

PREŽIVLJAVANJE FRANCISELLA NOVICIDA U VODAMA IZ JEZERA LOKVE, LEPENICA I BAJER

Vidinić, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:849438>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivan Vidinić
PREŽIVLJAVANJE *FRANCISELLA NOVICIDA* U VODAMA IZ JEZERA LOKVE,
LEPENICA I BAJER
Završni rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marina Šantić

Završni rad obranjen je dana _____ u/na _____, pred
povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima 47 stranica, 8 slika, 4 tablice, 15 literaturnih navoda

Zahvala

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marini Šantić koja mi je omogućila sve potrebne materijale i pomogla svojim savjetima u izradi ovog završnog rada. Veliko hvala za ideju, vrijeme i strpljenje.

Također bi se htio zahvaliti dr. sc. Mateji Ožanič, dr. sc. Valentini Marečić te čitavom osoblju Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju na Medicinskom fakultetu u Rijeci na pomoći u izvršavanju praktičnog dijela završnog rada.

I na kraju, zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci i usmjeravanju prema pravom putu, kako u obrazovanju, tako i u životu.

Sažetak

F. tularensis je gram negativni kokobacil veličine 0,2-0,7 μm , asporogen, nepokretan i ne posjeduje pile. Vrsta *Francisella tularensis* obuhvaća četiri podvrste (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* i *novicida*) od kojih je *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) najvirulentnija i najpatogenija te uzrokuje tularemiju, bolest divljih životinja koja se može prenijeti na čovjeka. Ozbiljnost infekcije varira ovisno o mjestu ulaska bakterije, imunološkom stanju čovjeka i virulenciji uzročnika. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi sposobnost preživljavanja bakterije *Francisella novicida* u vodama iz jezera Gorskog kotra. Jezero Lokve, jezero Lepenica i jezero Bajer poslužili su kao izvor za uzimanje uzoraka voda za ispitivanje u praktičnom radu. Sva su tri jezera nastala umjetnim putem, odnosno izgradnjom brane koja zadržava vodu na odgovarajućem području u svrhu iskorištavanja energije vodotoka. U praktičnom radu je korišten bakterijski soj *F. novicida* U112, dok se za kultivaciju koristio BCYE agar. U radu su primijenjene i ostale hranjive podloge ovisno o bakteriji stalne mikroflore vode koja se proučavala. Uzorci su obrađeni metodom membranske filtracije. U vodama iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer proučavale su se promjene broja bakterije *F. novicida* u sterilnim i nesterilnim uzorcima za svako jezero pojedinačno. Provedena je i usporedba svih uzoraka sterilnih voda iz sva tri jezera te svih uzoraka nesterilnih voda iz sva tri jezera. Također je praćena promjena broja bakterija stalne mikroflore u uzorcima voda navedenih jezera prije i nakon unosa *F. novicida*. Obradom rezultata uočeno je da *F. novicida* preživljava u ispitivanim vodama iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer te da se bolje razmnožava u sterilnim, a lošije u nesterilnim uzorcima. Također, unosom *F. novicida* u uzorke s prirodnom mikroflorom dolazi do povećanja broja ostalih bakterija iz razloga što u „natjecanju“ za hranjive tvari uzimaju veći dio u odnosu na *F. novicida* pa joj time sprječavaju rast i razmnožavanje.

Ključne riječi: *Francisella*, tularemija, jezero Lokve, jezero Lepenica, jezero Bajer

Summary

F. tularensis is a gram negative cocobacillus 0.2-0.7 μm in size, asporogenic, immobile and does not possess fimbriae. The species *Francisella tularensis* comprises four subspecies (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* and *novicida*) of which *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (type A) is the most virulent and most pathogenic. It is causative agent of tularemia, a wildlife disease that can be transmitted to humans. The severity of the infection varies depending on the site of entry of the bacterium, the human immune status and the virulence of the agent. The aim of this study was to determine the viability of *Francisella novicida* in the water from lakes of Gorski Kotar. Lake Lokve, Lake Lepenica and Lake Bajer served as sources for sampling water for practical work. All three lakes were created artificially, that is, by constructing a dam that holds water in the appropriate area for the purpose of harnessing the water flow. In the practical work, the bacterial strain *F. novicida* U112 was used, while BCYE agar was used for cultivation. Other nutrient media were also applied in the study, depending on the bacterium of the permanent microflora of the water under study. Samples were processed by membrane filtration. Changes in *F. novicida* number in sterile and non-sterile samples were studied in the waters of Lake Lokve, Lepenica and Bayer for each lake individually. A comparison of all sterile water samples from all three lakes and all non-sterile water samples from all three lakes was also performed. Changes in the number of bacteria in the permanent microflora in the water samples of these lakes before and after the introduction of *F. novicida* were also monitored. Based on the results obtained, it was observed that *F. novicida* survives in the tested waters of Lokve, Lepenica and Bajer lakes and that it reproduces better in sterile and worse in non-sterile samples. Also, the introduction of *F. novicida* into specimens with natural microflora results in an increase in the number of other bacteria due to the fact that in the "competition" for nutrients they take up a greater proportion than *F. novicida* and thus prevent its growth and reproduction.

Keywords: *Francisella*, Tularemia, Lokve Lake, Lepenica Lake, Bayer Lake

Sadržaj

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. <i>Francisella</i> spp.	1
1.1.1. Taksonomska podjela	1
1.1.2. Fiziologija.....	2
1.1.3. <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	2
1.1.4. Tularemija	2
1.1.5. Geografska rasprostranjenost i epidemiologija	3
1.1.6. Epidemije tularemije u vodenim područjima	3
1.1.7. Rezervoari i putovi prijenosa	6
1.1.8. Unutarstanični život i virulencija	6
1.1.9. Klinička slika.....	7
1.1.10. Dijagnoza	7
1.1.11. Liječenje i prevencija	8
1.1.12. <i>Francisella novicida</i>	8
1.2. Vode.....	9
1.2.1. Jezero Lokve	10
1.2.2. Jezero Lepenica	11
1.2.3. Jezero Bajer	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Bakterijski soj	14
3.2. Hranjive podloge	14
3.3. Uzimanje uzoraka vode	19
3.4. Metoda membranske filtracije	19
3.5. Inokulacija <i>F. novicida</i>	21
3.6. Određivanje broja bakterija	23
3.7. Statistička obrada podataka	23
4. REZULTATI.....	24
4.1. Kinetika rasta <i>F. novicida</i> u vodi iz jezera Lokve	24
4.2. Kinetika rasta <i>F. novicida</i> u vodi iz jezera Lepenica	25
4.3. Kinetika rasta <i>F. novicida</i> u vodi iz jezera Bajer	26
4.4. Kinetika rasta <i>F. novicida</i> u sterilnim vodama iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer....	28
4.5. Kinetika rasta <i>F. novicida</i> u nesterilnim vodama iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer	29

4.6.	Mikrobiologija jezera Lokve, Lepenica i Bajer prije i nakon unosa <i>F. novicida</i>	31
4.7.	Određivanje ukupnog broja bakterija u vodi	33
5.	RASPRAVA	34
6.	ZAKLJUČAK	36
7.	LITERATURA	37

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. *Francisella* spp.

Bakterija roda *Francisella* ime je dobila u čast Edwardu Francisu, američkom mikrobiologu koji je 1922. godine otkrio uzročnika tularemije, odnosno bakteriju koja je potom nazvana *Francisella tularensis*. Spomenuti mikroorganizam je prvi put izoliran 1911. godine iz malih sisavaca u okrugu Tulare u Kaliforniji (9,10).

1.1.1. Taksonomska podjela

Rod *Francisella* se sastoji od dviju vrsta. Vrsta *Francisella tularensis* obuhvaća četiri podvrste (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* i *novicida*) od kojih je *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) najvirulentnija i najpatogenija te uzrokuje tularemiju, bolest divljih životinja koja se može prenijeti na čovjeka. Druga vrsta roda *Francisella* jest *Francisella philomiragia* (9). Neke od ostalih otkrivenih vrsta bakterija roda *Francisella* su: *F. haliotica*, *F. hispaniensis*, *F. noatunensis*, *F. salina*, *F. frigiditurrens*, *F. guangzhouensis*, *F. marina*, *F. ulginis* i *F. endociliophora* (13).

1.1.2. Fiziologija

F. tularensis je gram negativni kokobacil veličine 0,2-0,7 µm, asporogen, nepokretan i ne posjeduje pile. Obavijen je tankom kapsulom, preživljava isključivo u uvjetima bogatim kisikom i zahtjeva 3 dana kultivacije (9).

1.1.3. *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*

U prirodi *F. tularensis tularensis* i *F. tularensis novicida* zauzimaju različite ekološke niše. *F. tularensis* je klasični vektorski zoonotski patogen, dok *F. novicida* nije. Kao unutarstanični patogen, *F. tularensis* (i subsp. *tularensis* i subsp. *holarctica*) inficira, uzrokuje bolest i smrtnost u velikom broju životinja domaćina. Održavanje *F. tularensis* u prirodi uključuje ciklus u kojem sisavci služe kao domaćini za pojačanje, a vektori artropoda hrane se tim domaćinima kako bi se bakterija prenijela na druge životinje (1).

