prof.

Thesis accepted: 13th February 2019

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Problematika istraživanja	1
1.1.1 Bakterije roda <i>Acinetobacter</i>	1
1.1.2 Vrsta <i>Acinetobacter baumannii</i>	1
1.1.3 Rezistencija <i>Acinetobacter baumannii</i> na antibiotike	4
1.1.4 Prisutnost <i>Acinetobacter baumannii</i> u prirodnom okolišu	6
1.1.5 Cilj istraživanja.....	7
2. MATERIJAL I METODE.....	8
2.1 Izolati <i>Acinetobacter baumannii</i>	8
2.2 Hranjivi mediji	8
2.3 Izvedba pokusa.....	9
2.4 Statistička analiza	10
3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	11
3.1 Preživljavanje <i>Acinetobacter baumannii</i> na 4 °C	11
3.2 Preživljavanje <i>Acinetobacter baumannii</i> na 22 °C	13
3.3 Preživljavanje <i>Acinetobacter baumannii</i> na 44 °C	15
4. RASPRAVA	17
5. ZAKLJUČAK	21
6. LITERATURA.....	22

1. UVOD

1.1 Problematika istraživanja

1.1.1 Bakterije roda *Acinetobacter*

U literaturi rod *Acinetobacter* prvi put se spominje 1911. godine kada je nizozemski mikrobiolog opisao organizam pod nazivom *Micrococcus calcoaceticus*. Tijekom sljedećih desetljeća pronađeno je i opisano još vrsta čija se taksonomija nekoliko puta mijenjala (Peleg i sur 2008). Tek su 1954. Brisou i Prévot predložili današnji naziv za rod kako bi razlikovali nepokretne od pokretnih mikroorganizama. Rod je svoje ime dobio je od grčke riječi „akinetos“ što znači nepokretan (Brisou i Prévot 1954). Od 1954. godine do danas opisano je i imenovano 57 vrsta roda (Peleg i sur. 2008).

Rod *Acinetobacter* karakteriziraju gram negativni, nesporogeni, nepokretni kokobacili, obligatni aerobi koji ne razgrađuju šećere (Peleg i sur. 2008). Vrste roda *Acinetobacter* smatraju se sveprisutnima. Prirodno se pojavljuju u tlima i vodi te na životinjama. Osim u prirodi Gennari i Stegagno (1985, 1986) pronašli su bakterije roda *Acinetobacter* u svježim i smrznutim ribljim proizvodima, sirovom zamrznutom povrću i pokvarenom mesu, mlijeku i siru (Gennari i sur. 1992). Vrste roda *Acinetobacter* nalazimo i kao dio prirodne flore ljudske kože. Pronađena je na 43 % nehospitaliziranih pojedinaca posebice u vlažnim područjima kao što su prepone. Vrsta *Acinetobacter baumannii* rijetko se pronalazi kao dio flore ljudske kože (3 % ispitanih uzoraka) (Seifert i sur. 1997) te izmetu (0,8 % ispitanih uzoraka) (Dijkshoorn i sur. 2005).

1.1.2 Vrsta *Acinetobacter baumannii*

S aspekta kliničke mikrobiologije vrsta *Acinetobacter baumannii* je najviše proučavana vrsta ovog roda (Slika 1). *A. baumannii* smatra se oportunističkim patogenom, jednim od vodećih uzročnika bolničkih infekcija u svim zemljama svijeta, posebice u jedinicama intenzivnog liječenja i operacijskim salama (Peleg i sur. 2008, Towner 2009). Bakteriju je teško ukloniti iz bolničkog okruženja zbog izrazite otpornosti na stresne uvjete (Bravo i sur. 2016; Gonzales i sur. 2018; Matešić i sur. 2013). Iako se vrste roda *Acinetobacter* opisuju kao nepokretni kokobacili Eijkelkamp i sur. (2011) u svojem istraživanju otkrili su da *A. baumannii*, koja pripada Internacionalnom klonu I ima sposobnost kretanja, odnosno trzanja. Ta sposobnost uvelike ovisi o mediju u kojem

se bakterija nalazi te je veća pri većim temperaturama (37 °C). Takvo otkriće bitno je jer se smatra da pokretljivost bakterija poboljšava njihovu mogućnost da vrše zaraze. Uz to, većina kliničkih izolata *A. baumannii* pokazuje višestruku otpornost na antimikrobne lijekove (multidrug-resistance; MDR) (Howard i sur. 2012). Infekcije koje uzrokuje teško je liječiti upravo zbog sposobnosti bakterije da brzo razvija otpornost na različite antibiotike radi urođenih i stečenih mehanizama (Goić-Barišić 2012). Svjetska zdravstvena organizacija označila je izolate otporne na karbapeneme prioritarnom oznakom (grupa 1) naglašavajući potrebu otkrivanja novih antibiotika (WHO 2017). *A. baumannii* spada u ESKAPE skupinu patogena koju karakteriziraju mehanizmi otpornosti na različite antibiotike (Pendelton i sur. 2013)

A. baumannii uzrokuje infekcije respiratornog, urinarnog, središnjeg krvožilnog i središnjeg živčanog sustava (Towner 2009). Potencijalni izvori zaraza u bolnicama su brojni. Pacijenti mogu doći u doticaj s bakterijama putem bolničkog osoblja i predmeta koje oni koriste, medicinskog pribora, direktnim kontaktom sa zaraženom osobom ili predmetima s kojima je bila u dodiru (Dancer 2014; Matešić i sur. 2013; Towner 2009). Rizik nastanka infekcije je veći ako pacijent boravi u jedinici intenzivnog liječenja, u anamnezi ima traumu, kirurški zahvat ili potrebu za potpornom ventilacijom.

Osim bolničkih infekcija, javljaju se još i sporadične izvanbolničke infekcije tzv. „Community-acquired infections“. Falagas i sur. (2007) proveli su opsežno istraživanje u kojem su proučavali 43 rada napisana na engleskom, njemačkom, talijanskom i francuskom jeziku, a u kojima su jasno zabilježeni slučajevi zaraze *A. baumannii* van bolničkog okruženja. Istraživanjem su došli do spoznaje da se infekcije *A. baumannii* javljaju kod ljudi koji boluju od bolesti kao što su dijabetes, kronične plućne bolesti, bolesti bubrega i bakterijemije. Uz to većina ispitanika bila je ovisna o cigaretama i/ili alkoholu. Najviše takvih slučajeva prijavljeno je u tropskim i subtropskim područjima. Važno je napomenuti da bez obzira što su izvanbolničke infekcije uzrokovane izolatima koji nemaju razvijenu otpornost na antibiotike kao izolati pronađeni u bolnicama, oni svejedno uzrokuju veliki postotak smrtnost. Od 80 zabilježenih pacijenata 45 je umrlo, što iznosi 56 %.

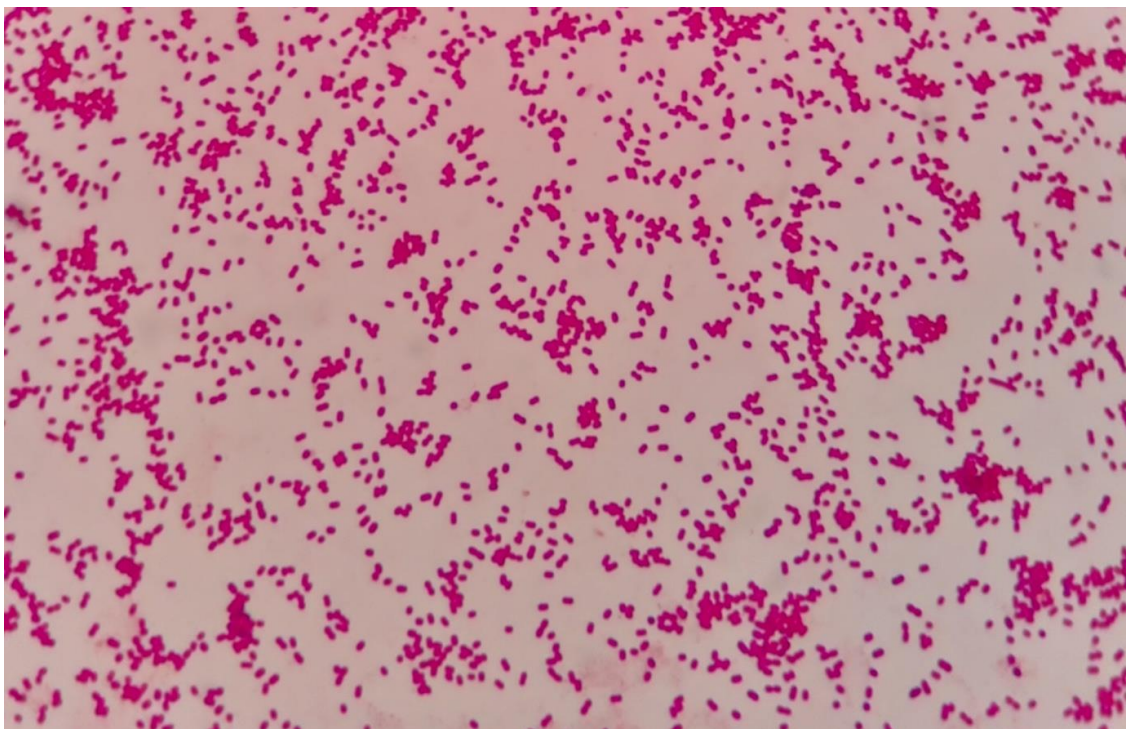
A. baumannii može preživjeti i do nekoliko mjeseci na bolničkim površinama (Tablica 1) (Dancer 2014, Towner 2009). Preživljavanje patogenih mikroorganizama u

bolničkom okruženju predstavlja veliki problem u zdravstvenom sustavu i opasnost od širenja zaraza.

