

# PREŽIVLJAVANJE FRANCISELLA NOVICIDA U VODAMA IZ RIJEKA ČABRANKA, KUPICA I GEROVČICA

---

Žagar, 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:184:428930>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-18**



*Repository / Repozitorij:*

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

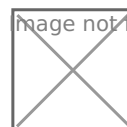


Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET RIJEKA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivan Žagar

Preživljavanje *Francisella novicida* u vodama iz rijeka  
Čabranka, Kupica i Gerovčica

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 sadrži 43 stranice, 4 tablice, 9 slika, 80 literaturnih navoda.

## **ZAHVALA**

**Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Marini Šantić na temi, idejama i stručnim savjetima tijekom izrade ovog završnog rada.**

**Također, zahvaljujem se osoblju Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela završnog rada, a osobito komentoru dr. sc. Mateji Ožanič.**

**Za kraj, veliko hvala mojoj obitelji na velikoj podršci i omogućavanju pohađanja ovog studija na Medicinskom fakultetu u Rijeci.**

## SAŽETAK

Rod *Francisella* dobio je ime po Edwardu Francisu, najznačajnijem znanstveniku u području istraživanja tularemije. On je prvi otkrio bakteriju iz roda *Francisella* u gradu Tulari (Kalifornija, SAD), koja je prvobitno nazvana *Bacterium tularensis*, a 1920. godine je promijenila naziv u *Francisella tularensis*. Bakterija se nalazi svugdje u prirodi: zemlji, prašini, vodi i slami. Ova bakterija smatra se i potencijalnim biološkim oružjem. Rod *Francisella* obuhvaća vrste: *hispaniensis*, *noatunensis*, *novicida*, *philomiragia* i *tularensis*. Podvrste *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) i *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B) uzrokuju tularemiju u čovjeka. Zbog visoke virulencije bakterije, istraživanja s *F. tularensis* provode se u tzv. BSL-3 laboratorijima (engl. *Biosafety Level 3*), laboratorijima s visokim stupnjem zaštite. Tularemija se može prenijeti na čovjeka u kontaktu sa zaraženom životinjom, konzumacijom kontaminirane hrane ili vode, boravkom u prostorima s kontaminiranim aerosolom te vektorima poput komaraca i krpelja. Donedavno se i *F. novicida* smatrala podvrstom *F. tularensis*, međutim, nakon novijih istraživanja, *F. novicida* svrstana je u zasebnu vrstu. *F. novicida* genetski je vrlo slična s *F. tularensis*, iako s njome nije potrebno raditi u laboratoriju visokog stupnja zaštite jer ne predstavlja opasnost za zdravog čovjeka. Staništa koja se smatraju pogodnim za preživljavanje *F. novicida* su vodeni ekosustavi, slane i bočate vode, led te vlažna tla. S obzirom da ne postoji puno podataka i istraživanja o mikrobiologiji voda Gorskog kotara (Hrvatska), cilj rada bio je ispitati preživljavanje bakterije *F. novicida* u vodama iz rijeka Gorskog kotara: Čabranka, Gerovčica i Kupica. Dio uzoraka voda obrađen je na Sartorius uređaju za membransku filtraciju. Određena koncentracija *F. novicida* ubačena je u uzorke voda te je praćena njena sposobnost preživljavanja u periodu od 5 dana, svakodnevnim nasađivanjem deseterotrostrukih razrjeđenja uzoraka na hranjivu podlogu, BCYE agar. Također, cilj je bio i usporediti preživljavanje *F. novicida* između ove tri rijeke, te pratiti kako će se mijenjati mikrobiologija uzoraka rijeka prije i nakon dodatka *F. novicide*. Rezultati istraživanja pokazuju da u rijekama Čabranka, Gerovčica i Kupica bakterija *F. novicida* preživljava, ali se broj vremenom postepeno smanjuje. Od svih ispitivanih uzoraka rijeka, bakterija *F. novicida* najbolje preživljava u prethodno steriliziranom uzorku rijeke Gerovčice, a najslabije preživljava u nesteriliziranom uzorku rijeke Gerovčice. Također, rezultati pokazuju kako *F. novicida* bolje preživljava u prethodno steriliziranim uzorcima voda iz rijeka. Pretpostavljamo da normalna mikrobiološka flora sprječava daljnje razmnožavanje *F. novicida* u tim vodama.

**Ključne riječi:** *Francisella novicida*, rijeka Čabranka, rijeka Gerovčica, rijeka Kupica, preživljavanje, metoda membranske filtracije

## SUMMARY

Genus *Francisella* was named after Edward Francis, the most significant scientist in the area of tularemia research. He first discovered bacteria from the genus of *Francisella* in the town of Tulare (California, USA), which was originally called *Bacterium tularensis*, and in 1920 it changed its name to *Francisella tularensis*. The bacteria is found everywhere in nature: soil, dust, water and straw. This bacterium is also considered to be potential biological weapon. Genus *Francisella* covers species: *hispaniensis*, *noatunensis*, *novicida*, *philomiragia* and *tularensis*. Subspecies *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A) and *F. tularensis* subsp. *holarctica* (type B) cause tularemia in humans. Due to high virulence the bacterium *F. tularensis* requires work in BSL-3 (*Biosafety Level 3 Labs*) - laboratories with a high degree of protection. Tularemia can be transmitted to a human by the contact with an infected animal, consuming contaminated food or water, inhaling contaminated aerosols and by vectors such as mosquitoes and ticks. *F. novicida* was considered as subspecies of *F. tularensis*, however, recently has been transferred into the separate species. *F. novicida* is genetically very similar to *F. tularensis*, although it is not necessary to work with this bacteria in a high-level of protection laboratory because it poses no risk to healthy human. Habitats that are considered suitable for the survival of *F. novicida* are water ecosystems, salty and brackish waters, ice and moist soils. Since there is not much data on the water microbiology of Gorski Kotar (Croatia), the aim of this work was to investigate the survival of *F. novicida* in waters from Gorski Kotar rivers: „Čabranka“, „Kupica“ and „Gerovčica“. One part of the water samples were processed on a Sartorius device for membrane filtration. A specific concentration of *F. novicida* was injected into water samples and its survival ability was monitored during a period of 5 days by tenfold dilutions on BCYE agar. In addition, the aim was to compare the survival of *F. novicida* between those three rivers, and to monitor the changes of microbiology in the river samples before and after the addition of *F. novicida*. The results of the study show that in rivers „Čabranka“, „Gerovčica“ and „Kupica“, *F. novicida* survive, but the number gradually decreases over time. Of all the river samples tested, the bacterium survives the best in the previously sterilized sample of the „Gerovčica“ river, and the least survives in the non-sterilized sample of the „Gerovčica“ river. Also, the results show that *F. novicida* survives better in previously sterilized river water samples. We assume that the normal microbial flora prevents further propagation of *F. novicida* in those waters.

**Key words:** *Francisella novicida*, river „Čabranka“, river „Gerovčica“, river „Kupica“, survival, membrane filtration method



## SADRŽAJ

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....                           | 1  |
| 1.1. Rod <i>Francisella</i> .....                                       | 1  |
| 1.1.1. <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> .....     | 2  |
| 1.1.2. <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> .....     | 2  |
| 1.1.3. <i>Francisella novicida</i> .....                                | 3  |
| 1.2. Tularemija.....                                                    | 4  |
| 1.2.1. Epidemiologija tularemije s naglaskom na vodene ekosustave ..... | 4  |
| 1.2.2. Tularemija u ljudi.....                                          | 5  |
| 1.2.3. Tularemija u životinja .....                                     | 6  |
| 1.2.4. Prevencija i liječenje tularemije .....                          | 7  |
| 1.3. Patogeneza i virulencija <i>Francisella</i> .....                  | 8  |
| 1.3.1. Činitelji patogenosti .....                                      | 8  |
| 1.3.2. Unutarstanični život i virulencija.....                          | 10 |
| 1.4. Dijagnostika i laboratorijska sigurnost .....                      | 11 |
| 1.5. Proučavane vode iz rijeka.....                                     | 12 |
| 1.5.1. Rijeka Čabranka.....                                             | 12 |
| 1.5.2. Rijeka Kupica.....                                               | 13 |
| 1.5.3. Rijeka Gerovčica.....                                            | 13 |
| 2. CILJ RADA.....                                                       | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE .....                                            | 15 |
| 3.1. Bakterijski soj .....                                              | 15 |
| 3.2. Hranjive podloge .....                                             | 15 |
| 3.3. Ispitivanje vode.....                                              | 18 |
| 3.4. Uzimanje uzoraka .....                                             | 18 |
| 3.5. Metoda membranske filtracije .....                                 | 19 |
| 3.6. Inokulacija <i>F. novicida</i> .....                               | 22 |
| 3.7. Postupak određivanja broja bakterija .....                         | 23 |
| 3.8. Statistička obrada podataka .....                                  | 24 |
| 4. REZULTATI.....                                                       | 25 |
| 4.1. Preživljavanje <i>F. novicida</i> u vodi iz rijeke Čabranke.....   | 25 |
| 4.2. Preživljavanje <i>F. novicida</i> u vodi iz rijeke Kupice .....    | 26 |

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3. Preživljavanje <i>F. novicida</i> u vodi iz rijeke Gerovčice.....                                            | 28 |
| 4.4. Usporedba preživljavanja <i>F. novicida</i> u nesterilnim vodama iz rijeka Čabranka, Kupica, Gerovčica ..... | 29 |
| 4.5. Usporedba preživljavanja <i>F. novicida</i> u sterilnim vodama iz rijeka Čabranka, Kupica, Gerovčica.....    | 30 |
| 4.6. Mikrobiologija rijeka Čabranka, Kupica i Gerovčica prije i nakon dodatka <i>F. novicida</i> .....            | 31 |
| 5. RASPRAVA.....                                                                                                  | 35 |
| 6. ZAKLJUČAK .....                                                                                                | 37 |
| 7. LITERATURA.....                                                                                                | 38 |
| 8. KRATKI ŽIVOTOPIS PRISTUPNIKA .....                                                                             | 43 |



# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1. Rod *Francisella*

Rod *Francisella* svrstan je u porodicu *Francisellaceae*. *Francisella* spp. sastoji se od Gram negativnih kokobacila, a obuhvaća vrste *hispaniensis*, *noatunensis*, *novicida*, *philomiragia* i *tularensis* (Tablica 1.). 1912. godine u okrugu Tulare u Kaliforniji (SAD) prvi je put izolirana *F. tularensis*. Opisana je kao uzorčnik „bolesti sličnoj kugi“ u vjeverica (1). Rod je dobio ime po znanstveniku Edwardu Francis, najznačajnijem znanstveniku u području istraživanja tularemije. S obzirom na mjesto prvog pojavljivanja (grad Tulara), bakterija je prvotno nazvana *Bacterium tularensis*, a 1920. je promjenila ime u *Francisella tularensis* (2).