1.1.4. Tularemija

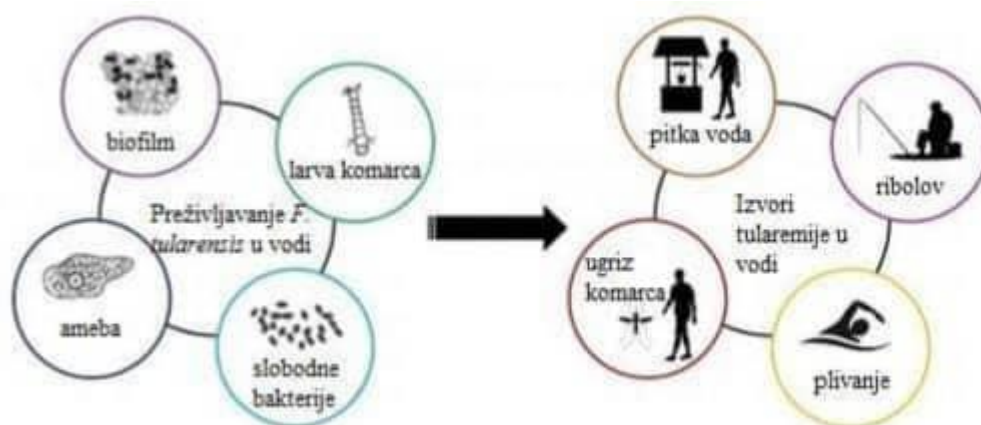
Tularemija je zoonoza čiji je uzročnik *Francisella tularensis*, a karakteriziraju ju kožne lezije na mjestu ulaza bakterije uz upalu limfnih čvorova, pneumoniju ili stanje povišene temperature. Prvenstveno je bolest divljih životinja, a čovjek se može zaraziti susretom sa zaraženom životinjom ili insektom prijenosnikom. Prvi put je prepoznata kao bolest glodavaca nalik na kugu, a nazvana je po okrugu Tulare u Kaliforniji gdje je bolest bila endemska među glodavcima. Nakon 1940. godine *F. tularensis* je korištena i kao potencijalno biološko oružje u sukobima između SAD-a i SSSR-a u Hladnom ratu (1,8,10).

1.1.5. Geografska rasprostranjenost i epidemiologija

Francisella tularensis subsp. *tularensis* (tip A) se pojavljuje isključivo u Sjevernoj Americi, a podvrsta *holarctica* (tip B) je endemična u pojedinim dijelovima Europe, Azije i Sjeverne Amerike. U Hrvatskoj se bolest javlja povremeno. Tularemija je sezonska bolest te do učestalije pojavnosti dolazi u ljetnim mjesecima zbog češćeg kontakta sa zaraženim zečevima i člankonošcima, i u vrijeme ratnih sukoba zbog boravka u prirodi. Posebno su ugroženi ljudi koji su u stalnom kontaktu sa životinjama (lovci, mesari, krznari). Bolest se najčešće pojavljuje u ruralnim predjelima, dok je u urbanoj sredini učestalost niska (2,8,9).

1.1.6. Epidemije tularemije u vodenim područjima

Epidemiologija bakterije roda *Francisella* složena je i varira ovisno o ekosustavu i geografskom području. Postoje određeni nedostaci u poznavanju uloge člankonožaca, divljih životinja i okoliša u održavanju infekcije u prirodnim staništima ali je poznato da spomenuti mikroorganizam preživljava u vodi, larvama komaraca, amebama i u biofilmu. Čovjek može biti zaražen konzumiranjem kontaminirane vode, ubodom komarca i tijekom plivanja ili ribolova (12,13).



Slika 1. Preživljavanje *F. tularensis* u vodi te putovi prijenosa na čovjeka. *F. tularensis* u vodi preživljava u amebama, larvama komaraca, u obliku biofilma te se može naći i kao slobodno živuća bakterija. Čovjek se zarazi ugrizom komarca ili ingestijom mikroorganizma prilikom ribolova, plivanja i konzumiranja kontaminirane vode. Tekst je prilagođen prema članku broj 13.

DNA iz bakterije *F. tularensis* pronađena je u vodi i sedimentu, što nam govori da sigurno opstaje u okolišu. Visoko endemična područja ili prirodna žarišta tularemije poznata su već nekoliko desetljeća. U tim se područjima slučajevi tularemije javljaju svake godine i to u većem broju nego u manje pogođenim područjima. Na primjer, područja visoke endemičnosti identificirana su u Njemačkoj i Švedskoj. U Švedskoj je izbijanje tularemije otkriveno teorijom fokalne infekcije što znači da su slučajevi tularemije kod ljudi poticali iz različitih lokalnih izvora infekcije i da je na tim mjestima moglo doći do preživljavanja bolesti. Prema laboratorijskim eksperimentima *F. holarctica* preživljava u vodi nekoliko mjeseci, pa je s obzirom na njenu snažnu povezanost s vodom, moguće da komarci igraju ulogu u prenošenju tularemije iz vodenih izvora na ljude. Iako ne postoje eksperimentalni podaci koji bi podržali ovu tvrdnju, sezona epidemija tularemije kod ljudi ima tendenciju da se javlja u ljeto i jesen, kada je broj komaraca najveći. Prijenos *F. tularensis* sa zaraženih

komaraca nije eksperimentalno potvrđen, no pretpostavlja se da se takav prijenos odvija u vrlo niskom postotku pa je time bilo teže potvrditi pretpostavku (12).

Glodavci su također uključeni u širenje tularemije kontaminiranom hranom i vodom. U Norveškoj se epidemije tularemije kod ljudi pripisuju pitkoj vodi iz bunara koje su zagađene mrtvim lemingom ili njegovim izlučevinama. Slično tome, na Kosovu je izbijanje orofaringealne tularemije kod ljudi pripisano kontaminaciji hrane i vode fekalijama glodavaca. Iz dosad provedenih istraživanja nije jasno djeluju li male vrste glodavaca kao pojačivači infekcije tularemije ili su možda rezervoari ili se njihova uloga razlikuje u različitim područjima. Crvena lisica, divlja svinja i rakunski pas mogu se zaraziti bakterijom *F. tularensis* kada jedu zaražen plijen, poput zečeva i malih glodavaca, te potom razviju antitijela. Međutim, ne smatraju se da su ove vrste osobito osjetljive na razvoj bolesti. Njihova potencijalna uloga asimptomatskih nositelja ili širenja infekcije u prirodi nije istražena. U proteklih 20 godina, slučajevi tularemije koji su povezani s kontaminiranom pitkom vodom prijavljeni su u mnogim državama u Europi među kojima su Turska, Kosovo, Bugarska, Gruzija, Makedonija, Norveška, Švedska, Italija i Njemačka (12,13).

F. novicida je u rijetkim slučajevima ljudski patogen. Dosad je objavljeno tek nekoliko slučajeva gdje je pronađena *F. novicida* kod čovjeka. Kod svih slučajeva izvor zaraze su bila vodena područja. U SAD-u se dogodio slučaj bakterijemije *F. novicida* nakon nesreće utapanja čovjeka u Atlantskom oceanu i još nekoliko slučajeva koji su se dogodili nakon izlaganja vrućoj izvorskoj vodi u blizini slanog jezera te nakon izlaganja vodi iz privatnog bunara za vodu. U Australiji je prijavljen slučaj gdje je pacijent razvio ulceroglandularni oblik infekcije *F. novicida* nakon što se porezao u bočatoj vodi. Treba napomenuti da je većina pacijenata oboljelih od infekcije *F. novicida* imunokompromitirana. Identifikacija *F. novicida* nikada nije zabilježena kod sisavaca ili člankonožaca. Jedini poznati rezervoar ove bakterije je

vodeni okoliš o čemu svjedoči višestruko ponovljena izolacija *F. novicida* iz uzoraka vode (13).

1.1.7. Rezervoari i putovi prijenosa

Klinički izraz tularemije kod ljudi ovisi prvenstveno o putu prijenosa. Ljudi se inficiraju izravnim kontaktom sa zaraženim životinjama, gutanjem zaražene vode ili hrane i udisanjem infektivnih aerosola.

Domaćini *F. tularensis* su brojne divlje i domaće životinje (sisavci, kućni ljubimci, ptice) od kojih su najčešći glodavci i zečevi. Bolest se prenosi vektorski, odnosno člankonošcima kao što su krpelji, uši, muhe i komarci. Čovjek se može zaraziti kontaktom sa zaraženim životinjama, a moguća je i laboratorijska infekcija. Jednim od najčešćih načina prijenosa bakterije na čovjeka se smatra ubod krpelja na zečju kožu. Zečevi roda *Sylvilagus* i *Lepus* se smatraju najvažnijim rezervoarima te je iz tog razloga tularemija poznata i pod nazivom „zečja groznica“. *F. tularensis* je izrazito infektivni patogen pa je stoga dovoljno unijeti (inhalacijom ili inokulacijom) 10 do 50 mikroorganizama da bi došlo do pojave bolesti. Osim udisanjem, uzročnik može ući u organizam čovjeka kroz oštećenu kožu ili sluznicu konjunktiva, usne šupljine ili ždrijela. Do sada nije zabilježen prijenos bakterije s čovjeka na čovjeka (8,9,10).

1.1.8. Unutarstanični život i virulencija

F. tularensis je fakultativni unutarstanični patogen kojem su makrofagi glavno stanište, a pored njih može preživjeti i u stanicama retikuloendotelnog sustava. Virulentni sojevi imaju antifagocitnu, polisaharidnu kapsulu koja smanjuje patogenost bakterije ukoliko ju izgubi. Uzročnik posjeduje endotoksin. Za kontrolu umnažanja bakterije u makroorganizmu nužan je

jak imunološki odgovor s proizvodnjom gama interferona kao i čimbenik tumorske nekroze (eng. TNF, tumor necrosis factor) (9,10).

1.1.9. Klinička slika

Klinička slika infekcije varira ovisno o mjestu ulaska bakterije, imunološkom stanju čovjeka i virulenciji uzročnika. Iz tog razloga bolest može proći asimptomatski, biti blagog oblika bez posljedica ili se razviti u akutnu sepsu s brzim smrtnim ishodom. Nakon razdoblja inkubacije od 3 do 5 dana, bolest često počinje prilično naglim simptomima nalik gripi kao što su groznica, zimica, slabost, bol u grlu i glavobolja. Hepatosplenomegalija (kod 20% bolesnika) i osip (kod 35% bolesnika) su česti simptomi dok su druge kliničke manifestacije ovisne o mjestu ulaza infekta. Obzirom na mjesto ulaza bakterije, razlikujemo vanjske i unutarnje oblike tularemije. Vanjski oblici su ulceroglandularni, glandularni, okuloglandularni i tonziloglandularni (anginozni), a unutarnji su plućni, tifoidni (septički) i abdominalni oblik. Plućni oblik odgovara atipičnoj pneumoniji, zahvaća starije bolesnike te je najteži oblik tularemije uz najviši letalitet. Od ostalih poremećaja može doći do pojave meningitisa, hepatitisa i zatajivanja bubrega (2,8,9,10).