Tablica 1. Površine s kojih je izolirana bakterija *A. baumannii* u bolničkim sredinama (podaci preuzeti iz Towner, 2009)

Bolničke površine	Medicinska oprema	Predmeti medicinskog osoblja
Okviri kreveta, lavabo, okviri od plastike, kante za smeće, posteljina, madraci, jastuci, bolesnički kartoni	Bronhoskopi, respiratori, mehanička potporna ventilacija, tlakomjeri, balon za reanimaciju	Ruke, sapun, dispenzeri, kompjuteri, mobiteli, pisaći pribor, šalice

Nepostojanje zakonske regulative u RH koja bi propisivala obaveznu dezinfekciju bolničkih otpadnih voda prije ispuštanja u kanalizacijski sustav rezultira pojavom *A. baumannii* u bolničkim otpadnim vodama. *A. baumannii* kanalizacijom dolaze u okoliš, odnosno prirodne recipijente i potencijalna su prijetnja ljudskom zdravlju (Higgins i sur. 2018; Hrenović i sur. 2016; Kovačić i sur. 2017; Šeruga Musić i sur. 2017). Izolati *A. baumannii* srodni kliničkim izolatima pronađeni su u influentu i efluentu na uređaju za pročišćivanje otpadnih voda grada Zagreba. U Zagrebu su prvi puta 2015. godine, u efluentu pročišćivača otpadnih voda, pronađeni višestruko rezistentni okolišni izolati *A. baumannii* (Hrenović i sur. 2016).



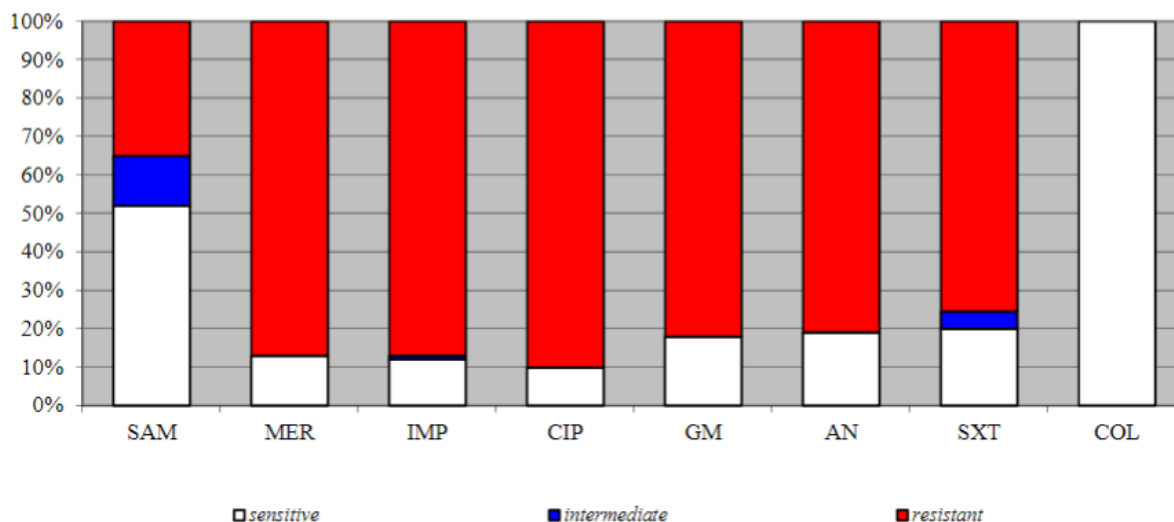
Slika 1. Bojanje po Gramu bakterije *A. baumannii*, povećanje od 100x (autor: Iva Tomašin)

1.1.3 Rezistencija *Acinetobacter baumannii* na antibiotike

Američko udruženje infektologa označilo je *A. baumannii* oznakom „crveno“ naglašavajući problem višestruke otpornosti bakterije na antibiotike te njezin epidemiološki značaj u odnosu na bolničku sredinu (Goić-Barišić 2018). U zadnjem desetljeću u Europi i širom svijeta *A. baumannii* postala je izuzetno otporna na skupinu antibiotika karbapenema. Karbapenemi su grupa beta-laktamskih antibiotika širokog spektra djelovanja važni u liječenju bolesti uzrokovanih višestruko rezistentnim, gram-negativnim bakterijama poput *A. baumannii*. Osim u Europi, *A. baumannii* otporni na karbapeneme, problematični su u sjevernoj i sjeveroistočnoj Aziji, sjevernoj Americi i Bliskom istoku (ECDC 2016). Razvoj rezistencije na antibiotike posljedica je izmjene genomske strukture u kombinaciji s promjenjivom ekspresijom gena (Towner 2009). Razvoj rezistencije na karbapeneme posljedica je produkcije enzima skupine oksacilinaza (OXA enzimi) koje imaju sposobnost hidrolize karbapenema. Drugi mehanizmi rezistencije na antibiotike uključuju gubitak proteina u vanjskoj membrani, izbacivanje antibiotika iz stanice, ezimske modifikacije ili kombinacije navedenih mehanizama rezistencije. Veliko kliničko značenje danas imaju oksacilinaze koje se dijele u četiri filogenetske skupine specifične za izolate *A. baumannii*: OXA-23 skupina, OXA-40

skupina, OXA-58 skupina i najveća OXA-51 skupina, poznata i kao prirodno kromosomski kodirane oksacilinaze. OXA-51 skupina oksacilinaza uglavnom ima slabu sposobnost hidrolize karbapenema, ali prisustvo insercijske sekvencije ISAbal smještene neposredno uz bla_{OXA-51-like} gena djeluje kao promotor rezistencije ili smanjene osjetljivosti na karbapeneme u kliničkih izolata *A. baumannii* (Goić-Barišić i sur. 2009).

U bolnicama Hrvatske registrirana su dva dominantna klona *A. baumannii*. Internacionalni klon 1 (IC1) prvi put je registriran u Kliničkom bolničkom centru Split. Karakterizira ga smanjena osjetljivosti na jedan ili oba karbapenema (Vranić-Ladavac i sur. 2014). Novi klon IC2, zbog svoje rezistentnosti na oba karbapenema (imipenem i meropenem), doveo je do epidemijskog širenja 2009. godine. Uz rezistenciju na karbapeneme prisutna je i rezistencija na kinolone i aminoglikozide (Slika 2). Označava se kao multiplorezistentni patogen te je danas prisutan u većini zdravstvenih ustanova u Hrvatskoj (Goić-Barišić i sur. 2011).



Slika 2. Rezistencija na antibiotike u razdoblju od 1.10.-31.12. 2017., zbirni prikaz izolata iz 37 centara u RH (SAM- ampicillin+sulbactam, MER- meropenem, IMP- imipenem, CIP- ciprofloxacina, GM- gentamicin, AN- amikacin, SXT- Co-trimoxazole, COL- colistin) (Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2017. g., Akademija medicinskih znanosti Hrvatske)

1.1.4 Prisutnost *Acinetobacter baumannii* u prirodnom okolišu

Bakterije roda *Acinetobacter* smatraju se sveprisutnima u prirodi što često dovodi do zabune da je i vrsta *A. baumannii* široko rasprostranjena u okolišu, da ju je moguće pronaći u tlu, vodi i životinjama te da nastanjuje floru kože i dišnih puteva. *A. baumannii* nije sveprisutna u okolišu te još uvijek nije poznato njeno prirodno stanište (Peleg i sur. 2008) kao ni točni mehanizmi širenja unutar i izvan bolničkog okruženja (Hrenović i sur. 2014). Prvi okolišni izolat *A. baumannii*, višestruko otporan na antibiotike te srodan bolničkom izolatu, pronađen je u uzorcima rijeke Seine (Girlich i sur. 2010). U Hrvatskoj su Hrenović i sur. (2014) otkrili izolat *A. baumannii*, srodan kliničkom izolatu, u paleotlu u Istri. Smatra se da je bakterija tamo dospjela sa divljeg odlagališta otpada. Okolišni izolati *A. baumannii* srodni kliničkim izolatima pronađeni su u komunalnim otpadnim vodama prije i nakon provedenog drugog stupnja pročišćavanja na pročišćivaču otpadnih voda grada Zagreba (Hrenović i sur. 2016). U rijeci Savi, nizvodno od Zagreba pronađena su 4 izolata *A. baumannii* srodna Internacionalnom klonu 2 (IC2) (Šeruga-Musić i sur. 2017). Berlau i sur. (1999) istraživali su pojavnost bakterija roda *Acinetobacter* na povrću kao mogućeg prirodnog staništa vrsta tog roda. U 27 % uzorka nađena je vrsta *A. baumannii*. U Hong Kong-u je također pronađena *A. baumannii* na lokalno uzgojenom povrću no samo u jednom uzorku (Houang i sur. 2009). U drugoj studiji istraživani su uzorci tla u Hong Kong-u te su u 22 od 60 uzoraka pronađene vrste roda *Acinetobacter*. Od toga je 23 % činila vrsta *A. baumannii* (Houang i sur. 2009).

Bez obzira na to što je vrsta *A. baumannii* sporadično pronađena u tlu i na povrću ona nije tipičan organizam koji pronalazimo u okolišu (Peleg i sur. 2008).