Nedavna istraživanja pokazuju kako je rod *Francisella* još i rašireniji nego što se mislilo. Bakterija se nalazi svugdje u prirodi; zemlji, prašini, vodi i slami (3). U humanoj medicini najznačajnije su vrste *F. philomiragia* i *F. tularensis*. Za rast na hranjivim podlogama *Francisella* zahtijeva dodatak mnogih nutritivnih tvari poput alfa-ketoglutarata, željezova pirofosfata i L-cisteina (4). Bakterija se inkubira na 37 °C, 24-48 sati, međutim, treba naglasiti da je za pojavljivanje pojedinih kolonija ponekad potrebno i 2 do 4 dana. Porast *Francisella* na čokoladnom agaru vidimo u obliku okruglih i glatkih kolonija sivkaste boje, veličine 2-4 mm. Nadalje, na podlogama koje sadrže krv, *Francisella* stvara usku zonu alfa hemolize. Modernim metodama taksonomije, *Francisella* je smještena u gama podskupinu proteobakterija (5).

Tablica 1. Taksonomija unutar roda *Francisella*

| Rod                | Vrsta               | Podvrsta            |
|--------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Francisella</i> | <i>tularensis</i>   | <i>tularensis</i>   |
|                    |                     | <i>holarctica</i>   |
|                    |                     | <i>mediasiatica</i> |
|                    | <i>novicida</i>     |                     |
|                    | <i>hispaniensis</i> |                     |
|                    | <i>philomiragia</i> |                     |
|                    | <i>noatunensis</i>  | <i>noatunensis</i>  |
|                    |                     | <i>orientalis</i>   |

### 1.1.1. *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*

Postoje 3 podvrste *Francisella tularensis*: *tularensis*, *holarctica* i *mediastatica*. Prije se i *F. novicida* smatrala podvrstom *F. tularensis*, međutim nakon novijih istraživanja, *F. novicida* svrstana je u zasebnu vrstu (6). Za čovjeka su značajne dvije podvrste, *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) i *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B). Ove dvije podvrste uzrokuju tularemiju kod ljudi, međutim, razlikuju se po virulenciji, ishodu bolesti te geografskoj rasprostranjenosti. Subsp. *holarctica* uzrokuje blaži oblik bolesti uzduž cijele sjeverne polutke. S druge strane, *F. tularensis* subsp. *tularensis* dovodi do visoke stope smrtnosti u čovjeka, a pojavljuje se uglavnom u Sjevernoj Americi (7).

Različitim molekularnim metodama, poput pulsirajuće gel elektroforeze, genotipiziraju se podvrste *F. tularensis*. Definirana su tri tipa unutar podvrste *tularensis*: A1a, A1b i A2. Ove tri podvrste razlikuju se u odnosu na klinički tijek bolesti. Najviša stopa smrtnosti zabilježena je u pacijenata inficiranih tipom A1b (8). 1941. godine izoliran je iz kožne ulceracije pacijenta najvirulentniji soj *F. tularensis* subsp. *tularensis* tipa A, a nazvan je Schu S4 (9).

Kako bi se bolje razumjela sama patogeneza tularemije, u novije se vrijeme *Francisella* sve više istražuje. Zanimljivo je i to što postoji moguća zlouporaba *Franciselle* u svrhu biološkog oružja, terorističkih prijetnji i napada te proizvodnje sojeva otpornih na antibiotike. Također, valja naglasiti da *F. tularensis* subsp. *tularensis* ima vrlo nisku infektivnu dozu, samo 15 bakterija je dovoljno da dođe do infekcije, a zatim do bolesti kod čovjeka. Na čovjeka se može prenijeti svim mogućim putevima uključujući oralni put, kapljični put, kroz kožu i konjuktivu te člankonošcima. Zbog ovako niske infektivne doze, odnosno visoke virulentnosti i visokog stupnja patogenosti, *F. tularensis* subsp. *tularensis* zahtijeva rad u laboratoriju visokog stupnja zaštite, odnosno BLS-3 laboratoriju (10).

### 1.1.2. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*

*Francisella tularensis* subsp. *holarctica* ili *Francisella tularensis* tipa B drugi je po redu od uzročnika tularemije u ljudi. Geografski je rasprostranjena na području Europe i Azije. Za razliku od tipa A, ovaj tzv. tip B dovodi do blažih oblika bolesti te ima značajno niže stope smrtnosti. *Holarctica* se razlikuje od drugih podvrsta, prvenstveno po tome što je

povezana sa slatkovodnim okruženjima i glodavcima poput dabrova koji često borave uz vodu (11). Ovoj podvrsti dug opstanak u prirodi omogućuje preživljavanje u protozoama. Bolest se najčešće prenosi s čovjeka na čovjeka ubodom vektora poput krpelja ili komarca (12). Od podvrste *holarctica* je početkom 20. st. konstruiran soj živuće vakcine, LVS- soj (engl. live vaccine strain) (13). LVS- soj je nastao u svrhu cijepljenja, subkultivacijom bakterije *F. tularensis* subsp. *holarctica* na hranjivom agaru te uzastopnim intraperitonealnim infekcijama miševa, a u konačnici izolacijom iz samog tkiva životinje (14). Točan mehanizam nastanka LVS- soja još nije potpuno razjašnjen, a smatra se da je došlo do slučajnih mutacija genoma (15). Još uvijek ne postoji licencirano cjepivo za tularemiju zato što LVS- soj dovodi do bolesti u imunokompromitiranih osoba te taj soj nije još u potpunosti opisan.

### 1.1.3. *Francisella novicida*

*Francisella novicida* se u početku smatrala podvrstom *F. tularensis*, zajedno sa *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) i *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B). Međutim, na temelju određenih fenotipskih razlika izolat je svrstan u zasebnu vrstu *Francisella novicida* (16). Ova bakterija je prvi put izolirana 1950. godine iz slane vode zaljeva Ogden Bay, Utah. U početnim istraživanjima se zaključilo kako je bakterija morfološki vrlo slična *F. tularensis*, ali je fermentirala saharozu i vidjelo se da je puno manje virulentna. Stoga je, 1964. godine, *F. novicida* klasificirana je kao zasebna vrsta. *F. novicida* može uzrokovati bolest samo u imunokompromitiranih osoba, no vrlo rijetko (opisano nekoliko slučajeva u SAD-u) (18,19). Općenito, neki od dokumentiranih slučajeva bolesti, uzrokovanih s *F. novicida* u okolišu, uključivali su vodene ekosustave, slanu i bočatu vodu, led, te tlo (16). Iako su *F. novicida* i *F. tularensis* u vrlo bliskoj genetskoj vezi, do sada nije bilo zabilježenih slučajeva prijenosa *F. novicida* sojeva sa člankonožaca (krpelji, komarci...) na čovjeka. *F. novicida* nije opasna za čovjeka, međutim, opasna je za životinje. Uzrokuje bolest kod više od 200 životinjskih vrsta, poput zečeva, vjeverica, miševa, psa, mačaka, ovaca i majmuna (11). Geografski je rasprostranjena na području Australije (20).

Kolonije *F. novicida* na hranjivim podlogama rastu u obliku koka i/ili kokobacila. Bakterija je gram-negativna te je za nju tipičan, kao i za ostale vrste roda *Francisella*, unutarstanični rast i način razmnožavanja. Također, *F. novicida* ima manje zahtjeve za rast na hranjivim podlogama za razliku od *F. tularensis*. Na hranjivoj podlozi, CGBA agaru (engl.

cysteine-glucose-blood agar), pri 37 °C, kolonije *F. novicida* uoče se već nakon 24 sata, dok su kolonije *F. tularensis* vidljive tek nakon 3 do 7 dana (17). Genom *F. novicida* (soj U112) sastoji se od 84 gena. Ti geni su inaktivirani kod *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 i *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (21). Također, ti su geni uključeni u metabolizam ugljikohidrata, ciklus stvaranja energije, biosintezu aminokiselina te prijenos i modifikaciju DNK (22).