1.1.10. Dijagnoza

Uzročnik tularemije se može izolirati iz kožnih ogrebotina, sputuma, limfnih čvorova i krvi. Na uzorcima koji idu na laboratorijsku analizu je potrebno označiti da se sumnja na tularemiju kako bi se zaštitilo laboratorijsko osoblje. Proces kultivacije *F. tularensis* je težak i dugotrajan pa se tularemija stoga dokazuje serološkim testovima (ELISA, western blot, aglutinacija). Uz titar protutijela, u dijagnostici se također primjenjuje i PCR test (9,10).

1.1.11. Liječenje i prevencija

F. tularensis je otporna na sve beta laktamske antibiotike pa je najbolji izbor uzimanje gentamicina ili streptomicina kroz 10 dana. Za liječenje tularemije se još mogu koristiti fluorokinoloni i doksiciklin. Najvažnija mjera prevencije tularemije je izbjegavanje susreta sa bolesnim ili uginulim životinjama (gdje *francisella* preživljava mjesecima) i pijenje izvorske vode koje mogu biti kontaminirane. Nošenje odjeće s dugim rukavima i nogavicama je potrebno kako bi se izbjegao ugriz zaraženog vektora. Osobama s visokom izloženosti infekciji se preporučuje atenuirano cjepivo (8,9,10). Preporučuje se pojačani aktivni nadzor tularemije, što uključuje istodobno ispitivanje ljudi, divljih životinja, domaćih životinja i vektora. To će pridonijeti boljem razumijevanju uloge različitih životinjskih vrsta i vektora u razvoju, prenošenju i održavanju bolesti. Razvoj jednostavnih terenskih dijagnostičkih metoda, primjenjivih na razne životinjske vrste, olakšao bi terenska ispitivanja (12).

1.1.12. *Francisella novicida*

U usporedbi s *F. tularensis*, infekcija *F. novicida* nije povezana sa zdravim osobama. Infekcija *F. novicida* kod ljudi je iznimno rijetka i stoga ju je često teško dijagnosticirati. Dokumentirano je samo 12 slučajeva. U australskom bolesniku zabilježena je infekcija nalik *F. novicida*, međutim, usporedbe genoma pokazuju da je soj sličniji *F. hispanensis*. Bolest koju uzrokuje *F. novicida* ne podsjeća na tularemiiju. Kliničke informacije dostupne za 11 prijavljenih slučajeva ukazuju na to da se 9 slučajeva *F. novicida* dogodilo u bolesnika koji su imunokompromitirani ili imaju temeljne zdravstvene probleme. Vrućica i akutna bolest,

obilježja tularemije kod zdravih osoba, su kod infekcije s *F. novicida* uočene isključivo kod imunokompromitiranih bolesnika. Kod dvije zdrave osobe s infekcijom *F. novicida* prijavljena je regionalna limfadenopatija, bez vrućice ili drugih simptoma. S obzirom na rijetkost infekcije bakterijom *F. novicida* kod ljudi, malo se zna o tome kako se uzročnik prenosi. Prijavljene ljudske infekcije povezane su s nerazjašnjenim putevima izlaganja. Za one slučajeve u kojima je utvrđen način infekcije, dva slučaja su bila posljedica gotovo utapanja u slanoj vodi, a tri slučaja su bila povezana s onečišćenjem okoliša. Nema dokaza koji bi upućivali na to da se *F. novicida* može prenositi putem zaraženih životinja ili vektorima člankonošcima. Za razliku od *F. tularensis*, identifikacija *F. novicida* nikada nije prijavljena kod divljih životinja (zdravih ili umirućih), što ukazuje da u prirodi *F. novicida* nije zoonotska bakterija. *F. novicida* također nikada nije identificirana u artropodima u prirodi. Štoviše, u slučaju artropoda, čini se da nedostatak identifikacije *F. novicida* nije rezultat neodgovarajućih metoda ispitivanja jer su brojne bakterije slične rodu *Francisella* identificirane u krpeljima putem PCR-a i sekvenciranja. Budući da artropodni vektori karakteristično stječu infekciju od zaraženih životinja, nedostatak identifikacije *F. novicida* u člankonošcima u skladu je s pretpostavljenom nesposobnošću *F. novicida* da uzrokuje bakterijemiju kod divljih životinja. Vrlo je vjerojatno da se *F. novicida* nalazi u ekološkoj niši i da se razmnožava u prirodi putem mehanizma koji ne uključuje domaćine sisavce ili člankonošce. Jedini izvor bakterije *F. novicida* do danas su slane vode. To uključuje soj vrste *F. novicida* U112 kao i 9 drugih izolata *F. novicida*. Ostali okolišni izvori *F. novicida*, uključujući bočatu vodu i tlo, otkriveni su na temelju PCR detekcije i analize sekvenci (1).

1.2. Vode

Izvor ispitivanih voda koje se koriste u ovom radu su tri akumulacijska jezera s područja Gorskoga kotara: jezero Lokve, jezero Lepenica i jezero Bajer. Sva su tri jezera nastala

umjetnim putem, odnosno izgradnjom brane koja zadržava vodu na odgovarajućem području koje podrazumijeva duboke i uske riječne doline gdje bočne strane čine prirodne zidove. Svrha izgradnje brane je hidroelektrana, dakle iskorištavanje energije vodotoka kako bi se proizvela električna energija. Voda koja se zadržava na brani može se također koristiti za vodoopskrbu i navodnjavanje (4,5,6).

1.2.1. Jezero Lokve

1.2.1.1. Geografski položaj

Jezero Lokve je udaljeno oko 10 km od Delnica prema jugozapadu te tri km od mjesta Lokve prema zapadu. Okolicu jezera čini šumovito područje obraslo crnogoricom te svojim izduženim i višekrakim oblikom podsjeća na način njegova postanka (potapanje okolnog područja). Proteže se od sjeverozapada prema jugoistoku. U blizini Lokvarskog jezera se nalazi špilja Lokvarka koja je zbog svojih ljepota proglašena spomenikom prirode (4,5,7).

1.2.1.2. Karakteristike

Nastalo je 1995. godine podizanjem brane visoke 51 m, odnosno zaustavljanjem toka rijeke Lokvarke koja je i jedina pritoka jezera. Jezero je duboko 40 metara, površine 2,1 km², nalazi se na 767 m nadmorske visine te se ulijeva u potok Križ. Prema postanku i smještaju vrlo je slično jezeru Bajer te zajedno s njim spada među najviša jezera u Hrvatskoj (4,7).

1.2.1.3. Način korištenja

Jezero predstavlja turističku atrakciju, omiljeno je među rekreativcima (šetači, biciklisti, planinari) te je bogato raznim vrstama riba koje privlače velik broj ribiča. Najkarakterističnije vrste su pastrva, klen, šaran i karas, od kojih se ističe pastrva zbog svoje veličine. 1973. godine je ondje ulovljena pastrva koja je bila duga 124 cm i težila 25,4 kg, što predstavlja

svjetski rekord u ribolovu u kontekstu jezerskih pastrvi. Osim ribolova, na jezeru se organiziraju veslačke regate i natjecanja u podvodnoj orijentaciji. Dio je hidroenergetskog sustava Vinodol (4,5,7).

1.2.2. Jezero Lepenica

1.2.2.1. Geografski položaj

Fužinarski kraj je izuzetno bogat vodom, dok su Fužine hrvatsko naselje koje godišnje primi najveću količinu oborina (do 4000 mm/m²). Kako bi se ta velika količina vode iskoristila, u tom su kraju napravljena tri akumulacijska jezera: Lepenica, Bajer i Potkoš. Jezero Lepenica je smješteno zapadno od jezera Bajer kod naselja Fužine u Gorskom kotaru i površinom je najveće u fužinarskom kraju. Pruža se u smjeru od istoka prema zapadu u duljini od 2 km (5,6,7).

1.2.2.2. Karakteristike

Nastalo je 1988. godine izgradnjom brane u Lepeničkoj dolini, odnosno zaustavljanjem toka rijeke Ličanke koja je i jedina pritoka jezera. Jezero je duboko 18 m, površine 0,45 km², nalazi se na 730 m nadmorske visine te se ulijeva u rijeku Ličanku. Osim rijeke Ličanke, jezero dobiva vodu i iz šumskih potoka koji se spuštaju s okolnih brda (6,7).

1.2.2.3. Način korištenja

Zbog visoke temperature vode koja ljeti može dosegnuti 23 °C, jezero je pogodno za kupanje te se na njemu svake godine održavaju prvenstva u orijentacijskom ronjenju i natjecanja u ribolovu. Dio je hidroenergetskog sustava Vinodol (6,7).

1.2.3. Jezero Bajer

1.2.3.1. Geografski položaj

Jezero Bajer drugo je po veličini u fužinarskom kraju, a riječ bajer u nekim dijelovima Hrvatske ima značenje „umjetno jezero“, što odgovara njegovom postanku. Pruža se u smjeru od sjevera prema jugu (5,6,7).

1.2.3.2. Karakteristike

Nastalo je u periodu od 1947. do 1950. godine gradnjom brane, odnosno zaustavljanjem toka rijeke Ličanke koja je i jedina pritoka jezera. Jezero je vrlo plitko (najveća dubina je 7 m), površine 0,36 km², nalazi se na 730 m nadmorske visine te se ulijeva u rijeku Ličanku (6,7).