No konstantno širenje klinički značajnih izolata bakterije *A. baumannii* van bolničkog okruženja u okoliš je evidentno (Higgins i sur. 2018, Hrenović i sur. 2016, Kovačić i sur. 2017, Šeruga Musić i sur. 2017). Dospjevanje izolata otpornih na antibiotike u okoliš predstavlja potencijalnu prijetnju ekosustavu u cijelosti. U vodenim ekosustavima bakterija dolazi u doticaj sa mnogim organizmima od kojih su nama najznačajnije ribe koje se koriste u komercijalne, prehrambene i rekreacijske svrhe (Burger 2002). S obzirom da postoji mogućnost zaraze tim istim izolatima potrebno je istražiti potencijalne puteve kolonizacije i posljedično tome infekcije. Xia i sur. (2008) zabilježili su pojavu jednog izolata *A. baumannii* na uginulim ribama na ribljim farmama u Kini. Dva izolata bakterije pronađena su na ribama u Mediteranu (Brahmi i sur. 2016). To ukazuje na sposobnost bakterije da zarazi riblji organizam. Dekić i sur. (2018) u svom

istraživanju proučavali su mogućnost kolonizacije klinički značajnih izolata *A. baumannii* u prirodnoj izvorskoj vodi na gupi ribicama (*Poecilia reticulata*) te su testirali slatkovodne ribe u rijeci Savi na prisutnost bakterije. Na škragama i u probavnom traktu riba u Savi nije pronađena bakterija. Također nisu primjećeni nikakvi znakovi infekcija niti pojava smrtnosti kod gupi ribica. Sposobnost bakterije da kolonizira riblji organizam proporcionalna je koncentraciji bakterija u vodenom mediju tj što je veća koncentracija bakterije veća je mogućnost da dođe do zaraze. Rezultati su pokazali da ribe nisu potencijalni vektori zaraza uzrokovanih kliničkim izolatima *A. baumannii* te ne predstavljaju prijetnju javnom zdravstvu. Kao razlog Dekić i sur. navode niske koncentraciju bakterije u prirodnim vodama te imunološki sustav ribe.

1.1.5 Cilj istraživanja

S obzirom na recentnu literaturu možemo zaključiti da *A. baumannii* putem ilegalno odbačenog ljudskog otpada ili ispusta neodgovarajuće pročišćenih otpadnih voda dolazi u prirodni okoliš, gdje predstavlja javnozdravstveni rizik. Stoga je potrebno dobiti uvid u mogućnost preživljavanja *A. baumannii* u vodenim medijima kako bi mogli predvidjeti njeno ponašanje u okolišu. Cilj ovog diplomskog rada je proučiti sposobnost preživljavanja okolišnih izolata bakterije *A. baumannii* u različitim vodenim medijima i pri različitim temperaturama kroz 50 dana praćenja.

2. MATERIJAL I METODE

2.1 Izolati *Acinetobacter baumannii*

U ovom radu korištena su dva okolišna izolata *A. baumannii*, pohranjeni na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta označeni kao IN31 i IN58 (Higgins i sur. 2018), izdvojena iz influenta Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba. Influent na ovom uređaju predstavlja skupnu kanalizaciju grada Zagreba s uključenim kućanskim, bolničkim, industrijskim i slivnim vodama. Oba izolata osjetljiva su na sve testirane antibiotike (Tablica 2).

Tablica 2. Prikaz osjetljivosti izolata IN31 i IN58 na antibiotike. IN-influent Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba; MEM-meropenem, IMI-imipenem, CIP-ciprofloxacina, LVX-levofloxacina, TOB-tobramycin, GEN-gentamicin, AMK-amikacin, MIN-minocycline, SXT-trimethoprim-sulphamethoxazole, CST-colistin. Preuzeto iz Higgins i sur. 2018.

Datum pronalaska izolata	Naziv izolata	MEM	IMI	CIP	LVX	TOB	GEN	AMK	MIN	SXT	CST	Antibiogram
23.9.2015	IN31	<0.25 S	<0.25 S	<0.25 S	<0.12 S	<1 S	<1 S	<2 S	<1 S	<20 S	≤ 0.5 S	S
26.1.2016	IN58	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.12 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 1 S	≤ 20 S	≤ 0.5 S	S

2.2 Hranjivi mediji

Korištena su tri tekuća medija: komercijalno dostupna prirodna izvorska voda (dalje u tekstu IZ), hranjivi bujon (Biolfe) (goveđi ekstrakt 3g/L, pepton 5g/L) razrijeđen destiliranom vodom u omjeru 1:100 (dalje u tekstu NB+D) te hranjivi bujon razrijeđen prirodnom izvorskom vodom također u omjeru 1:100 (dalje u tekstu NB+IZ).

Za brojanje bakterija korištena je Mueller-Hinton (Biolife) hranjiva podloga.

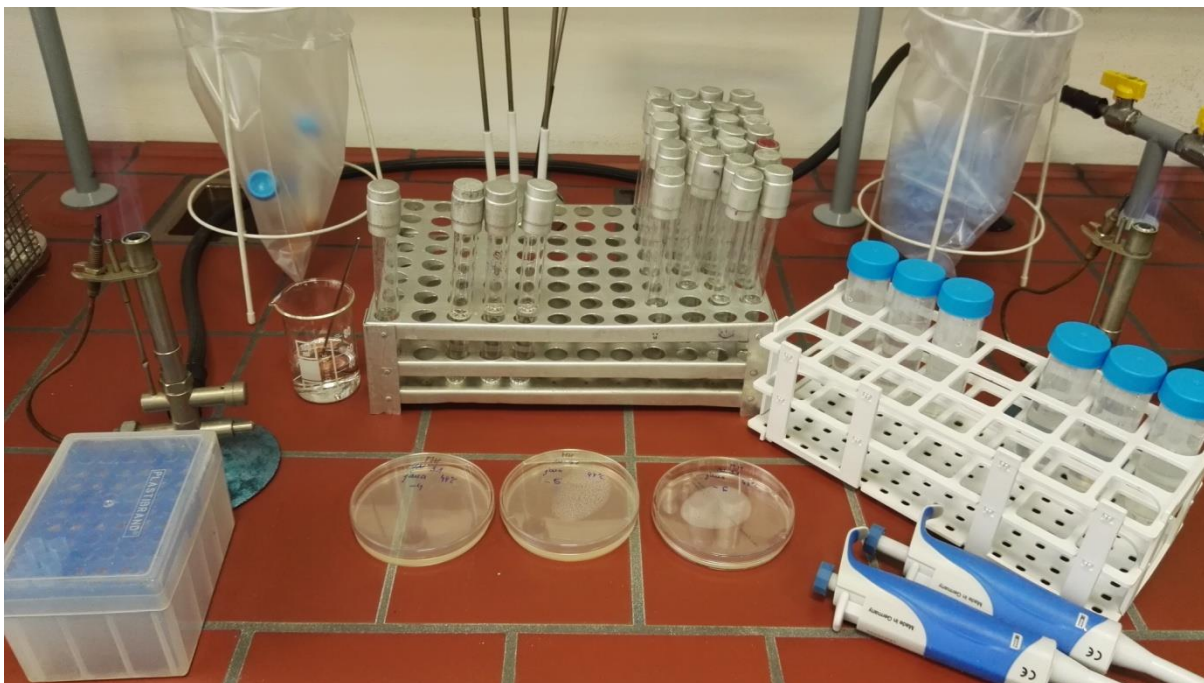
Mueller-Hinton (MH) agar pripremljen je prema uputama proizvođača. 38 g MH agar dehidrirane podloge uz dodatak 3 g agara otopljeno je u 1 L destilirane vode. Podloga se zatim sterilizirala u autoklavu na 121 °C 20 minuta. Sastav podloge je sljedeći: škrob 1,5 g/L, goveđi ekstrakt 2g/L, agar 17g /L, kiseli hidrolizat kazeina 17,5 g/L. Sterilni tekući agar ulijevan je u petrijevke ispod plamenika te u sterilnim uvjetima ostavljen da se ohladi.

Za eksperiment bilo je potrebno pripremiti i fiziološke otopine. U 1 L destilirane vode otopljeno je 8,5g NaCl-a. U epruvete je pipetirano po 9 m L otopine koja je zatim autoklavirana na 121 °C 20 minuta.

2.3 Izvedba pokusa

Prije početka pokusa pH vodenih medija izmjeren je pH metrom (WTW pH 330/set-1) te su dobivene slijedeće vrijednosti pH: IZ=8,40; NB+IZ=8,47; NB+D= 7,10. Da bi mogli pripremiti bakterijske suspenzije inokulirali smo izolate IN31 I IN58 na Mueller-Hinton agar te ih stavili na 42 °C/24 h. Bakterijska biomasa svakog izolata suspendirana je u 10 m L fiziološke otopine te je po 1 m L suspenzije dodan u Shott boce napunjene s 200 m L prethodno spomenutim sterilnim vodenim medijima. Određen je početni broj bakterija CFU (Colony Forming Unit) metodom decimalnih razrjeđenja i uzgojem na Mueller-Hinton agaru na temperaturi od 42 °C/24 h. Iz svake Shott boce prebačeno je tri puta po 30 m L bakterijske suspenzije u epruvete kako bi početni broj bakterija bio jednak. Te su suspenzije inkubirane u zatvorenim epruvetama bez miješanja na 4, 22 i 44 °C.

Broj vijabilnih kolonija praćen je tijekom 50 dana pokusa po prethodno definiranom vremenskom intervalu: prvi dan, drugi dan te svaki sedmi dan. Po 1 m L prethodno vorteksirane bakterijske suspenzije stavljen je u 9 m L fiziološke otopine te su se radila decimalna razrjeđenja (-2 do -7). Pipetom je 0,1 m L suspenzije nacjepljivano na hranjive podloge (Slika 3). Inkubacija je trajala 24 h na temperaturi od 42 °C. Nakon inkubacije prebrojane su kolonije te je izračunat CFU. Rezultati su logaritmirani i izraženi kao log CFU/mL.