Upravo zato što *F. novicida* nije infektivna za čovjeka, izabrana je kao bakterijski model za izradu eksperimentalnog dijela ovog završnog rada. Ova bakterija pogodna je za laboratorijsko istraživanje te ne zahtijeva laboratorije visokog stupnja zaštite (BSL-3). Međutim treba naglasiti da *F. novicida* ima sposobnost infekcije humanih makrofaga *in vitro*. Također kod životinja, posebno onih koje se koriste u laboratorijskim istraživanjima poput miševa, dovodi do bolesti slične tularemiji kod čovjeka. Visoka genetska sličnost *F. novicida* s *F. tularensis* te ostale karakteristike pridonijele su njenoj širokoj primjeni u eksperimentalnim istraživanjima tularemije (23).

## 1.2. Tularemija

### 1.2.1. Epidemiologija tularemije s naglaskom na vodene ekosustave

Put prijenosa tularemije može biti različit; može se prenijeti putem vektora (krpelji, muhe, komarci itd.), direktnim kontaktom sa zaraženom životinjom te konzumacijom vode ili hrane kontaminirane životinjskim izlučevinama. Općenito, krpelji su na području Europe najznačajniji člankonošci koji omogućuju opstanak *F. tularensis* u prirodi. Najznačajnije vrste krpelja su: *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis concinna*, *Dermacentor marginatus* i *Dermacentor reticulans*. Nadalje, u srednjoj Europi izravan kontakt sa zečevima tijekom lova najčešći je put prijenosa, dok se u sjevernoj Europi infekcija najčešće povezuje s ubodima komaraca. Podvrsta *holarctica* često je izolirana iz vodenih ekosustava kao što su bare, jezera, potoci i rijeke. Obzirom da je podvrsta *F. tularensis* subsp. *holarctica* karakteristična za vodena staništa u endemičnim područjima, istraživanja su utvrdila da može doći do infekcije larvi komaraca tijekom razvoja u vodi. Također, životinje poput dabrova imaju važnu ulogu u održavanju *F. tularensis* u vodenim ekosustavima na području Sjeverne Amerike i Skandinavije. U rizične skupine spadaju ljudi koji često borave u prirodi, šumari,

rekreativci, lovci, mesari koji obrađuju zaraženo meso, poljoprivrednici, veterinari te laboratorijski djelatnici (25). Najčešći put prijenosa bolesti je udisanje infektivnog aerosola. Međutim, *Francisella* u organizam može ući na više načina i mjesta, te je stoga poznata kao jedan od najinfektivnijih bakterijskih patogena.

Mnoga istraživanja su utvrdila kako *F. tularensis* u vodenom okolišu može preživjeti i do nekoliko mjeseci. Pretpostavlja se kako *Francisella* u vodenim ekosustavima preživljava u zajednici s protozoama. Opisano je nekoliko slučajeva epidemija tularemije povezanih sa konzumacijom kontaminiranog leda ili vode. *F. tularensis* subsp. *holarctica* najčešće je povezana sa vodenim okolišem, dok se podvrsta *tularensis* najčešće ne povezuje s kontaminiranom vodom (27). Što se tiče *F. novicida*, nema podataka koji pokazuju da dovodi do bolesti u čovjeka ili da se prenosi kontaktom s vektorima ili zaraženim životinjama (31).

### 1.2.2. Tularemija u ljudi

*F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) i *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B) uzrokuju tularemiju u ljudi. Rezervoari bolesti su različiti, poput lagomorfa (dvojezupci) i glodavaca, a povećanjem broja tih vrsta u prirodi raste i incidencija bolesti u čovjeka. Ove dvije podvrste *F. tularensis*, tip A i tip B, međusobno se razlikuju po ishodu bolesti, ali i prema geografskoj rasprostranjenosti. *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) javlja se na području Sjeverne Amerike, te je puno infektivnija i smrtonosnija od tipa B. S druge strane, *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B) javlja se na području cijele sjeverne hemisfere, te uzrokuje nešto blaži tip bolesti (7). Brojna znanstvena istraživanja pokazala su da je infektivna doza *F. tularensis* subsp. *tularensis* vrlo niska, samo 15-20 bakterija dovoljno je da čovjek unese u sebe respiratornim putem te da dođe do pojave bolesti. Vrijeme inkubacije traje od 3 do 5 dana (24).

*Francisella* može izazvati unutarnje i vanjske oblike bolesti. Među vanjske oblike bolesti spadaju anginozni, glandularni, okuloglandularni i ulceroglandularni oblik. Najčešći tip bolesti je ulcero-glandularna tularemija. Ona nastaje izravnim kontaktom sa zaraženim životinjama ili ugrizom zaraženog vektora (26). Kada bakterija uđe u čovjekov organizam nastaje lezija, te se ta lezija dalje razvija u čir. Čir je gotovo bezbolan, okružen je zonom upale, te nastaje u roku 7 dana. Ako je riječ o glandularnoj tularemiji, tad unutar nekoliko dana dolazi do opće slabosti, povišene temperature, grlobolje, glavobolje, izostaje pojava



lezije te dolazi do povećanja bolnih limfnih čvorova (27). Nadalje, ukoliko dođe do inokulacije bakterije u oko, tada govorimo o okuloglandularnom obliku tularemije. Dolazi do pojave konjuktivitisa, stvaranja gnoja i otoka očnih kapaka (28). Infekciju je potrebno hitno liječiti da se ne bi proširila na lokalne limfne čvorove. Potom, ako se hrana ili voda inficirana *Francisella* *proguta*, dolazi do pojave anginoznog oblika bolesti. Kod anginozne tularemije dolazi do povećanja limfnih čvorova u području vrata te do pojave faringitisa.

S druge strane, u unutarnje oblike bolesti spadaju abdominalni, plućni i tifoidni oblik bolesti (26). Gastrointestinalna tularemija može se pojaviti u obliku blagog proljeva, međutim komplikacije i veća infektivna doza mogu dovesti do akutne bolesti s teškim ulceracijama crijeva. Nadalje, pri udisanju aerosola kontaminiranog izlučevinama zaraženih životinja javlja se plućni oblik bolesti (29). Ovaj oblik tularemije najčešće se javlja u ruralnim područjima, kod ljudi koji se bave poljoprivredom te često dolazi do udisanja infektivnog praha. Simptomi plućne tularemije ovise o virulentnosti soja i infektivnoj dozi. Ako se ne liječi, stopa smrtnosti može iznositi i do 30% kod visoko virulentnih sojeva. Liječenje se provodi antibiotskom terapijom. Ako se radi o akutnoj infekciji, tada se javlja opća slabost te visoka temperatura, a kod težih oblika bolesti javlja se upala pluća (30). Kod određenog postotka ljudi bolest često ostane nedijagnosticirana, upravo zbog općih simptoma tularemije.

### **1.2.3. Tularemija u životinja**

Tularemija u životinja javlja se najčešće u obliku akutne febrilne bolesti. Kao i kod čovjeka, klinička obilježja različita su s obzirom na put infekcije i infektivnu dozu. Slučajevi tularemije opisani su u više od 200 vrsta domaćih i divljih životinja (32). Jedan od zabilježenih slučajeva infekcije govori o psu koji se kupao u kontaminiranoj vodi, a drugi slučaj opisuje psa koji je polizao zaraženu životinju i tako se zarazio (33). Još jedan od zanimljivih slučajeva koji je opisan je pas koji je počeo dobivati simptome limfadenopatije, vrućice i anoreksije, te je laboratorijskom dijagnozom potvrđena dijagnoza tularemije. Utvrdilo se da je do zaraze došlo kada je pas pojeo divljeg zeca (34). Također, opisan je jedan eksperiment kada su psi u svrhu istraživanja zaraženi franciselom. U roku od 5 dana razvili su znakove groznice, limfadenopatije, pustule na mjestu inokulacije te su imali mukozne izlučevine iz nosa i oka (35).

Osim na psima, opisani su i slučajevi tularemije na mačkama. Kod mačka se pokazalo da klinička manifestacija bolesti nije nužna. Međutim, ako se bolest manifestira, javljaju se simptomi poput dehidracije, groznice, anoreksije, jezične ulceracije te hepatomegalije i splenomegalije. U najtežim slučajevima dolazi do teške groznice sa fatalnim ishodom (36). Mačka može o ne mora imati simptome bolesti, međutim, u oba slučaja može prenijeti infekciju na druge životinje ili čovjeka. Laboratorijski nalazi koji dokazuju infekciju su povišena koncentracija neutrofila, trombocitopenija i transaminaza (37).

Psi i mačke nisu jedine domaće životinje kod kojih se može javiti tularemija. Dokumentirano je nekoliko slučajeva tularemije kod ovaca na području SAD-a (Montana i Idaho). Za većinu zaraženih ovaca tularemija je bila smrtonosna (38). Neki od zabilježenih simptoma bolesti bili su: dijareja, visoka temperatura, anoreksija te povećani limfni čvorovi (39).

Osim domaćih životinja, tularemija je zabilježena i u nekoliko divljih životinja poput majmuna, vjeverica, zečava i miševa. Neke od vrsta majmuna koja su bila zaražena tularemijom su *tamarin* i *talopin*, a bolest se manifestirala u obliku nekroze jetre i slezene, splenomegalije te krvarenja sluznice crijeva (40). Također, kod tzv. vjeveričastih majmuna zaraženih francisellom, javljali su se simptomi krvarenja u područjima srca, moždanih ovojnica, nadbubrežnih žlijezda i pluća (41).