1.2.3.3. Način korištenja

Turistički je najatraktivnije jezero gorske Hrvatske te je privlačno izletnicima i vikendašima zbog izgrađene šetnice uz rub jezera i posjeta špilji Vrelo, otkrivenoj za vrijeme izgradnje brane. Mala udaljenost od mora (oko 30 km) omogućava mu da bude turističko odredište i u ljetnim mjesecima kada posjetitelji mijenjaju kupanje u moru šumovitom okolicom jezera. Najvažnija aktivnost koja se dešava na jezeru je športski ribolov, dok rekreativci mogu uživati u pogledu šetajući po uređenim šetnicama ili ploviti mirnom vodom u iznajmljenom čamcu. Dio je hidroenergetskog sustava Vinodol (5,6,7).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog završnog rada bio je ispitati preživljavanje bakterije *F. novicida* u vodama iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer na način da su se proučavale promjene broja spomenute bakterije u sterilnim i nesterilnim uzorcima za svako jezero pojedinačno. Provedena je i usporedba svih uzoraka sterilnih voda iz sva tri jezera te svih uzoraka nesterilnih voda iz sva tri jezera. Također je praćena promjena broja bakterija stalne mikroflore u uzorcima voda navedenih jezera prije i nakon unosa *F. novicida*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bakterijski soj

U praktičnom je radu korišten bakterijski soj *F. novicida* U112 koji raste na BCYE agaru tvoreći bijelo-sive kolonije. Spomenuti soj je izabran iz razloga što su kod njega primijećena češća oboljenja preko zaražene vode kod ljudi nego što je to slučaj kod ostalih sojeva roda *Francisella*.

3.2. Hranjive podloge

Hranjiva podloga koja je korištena u eksperimentalnom radu za kultivaciju bakterije *F. novicida* jest BCYE agar.

Sastav BCYE agara u jednoj litri deionizirane vode:

- 10 g kvašćevog ekstrakta
- 10 g ACES pufera
- 2 g aktivnog ugljena
- 2,8 g kalijevog hidroksida
- 1 g alfa ketoglutarata
- 0.4 g L-Cisteina
- 0.25 g željezovog pirofosfata
- 12 g agara

Kultivacija *F. novicida* zahtijeva posebne uvjete što se tiče medija za rast. Ekstrakt kvasca pruža izvore dušika, ugljika i vitamina u BCYE agaru. Aktivni ugljen se raspada na vodikov peroksid i druge toksične produkte. ACES pufer je dodan u formulaciju da se dobije stabilan pH za optimalan rast. Alfa ketoglutarat stimulira rast mikroorganizma. L-cistein je esencijalna aminokiselina i važan izvor energije, dok željezov pirofosfat služi kao izvor željeza. Agar je sredstvo za stvrdnjavanje (11).

Osim BCYE agara, u praktičnom radu su korištene i druge hranjive podloge u svrhu ispitivanja mikrobiologije vode iz jezera (Lokve, Lepenica i Bajer) prije i nakon unosa *F. novicida*.

Ostale korištene hranjive podloge su:

- SB agar
- KEA agar
- TTC agar
- m-FC agar
- les endo agar
- TSN agar
- Pseudomonas agar

Porast na navedenim agarima je proveden postupkom membranske filtracije (opisanom u odlomku 3.4.). Nakon filtracije, filteri su s mrežicom prema gore stavljeni na odgovarajuću hranjivu podlogu.

Dokazivanje prisutnosti i određivanje broja enterokoka provedeno je filtracijom određene količine uzorka preko membranskog filtra (veličine pora 0,45 mikrometara) kroz koji ne mogu proći bakterije. Filtar je položen na selektivnu podlogu koja sadrži natrij azid koji inhibira rast gram negativnih bakterija i 2,3,5-trifeniltetrazolium koji se reducira u crveno obojeni formazan u prisutnosti enterokoka. Nakon filtracije 100 mililitara uzorka kroz membranu od 0,45 mikrometara, membrana je sterilnom pincetom premještena na gotovu podlogu, slanetz-bartley agar, uz izbjegavanje formiranja zraka između podloge i filter-papira. Podloga je preokrenuta (poklopac Petrijeve zdjelice okrenut prema dolje) i inkubirana na 37 °C tijekom 48 sati. Zbog razvoja tipičnih crveno obojenih kolonija, membrana je premještena na eskulin (KEA) agar i inkubirana 2 sata na 44 °C. Izbrojane su sve kolonije s tamnim prstenom i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 mililitara. Kao potvrdni test koristio se pozitivan porast na KEA agaru (3).

Dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *E. coli* provedeno je filtracijom određene količine uzorka preko membranskog filtra (veličine pora 0,45 mikrometara) kroz koji ne mogu proći bakterije. Filtar je položen na selektivnu podlogu, TTC agar, koja sadrži natrij-heptadecil sulfat (inhibira rast gram pozitivnih bakterija). Laktoza pozitivna *Escherichia coli* i koliformne bakterije daju žuto-narančastu boju kolonija na agaru reducirajući TTC. Nakon filtracije 100 mililitara uzorka kroz membranu od 0,45 mikrometara, membrana je sterilnom pincetom premještena na gotovu podlogu, TTC agar, uz izbjegavanje formiranja zraka između podloge i filter-papira. Podloga je preokrenuta (poklopac Petrijeve zdjelice okrenut prema dolje) i inkubirana na 37 °C tijekom 24 sata. Izbrojane su sve kolonije žuto-narančaste boje i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 mililitara. Potvrdni testovi su oksidaza test i indol (3).

Dokazivanje prisutnosti i određivanje broja fekalnih koliforma provedeno je filtracijom određene količine uzorka preko membranskog filtra (veličine pora 0,45 mikrometara) kroz koji ne mogu proći bakterije. Filtar je položen na selektivnu podlogu, m-FC agar, koja sadrži pepton i ekstrakt kvasca koji tvore izvor nutrijenata za rast bakterija, te žučne soli (inhibiraju rast gram pozitivnih bakterija). Na temperaturi od 44 celzijeva stupnja fekalni koliformi fermentiraju laktozu i pritom formiraju kolonije plave boje dok ostale bakterije tvore sive kolonije. Nakon filtracije 100 mililitara uzorka kroz membranu od 0,45 mikrometara, membrana je sterilnom pincetom premještena na gotovu podlogu, m-FC agar, uz izbjegavanje formiranja zraka između podloge i filter papira. Podloga je preokrenuta (poklopac Petrijeve zdjelice okrenut prema dolje) i inkubirana na 44 °C tijekom 24 sata. Izbrojane su sve kolonije plave boje i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 mililitara. Potvrdni test je oksidaza test (3).

Dokazivanje prisutnosti i određivanje broja ukupnih koliforma provedeno je filtracijom određene količine uzorka preko membranskog filtra (veličine pora 0,45 mikrometara) kroz koji ne mogu proći bakterije. Filtar je položen na selektivnu podlogu, Les endo agar, koja sadrži ekstrakt kvasca, peptone, dušik, vitamine i minerale. Ekstrakt kvasca služi kao izvor vitamina B-kompleksa koji potiče rast bakterija, a peptoni su izvor ugljika. Podloga od ugljikohidrata sadržava laktozu. Bakterije koje fermentiraju laktozu tvore kolonije crvene boje, a razvoj metalnog sjaja dolazi kada bakterije proizvode aldehid koji vrlo brzo fermentira laktozu. Bakterije koje ne fermentiraju laktozu tvore čiste, bezbojne kolonije. Nakon filtracije 100 mililitara uzorka kroz membranu od 0,45 mikrometara, membrana je sterilnom pincetom premještena na gotovu podlogu, Les endo agar, uz izbjegavanje formiranja zraka između podloge i filter papira. Podloga je preokrenuta (poklopac Petrijeve zdjelice okrenut prema dolje) i inkubirana na 37 °C tijekom 24 sata. Izbrojane su sve crveno

obojane kolonije sa karakterističnim metalnim sjajem i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 mililitara. Potvrdni test je oksidaza test (3).

Dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Clostridium perfringens* provedeno je filtracijom određene količine uzorka preko membranskog filtra (veličine pora 0,45µm) kroz koji ne mogu proći bakterije. Filtar se polaže na selektivnu podlogu, TSN agar, i inkubira u anaerobnim uvjetima. TSN agar sadržava triptozu, ekstrakt kvasca i pepton koji čine osnovu za rast bakterija (dušik, vitamine, minerale i aminokiseline). U prisutnosti željezo amonij citrata formiraju se crne kolonije kao posljedica redukcije sulfita u sulfid zbog prisutnosti bakterija koje proizvode sumporovodik. Cikloserin u podlozi ima ulogu inhibicije rasta konkurentne mikrobne flore. Nakon filtracije 100 mililitara uzorka kroz membranu od 0,45µm, membrana je sterilnom pincetom premještena na gotovu podlogu, TSN agar, uz izbjegavanje formiranja zraka između podloge i filter papira. Podloga je stavljena u Gas-Pack sustav i prije zatvaranja je ubačen reagens za stvaranje plina (anaerobnih uvjeta). Zatvoren sustav je inkubiran na 37 °C tijekom 20 sati. Izbrojane su sve crne kolonije i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 mililitara. Potvrdni test je bojanje po Gramu (3).

Pseudomonas Agar je hranjiva podloga koja je osmišljena tako da dodavanjem odgovarajućeg dodatka (SR0102 ili SR0103) medij postane selektivan za *Pseudomonas aeruginosa* ili *Pseudomonas* spp. općenito. Osnovni medij je modifikacija King's A Medium1 u kojoj su prisutni magnezijev klorid i kalijev sulfat za bolju produkciju pigmenta. Pozitivan porast na Pseudomonas agaru uočavamo u obliku plavo zelenih kolonija, a inkubacija se vrši na 25 do 30 °C tijekom 48 sati.

3.3. Uzimanje uzoraka vode

Oznaka (EN) ISO 5667 predstavlja međunarodne norme za uzorkovanje prema kojima se provodi uzorkovanje voda. Kod uzorkovanja vode prirodnih i umjetnih jezera koristili smo normu HRN ISO 5667-4. Uzorak vode uzet je u sterilnu bocu u dovoljnoj količini koja je potrebna za izvršavanje analize pri čemu se obraćala pažnja na pravilno uzorkovanje kako bi uzorak kojim se ispituju pokazatelji kvalitete bio što reprezentativniji. U ovom slučaju voda je uzeta iz aseptičkih izvora jezera Lokve, Lepenica i Bajer s područja uz obalu na dubini do jednog metra, a uzorci su sakupljeni u prethodno isprane boce volumena dvije litre. Za svako jezero su uzete po dvije boce s uzorkom vode koje su potom čuvane u hladnjaku do početka provođenja analize (3).