Slika 3. Inokulacija bakterije *A. baumannii* iz određenih decimalnih razrjeđenja na Mueller-Hinton podlogu (autor: Iva Tomašin)

2.4 Statistička analiza

Postotak preživljavanja za grafički prikaz izračunat je po formuli:

$$\text{Preživljavanje (\%)} = \left(\frac{\log CFU / mL_{t(m)}}{\log CFU / mL_{t(0)}} \right) \times 100$$

gdje $t(0)$ predstavlja početni broj bakterija, a $t(m)$ broj bakterija u mjenom trenutku. Statistička analiza provedena je koristeći Microsoft Excel 2016 i Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc.) programe. Za usporedbu varijabli korišten je t-test na vrijednostima redukcije broja bakterija. Redukcija bakterija računala se po formuli:

$$\text{redukcija bakterija} = \log CFU / mL_{t(0)} - \log CFU / mL_{t(fin)}$$

gdje $t(0)$ predstavlja početni broj, a $t(fin)$ broj bakterija na kraju eksperimenta. Vrijednosti se smatraju statistički značajne ako je $p < 0,05$.

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Osnovom provedenih statističkih analiza podatke smo raspodijelili po temperaturama i prikazali grafički. Bakterija *A. baumannii* preživjela je svih 50 dana pokusa na temperaturama od 4, 22 (Slika 4) i 44 °C u tri različita vodena medija (izvorska voda, izvorska voda obogaćena hranjivima te destilirana voda obogaćena hranjivima). Najveću redukciju primjećujemo na 44 °C u prirodnoj izvorskoj vodi (Slika 7). Najmanja redukcija u odnosu na druge temperature desila se na 22 °C. Primjećujemo povećanje inicijalnog broja bakterija (Slika 6). Na 4 °C bakterijama je odgovarala destilirana voda sa hranjivima i redukcija broja bakterija je u tom vodenom mediju bila najmanja (Slika 5).



Slika 4. Prikaz kolonija *A. baumannii* iz pokusa na 22 °C u NB+izvorska voda, uzgojene na 42. dan pokusa na Mueller-Hinton agaru.

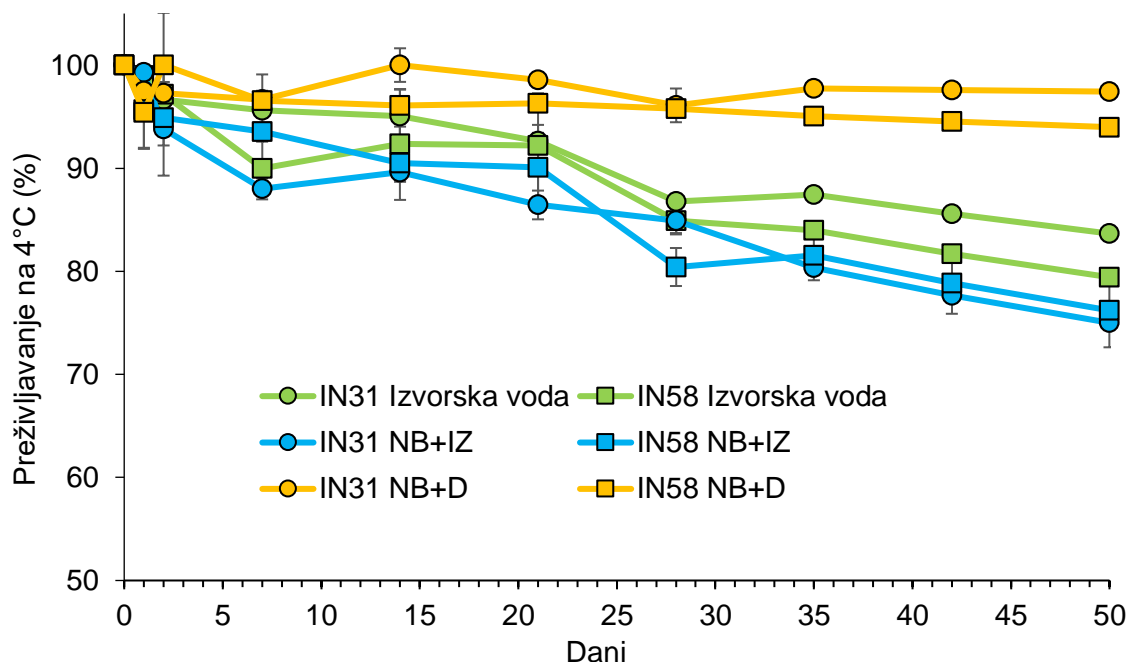
3.1 Preživljavanje *Acinetobacter baumannii* na 4 °C

U odnosu na prirodnu izvorsku vodu i izvorsku vodu obogaćenu hranjivim bujonom, najveći postotak preživljavanja na 4 °C bio je u destiliranoj vodi obogaćenoj hranjivim bujonom ($p=0,000$) (Tablica 3). Postotak preživljavanja dva proučavana izolata 50. dan bio je $\geq 95\%$ (Slika 5). Preživljavanje izolata IN31 nakon 50 dana iznosilo je 100

%, a izolata IN58 94 %. Najveći pad postotka bakterija bio je u izvorskoj vodi obogaćenoj hranjivima. Prvih 35 dana pokusa preživljavanje bakterija je vidljivo variralo (Slika 5.), no nakon 35 dana postaje uniformno i konstantno opada. Takav način ponašanja primjećujemo i u izvorskoj vodi. Javlja se konstantan pad broja bakterija, osim kod IN58 21-i dan kada je postotak preživljavanja iznosio 92 %. Zadnji dan mjerenja preživljavanje za IN31 iznosilo je 84 %, a IN58 79 %.

Tablica 3. Broj kolonija *A. baumannii* tijekom 50 dana praćenja na 4°C

Vrijeme (dan)		0	1	2	7	14	21	28	35	42	50
CFU/mL	IN31 IZ	4,00E+06	3,00E+06	2,00E+06	2,00E+06	2,50E+06	1,20E+06	5,00E+05	2,00E+05	3,00E+05	2,50E+05
		4,60E+06	4,00E+06	3,30E+06	2,40E+06	1,62E+06	1,62E+06	6,50E+05	4,70E+05	4,90E+05	1,95E+05
	IN58 IZ	1,40E+07	1,30E+07	9,00E+06	1,00E+06	3,00E+06	7,00E+06	1,00E+06	1,20E+06	3,00E+05	5,00E+05
		1,21E+07	9,30E+06	7,40E+06	1,60E+06	4,60E+06	1,90E+06	1,20E+06	1,15E+06	5,80E+05	5,70E+05
	IN31 NB+IZ	9,00E+06	8,00E+06	2,00E+06	6,00E+05	1,90E+06	1,20E+06	7,00E+05	2,00E+05	1,00E+05	1,00E+05
		6,70E+06	6,00E+06	4,20E+06	5,90E+05	1,18E+06	6,80E+05	7,10E+05	2,00E+05	9,00E+04	2,90E+05
	IN58 NB+IZ	1,60E+07	5,00E+06	5,00E+06	6,00E+06	5,00E+06	5,00E+06	5,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	6,00E+04
		1,13E+07	8,70E+06	6,70E+06	3,60E+06	1,60E+06	1,40E+06	5,80E+05	3,10E+05	4,00E+04	3,80E+04
	IN31 NB+D	9,00E+06	5,00E+06	4,00E+06	4,00E+06	1,60E+07	7,00E+06	4,00E+06	7,00E+06	9,00E+06	5,00E+06
		7,10E+06	5,70E+06	6,70E+06	5,50E+06	8,70E+06	5,80E+06	4,60E+06	3,60E+06	2,20E+06	2,80E+06
	IN58 NB+D	1,60E+07	5,00E+06	2,90E+07	8,00E+06	1,00E+07	8,00E+06	8,00E+06	4,00E+06	2,00E+06	1,00E+06
		1,39E+07	9,80E+06	7,70E+06	8,80E+06	6,10E+06	8,20E+06	6,90E+06	6,90E+06	3,00E+06	2,00E+06
log CFU/mL											
	IN31 IZ	6,6	6,5	6,3	6,3	6,4	6,1	5,7	5,8	5,7	5,5
		6,7	6,6	6,5	6,4	6,2	6,2	5,8	5,8	5,7	5,6
	IN58 IZ	7,1	7,1	7,0	6,0	6,5	6,8	6,0	6,0	5,9	5,7
		7,1	7,0	6,9	6,2	6,7	6,3	6,1	5,9	5,8	5,6
	IN31 NB+IZ	7,0	6,9	6,3	5,8	6,3	6,1	5,8	5,6	5,4	5,2
		6,8	6,8	6,6	5,8	6,1	5,8	5,9	5,5	5,3	5,1
	IN58 NB+IZ	7,2	6,7	6,7	6,8	6,7	6,7	5,7	6,0	5,8	5,7
		7,1	6,9	6,8	6,6	6,2	6,1	5,8	5,6	5,4	5,2
	IN31 NB+D	7,0	6,7	6,6	6,6	7,2	6,8	6,6	6,8	6,8	6,8
		6,9	6,8	6,8	6,7	6,9	6,8	6,7	6,7	6,7	6,7
	IN58 NB+D	7,2	6,7	7,5	6,9	7,0	6,9	6,9	6,9	6,8	6,8
		7,1	7,0	6,9	6,9	6,8	6,9	6,8	6,8	6,7	6,7