#### **1.2.4. Prevencija i liječenje tularemije**

Ukoliko želimo spriječiti pojavu tularemije, važno je slijediti neke od sljedećih uputa: izbjegavati kontakt sa životinjama za koje se sumnja da imaju infekciju, ne konzumirati hranu i vodu (led) za koje se sumnja da su kontaminirani, izbjegavati prostore gdje ima puno prašine i mogućnosti kontaminacije aerosola u zraku, izbjegavati sjedenje na zemlji ili slami, koristiti sredstva protiv komaraca i krpelja pri boravku u prirodi, redovito i pravilno pranje ruku, itd.

Što se tiče liječenja tularemije, ona se uspješno može liječiti antibioticima poput aminoglikozida. Prije su se koristili i lijekovi poput streptomicina te kloramfenikola, međutim, danas se sve rjeđe koriste jer je ustanovljeno da djeluju nefrotoksično, ototoksično te utječu na hematopoezu (10). U SAD-u se u liječenju plućne tularemije koristi gentamicin (29). Nažalost, kod nekih lijekova utvrđena je ponovna pojava bolesti nakon primjene,

primjerice kod tetraciklina (30). Neki lijekovi imaju i negativne nuspojave, poput negativnog djelovanja na razvoj zubiju u male djece kod primjene doksiciklina (42). Nadalje, kod blažih oblika tularemije koriste se ciprofloksacini. Ciprofloksacin primjenjuje se „*per os*“ i vrlo je djelotvoran, posebice kod trudnica i djece (43).

Kada govorimo o cijepljenju protiv tularemije, provode se mnoga istraživanja, međutim danas još uvijek ne postoji licencirano cjepivo. Otkriveno je mnoštvo imunogenih proteina, ali ni jedan ne potiče zaštitni imuni odgovor (44). Današnja istraživanja u liječenju tularemije sve su više usmjerena na tzv. „T-stanice“ koje su sastavni dio stanične imunosti (42). 1950. godine proizveden je tzv. LVS soj živuće vakcine (engl. *live vaccine strain*), te je cijepljenje tim sojem rezultiralo smanjenjem mnogih infekcija, posebice infekcija kod osoba u riziku poput laboratorijskih djelatnika (45). Negativna strana LVS soja je ta što nije u potpunosti opisano kako djeluje te dovodi do bolesti u osoba oslabljenoga imuniteta, stoga se taj soj još uvijek ne može voditi kao cjepivo. Danas se u svijetu provode mnogobrojna istraživanja kako bi se pronašlo odgovarajuće cjepivo protiv tularemije (46).

### 1.3. Patogeneza i virulencija *Francisella*

#### 1.3.1. Činitelji patogenosti

*F. tularensis* nema tipične čimbenike virulencije poput egzotoksina. Ova bakterija je virulentna po tome što se razmnožava unutar organizma domaćina. Posljedica toga je nenormalno funkcioniranje organizma te snažna upalna reakcija domaćina koja dodatno razvija bolest. Činitelji patogenosti *Francisella* još se uvijek istražuju, primjerice, otkriveno je da neki sojevi sadrže kapsulu čija važnost još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Nadalje, otkriveno je da bakterija na svojoj površini sadrži tzv. tip IV sustava pila koji ima veliku važnost u adherenciji bakterije za stanicu domaćina. Također, ovaj sustav pila ima i ulogu u sekreciji raznih bjelančevina u citosol stanice domaćina.

Još se uvijek istražuje koje točno komponente bakterije dovode do upalnog odgovora domaćina, a utvrđeno je da lipopolisaharid (LPS) kod *Francisella* nema toliku važnost u upali, za razliku od drugih gram negativnih bakterija (47). Također, organizam domaćina prepoznaje određene bakterijske komponente *Francisella* poput tzv. TLR skupina receptora (engl. *Toll-Like Receptors*) koji izazivaju urođeni imunološki odgovor na *Francisellu*. Ti

receptori nalaze se na površini dendritičnih stanica i stanica makrofaga (48). TLR skupina receptora reagira s nekoliko bakterijskih lipoproteina što dovodi do indukcije protuupalnih citokina za vrijeme infekcije (49). Tijekom razvoja bolesti aktivirani makrofazi i neutrofili oslobađaju protein matriks metaloprotein 9, koji pripada obitelji metaloproteaza. Glavna uloga tog proteina je nakupljanje leukocita u tkivima. Jedno istraživanje pokazalo je da će organizmi koji imaju mutaciju u stvaranju tog proteina lakše preboljeti infekciju, za razliku od organizama kod kojih je ovaj protein normalno izražen (48). *F. novicida* i *F. tularensis* sadrže jedinstvene i neobične modifikacije molekule lipida A jer se ne vežu za molekule domaćina kako bi inicirale protuupalni odgovor, kao kod ostalih gram negativnih bakterija (50). Pretpostavlja se da je za ovakav drugačiji imunološki odgovor u domaćina odgovorna različita struktura O antigena kod ovih vrsta *Francisella*. Istraživanjima je utvrđeno da je kod *F. novicida* O antigen odgovoran za rezistentnost bakterije na komponente seruma, dok je kod vrste *F. tularensis* taj antigen nužan za unutarstanični opstanak bakterije (49).

*F. tularensis* ima poseban način ulaska u stanicu domaćina na način da ulazi fagocitozom i veže se na različite receptore koji se nalaze na površini makrofaga (50,51). Nadalje, na bakterijskoj površini *F. tularensis* nalazi se tzv. faktor elongacije (EF). Faktor EF ima veoma važnu ulogu adhezije na stanice makrofaga. Također, zajedno s faktorom EF međusobno djeluje i tzv. protein FsaP, koji je smješten na vanjskoj membrani bakterije (52, 53). Nadalje, za ulazak bakterije u stanicu domaćina bitno je spomenuti i još neke receptore poput Fc receptora. Fc receptori odgovorni su za ulazak bakterije u domaćina ukoliko je ona obložena protutijelima (52).

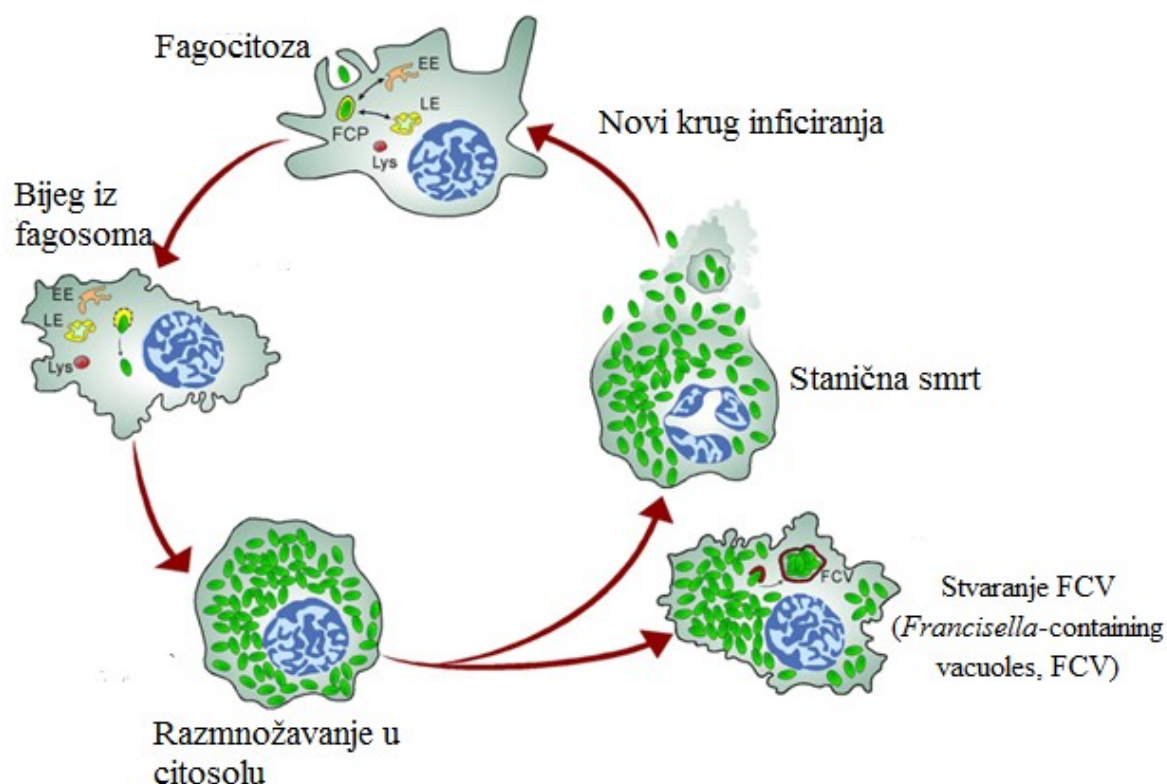
Prilikom ulaska u stanicu domaćina, *Francisella* je smještena u fagosomu (vezikula koja se stvara oko čestice koja se apsorbira fagocitozom) te na taj način prodire kroz membranu u stanicu domaćina. U taj prodor bakterije u stanicu domaćina uključeni su i membranski protein kaveolin-1 te tzv. lipidne splavi. Lipidne splavi (engl. *Lipid Rafts*) su stanične membrane bogate kolesterolom te sadrže razne signalne molekule i receptore koje komuniciraju sa patogenima (55).

Dakle, u činitelje patogenosti *Francisella* spadaju: pili, lipopolisaharid (LPS), kapsula i FPO; tzv. *Francisella* patogeni otok koji je detaljnije opisan u sljedećem poglavlju.