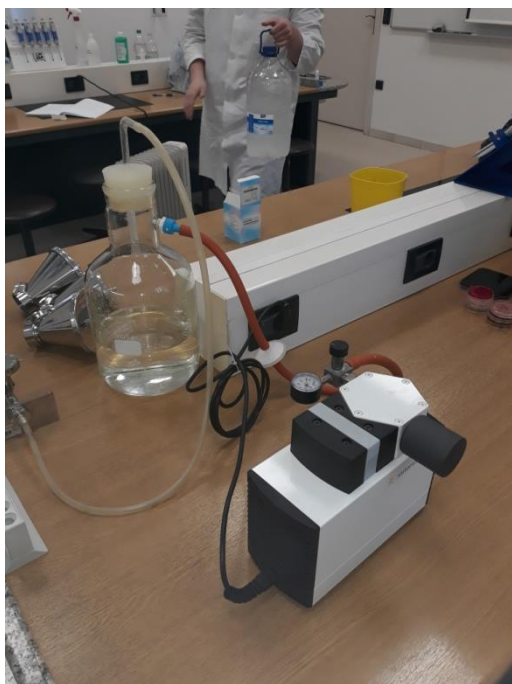
3.4. Metoda membranske filtracije

Metoda membranske filtracije je kvalitativna i kvantitativna te se njome dokazuje prisutnost i određuje broj mikroorganizama u 100 mililitara uzorka. Na slici 1. je prikazan uređaj za membransku filtraciju. Prije upotrebe su sterilne hranjive podloge poredane u red u području dohvata ruke zajedno sa paketima sa sterilnim membranskim filterima. Potom je potrebno sterilizirati uređaj pomoću plamenika. Pokretanjem plamena spiralno, ručno je plamenikom spaljeno unutarnje područje od vrha do dna lijevka, poklopac lijevka te podloga namijenjena za filter papir. Nakon sterilizacije uređaja uklanjamo lijevke te sa prethodno steriliziranom (kratkim provlačenjem kroz plamen) pincetom stavljamo filter papir, s mrežastom stranom okrenutom prema gore, na držač lijevka (metalni frit). Potom se lijevak vrati na uređaj za membransku filtraciju te učvrsti držačem. Postupak se ponavlja s ostalim lijevcima. Nakon postavljanja filtera i lijevka, u lijevak ulijevamo 100 mililitara uzorka vode

koju ispitujemo, okrećemo ručkice na otvoreni položaj te uključujemo uređaj. Nakon završene filtracije, ručkice se zatvore, lijevak se skloni sa podloge za filter papir te se ponovno plamenikom sterilizira pinceta kojom uzimamo filter papir i stavljamo ga, s mrežicom prema gore, na odgovarajuću selektivnu podlogu u Petrijevoj zdjelici. Ukoliko zaostanu mjehurići zraka ispod filtra potrebno ga je podići te ponovno staviti na agar (3).



Slika 2. Uređaj za membransku filtraciju



Slika 3. Vakuumska pumpa

3.5. Inokulacija *F. novicida*

Cilj istraživanja je bio usporediti razmnožavanje bakterije *Francisella novicida* u steriliziranoj vodi u odnosu na njeno razmnožavanje u nesteriliziranoj vodi (vodi gdje su prisutne sve ostale bakterije). U malu bocu gdje je pripremljena sterilizirana voda (100 mL) i u veliku bocu gdje je pripremljena nesterilizirana voda (600 mL) dodan je određen volumen suspenzije koja je sačinjena od fiziološke otopine (slijepa proba) i bakterije (*F. novicida*) umućene štapićem. Uvrštavanjem u formulu za razrjeđenje ($c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$) dobiven je volumen suspenzije (V_1) koji je dodan u pojedinu bocu pri čemu je koncentracija bakterije koju želimo dobiti u svim uzorcima 1×10^5 cfu/mL (c_2), vrijednost apsorbancije koja je standard za *Francisella* iznosi 1×10^9 cfu/mL (c_1), a volumeni vode u pojedinoj boci (V_2) su 100, odnosno 600 mL:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$c_1 = 1 \times 10^9 \text{ cfu/mL}$$

$$c_2 = 1 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$$

$$V_2 = 600 \text{ mL}$$

$$V_1 = ?$$

$$1 \times 10^9 \text{ cfu/mL} \times V_1 = 1 \times 10^5 \text{ cfu/mL} \times 600 \text{ mL}$$

V_1 (600 mL) = 60 μ L $\rightarrow$ volumen suspenzije koja je dodana u uzorak nesterilne vode (600 mL)

$$c_1 = 1 \times 10^9 \text{ cfu/mL}$$

$$c_2 = 1 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$$

$$V_2 = 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = ?$$

$$1 \times 10^9 \text{ cfu/mL} \times V_1 = 1 \times 10^5 \text{ cfu/mL} \times 100 \text{ mL}$$

V_1 (100 mL) = 10 μ L $\rightarrow$ volumen suspenzije koja je dodana u uzorak sterilne vode (100 mL)

Apsorbancija u ovom slučaju odgovara zamućenju (OD, optical density). Što je zamućenje veće, to je veći broj bakterija, odnosno veći iznos OD. Apsorbancija, odnosno optička gustoća određena je uz pomoć spektrofotometra pri valnoj duljini od 600 nm. Suspenzija koja sadrži fiziološku otopinu u kojoj je umućena *F. novicida* je homogenizirana na tresilici i zatim prelivena u kivetu. Nakon izmjerene apsorbancije za slijepu probu (fiziološka otopina), u spektrofotometar je stavljena pripremljena suspenzija. Vrijednost optičke gustoće je iznosila približno 1, što znači da broj bakterija u toj suspenziji iznosi 1×10^9 cfu/mL, što nam je bio cilj. Veza između navedenih vrijednosti apsorbancije i broja

bakterija je standard za bakteriju *F. novicida* dobiven laboratorijskom praksom te ne vrijedi za ostale vrste bakterija. Iz dobivene suspenzije koncentracije 1×10^9 cfu/mL, potrebno je pripremiti suspenziju koncentracije 1×10^5 cfu/mL. Preračunavanjem prema gore napisanom izračunu su dobiveni volumeni koje dodajemo u pojedinu bocu s vodom kako bi u svim uzorcima koncentracija bakterijske suspenzije bila 1×10^5 cfu/mL. U malu bocu gdje je sterilizirana voda dodano je 10 μ L, a u veliku bocu gdje je nesterilizirana voda dodano je 60 μ L suspenzije.

3.6. Određivanje broja bakterija

Deseterostruka razrjeđenja su napravljena u mikrotitar pločicama od 96 jažica. Na vrhu ploče s jažicama je dodano po 200 μ L svakog uzorka. U redove ispod je dodano po 180 μ L fiziološke otopine u 5 sljedećih jažica. Deseterostruko razrjeđenje je napravljeno pipetiranjem 20 μ L suspenzije u svaku od jažica (iz jedne u drugu) s fiziološkom otopinom pomoću multikanalne pipete. Nakapavanjem je iz svake jažice dodano 10 μ L na BCYE agar s lijeva na desno (od najmanje do najveće gustoće, odnosno od najvećeg do najmanjeg razrjeđenja). Nakon inkubacije, rezultati porasta bakterije na agaru kroz pet dana su očitani i prikazani grafovima.

3.7. Statistička obrada podataka

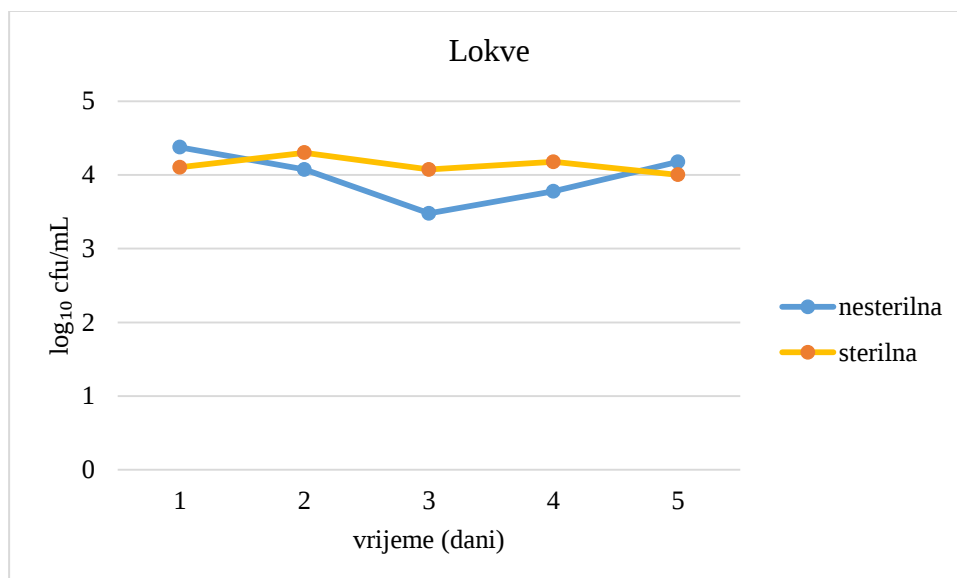
Dobiveni rezultati prikazani su grafički obradom podataka u programu Microsoft Office Excel. Vrijednosti broja kolonija (cfu/mL) su prikazani kao logaritam po bazi 10 ($\log_{10}$ cfu/mL). Izračunata je aritmetička sredina i standardna devijacija rezultata.