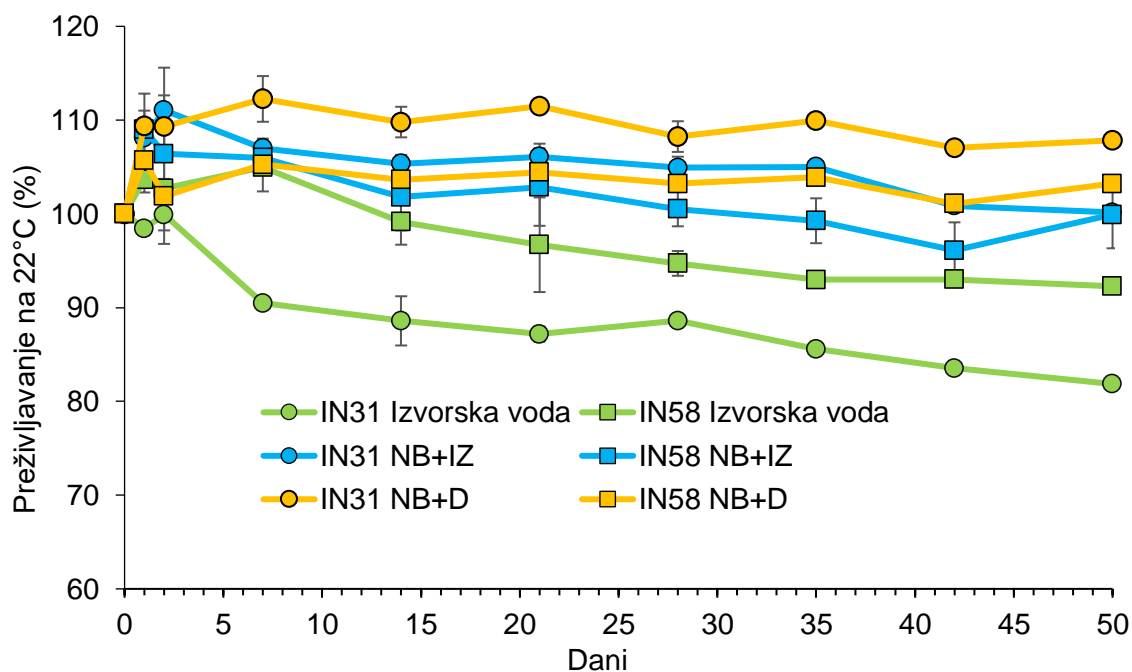
Slika 5. Preživljavanje *A. baumannii* na 4 °C izraženo u postocima sa standardnom devijacijom rezultata kroz pedeset dana praćenja (NB+IZ-nutrient broth + izvorska voda, NB+D- nutrient broth + destilirana voda). Početni broj bakterija iznosio je za IN31: izvorska voda $6,6 \pm 0,0$ log CFU/mL, NB+IZ $6,9 \pm 0,1$ log CFU/mL, NB+D $6,9 \pm 0,1$ log CFU/mL; za IN58: izvorska voda $7,1 \pm 0,0$ log CFU/mL, NB+IZ $7,1 \pm 0,1$ log CFU/mL, NB+D $7,2 \pm 0,0$ log CFU/mL medija.

3.2 Preživljavanje *Acinetobacter baumannii* na 22 °C

Na temperaturi od 22 °C bakteriji *A. baumannii* najbolje su odgovarali uvjeti u destiliranoj vodi obogaćenju hranjivima gdje se broj bakterija povećao i dosegao 112 % (IZ $p=0,001$; NB+IZ $p=0,011$) (IN31, Slika 6, Tablica 4). Kroz 50 dana pokusa postotak preživljavanja nije pao ispod 100 % te je 50-i dan pokusa iznosio za IN31 108 %, a za IN58 103 %. Bakterijama je odgovarala i izvorska voda obogaćena hranjivima, gdje je također postotak preživljavanja bio iznad 100 %, osim kod IN58. 35. dan pokusa iznosio je 99 %, a 42. dan 96 %. Bakteriji je najmanje odgovarala izvorska voda. Primjećujemo konstantan, ravnomjeren pad broja bakterija. Izolatu IN58 su malo bolje odgovarali uvjeti tokom cijelog pokusa. Zadnji dan mjerenja postotak preživljavanja bio je 96 %. IN31 pokazuje najveći pad te zadnji dan pokusa preživljavanje iznosi 82 %.

Tablica 4. Broj kolonija *A. baumannii* tijekom 50 dana praćenja na 22°C

Vrijeme (dan)		0	1	2	7	14	21	28	35	42	50
CFU/mL	IN31 IZ	4,00E+06	3,00E+06	4,00E+06	1,00E+06	1,10E+06	6,00E+05	1,10E+06	7,00E+05	4,00E+05	3,00E+05
		4,60E+06	3,80E+06	4,50E+06	1,00E+06	5,10E+05	6,10E+05	5,10E+05	3,20E+05	3,00E+05	2,40E+05
	IN58 IZ	1,40E+07	2,80E+07	2,10E+07	5,00E+07	1,60E+07	8,00E+06	6,00E+06	5,00E+06	9,00E+06	5,00E+06
		1,21E+07	2,02E+07	1,96E+07	1,73E+07	8,00E+06	7,20E+06	5,00E+06	3,40E+06	1,30E+07	2,70E+06
	IN31 NB+IZ	9,00E+06	2,80E+07	4,00E+07	1,00E+07	1,80E+07	2,30E+07	1,90E+07	1,60E+07	9,00E+06	9,00E+06
		6,70E+06	2,80E+07	5,00E+07	1,80E+07	1,82E+07	1,81E+07	1,51E+07	1,36E+08	8,80E+06	7,00E+06
	IN58 NB+IZ	1,60E+07	6,70E+07	3,00E+07	4,00E+07	1,00E+07	2,00E+07	1,20E+07	1,00E+07	6,00E+06	1,40E+07
		1,13E+07	5,18E+07	4,90E+07	3,20E+07	3,20E+07	2,30E+07	1,77E+07	1,41E+07	5,40E+06	1,25E+07
	IN31 NB+D	9,00E+06	4,00E+07	3,00E+07	7,00E+07	2,00E+07	7,00E+07	4,00E+07	4,60E+07	2,20E+07	3,10E+07
		7,10E+06	3,17E+07	4,10E+07	4,50E+07	7,10E+07	3,50E+07	2,20E+07	3,27E+07	2,72E+07	2,50E+07
	IN58 NB+D	1,60E+07	4,20E+07	1,00E+07	3,00E+07	2,00E+07	3,00E+07	2,00E+07	3,00E+06	1,00E+06	7,00E+05
		1,39E+07	3,52E+07	4,10E+07	4,20E+07	3,70E+07	3,20E+07	3,20E+07	3,10E+06	8,00E+05	1,50E+06
log CFU/mL	IN31 IZ	6,6	6,5	6,6	6,0	6,0	5,8	6,0	5,8	5,6	5,5
		6,7	6,6	6,7	6,0	5,7	5,8	5,7	5,5	5,5	5,4
	IN58 IZ	7,1	7,4	7,3	7,7	7,2	6,9	6,8	6,7	7,0	6,7
		7,1	7,3	7,3	7,2	6,9	6,9	6,7	6,5	7,1	6,4
	IN31 NB+IZ	7,0	7,4	7,6	7,0	7,3	7,4	7,3	7,2	7,0	7,0
		6,8	7,4	7,7	7,3	7,3	7,3	7,2	8,1	6,9	6,8
	IN58 NB+IZ	7,2	7,8	7,5	7,6	7,0	7,3	7,1	7,0	6,8	7,1
		7,1	7,7	7,7	7,5	7,5	7,4	7,2	7,1	6,9	7,1
	IN31 NB+D	7,0	7,6	7,5	7,8	7,3	7,8	7,6	7,7	7,3	7,5
		6,9	7,5	7,6	7,7	7,9	7,5	7,3	7,5	7,4	7,4
	IN58 NB+D	7,2	7,6	7,0	7,5	7,3	7,5	7,3	7,4	7,2	7,3
		7,1	7,5	7,6	7,6	7,6	7,5	7,5	7,5	7,3	7,5