### 1.3.2. Unutarstanični život i virulencija

Kako bi iskoristila dostupne izvore energije iz unutarstaničnog okoliša, *Francisella* prodire u stanicu domaćina. Da bi bakterija preživjela u stanici, mora povećati uvoz hranjivih tvari ili razgraditi sve kompleksne strukture poput glikogena, lipida i bjelančevina, jer je u njima pohranjen najveći dio potencijalnih nutrijenata (56,57,58).

*Francisella* ulazi u stanicu procesom fagocitoze. Poslije ulaska u stanicu nalazi se u fagosomu oko 2 sata. Nakon 2 sata izlazi iz fagosoma (*bijeg iz fagosoma*) te se replicira u citosolu. Bakterija se dalje širi procesom apoptoze (proces programirane stanične smrti) iz inficiranih na neinficirane stanice. U tom procesu dolazi do stvaranja tzv. FCV vakuola, tj. vakuola koje sadrže *Francisellu* (engl. *Francisella-containing vacuoles*, FCV) te pri tome dolazi do razaranja stanica i stanične smrti. Zatim bakterija ponovno započinje s novim krugom infekcije (59-64) (Slika 1.). Osim u makrofagima, brojna istraživanja pokazuju da se *F. tularensis* uspješno razmnožava i u neutrofilima, plućnim epitelnim stanicama, dendritičkim stanicama, hepatocitima, stanicama artropoda te protozoama (7).



**Slika 1. Model unutarstaničnog životnog ciklusa *F. tularensis* prilagođen prema makrofagima.** Izvor: Chong, A., Celli, J. *The Francisella intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. Frontiers in Microbiol.* 2010. (1) 138.

Unutarstanični život *F. tularensis* vrlo je složen i još se uvijek istražuje, a posebno se istražuju uloge pojedinih gena u tom životnom ciklusu. Tako je otkriven tzv. *Francisella* patogeni otok (engl. *Francisella pathogenicity island*, FPI) koji sadrži 26-19 gena nužnih za unutarstanično razmnožavanje i virulenciju. Među tih 19 gena otkriveni su i geni koji su se pokazali prijeko potrebni za virulentnost *Franciselle*, a to su geni *iglABCD* i *pdpABCD* (65). Također, treba napomenuti da podvrste *holarctica* i *tularensis* sadrže po dvije kopije FPI-a (*Francisella pathogenicity island*), dok vrsta *F. novicida* sadrži samo jedan FPI. Razlikuje se lučenje tzv. FPI proteina između vrsta *F. novicida* i *F. tularensis*. *F. novicida* izlučuje samo 4 FPI proteina (IglC, IglE, , PdpA i PdpE), dok se nakon infekcije makrofaga s *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS sojem izlučuje čak 8 FPI proteina (IglC, IglE, IglI, IglF, IglJ, VgrF, PdpA i PdpE) (66). FPI proteini imaju vrlo važne uloge. Oni doprinose u virulenciji *Franciselle* u miševima, fagosomalnom bijegu, te repliciranju u stanicama sisavaca i ameba. Također, kod *in vivo* i *in vitro* infekcija s *F. tularensis* značajno je povišena ekspresija tzv. IglC proteina, a oni se smatraju ključnim faktorom virulencije *Franciselle* (67,68). Dakle, glavnim se mehanizmom virulencije *F. tularensis* smatra sposobnost razmnožavanja i preživljavanja u stanicama domaćina.

#### 1.4. Dijagnostika i laboratorijska sigurnost

Pri radu laboratorijskog osoblja s bakterijom *F. tularensis*, koja je visoko virulentna i lako se prenosi putem aerosola, postoji visoka opasnost od infekcija. Zbog ovih se razloga rad s ovom bakterijom provodi u posebno opremljenim laboratorijima sa stupnjem zaštite III, u tzv. BSL-3 laboratorijima. BSL-3 laboratoriji omogućuju uporabu modernih bioloških kabineta, a laboratorijsko osoblje mora nositi posebnu zaštitnu odjeću.

Pri sumnji na tularemiju najčešće se obrađuju uzorci poput krvi, sadržaj iz limfnih čvorova ili ulceroznih ogrebotina. Prilikom transporta uzoraka koristi se najčešće podloga Cary-Blair (25, 27). Zatim, kada se dopremi u laboratorij, *Francisella* se najčešće uzgaja na BCYE (engl. Buffered Charcoal Yeast Extract) hranjivoj podlozi ili čokoladnom agaru. Pošto *Francisella* zahtjeva obogaćene hranjive podloge, dodatno se dodaju soli željeza i alfa cistein. Inkubacija traje od 24 do 48 sati pri temperaturi od 37 °C. Međutim, tularemija se najčešće dokazuje serološkim metodama zbog otežane kultivacije. Najčešće serološke metode koje se

koriste su mikroaglutinacija i test aglutinacije u nizu epruveta (25). U novije se vrijeme sve više koriste i molekularne metode poput PCR-a.

Općenito, laboratorijski djelatnici pri radu s *Francisellom* ili bilo kojim drugim patogenom moraju nastojati izbjeći svaku radnju koja povećava mogućnost infekcije, izbjegavati kontakt kože ili sluznice s infektivnim uzorcima te nakon svog obavljenog rada dekontaminirati i dezinficirati laboratorij te zbrinuti otpad na odgovarajući način. Posljednji i jedan od najbitnijih koraka je pravilno i temeljito oprati ruke odgovarajućim dezinficijensom.

## **1.5. Proučavane vode iz rijeka**

U ovome završnome radu proučavano je preživljavanje bakterije *F. novicida* u vodama iz rijeka Gorskog kotara: Čabranka, Kupica, i Gerovčica.

### **1.5.1. Rijeka Čabranka**

Rijeka Čabranka pritok je rijeke Kupe te izvire u dva mlaza. Prvi mlaz nalazi se u dubokoj jaruzi pod Obrhom iznad Čabra, a drugi; nedaleko odatle, u jezercu Zelenoj konti, te prima iz Slovenije potok Sušicu. U Čabru uvire u nju i potok Trščanka – *Pakleni jarak*, a kod Plešci potok Mandli. Duga je od izvora do ušća u Kupu (kod sela Hrvatsko i Osilnica) oko 13 km. Dolina Čabranke okružena je bujnom vegetacijom šuma, pašnjaka i livada pa je vrlo privlačna za sportskog ribolovca i druge posjetioce. U gornjem toku ima potočne pastrve, a u donjem – osim pastrve i nešto lipljana, klena i peša (69). Rijeka Čabranka čini prirodnu granicu Hrvatske i Slovenije. Također, na njoj je izgrađena i mala hidroelektrana te uzgajalište pastrve (70). Sam izvor rijeke Čabranke udaljen je oko 20 minuta hoda od centra Čabra kroz kojeg protječe. Grad Čabar koristi lijevo izvorište Čabranke za vodoopskrbu. Kloriranje vode provodi se ručno. Izvorište je bakteriološki nesigurno zbog čestog fekalnog zagađenja. Jedan od uzroka čestog fekalnog zagađenja jesu naselja bez izgrađene kanalizacije u područjima neposrednog utjecaja na podzemne vode (71). Rezultati ispitivanja zdravstvene ispravnosti vode za piće vodoopskrbnog sustava na području Čabra u 2019. godini (od siječnja do travnja) bili su sljedeći; od 10 pregledanih uzoraka, 4 (40%) je bilo mikrobiološki

neispravno. Uzrok mikrobiološke neispravnosti bile su ukupne koliformne bakterije te enterokoki (72).

### **1.5.2. Rijeka Kupica**

Rijeka Kupica, pritok rijeke Kupe, izvire kod zaseoka Mala Lešnica ispod Kupjačkog vrha u obliku gorskog jezera. Protičući 3 km kroz lijepe krajolike, plijeni pažnju svojim virovima i brzacima, te se ulijeva u Kupu kod Broda na Kupi. Kupica je bogata kalifornijskom i potočnom pastrvom, lipljanom, a u donjem toku ima i mladice. U malom ribogojilištu u Maloj Lešnici, koje je izgradilo Šumsko gospodarstvo – Delnice, uzgaja se pastrva (69). Kupica je prva rijeka u Hrvatskoj gdje je uveden režim „*Catch and release*“, (uhvati i pusti) (73). Izvor Kupice koristi vodovod Delnice za vodoopskrbu Delnica i Mrkoplja. U procesu pročišćavanja Kupice primjenjuju se postupci filtracije, koagulacije i kloriranja vode (71). Rezultati ispitivanja zdravstvene ispravnosti vode za piće vodoopskrbnog sustava na području Delnica u 2019. godini (od siječnja do travnja) bili su sljedeći; od 20 pregledanih uzoraka, svi uzorci su bili mikrobiološki ispravni (72).

### **1.5.3. Rijeka Gerovčica**

Rijeka Gerovčica protječe Gerovskom visoravni (gornji tok) u dva kraka te ponire u blizini naselja Mali Lug. Ponovno izvire nedaleko naselja Zamost (donji tok) te se na kraju ulijeva u rijeku Čabranku. Donji tok Gerovčice dug je oko 1400 metara (74). Na Gerovčici su izgrađena dva mlina koji su i danas još u funkciji- jedan od mlinova služi za proizvodnju žita, a drugi je dio pilane (75). U naselju Zamost, kroz koje prolazi Gerovčica, posjetitelji mogu razgledati Pilu venecijanku- Malinarić (pilana na vodu), Salančev mlin te obližnji izvor Gerovčice (76). U svrhu izrade eksperimentalnog dijela završnog rada voda je uzorkovana na donjem toku rijeke Gerovčice. Izvor Gerovčice ne koristi se za javnu vodoopskrbu.