4. REZULTATI

4.1. Kinetika rasta *F. novicida* u vodi iz jezera Lokve

U trenutku unosa *F. novicida* u uzorke vode iz jezera Lokve broj bakterija je iznosio 1×10^5 cfu/mL. Preživljavanje bakterije u uzorcima sterilizirane i nesterilizirane vode praćeno je kroz period od 5 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon jednog dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio $1,3 \times 10^4$ cfu/mL, a u nesteriliziranoj $2,7 \times 10^4$ cfu/mL. Nakon dva dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio 2×10^4 cfu/mL, a u nesteriliziranoj $1,2 \times 10^4$ cfu/mL. Nakon tri dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio $1,35 \times 10^4$ cfu/mL, a u nesteriliziranoj 3×10^3 cfu/mL. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio 15×10^3 cfu/mL, a u nesteriliziranoj 6×10^3 cfu/mL. Nakon pet dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio 10×10^3 cfu/mL, a u nesteriliziranoj 15×10^3 cfu/mL.



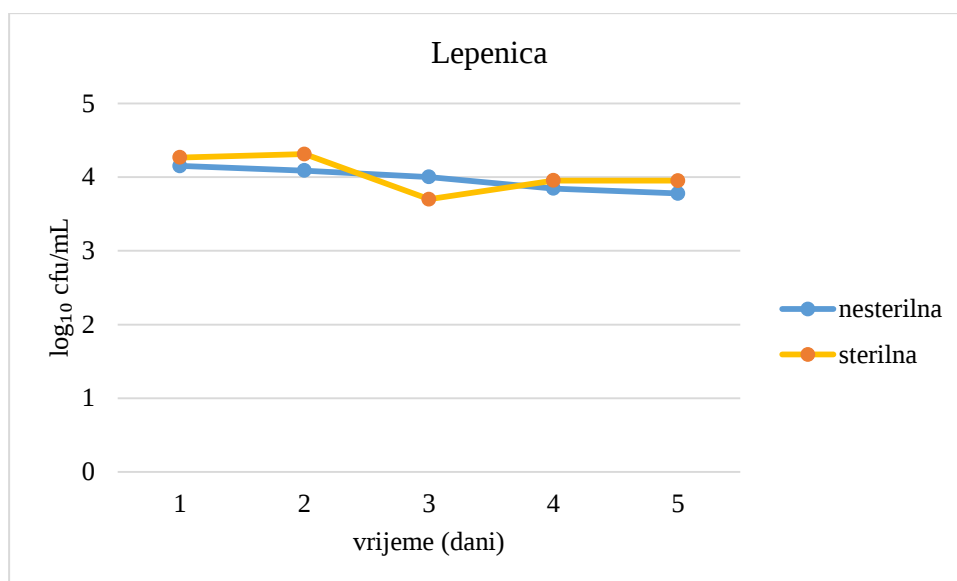
Slika 4. Kinetika rasta *F. novicida* u vodi iz jezera Lokve. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C na BCYE agaru, praćeno je preživljavanje bakterije u uzorcima sterilizirane i nesterilizirane vode iz jezera Lokve. Promjena broja bakterija prikazana je kroz razdoblje od 5 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani u hladnjaku na 4 °C.

Iz prikazanih rezultata (Slika 3.) može se uočiti da je broj bakterija *F. novicida* u oba uzorka vode nakon 5. dana rasta nešto manji nego nakon 1. dana. Nesterilizirana voda je imala veće oscilacije u broju bakterija nego sterilizirana. Broj bakterija u nesteriliziranoj vodi je pao do 3. dana, pa se zatim dizao do 5. dana da bi u konačnici bio gotovo jednak kao i na početku. U uzorku sterilizirane vode vidimo porast broja bakterija u dva navrata (2. i 4. dan), da bi se nakon 5. dana vratio na približno jednaku vrijednost kao i na početku. Zbog izraženog pada broja bakterija nakon 3. dana rasta u uzorku nesterilizirane vode, može se reći da bakterija bolje raste u steriliziranoj vodi.

4.2. Kinetika rasta *F. novicida* u vodi iz jezera Lepenica

U trenutku unosa *F. novicida* u uzorke vode iz jezera Lepenica broj bakterija je iznosio 1×10^5 cfu/mL. Preživljavanje bakterije u uzorcima sterilizirane i nesterilizirane vode praćeno je kroz period od 5 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon jednog dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio $1,85 \times 10^4$ cfu/mL, a u nesteriliziranoj $1,5 \times 10^4$ cfu/mL. Nakon dva dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio $2,05 \times 10^4$ cfu/mL, a u nesteriliziranoj $1,25 \times 10^4$ cfu/mL. Nakon tri dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio 5×10^3 cfu/mL, a u nesteriliziranoj 1×10^4 cfu/mL. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio 9×10^3 cfu/mL, a u nesteriliziranoj 7×10^3 cfu/mL. Nakon pet dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio 9×10^3 cfu/mL, a u nesteriliziranoj 6×10^3 cfu/mL.



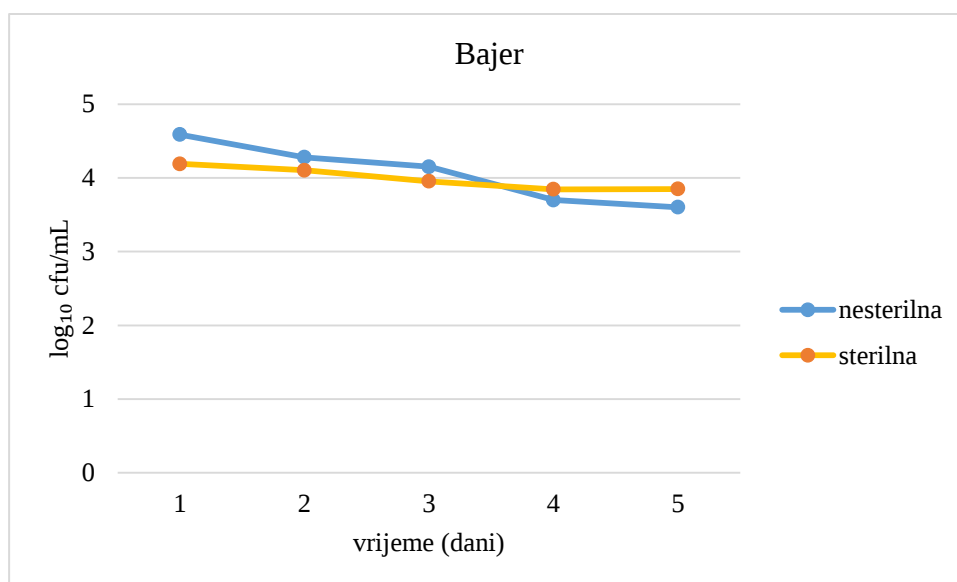
Slika 5. Kinetika rasta *F. novicida* u vodi iz jezera Lepenica. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C na BCYE agaru, praćeno je preživljavanje bakterije u uzorcima sterilizirane i nesterilizirane vode iz jezera Lepenica. Promjena broja bakterija prikazana je kroz razdoblje od 5 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani u hladnjaku na 4 °C.

Iz prikazanih rezultata (Slika 4.) može se uočiti da je broj bakterija *F. novicida* u oba uzorka vode nakon 5. dana rasta manji nego nakon 1. dana. Kod uzorka nesterilizirane vode vidimo jednoličan pad broja bakterija dok se u uzorku sterilizirane vode javlja nagli pad (3. dan) pa zatim nagli porast broja bakterija (4. dan). Izuzevši broj bakterija nakon 3. dana rasta, može se reći da bakterija bolje preživljava u sterilnoj vodi.

4.3. Kinetika rasta *F. novicida* u vodi iz jezera Bajer

U trenutku unosa *F. novicida* u uzorke vode iz jezera Bajer broj bakterija je iznosio 1×10^5 cfu/mL. Preživljavanje bakterije u uzorcima sterilizirane i nesterilizirane vode praćeno je kroz period od 5 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon jednog dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio $1,7 \times 10^4$ cfu/mL, a u nesteriliziranoj 4×10^4 cfu/mL. Nakon dva dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio $1,3 \times 10^4$ cfu/mL, a u nesteriliziranoj $1,9 \times 10^4$ cfu/mL. Nakon tri dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio 9×10^3 cfu/mL, a u nesteriliziranoj $1,5 \times 10^4$ cfu/mL. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio 7×10^3 cfu/mL, a u nesteriliziranoj 5×10^3 cfu/mL. Nakon pet dana rasta broj bakterija u steriliziranoj vodi je iznosio $7,5 \times 10^3$ cfu/mL, a u nesteriliziranoj 4×10^3 cfu/mL.



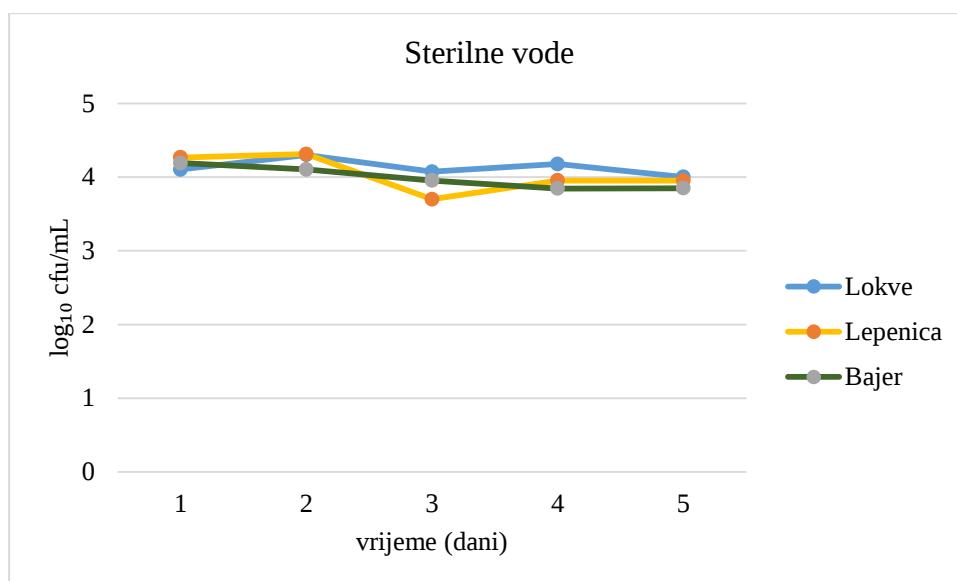
Slika 6. Kinetika rasta *F. novicida* u vodi iz jezera Bajer. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C na BCYE agaru, praćeno je preživljavanje bakterije u uzorcima sterilizirane i nesterilizirane vode iz jezera Bajer. Promjena broja bakterija prikazana je kroz razdoblje od 5 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani u hladnjaku na 4 °C.