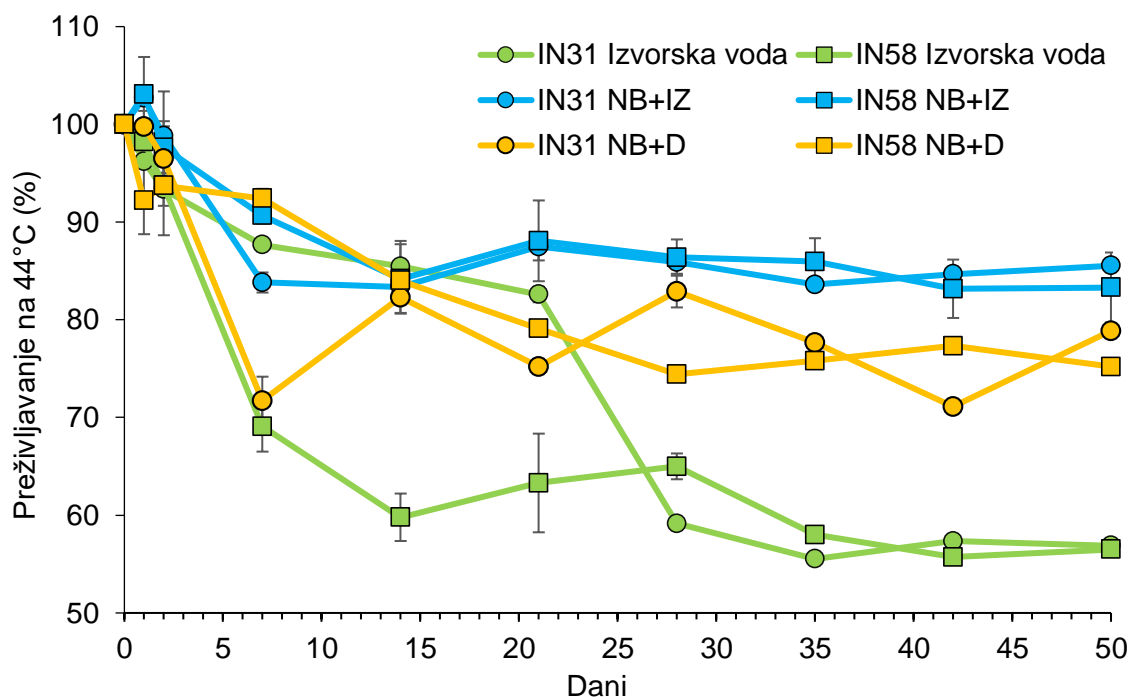
Slika 6. Preživljavanje *A. baumannii* na 22 °C izraženo u postocima sa standardnom devijacijom rezultata kroz pedeset dana praćenja (NB+IZ-nutrient broth + izvorska voda, NB+D- nutrient broth + destilirana voda. Početni broj bakterija iznosio je za IN31: izvorska voda $6,6 \pm 0,0$ log CFU/mL, NB+IZ $6,9 \pm 0,1$ log CFU/mL, NB+D $6,9 \pm 0,1$ log CFU/mL; za IN58: izvorska voda $7,1 \pm 0,0$ log CFU/mL, NB+IZ $7,1 \pm 0,1$ log CFU/mL, NB+D $7,2 \pm 0,0$ log CFU/mL medija.

3.3 Preživljavanje *Acinetobacter baumannii* na 44 °C

Na 44 °C primjećujemo najveće oscilacije u preživljavanju (Slika 7, Tablica 5). To je posebno vidljivo u destiliranoj vodi sa hranjivima gdje se postotak preživljavanja kod IN31 mijenjao na tjednoj bazi. Do naglog pada broja bakterija dolazi već sedmi dan kad je postotak preživljavanja iznosio 72 % da bi već idući tjedan porastao na 82 %. Te oscilacije traju kroz svih 50 dana promatranja kada postotak preživljavanja iznosi 79 % za IN31 te 75 % za IN58. Bakterijama je najviše odgovarala izvorska voda sa hranjivima (IZ $p=0,000 < NB+D$ $p=0.006$). Tu možemo primijetiti najmanje oscilacija i najmanji pad broja kolonija. Postotak preživljavanja za IN31 50-i dan iznosio je 86 %, a za IN58 83 %. U izvorskoj vodi je opet primijećen najveći pad broja bakterija. IN58 naglo je pao već sedmi dan pokusa te je njegova vrijednost bila 67 %. Do kraja pokusa vrijednost je pala na 56 %. IN31 je prvi nagli pad doživio 28. dan kada je postotak preživljavanja bio 59 %. Zadnji dan mjerenja preživljavanje je iznosilo 57 %.

Tablica 5. Broj kolonija *A. baumannii* tijekom 50 dana praćenja na 44°C

Vrijeme (dan)		0	1	2	7	14	21	28	35	42	50
CFU/mL	IN31 IZ	4,00E+06	2,00E+06	3,00E+06	9,00E+05	4,00E+05	3,00E+05	1,00E+04	7,00E+03	7,00E+03	7,00E+03
		4,60E+06	2,90E+06	8,00E+05	4,70E+05	5,40E+05	3,00E+05	7,00E+03	3,30E+03	5,80E+03	5,00E+03
	IN58 IZ	1,40E+07	1,10E+07	7,00E+06	6,00E+04	1,00E+04	3,30E+04	1,90E+04	6,60E+04	7,00E+03	1,09E+04
		1,21E+07	8,60E+06	3,10E+06	1,12E+05	3,20E+04	3,08E+04	1,04E+04	2,40E+04	1,21E+04	1,04E+04
	IN31 NB+IZ	9,00E+06	1,10E+07	8,00E+06	6,00E+05	6,00E+05	9,00E+05	9,00E+05	6,00E+05	6,00E+05	7,00E+05
		6,70E+06	1,29E+07	5,20E+06	5,90E+05	5,10E+05	1,25E+06	7,60E+05	5,50E+05	7,70E+05	8,70E+05
	IN58 NB+IZ	1,60E+07	1,90E+07	6,00E+06	3,00E+06	1,00E+06	2,00E+06	1,80E+06	1,40E+06	9,00E+05	1,20E+06
		1,13E+07	2,59E+07	1,37E+07	2,80E+06	1,00E+06	1,80E+06	1,15E+06	1,28E+06	8,00E+05	6,30E+05
	IN31 NB+D	9,00E+06	8,00E+06	3,00E+06	7,00E+04	6,90E+05	1,40E+05	7,70E+05	2,30E+05	1,20E+05	3,70E+05
		7,10E+06	7,40E+06	6,90E+06	1,14E+05	3,38E+05	1,72E+05	3,63E+05	2,30E+05	5,50E+04	2,08E+05
	IN58 NB+D	1,60E+07	5,00E+06	7,00E+06	4,00E+06	1,00E+06	7,00E+05	2,60E+05	2,70E+05	3,30E+05	2,20E+05
		1,39E+07	3,40E+06	4,00E+06	4,53E+06	1,13E+06	3,20E+05	1,83E+05	2,78E+05	3,75E+05	2,78E+05
log CFU/mL	IN31 IZ	6,6	6,3	6,5	6,0	5,6	5,5	4,0	3,8	3,8	3,8
		6,7	6,5	5,9	5,7	5,7	5,5	3,8	3,5	3,8	3,7
	IN58 IZ	7,1	7,0	6,8	4,8	4,0	4,5	4,3	4,8	3,8	4,0
		7,1	6,9	6,5	5,0	4,5	4,5	4,0	4,4	4,1	4,0
	IN31 NB+IZ	7,0	7,0	6,9	5,8	5,8	6,0	6,0	5,8	5,8	5,8
		6,8	7,1	6,7	5,8	5,7	6,1	5,9	5,7	5,9	5,9
	IN58 NB+IZ	7,2	7,3	6,8	6,5	6,0	6,3	6,3	6,1	6,0	6,1
		7,1	7,4	7,1	6,4	6,0	6,3	6,1	6,1	5,9	5,8
	IN31 NB+D	7,0	6,9	6,5	4,8	5,8	5,1	5,9	5,4	5,1	5,6
		6,9	6,9	6,8	5,1	5,5	5,2	5,6	5,4	4,7	5,3
	IN58 NB+D	7,2	6,7	6,8	6,6	6,0	5,8	5,4	5,4	5,5	5,3
		7,1	6,5	6,6	6,7	6,1	5,5	5,3	5,4	5,6	5,4



Slika 7. Preživljavanje *A. baumannii* na 44 °C izraženo u postocima sa standardnom devijacijom rezultata kroz pedeset dana praćenja (NB+IZ-nutrient broth + izvorska voda, NB+D- nutrient broth + destilirana voda. Početni broj bakterija iznosio je za IN31: izvorska voda $6,6 \pm 0,0$ log CFU/mL, NB+IZ $6,9 \pm 0,1$ log CFU/mL, NB+D $6,9 \pm 0,1$ log CFU/mL; za IN58: izvorska voda $7,1 \pm 0,0$ log CFU/mL, NB+IZ $7,1 \pm 0,1$ log CFU/mL, NB+D $7,2 \pm 0,0$ log CFU/mL medija.

4. RASPRAVA

U ovom istraživanju proučavali smo preživljavanje *A. baumannii* u vodenim medijima na različitim temperaturama kako bi lakše mogli predvidjeti njeno ponašanje u prirodnim vodenim okolišima.

Mediji koje smo koristili su prirodna izvorska voda i destilirana voda. Bakterijske suspenzije inkubirane su u zatvorenim epruvetama bez miješanja na 4, 22 i 44 °C. Temperatura od 4 °C predstavlja temperaturu vodenih tijela zimi, 22 °C je sobna temperatura, temperatura u bolnicama, a temperatura od 42 C predstavlja gornju granicu na kojoj promatramo učinak temperature na bakteriju.

Za razrjeđivanje hranjiva u istraživanjima je uobičajeno koristiti destiliranu vodu. U ovom diplomskom radu, korištena je destilirana i komercijalna izvorska voda za razrjeđivanje hranjiva. Destilirana voda je tekućina iz koje smo uklonili plinove i otopljene ili suspendirane čestice te je zbog toga ona hipotonična (<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=14785>). Bakterijska stanica je hipertonična te je destilirana voda nepogodna za život bakterija. Osmotski tlak izvan stanice (u destiliranoj vodi) je manji nego u stanici te voda prodire u nju i dolazi do bubrenja ili prsnuća stanice (Wood 2015). Da bi mogli promatrati preživljavanje bakterija u takvoj sredini potrebno je dodati hranjiva bakterijama. Prirodna izvorska voda predstavlja prirodne recipijente u njihovim normalnim oligotrofnim stanjima. Medij prirodna voda obogaćena hranjivima predstavlja ponašanje bakterije u eutrofnim sredinama, sredinama obogaćenim hranjivima, poput kanalizacije.

Istraživanjem je potvrđeno da bakterija ima sposobnost preživljavanja na različitim temperaturama u različitim vodenim medijima kroz 50 dana.