## 2. CILJ RADA

Cilj ovog završnog rada bio je ispitati preživljavanje bakterije *F. novicida* u vodama iz rijeka Gorskog kotara: Čabranka, Gerovčica i Kupica. Određena koncentracija *F. novicida* ubačena je u uzorke voda te je praćena njena sposobnost preživljavanja u periodu od 5 dana, svakodnevnim nasađivanjem deseterostrukih razrjeđenja uzoraka na hranjivu podlogu, BCYE agar. Također, cilj je bio i usporediti preživljavanje *F. novicida* između ove tri rijeke, te pratiti kako će se mijenjati mikrobiologija uzoraka rijeka prije i nakon dodatka *F. novicida*.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Bakterijski soj

U eksperimentalnom radu korišten je bakterijski soj *Francisella novicida* U112. Ova bakterija drži se pohranjena pri temperaturi od -80 °C. Dva dana prije početka pokusa, bakterija je nasađena na BCYE agar (engl. Buffered Charcoal Yeast Extract Agar), krutu hranjivu podlogu s kvašćevim ekstraktom i aktivnim ugljenom. Zatim je slijedila inkubacija pri 37 °C uz 5 % CO<sub>2</sub>, u trajanju od 24-48 sati.

#### 3.2. Hranjive podloge

U svrhu izrade eksperimentalnog dijela završnog rada korišten je BCYE agar (engl. Buffered Charcoal Yeast Extract Agar), koji sadrži puferirani kvašćev ekstrakt te aktivni ugljen. Francizela je veoma zahtjevna za uzgoj, te se zbog toga u podlogu dodaje: L- cistein, serin, treonin, željezov pirofosfat i  $\alpha$ -ketoglutarat. Aminokiseline L- cistein, serin i treonin bakterija upotrebljava kao izvor ugljika i energije, a  $\alpha$ -ketoglutarat pospješuje rast bakterije. Ekstrakt kvasca i aktivni ugljen djeluju apsorpcijski i detoksitativno na produkte koji nastaju razgradnjom masnih kiselina te sprječavaju oksidaciju L-cisteina. Na BCYE agaru *F. novicida* raste u obliku bijelo-prozirnih kolonija.

Sastav BCYE agara (1L):

- 25 g agara s kvašćevim ekstraktom i aktivnim ugljenom
- 1000 ml destilirane vode
- 10 g ACES pufera 0,4 g L-cistein-HCl
- 0,25 g Fe-pirofosfata
- 1,0 g  $\alpha$ -ketoglutarata
- 0,4 g L-cisteina

U eksperimentalnom radu korištene su i mnoge druge hranjive podloge. Nakon što su se svi uzorci rijeka (Čabranka, Kupica, Gerovčica) profiltrirali metodom membranske

filtracije, pomoću sterilne pincete uklonjeni su filteri s držača filtera i svaki je stavljen, s mrežicom prema gore, na odgovarajuću hranjivu podlogu. Hranjive podloge koje su korištene u eksperimentalnom radu, osim BCYE agara, su:

- Les endo agar
- m-FC agar
- Slanetz-bartley agar (SB agar)
- Kanamicin eskulin azid agar (KEA agar)
- TTC agar
- TSC agar (ili TSN agar)
- Pseudomonas agar

Cilj korištenja ovih hranjivih podloga bio je ispitati mikrobiologiju ispitivanih rijeka (Čabranka, Kupica, Gerovčica), prije i nakon dodatka *F. novicida*.

Les endo agar služi nam za dokazivanje ukupnih koliforma metodom membranske filtracije. Ova selektivna podloga sadrži peptone kao izvor dušika, ugljika, vitamine i minerale. Izvor vitamina B-kompleksa je ekstrakt kvasca koji stimulira rast bakterija. Podloga od ugljikohidrata sadrži laktozu. Fosfati su puferi. Natrij-klorid održava osmotsku ravnotežu medija. Natrij lauril sulfat i natrij-dezoksikolat su inhibitori. Fuksin je pH indikator. Zbog dekolorizacije otopine fuksina, dodaje se natrij sulfit. Laktoza fermentirajuće bakterije proizvode acetaldehid. Acetaldehid reagira s fuksinom i natrij-sulfitom te tvore crveno obojene kolonije. Kada bakterije proizvode aldehid, dolazi do razvoja metalnog sjaja. Aldehid vrlo brzo fermentira laktozu. Laktoza nefermentirajuće bakterije tvore bezbojne kolonije. Inkubacija se provodi na 37 °C.

Za dokazivanje fekalnih koliforma metodom membranske filtracije koristi se m-FC agar. Ova selektivna podloga sadrži ekstrakt kvasca i pepton koji su izvor nutrijenata za rast bakterija. Žučne soli inhibiraju rast Gram-pozitivne flore koja je konkurentna. Na temperaturi od 44 °C fekalni koliformi mogu fermentirati laktozu. Pri fermentaciji laktoze dolazi do formiranja plavo obojenih kolonija. Druge bakterije formiraju sive kolonije.

Selektivna hranjiva podloga - slanetz-bartley agar (SB agar) koristi se za dokazivanje enterokoka. Ova hranjiva podloga sadrži natrij azid i 2,3,5-trifeniltetrazolium klorid. Natrij azid inhibira rast gram negativnih bakterija, dok se 2,3,5- trifeniltetrazolium klorid reducira u crveno obojeni formazan u prisutnosti enterokoka. Inkubacija na SB agaru provodi na 37 °C.

U slučaju da na SB agaru narastu tipične crveno obojene kolonije, radi se potvrdni test. Potvrdni test radi se na način da se membrana premjesti sa SB agara na Kanamicin eskulin azid agar (KEA agar). KEA agar prethodno se zagrije na 44 °C. U periodu od 2 sata enterokoki hidroliziraju eskulin te se 6,7-dihidroksikumarin, krajnji produkt hidrolize, veže s željezo (III) ionima. Kao posljedica toga nastaje tamno obojeni do crni kompleks.

Za dokazivanje *E.coli* metodom membranske filtracije koristi se selektivna podloga TTC. TTC agar sadrži natrij-heptadecil sulfat (Tergitol-7) koji inhibira rast gram pozitivnih bakterija. TTC je osjetljiv dehidrogenaza indikator. *E. coli* i koliformne bakterije slabo reduciraju podlogu TTC. Pozitivni porast na TTC agaru vidimo u obliku žuto-narančastih kolonija. Inkubacija se provodi na 37 °C.

Selektivna hranjiva podloga - TSC agar, koristi se za dokazivanje *C. perfringens* metodom membranske filtracije. Kod dokazivanja *C. perfringens*, nakon što se filter smjesti na selektivnu podlogu, mora se inkubirati u anaerobnim uvjetima. Podloga se stavlja u Gas-Pack sustav. TSC agar sadrži ekstrakt kvasca, triptozu i pepton. Oni osiguravaju agaru osnovne nutrijente za rast bakterija (vitamine, minerale, dušik i aminokiseline). Dinatrij-disulfit i željezo-amonij-citrat indikator su za H<sub>2</sub>S. Kada neke bakterije proizvode H<sub>2</sub>S, dolazi do redukcije sulfita u sulfid. Pri tome, u prisutnosti željezo amonij citrata, dolazi do formiranja crnih kolonija (77). Inkubacija se provodi na 37 °C.

Pseudomonas agar podloga dizajnirana je na način da dodavanjem odgovarajućih dodataka (SR0102 ili SR0103), medij postaje selektivan za *Pseudomonas aeruginosa* ili *Pseudomonas* spp. općenito. Agar sadrži magnezijev klorid i kalijev sulfat za poboljšanje proizvodnje pigmenta. Radi poboljšanja njegova selektivnog djelovanja, dodaju se cefaloridin i fucidin. Inkubacija traje 48 sati na 25-30 °C (78). Pozitivni porast na Pseudomonas agaru vidimo u obliku plavo obojenih kolonija.

### 3.3. Ispitivane vode

Čiste i nezagađene vode Gorskog kotara teku vrlo lijepim krajolicima i obiluju različitim vrstama riba poput potočne pastrve, mladice, lipljana, klena, peša, potočne mreene, kalifornijske pastrve itd. Rijeke Gorskog kotara značajne su i važne ne samo kao sastavni dio prirodnih znamenitosti, nego i zbog mogućnosti korištenja za ribolovni sport i sportsko-ribolovni turizam (aktivni odmor, relaksaciju i sl.) (69).

U ovome završnome radu proučavano je preživljavanje bakterije *F. novicida* u vodama iz rijeka Čabranka, Kupica, i Gerovčica. Sve tri rijeke nalaze se u Gorskome kotaru. Točnije, Čabranka i Gerovčica nalaze se na području općine Čabar, a Kupica na području grada Delnice, kod Broda na Kupi.

### 3.4. Uzimanje uzoraka

Uzorci voda iz rijeka Čabranka, Kupica i Gerovčica uzeti su na područjima donjeg toka tih rijeka, stoga su te rijeke promatrane kao rekreacijske vode. Uzimanje uzoraka voda, u ovome slučaju voda iz rijeka namijenjenih za rekreaciju, provelo se prema međunarodnim normama za uzorkovanje (EN) ISO 5667. Vodu je potrebno pravilno uzorkovati kako bi dobili reprezentativan uzorak, što znači da svaki element tog uzorka jednako dobro opisuje cjelinu iz koje je uzet (77).