Iz prikazanih rezultata (Slika 5.) može se uočiti da je broj bakterija *F. novicida* u oba uzorka vode nakon 5. dana rasta manji nego nakon 1. dana. Broj bakterija u steriliziranoj vodi se postepeno smanjivao do 4. dana da bi se u konačnici (5.dan) neznatno povećao, dok je u uzorku nesterilizirane vode vidljiv nagli pad broja bakterija nakon 4. dana rasta. U prva tri dana rasta bakterija je bolje preživljavala u nesteriliziranoj vodi, dok je u zadnja dva dana bolje rasla u steriliziranoj vodi.

4.4. Kinetika rasta *F. novicida* u sterilnim vodama iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer

U trenutku unosa *F. novicida* u uzorke sterilizirane vode iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer broj bakterija je iznosio 1×10^5 cfu/mL. Usporedba preživljavanja bakterije u uzorcima steriliziranih voda praćeno je kroz period od 5 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon jednog dana rasta broj bakterija u jezeru Lokve je iznosio $1,3 \times 10^4$ cfu/mL, u jezeru Lepenica $1,85 \times 10^4$ cfu/mL, a u jezeru Bajer $1,7 \times 10^4$ cfu/mL. Nakon dva dana rasta broj bakterija u jezeru Lokve je iznosio 2×10^4 cfu/mL, u jezeru Lepenica $2,05 \times 10^4$ cfu/mL, a u jezeru Bajer $1,3 \times 10^4$ cfu/mL. Nakon tri dana rasta broj bakterija u jezeru Lokve je iznosio $1,35 \times 10^4$ cfu/mL, u jezeru Lepenica 5×10^3 cfu/mL, a u jezeru Bajer 9×10^3 cfu/mL. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u jezeru Lokve je iznosio 15×10^3 cfu/mL, u jezeru Lepenica 9×10^3 cfu/mL, a u jezeru Bajer 7×10^3 cfu/mL. Nakon pet dana rasta broj bakterija u jezeru Lokve je iznosio 10×10^3 cfu/mL, u jezeru Lepenica 9×10^3 cfu/mL, a u jezeru Bajer $7,5 \times 10^3$ cfu/mL.



Slika 7. Usporedba kinetike rasta *F. novicida* u sterilnim vodama. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C na BCYE agaru, uspoređen je rast bakterije u uzorcima sterilizirane vode iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer. Promjena broja bakterija prikazana je kroz razdoblje od 5 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani u hladnjaku na 4 °C.

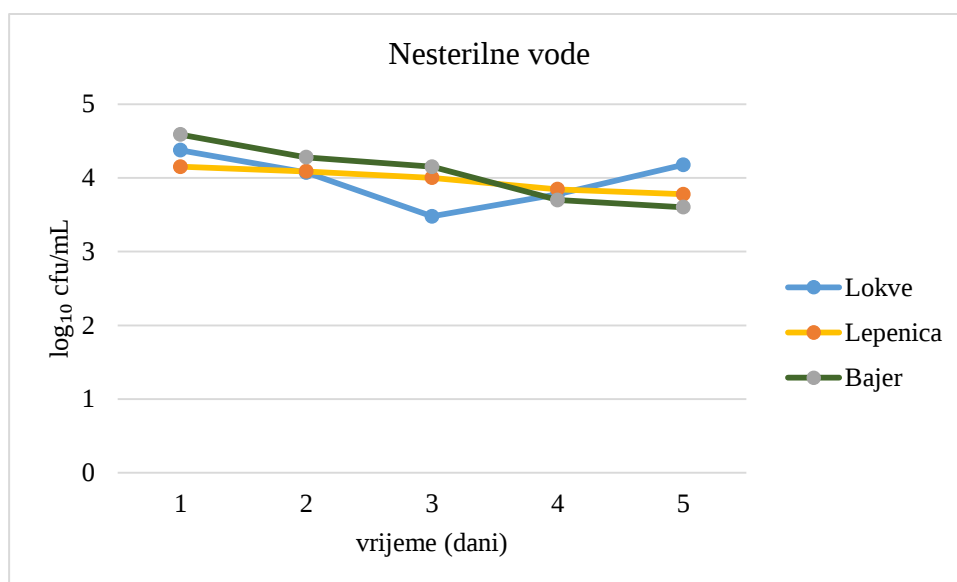
Uspoređujući uzorke sterilnih voda, vidimo kako *F. novicida* najbolje raste u vodi iz jezera Lokve, a najslabije u vodi iz jezera Bajer. Najveće odstupanje predstavlja broj bakterija u vodi iz jezera Lepenica nakon 3. dana rasta.

4.5. Kinetika rasta *F. novicida* u nesterilnim vodama iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer

U trenutku unosa *F. novicida* u uzorke nesterilizirane vode iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer broj bakterija je iznosio 1×10^5 cfu/mL. Usporedba preživljavanja bakterije u uzorcima nesteriliziranih voda praćeno je kroz period od 5 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon jednog dana rasta broj bakterija u jezeru Lokve je iznosio $2,7 \times 10^4$ cfu/mL, u jezeru Lepenica $1,5 \times 10^4$ cfu/mL, a u jezeru Bajer 4×10^4 cfu/mL. Nakon dva dana rasta broj

bakterija u jezeru Lokve je iznosio $1,2 \times 10^4$ cfu/mL, u jezeru Lepenica $1,25 \times 10^4$ cfu/mL, a u jezeru Bajer $1,9 \times 10^4$ cfu/mL. Nakon tri dana rasta broj bakterija u jezeru Lokve je iznosio 3×10^3 cfu/mL, u jezeru Lepenica 1×10^4 cfu/mL, a u jezeru Bajer $1,5 \times 10^4$ cfu/mL. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u jezeru Lokve je iznosio 6×10^3 cfu/mL, u jezeru Lepenica 7×10^3 cfu/mL, a u jezeru Bajer 5×10^3 cfu/mL. Nakon pet dana rasta broj bakterija u jezeru Lokve je iznosio 15×10^3 cfu/mL, u jezeru Lepenica 6×10^3 cfu/mL, a u jezeru Bajer 4×10^3 cfu/mL.



Slika 8. Usporedba kinetike rasta *F. novicida* u nesterilnim vodama. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C na BCYE agaru, uspoređen je rast bakterije u uzorcima nesterilizirane vode iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer. Promjena broja bakterija prikazana je kroz razdoblje od 5 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani u hladnjaku na 4 °C.

Uspoređujući uzorke nesterilnih voda, vidimo kako *F. novicida* najbolje raste u vodi iz jezera Lokve, a najslabije u vodi iz jezera Bajer. Najveće odstupanje predstavlja broj bakterija u vodi iz jezera Lokve nakon 3. dana rasta.

4.6. Mikrobiologija jezera Lokve, Lepenica i Bajer prije i nakon unosa *F. novicida*

Na početku pokusa su uzorci analizirani metodom membranske filtracije kada još nije bila dodana *F. novicida*, a nakon unosa spomenute bakterije uzorci su pohranjeni u hladnjaku tijekom 48 sati. Uzorci s inokuliranom *F. novicida* ponovno su analizirani metodom membranske filtracije nakon 48 sati. Dobiveni rezultati su izraženi kao broj kolonija u 100 mL vode (cfu/mL). Tablice 1., 2. i 3. prikazuju broj poraslih bakterija na pojedinoj hranjivoj podlozi, prije i nakon unosa *Francisella novicida*.

Tablica 1. Mikrobiologija jezera Lokve prije i nakon unosa bakterije *F. novicida*

Lokve		
Broj kolonija/100 mL vode	Prije unosa bakterije	Nakon unosa bakterije
SB→KEA	3	14
TTC	Bez porasta	192
m-FC	Bez porasta	Bez porasta
Les endo	400	800
TSN	1	Bez porasta
Pseudomonas agar	Bez porasta	Bez porasta

Iz tablice 1. iščitavamo da je na KEA agaru prije unosa *F. novicida* poraslo 3, a nakon unosa 14 kolonija enterokoka. Na TTC agaru prije unosa *F. novicida* nije bilo porasta, a nakon unosa porasle su 192 kolonije *E. coli*. Na m-FC agaru nije bilo porasta ni prije ni nakon unosa *F. novicida*. Na Les endo agaru je prije unosa *F. novicida* poraslo 400, a nakon unosa 800 kolonija ukupnih koliforma. Na TSN agaru je prije unosa *F. novicida* porasla 1 kolonija *C. perfringens*, a nakon unosa nije bilo porasta. Na Pseudomonas agaru nije bilo porasta ni prije ni nakon unosa *F. novicida*.

Tablica 2. Mikrobiologija jezera Lepenica prije i nakon unosa bakterije *F. novicida*

Lepenica		
Broj kolonija/100 mL vode	Prije unosa bakterije	Nakon unosa bakterije

SB→KEA	9	1
TTC	Bez porasta	10
m-FC	Bez porasta	20
Les endo	29	232
TSN	Bez porasta	1
Pseudomonas agar	2	Bez porasta

Iz tablice 2. iščitavamo da je na KEA agaru prije unosa *F. novicida* poraslo 9, a nakon unosa 1 kolonija enterokoka. Na TTC agaru prije unosa *F. novicida* nije bilo porasta, a nakon unosa poraslo je 10 kolonija *E. coli*. Na m-FC agaru prije unosa *F. novicida* nije bilo porasta, a nakon unosa poraslo je 20 kolonija fekalnih koliforma. Na Les endo agaru je prije unosa *F. novicida* poraslo 29, a nakon unosa 232 kolonije ukupnih koliforma. Na TSN agaru prije unosa *F. novicida* nije bilo porasta, a nakon unosa je porasla 1 kolonija *C. perfringens*. Na Pseudomonas agaru su prije unosa *F. novicida* porasle 2 kolonije Pseudomonasa, a nakon unosa nije bilo porasta.