A. baumannii najbolje preživljavaju u destiliranoj vodi sa hranjivima na temperaturi od 4 °C i 22 °C. Na preživljavanje može utjecati i pH. Optimalni pH za razvoj bakterije je između 5,5 i 6,5 (Garrity i sur. 2005). Destilirana voda imala je najmanji pH koji je iznosio 7,10 te je taj medij najpovoljniji za razvoj bakterija. U sličnom istraživanju Dekić i sur. (2018) potvrdili su da je optimalna temperatura za dugoročno preživljavanje *A. baumannii* upravo na 4 °C i 22 °C. Matešić i sur. (2013) također su istraživali preživljavanje *A. baumannii* u destiliranoj vodi, no bez hranjiva i zabilježili da je bakterija preživjela jedanaest dana u nepovoljnom okolišu. Bakterijama najmanje odgovara

prirodna izvorska voda. U ovom mediju niti na jednoj temperaturi nije došlo do umnažanja. Takav razvoj događaja je očekivan s obzirom da navedeni vodeni medij manjka hranjivima potrebnim za rast i razmnožavanje bakterija. Uz to izmjereni pH je bio najviši i iznosio 8,4. Da bakterijama ne odgovara izvorska voda možemo primijetiti na 22 °C gdje je jedino u izvorskoj vodi došlo do pada broja bakterija. Za izolat IN31 već nakon drugog dana inkubacije, a IN58 nakon sedmog dana. U izvorskoj vodi sa dodanim hranjivima došlo je do umnažanja broja bakterija što znači da bi se isto moglo dogoditi i u prirodnom okolišu, odnosno zatvorenim vodenim sustavima (rijeke, bare) koje bi bile zagađene krutim ili tekućim ljudskim otpadom (Hrenović i sur. 2016, Šeruga Musić i sur. 2017). U prilog tome ide i istraživanje Gonzales i sur. (2018) gdje navode da je *A. baumannii* sposobna preživjeti u stresnim uvjetima i bez hranjiva šezdeset dana te ponovo naseliti različite površine, invadirati domaćina i vršiti zarazu. Bakterija preživljava i prilagođava se promjenama temperature i dostupnosti nutrijenata. Pokus je pokazao najbolje preživljavanje nakon šezdeset dana u izvorskoj vodi, što znači da bi u povoljnim uvjetima (pridolazak hranjiva iz otpada) bakterije i u prirodi mogle ponovo postati patogene. Bravo i sur. (2016) svojim istraživanjem došli su do zaključka da je preživljavanje *A. baumannii* u vodenim medijima izravno povezano sa temperaturom. Dokazali su da temperatura utječe na kulturabilnost i vijabilnost bakterije to jest povećanjem temperature isti se smanjuju. Općenito, u svim medijima na temperaturi od 44 °C primjećujemo najviše oscilacija u preživljavanju (Slika 6) što se može objasniti „bust and boom“ strategijom (Bravo i sur. 2016) te ubrzanim metabolizmom bakterija zbog povećanja temperature (Dekić i sur. 2018). „Bust and boom“ strategija preživljavanja je fenomen kada bakterije koje su preživjele stresne uvjete žive „na račun“ umrlih bakterija. S druge strane bakterije koje su kroz pedeset dana pokusa inkubirane na 4 °C imaju usporen metabolizam (Dekić i sur. 2018) te nema većih oscilacija u njihovom preživljavanju, kao što smo pokazali ovim pokusom. U odnosu na suspenzije bakterija u drugim medijima, na 22 °C i 44 °C, na 4 °C nije došlo do velikog smanjenja postotka preživljavanja. Najveći pad primjećujemo u izvorskoj vodi sa hranjivima, gdje je iznosio 25 %. Niže temperature mogu biti korisne za produženje preživljavanja mezofilnih bakterija u uvjetima sa manjkom nutrijenata (Arana i sur. 2010), kao što je izvorska voda zimi.

Kovačić i sur. (2017) otkrili su da izolati *A. baumannii* preživljavaju i u morskoj vodi kroz pedeset dana, no ne dolazi do umnažanja, vjerojatno zbog manjka hranjiva. U slučaju da bakterija *A. baumannii* dođe u otvoreno more, predstavljala bi veliku javno zdravstvenu prijetnju jer bi morske struje bakteriju proširile na veliko područje. Slično istraživanje provele su i Dekić i Hrenović (2018). U morsku vodu inokuliran je izolat iz bolničke otpadne vode. Zabilježen je pad preživljavanja već nakon sedam dana pokusa. Na kraju pokusa preživljavanje je iznosilo 67%. Štimac i sur. (2009) istraživali su preživljavanje *Klebsiella pneumoniae* u različitim vodenim medijima. Destilirana voda je također bila najpovoljniji medij za preživljavanje i u njoj je došlo do umnažanja bakterije. Krivulja preživljavanja u morskoj vodi bila je konstantna dok izvorska voda nije nimalo odgovarala bakteriji te 142. dan pokusa više nije bila pronađena u mediju. Možemo primijetiti da su rezultati ovog rada slični mojima. Kovačić i sur. (2018) istraživali su sposobnost preživljavanja bakterije *Pseudomonas aeruginosa* u destiliranoj vodi. Svi ispitivani izolati preživjeli su kroz 28 dana pokusa. Okolišni izolati pokazali su veći postotak preživljavanja od kliničkih, iz čega je zaključeno da preživljavanje u destiliranoj vodi ovisi o vrsti medija iz kojeg je bakterija izolirana.

Brojni autori istraživali su preživljavanje *A. baumannii* u bolničkom okruženju i na različitim suhim površinama. Wendt i sur. (1997) dokazali su da pojedini sojevi *A. baumannii* preživljavaju i do četiri mjeseca na suhim površinama poput keramike, PVC-a, gume i nehrđajućeg čelika. Mnogi su potencijalni izvori zaraze *A. baumannii* u bolnicama (Tablica 1). S obzirom da bakterija odlično preživljava na niskim temperaturama (4 °C), može preživjeti i u frižiderima. Tamo može dospjeti preko ruku bolničkog osoblja, kuta te nekim drugim zaraženim predmetom te dugo preživjeti u nepovoljnim uvjetima. Ako bakterija dospije na sobnu temperaturu, koja izvrsno pogoduje razvoju i razmnožavanju bakterije, vrlo lako može doći do neočekivanih epidemija u bolnicama. Iako zaraženi predmeti utječu na širenje *A. baumannii*, najveći utjecaj u širenju zaraze imaju oboljeli pacijenti (Towner 2009).

U drugom istraživanju Ivanković i sur. (2017) dokazali su da *A. baumannii* tvori biofilm kao mehanizam preživljavanja te je tako manje osjetljiva na dezinficijense. Biofilm predstavlja zajednicu dobro strukturiranih mikrokolonija koja ima sposobnost dugotrajnog preživljavanja i izmjene genetskog materijala (Goić-Barišić 2012). U velikom istraživanju koje su proveli Kaliterna i sur. (2011) otkriveno je da 70% kliničkih izolata u Hrvatskoj ima sposobnost stvaranja biofilma. Bakterije u vodenom mediju su

bile osjetljivije na djelovanje dezinficijensa, dok su bakterije inokulirane na keramiku pokazale veću otpornost na dezinficijense, što može predstavljati problem jer je to čest materijal u bolnicama. Koncentracije dezinficijensa koje bi iskorijenile planktonske populacije *A. baumannii* uništile su manje od 50% bakterija na staklu zaštićenih biofilmom.

S obzirom na lošu provedbu dezinfekcijskih mjera u bolnicama (Matešić i sur. 2013.), velike koncentracije patogenih organizama mogu doći u bolničke otpadne vode, odnosno u kanalizacijske vode (Hrenović i sur. 2016, Kovačić i sur. 2017). Slična istraživanja provedena su i drugdje u svijetu. U Pekingu su također pronađeni izolati *A. baumannii* u bolničkim otpadnim vodama, no nakon provedene dezinfekcije njihov broj se uvelike smanjio. *A. baumannii* nije pronađen u prirodnim recipijentima kao ni u gradskoj kanalizaciji. Osim same prisutnosti *A. baumannii* u okolišu, epidemiološki problem može predstavljati i horizontalni prijenos gena otpornosti na antibiotike na druge bakterije (Zhang 2013).

5. ZAKLJUČAK

Bakterija *Acinetobacter baumannii* sposobna je preživjeti tijekom 50 dana u hranjivom bogatom ili siromašnim vodenim medijima pri temperaturama od 4, 22, 44°C.

Na 4 °C u izvorskoj vodi i hranjivima bogatim vodenim medijima (destilirana voda i izvorska voda) bakterija ne pokazuje mogućnost razmnožavanja.

Najbolju sposobnost preživljavanja bakterija pokazuje na sobnoj temperaturi (22 °C) u destiliranoj vodi obogaćenoj hranjivima.

Najlošije preživljavanje od 57 % inicijalnog broja bakterija nakon 50 dana kontakata zabilježeno je u hranjivom siromašnoj izvorskoj vodi pri 44 °C.

U hranjivima bogatom vodenom mediju zabilježen je porast inicijalnog broja bakterija.