Uzorak vode iz rijeka za eksperimentalnu analizu uzet je u čiste boce, prethodno isprane najmanje tri puta samim uzorkom rijeke koja se u tom trenutku uzorkuje. Za svaku rijeku uzeto je po 2 l uzorka. Uzorci su čuvani u tami na temperaturi između 4 i 10 °C. Analiza uzoraka provela se 24 h nakon uzorkovanja.

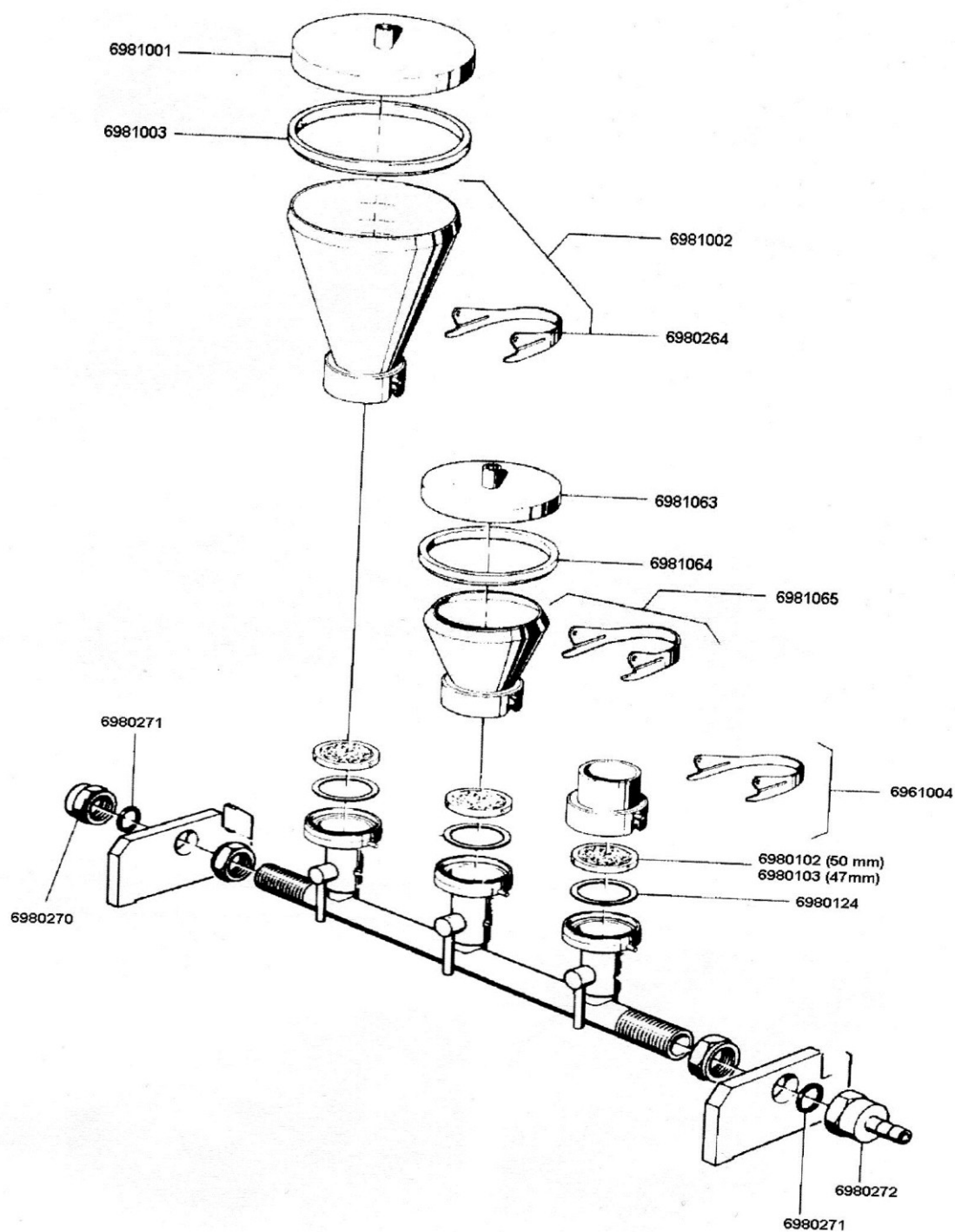
### 3.5. Metoda membranske filtracije

Metoda membranske filtracije je kvalitativna i kvantitativna. Ovom metodom određivala se prisutnost i broj bakterija u 100 ml uzorka vode. Reagensi su pohranjeni u hladnjak pri temperaturi od 4 °C. Uzorci voda analizirani su što je prije bilo moguće; unutar 24 h.

Sam postupak rada na Sartorius uređaju za membransku filtraciju (Slika 2.) sastojao se od nekoliko koraka. Najprije je bilo potrebno dezinficirati i očistiti radnu plohu komercijalno dostupnim dezinficijensom. Zatim su se posložile sve potrebne hranjive podloge u jedan red. Paketi sa sterilnim membranskim filterima stavili su se u područje rukohvata. Upalilio se Bunsenov plamenik, te se smjestio pokraj višestrukog sustava za filtraciju (Slika 3a). Također, pripremljena je pinceta i napunjena staklena čaša s alkoholom za dezinfekciju. Zatim se uklonio lijevak od nehrđajućeg čelika sa manifolda (cjevovoda), otpustivši klampu (Slika 3b). Najprije je bilo potrebno plamenom prijeći preko metalnog frita i držača filtera (Slika 3c). Pri tome je bilo važno da ručkice budu u otvorenoj poziciji. Zatim su se zatvorile ručkice te se plamenom prešlo preko donjeg dijela lijevka (Slika 3d). Postavljen je lijevak na držač filtera i prijeđeno je plamenom kroz cijeli unutarnji dio lijevka, od vrha do dna (Slika 3e). U konačnici se prešlo plamenom preko poklopca lijevka (Slika 3f). Zatim se stavio poklopac na lijevak te je tada je držač filtera bio sterilan. Postupak je bilo potrebno ponoviti i kod ostalih držača filtera.

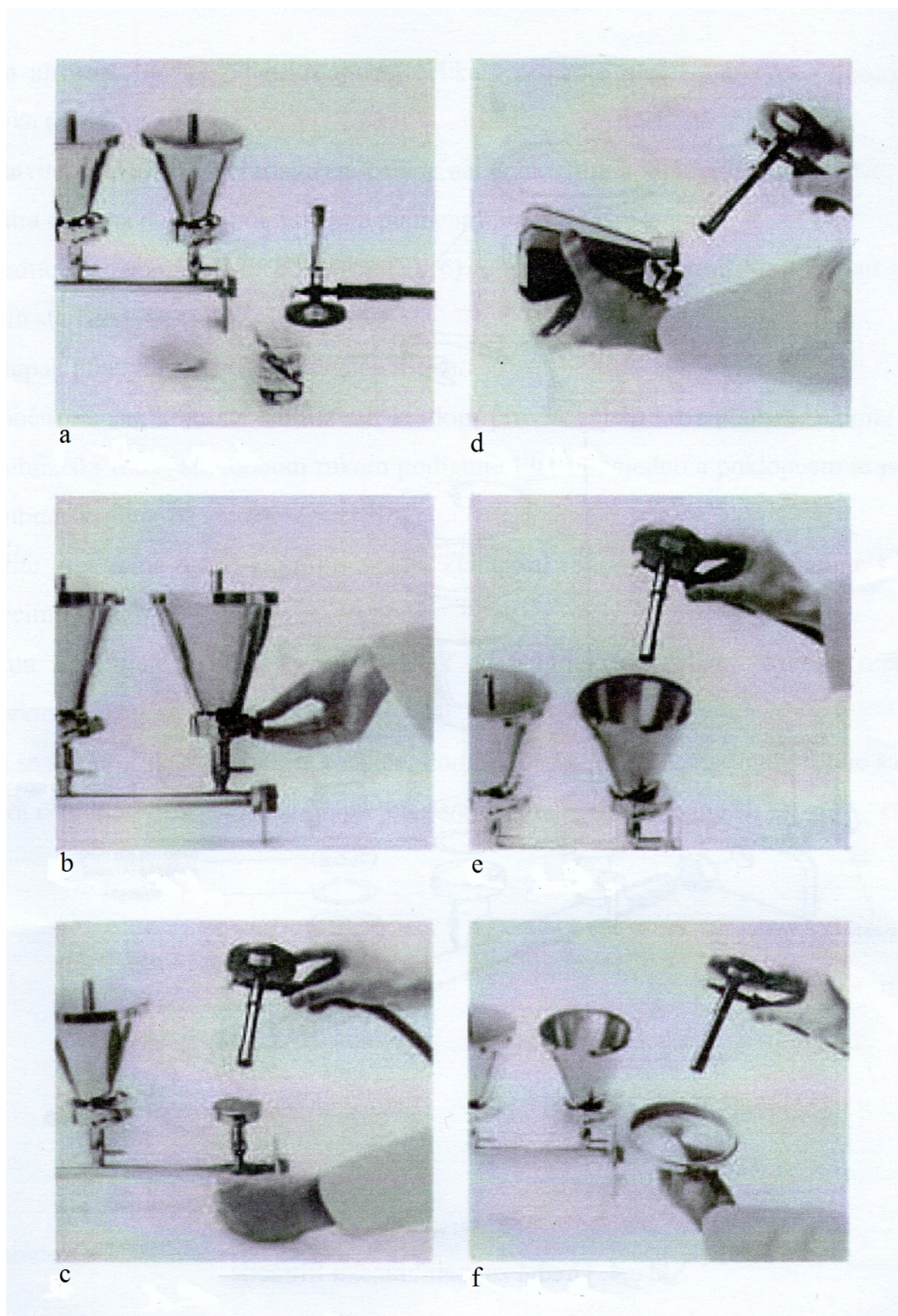
Zatim se sterilizirala pinceta kratkim povlačenjem kroz plamen. Pincetom je uzet sterilni membranski filter. Podignut je lijevak s poklopcem te je postavljen membranski filter na središte frita. Lijevak je vraćen na držač te je pričvršćen klampom. Postupak je bilo potrebno ponoviti i s ostalim lijevcima.