Tablica 3. Mikrobiologija jezera Bajer prije i nakon unosa bakterije *F. novicida*

Bajer		
Broj kolonija/100 mL vode	Prije unosa bakterije	Nakon unosa bakterije
SB→KEA	Bez porasta	Bez porasta
TTC	1	2
m-FC	Bez porasta	75
Les endo	47	15
TSN	4	Bez porasta
Pseudomonas agar	Bez porasta	Bez porasta

Iz tablice 3. iščitavamo da na KEA agaru ni prije ni nakon unosa *F. novicida* nije bilo porasta. Na TTC agaru je prije unosa *F. novicida* porasla 1 kolonija, a nakon unosa porasle su 2 kolonije *E. coli*. Na m-FC agaru prije unosa *F. novicida* nije bilo porasta, a nakon unosa poraslo je 75 kolonija fekalnih koliforma. Na Les endo agaru je prije unosa *F. novicida* poraslo 47, a nakon unosa 15 kolonija ukupnih koliforma. Na TSN agaru su prije unosa *F. novicida* porasle 4 kolonije *C. perfringens*, a nakon unosa nije bilo porasta. Na Pseudomonas agaru ni prije ni nakon unosa *F. novicida* nije bilo porasta.

Iz prikazanih rezultata u tablicama 1., 2. i 3. uočavamo da se nakon unosa *F. novicida* mikrobiologija uzoraka jezera promijenila te možemo reći da se broj bakterija povećao kod većine hranjivih podloga uz određen broj iznimki (smanjenje broja bakterija na KEA agaru (Tablica 2.) te smanjenje broja bakterija na Les endo agaru (Tablica 3.)).

4.7. Određivanje ukupnog broja bakterija u vodi

Ukupni broj bakterija u vodi je određen tako što je sterilnom pipetom otpipetirano po 1 mL uzorka od svakog jezera i nacijepljeno na dvije ploče (petrijeve zdjelice) s kvašćevim agarom. Nakon što je nasad s podlogom dobro promiješan, podloge su preokrenute te je jedna inkubirana na 22 °C tijekom 68 sati a druga na 37 °C tijekom 44 sata. Izbrojane su sve narasle kolonije i rezultat je izražen kao broj bakterija u 1 mL. Tablica 4. prikazuje broj poraslih kolonija na 22, odnosno 37 °C.

Tablica 4. Ukupni broj bakterija u vodi

Broj kolonija/1 mL vode	22 °C	37 °C
Lokve	240	296
Lepenica	29	57
Bajer	30	16

Iz rezultata iz tablice 4. možemo uočiti da bakterije iz jezera Bajer bolje rastu na temperaturi od 22 °C, dok bakterije iz jezera Lokve i Lepenica bolje rastu na temperaturi od 37 °C.

5. RASPRAVA

F. novicida U112 je bakterijski soj koji ne predstavlja opasnost za ljudsku populaciju te ne zahtjeva visok stupanj zaštite pri laboratorijskom radu. *F. tularensis*, mikroorganizam koji uzrokuje tularemiju, vrlo je sličan bakteriji *F. novicida* te je stoga pogodno istražiti nerazjašnjene karakteristike ove bolesti putem uzgoja *F. novicida*. U nedostatku informacija o preživljavanju *F. novicida* u vodama iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer, u ovom se radu povodom toga proučavao rast spomenutog mikroorganizma u sterilnoj, odnosno nesterilnoj vodi, te promjena broja bakterija koje su prirodno prisutne u navedenim jezerima Gorskoga kotara prije i nakon unosa *F. novicida*. Prirodno stanište *F. novicida* su vodeni ekosustavi koji uključuju slatke, slane i bočate vode gdje bakterija ima svoje domaćine koji najčešće podrazumijevaju komarce i amebe te zajedničko preživljavanje u obliku biofilma.

Dobiveni rezultati ovog istraživanja pokazuju da se broj bakterija u ispitivanim jezerskim vodama postepeno smanjuje kroz period od 5 dana rasta. Iznimku predstavlja nagli pad pa potom nagli porast u broju bakterija nakon trećeg dana rasta u jezerima Lokve i Lepenica, međutim u konačnici nakon petog dana ne dolazi do većih odstupanja. Usporedbom preživljavanja bakterije u sterilnoj i nesterilnoj vodi, može se reći kako bakterija bolje preživljava u sterilnoj vodi uz iznimku kod uzorka nesterilizirane vode iz jezera Bajer gdje je *F. novicida* bila u većem broju kroz prva tri dana rasta. *F. novicida* slabije preživljava u uzorcima nesterilne vode iz razloga što su u njoj prisutne sve ostale bakterije koje su dio prirodne mikroflore ispitivanih jezera te samim time ostaje manje hranjivih tvari potrebnih za rast i preživljavanje *F. novicida* u toj vodi, dok u sterilnoj vodi može normalno rasti bez utjecaja ostalih bakterija koje su prethodno uklonjene.

Istraživanje provedeno na amebama (*Acanthamoeba castellanii* i *Hartmannella vermiformis*) gdje je uspoređeno preživljavanje *F. novicida* u njihovim vakuolama pokazuje

da se bakterija može razmnožavati u tim uvjetima. Rezultati pokazuju da je *F. novicida* u određenom trenutku izloženosti u vakuolama dostigla dvostruko veći porast u odnosu na uzorke jezera Lokve, Lepenica i Bajer. Razlog tome vjerojatno je neprisutnost prirodnih neprijatelja koji bi mogli narušiti razmnožavanje bakterije dok u isto vrijeme u stanici amebe ima sve što je potrebno za rast i razmnožavanje (14).

Istraživanje provedeno na deioniziranoj vodi, koja služi kao otopina za lizu u testovima unutarstaničnog rasta *F. tularensis* dalo je određene rezultate. U deioniziranoj vodi je zabilježeno preživljavanje bakterije od samo 3%. Razlog tome vjerojatno je što otopina za lizu onemogućava bakteriji da dođe do hranjivih tvari i nastavi svoj rast i razmnožavanje u unutarstaničnom prostoru (15).

6. ZAKLJUČAK

Zaključci doneseni obradom rezultata ovog završnog rada su:

- Bakterija *F. novicida* preživljava u ispitivanim vodama iz jezera Lokve, Lepenica i Bajer
- Broj bakterija se postepeno smanjuje kroz ispitivani period od pet dana
- *F. novicida* bolje preživljava u steriliziranim, a lošije u nesteriliziranim uzorcima voda
- Uzmemo li u obzir sve ispitivane uzorke, *F. novicida* najbolje raste u uzorku sterilne vode iz jezera Lokve, a najlošije raste u nesterilnom uzorku vode iz jezera Bajer
- Bakterije stalne mikroflore u ispitivanim uzorcima jezera Gorskog kotra sprječavaju rast i razmnožavanje *F. novicida* uzimajući im dio potrebnih hranjivih tvari
- Dodatkom *F. novicida* u uzorke s prirodnom mikroflorom dolazi do povećanja broja ostalih bakterija. Razlog tome je „natjecanje“ za hranjive tvari između *F. novicida* i ostalih bakterija gdje ostale bakterije uzimaju veći dio hranjivih tvari koje im omogućuju razmnožavanje

7. LITERATURA

1. Luke C. Kingry and Jeannine M. Petersen (2014). Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*
2. Anders Sjöstedt (2016). Clinical manifestations and the epidemiology of tularemia
3. Šantić M., Gobin I., Ožanić M., Marečić V., *MIKROBIOLOGIJA HRANE I VODE* za studente preddiplomskog studija sanitarnog inženjerstva, Rijeka, Medicinski fakultet sveučilišta u Rijeci, Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, 2014.
4. <http://tz-lokve.hr/lokvarsko-jezero/?menu=8>
5. <http://www.tz-fuzine.hr/view.asp?p=15&c=14>
6. <http://gorskikotarbike.com/attractions/jezero-bajer/>
7. Tanocki Z., Crljenko I., JEZERA HRVATSKE, Školska knjiga, d.d., Zagreb, 2011.
8. Begovac J., Božinović D., Lisić M., Baršić B., Schöenwald S., *INFEKTOLOGIJA*, Profil International, Zagreb, Kaptol 25
9. Kalenić S. i sur., *MEDICINSKA MIKROBIOLOGIJA*, Medicinska naklada, Zagreb, 2019.
10. https://bib.irb.hr/datoteka/871606.SKRIPTA_MP_2017.pdf
11. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/86558dat.pdf>
12. Hestvik G., Warns-Petit E., Smith L. A., Fox N. J., Uhlhorn H., Artois M., Hannant D., Hutchings M. R., Mattsson R., Yon L., Gavier-Widen D. (2014), The status of tularemia in Europe in a one-health context
13. Hennebique A., Boisset S., Maurin M. (2019), Tularemia as a waterborne disease
14. Santic M., Ozanic M., Semic V., Pavokovic G., Mrvcic V., Kwaik Y. A. (2011), Intra-Vacuolar Proliferation of *F. Novicida* within *H. Vermiformis*
15. Chalabaev S., Christine A. A., Onderdonk A. B., Kasper D. L. (2011), Sensitivity of *Francisella tularensis* to ultrapure water and deoxycholate: implications for bacterial intracellular growth assay in macrophages

Životopis pristupnika

Osobne informacije

Ime i prezime: Ivan Vidinić

Datum i mjesto rođenja: 12. Svibnja 1996., Rijeka

Adresa i mjesto stanovanja: Korzo 8, Rijeka, Hrvatska

Državljanstvo: Hrvatsko

Spol: muško

Mobitel: +385981676425

Email: vidinicivan@gmail.com

Obrazovanje

2003.-2011.: Osnovna škola “Nikola Tesla” Rijeka

2011.-2015.: Salezijanska klasična gimnazija Rijeka

2015.-2019.: Medicinski fakultet Rijeka