6. LITERATURA

1. Arana, I., Muela, A., Orruño, M., Seco, C., Garaizabal, I., Barcina, I. 2010. Effect of temperature and starvation upon survival strategies of *Pseudomonas fluorescens* CHA0: comparison with *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Ecology* **74**, 500-509.
2. Berlau, J., Aucken, H. M., Houang, E., Pitt T. L. 1999. Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *Journal of Hospital Infections* **42**, 201-204.
3. Brahmi, S., Touati, A., Cadière, A., Djahmi, N., Pantel, A., Sotto, A., Lavigne, J. P., Dunyach-Remy, C. 2016. First description of two OXA-23-mediated carbapenem resistance in Sequence Type 2 *Acinetobacter baumannii* isolates in *Pagellus acarne* fished in the Mediterranean Sea afar Bejaia (Algeria). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60** 2513–2515.
4. 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.
5. Brisou, J., Prevot A. R. 1954. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Achromobacter* group. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* **86**, 722-728.
6. Burger J. 2002. Consumption patterns and why people fish. *Environmental Research* **90** 125–135.
7. Chapartegui-González, I., Lázaro-Díez, M., Bravo, Z., Navas, J., Icardo J. M., Ramos-Vivas, J. 2018. *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. *Plos ONE* **13**: e0201961.
8. Dancer, S. J. 2014. Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clinical Microbiology Reviews* **27**, 665-690.
9. Dekić, S., Hrenović, J. 2018. Preživljavanje bakterije *Acinetobacter baumannii* u različitim tipovima vode. *Hrvatske vode* **26**, 35-38.
10. Dekić, S., Hrenović, J., Ivanković, T., van Wiple, E. 2018. Survival of ESKAPE pathogen *Acinetobacter baumannii* in water of different temperatures and pH. *Water Science & Technology* **78**, 1370-1376.

11. Dekić, S., Klobučar, G., Ivanković, T., Zanella, D., Vucić M., Bourdineaud, JP., Hrenović, J. 2018. Emerging human pathogen *Acinetobacter baumannii* in the natural aquatic environment: a public health risk? *International Journal of Environmental Health Research* **28**, 315-322.
12. Dijkshoorn, L., van Aken, E., Shunburne, I., van der Reijden, T. J., Bernards, A. T., Nemec, A., Towner, K. J. 2005. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. In faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clinical Microbiology and Infections* **11**, 329-332.
13. Eijkelkamp, B. A., Stroehrer, U. H., Hassan, K. A., Papadimitriou, M. S., Paulsen, I. T., Brown, M. H. 2011. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiology Letters* **323**, 45-51
14. European Centre for Disease Prevention and Control. 2016. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in healthcare settings. Stockholm, ECDC;, 2016.
15. Falagas, M. E., Karveli, E. A., Kelesidis, I., Kelesidis, T. 2007. Community-acquired *Acinetobacter* infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **26**, 857-868.
16. Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N.R., Staley, J.T. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, The Proterobacteria, Part B, The Gammaproterobacteria*. Springer, New York
17. Gennari, M., Stegagno, F. 1985. Isolation and characterisation of *Acinetobacter calcoaceticus* from fresh, frozen and stored fish products. *Microbio. Alim Nutrit.* **3**, 247-259.
18. Gennari, M., Stegagno, F. 1986. Isolation and characterisation of *Acinetobacter calcoaceticus* from raw, washed and frozen vegetables. *Archivio Veterinario Italiano* **37**, 131-137.
19. Gennari, M., Parini, M., Volpon, D., Serio, M. 1992. Isolation and characterization by conventional methods and genetic transformations of *Psychrobacter* and *Acinetobacter* from fresh and spoiled meat, milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology* **15**, 61-75.
20. Girlich, D., Poirel, L., Nordmann, P. 2010. First isolation of the blaOXA-23 carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **54**, 578-579.

21. Goić-Barišić, I. 2009. Mehanizmi rezistencije na karbapeneme u *Acinetobacter baumannii*. *Infektološki glasnik* **29**, 185-190.
22. Goić-Barišić, I., Towner, K. J., Kovačić, A., Sisko Kraljević, K., Tonkic, M., Novak, A., *i sur.* 2011. Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-72 carbapenemase. *Journal of Hospital Infection* **77**, 368-369.
23. Goić-Barišić, I. 2012. Multiplorezistentni *Acinetobacter baumannii* (MRAB) – deset godina nakon pojave prvih izolata u Hrvatskoj. *Infektološki glasnik* **32**, 67-70.
24. Goić-Barišić, I. 2018. Epidemiologija i rezistencija kliničkih izolata *Acinetobacter baumannii* u Hrvatskoj tijekom desetgodišnjeg razdoblja – što se promijenilo? *Medicina Fluminensis* **54**, 268-273.
25. Higgins, P., Hrenović, J., Seifert, H., Dekić, S. 2018. Characterization of *Acinetobacter baumannii* from water and sludge line of secondary wastewater treatment plant. *Water Research* **140**, 261-267.
26. Hrenović, J., Durn, G., Goić-Barišić, I., Kovačić, A. 2014. Occurrence of an environmental *Acinetobacter baumannii* strain similar to a clinical isolate in paleosol from Croatia. *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 2860-2866.
27. Hrenović J., Goić-Barišić I., Kazazić S., Kovačić A., Ganjto M., Tonkic M. 2016. Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. *Eurosurveillance* **21**:pii=30195.
28. Houang, E. T. S., Chu, Y. W., Leung, C. M., Chu, K. Y., Berlau, J., Ng, K. C., Cheng, A. F. B. 2001. Epidemiology and Infection Control Implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 228-234.
29. Howard A., O'Donoghue M., Feeney A. & Sleator R. D. 2012. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. *Virulence* **3**, 243–250.
30. Ivanković, T., Goić-Barišić, I., Hrenović, J. 2017. Reduced susceptibility to disinfectants of *Acinetobacter baumannii* biofilms on glass and ceramics. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **68**, 99-108.
31. Kaliterna, V., Kaliterna, M., Hrenović, J., Barišić, Z., Tonkić, M., Goić-Barišić, I. 2015. *Acinetobacter baumannii* in Southern Croatia: clonal lineages, biofilm formation, and resistance patterns. *The Journal of Infectious Diseases* **47**, 902-907.

32. Kovačić, A., Šeruga Musić, M., Dekić, S., Tonkic, M., Novak, A., Rubić, Z., Hrenović, J., Goić-Barišić, I. 2017. Transmission and survival of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outside hospital setting. *International Microbiology* **20**, 165-169.
33. Kovačić, A., Tafra, D., Hrenović, J., Goić-Barišić, I., Dumanić, T. 2018. Preživljavanje bakterije *Pseudomonas aeruginosa* u destiliranoj vodi. *Hrvatske vode* **26**, 181-186.
34. Matešić, M., Vučković, D., Gobin, I. 2013. Preživljavanje bakterija na suhim površinama u bolničkoj sredini. *Medicina Fluminensis 2014*. **50**, 39-46.
35. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2017. g., Akademija medicinskih znanosti Hrvatske. 2017. <http://iskra.bfm.hr/upload/REZISTENCJE%20KNJIGA%20za%20WEB%2017.pdf> preuzeto 26.12.2018.
36. Peleg, A. Y., Seifert, H., Paterson, D. L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology* **21**, 538-582.
37. Pendelton, J. N., Gorman, S. P., Gimlore B. F. 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert review of Anti-Infective Therapy* **11**, 297-308.
38. Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M. 1997. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 2819-2825.
39. Šeruga Musić, M., Hrenović, J., Goić-Barišić, I., Hunjak, B., Škorić, D. 2017. Emission of extensively-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* from hospital settings to the natural environment. *Journal of Hospital Infection* **96**, 323-327.
40. Štimac, I., Vasiljev Marchesi, V., Tomljenović, M., Rukavina, T. 2010. Preživljavanje vrste *Klebsiella pneumoniae* u različitim uzorcima voda. *Hrvatske vode* **18**, 13-18.
41. Towner, K. J. 2009. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection* **73**, 355-363.
42. Vranić-Ladavac, M., Bedenic, B., Minandri, F., Istok, M., Bosnjak, Z., Francula-Zaninovic, S., *i sur.* 2014. Carbapenem resistance and acquired class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii* from Croatia 2009-2010. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **33**, 471-478.

43. Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., Rüdén, H. 1997. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 1394-1397.
44. WHO (World Health Organisation) 2017. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery and Development of New Antibiotics. https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1 preuzeto 27.11.2018.
45. Wood, J. M. 2015. Bacterial responses to osmotic challenges. *Journal of General Physiology* **145**, 381-388.
46. Xia, L., Xiong, D., Gu, Z., Xu, Z., Chen, C., Xie, J., Xu, P. 2008. Recovery of *Acinetobacter baumannii* from diseased channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in China. *Aquaculture* **284**, 285–288.
47. Zhang, C., Qiu, S., Wang, Y., Qi, L., Hao, R, i sur. 2013. Higher isolation of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* from the sewage of the hospitals in Beijing. *PloS ONE* **8**: e64857
48. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=14785>. preuzeto 10.02.2019.

ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

- **Ime i prezime:** Iva Tomašin
- **Mobitel:** 098/ 9520-399
- **E-mail:** ivatomasin93@hotmail.com

Školovanje:

2016.-2019. Diplomski studij Ekologije i Zaštite prirode, modul kopnene vode
(Prirodoslovno-Matematički fakultet, Zagreb)

2014.-2016. Diplomski studij Urbanog šumarstva, zaštite prirode i okoliša
(Šumarski fakultet, Zagreb)

2011.-2014. Preddiplomski studij Urbanog šumarstva, zaštite prirode i okoliša
(Šumarski fakultet, Zagreb)

2007.-2011. IV. Jezična gimnazija, Zagreb

1999.-2007. Osnovna škola Otok, Zagreb

Vještine:

- Korištenje MS Office paketa, GIS, PhotoScape
- Jezici: Engleski-B2, Njemački-A2

Ostalo:

- Vozačka dozvola B kategorije