Ispitivani uzorak uliven je u svaki lijevak od nehrđajućeg čelika. Okrenute su ručkice u otvoreni položaj. Zatim je upaljena vakuum pumpa. Općenito, izvor vakuuma može biti pumpa ili vodena pumpa. Nakon što se sve profiltriralo, zatvorene su ručkice i ugašena je vakuum pumpa. Zatim su uklonjeni filteri s držača filtera. Sterilnom je pincetom svaki filter stavljan, s mrežicom prema gore, na hranjivu podlogu (77). Postupak je bilo potrebno ponoviti i s ostalim uzorcima voda.



**Slika 2. Satorius uređaj za membransku filtraciju.** Slika prikazuje trostruki sustav za filtraciju s 500 ml lijevcima (lijevo), sa 100 ml lijevcima (sredina) i sa 40 ml lijevcima (desno). Izvor: Šantić M., Gobin I., Ožanić M., Marečić V., MIKROBIOLOGIJA HRANE I VODE za studente preddiplomskog studija sanitarnog inženjerstva





**Slika 3. Priprema uređaja za rad.** Izvor: 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.



### 3.6. Inokulacija *F. novicida*

Za svaki od uzorak vode iz rijeka (Čabranka, Kupica i Gerovčica) pripremili smo uzorak nesterilizirane vode u boci od 600 ml, te uzorak sterilizirane vode tog istog uzorka u boci od 100 ml. U svaki od uzoraka inokulirana je bakterija *F. novicida*. Cilj je bio dobiti bakterijsku suspenziju koncentracije  $1 \times 10^5$  CFU/ml. Najprije smo morali pripremiti otopinu kojoj će turbiditet tj. optička gustoća biti jednaka 1. Turbiditet otopine tj. bakterijske suspenzije određen je pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 600 nm. Otopinu dobijemo tako da u sterilnu fiziološku otopinu uronimo štapić na kojem smo prikupili prethodno nasađenu *F. novicida* s BCYE agara. Suspenzija je homogenizirana na tresilici. Otopinu (suspenziju) zatim prelijemo u kivetu. Prvo u spektrofotometar stavljamo i mjerimo apsorbanciju za slijepu probu (fiziološka otopina), a zatim za našu otopinu. Optička gustoća otopine približno je bila jednaka 1, što nam je bio i cilj. Drugim riječima, ako je optička gustoća bakterijske suspenzije jednaka 1, to znači da bakterije u toj otopini ima približno  $1 \times 10^9$  CFU/ml. To je utvrđeno na temelju prijašnje višegodišnje laboratorijske prakse, međutim, treba napomenuti da za svaku vrstu bakterije vrijede različita pravila i vrijednosti.

Od dobivene bakterijske suspenzije koncentracije  $1 \times 10^9$  CFU/ml, potrebno je pripremiti bakterijsku suspenziju koncentracije  $1 \times 10^5$  CFU/ml. Da bismo dobili tu koncentraciju otopine potrebno je napraviti izračun (Slika 3.). Rezultati izračuna bili su slijedeći: u bocu od 600 ml potrebno je dodati 60  $\mu$ l suspenzije, a u bocu od 100 ml potrebno je dodati 10  $\mu$ l suspenzije. Konačna koncentracija bakterijske suspenzije u svim uzorcima iznosi  $1 \times 10^5$  CFU/ml.

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

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

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

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


---

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

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

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

$$\underline{\underline{V_1(600 \text{ mL}) = 60 \text{ } \mu\text{l}}} \rightarrow \text{Količina suspenzije koja se dodaje u 600 mL uzorka vode.}$$

Šest puta manje se dodaje u 100 mL:

$$V_1(100 \text{ mL}) = 60 \text{ } \mu\text{l} / 6$$

$$\underline{\underline{V_1(100 \text{ mL}) = 10 \text{ } \mu\text{l}}} \rightarrow \text{Količina suspenzije koja se dodaje u 100 mL uzorka vode.}$$

**Slika 4. Izračun dobivanja bakterijske suspenzije koncentracije  $1 \times 10^5$  CFU/mL.**

### 3.7. Postupak određivanja broja bakterija

Broj bakterija u šest različitih tipova uzoraka (Čabranka- sterilna i nesterilna voda, Gerovčica- sterilna i nesterilna voda, Kupica- sterilna i nesterilna voda; primjerice, sterilna voda Čabranke znači da je u toj vodi od bakterija prisutna samo *Francisella novicida*) određivan je nakon inokulacije bakterija (prvi dan), zatim drugi, treći, četvrti te peti dan nakon inokulacije bakterija. Deseterostruka razrjeđenja bujona pripremljena su u mikrotitar pločicama od 96 jažica. U prvi red mikrotitar pločica odpipetirano je po 200  $\mu\text{l}$  svakog uzorka. U sve ostale, donje jažice, odpipetirano je po 180  $\mu\text{l}$  fiziološke otopine. Zatim su pomoću multikanalne pipete pripremljena serijska deseterostruka razrjeđenja. Deseterostruka razrjeđenja pripremljena su prijenosom po 20  $\mu\text{l}$  suspenzije iz jednog u drugi red jažica. Iz

svakog razrjeđenja nasađeno je po 10  $\mu$ l bakterijske suspenzije na BCYE agar. BCYE hranjiva podloga prethodno je zagrijana i obilježena. Nakon inkubacije od 24-48 sati pri 37 °C s 5% CO<sub>2</sub>, brojale su se porasle kolonije (engl. Colony Forming Units, CFU).

### **3.8. Statistička obrada podataka**

Svi rezultati obrađeni su u programu Microsoft® Office Excel. Rezultati broja kolonija (CFU/ml) preračunati su u obliku logaritma s bazom 10 (log<sub>10</sub> CFU/ml). Izračunata je srednja vrijednost te standardna devijacija rezultata. Rezultati su prikazani grafički.

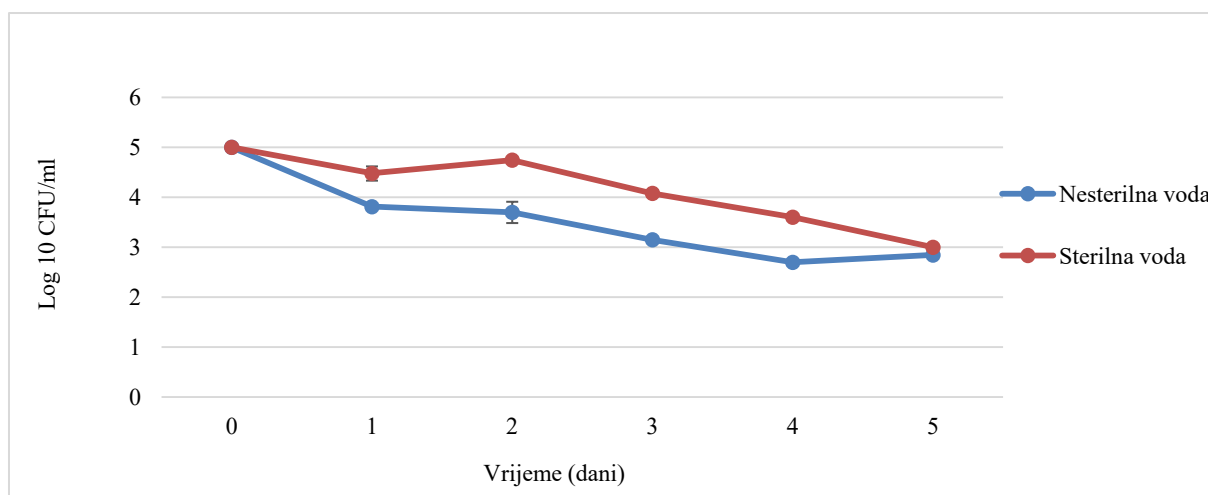
## 4. REZULTATI

### 4.1. Preživljavanje *F. novicida* u vodi iz rijeke Čabranke

Neposredno nakon inokulacije, broj bakterija u ispitivanom uzorku sterilne i nesterilne Čabranke iznosio je  $1 \times 10^5$  CFU/ml, označeno kao nulti dan (Slika 5.). Nakon toga, praćeno je preživljavanje *F. novicida* u ispitivanom uzorku tijekom 5 dana.

U nesteriliziranom uzorku Čabranke, nakon 48 sati od inokulacije *F. novicida* (označeno kao dan 1.), broj bakterija smanjio se na  $6,5 \times 10^3$  CFU/ml. Slijedećeg dana (dan 2.), broj bakterija pao je na  $5 \times 10^3$  CFU/ml. Pad broja bakterija nastavio se 3. dana, kada je iznosio  $1,5 \times 10^3$  CFU/ml, te 4. dana, kada je iznosio  $5 \times 10^2$  CFU/ml. Petog dana došlo je do laganog porasta broja bakterija u odnosu na 4. dana, a iznosio je  $7 \times 10^2$  CFU/ml (Slika 5.).

U steriliziranom uzorku Čabranke, nakon 48 sati od inokulacije *F. novicida* (označeno kao dan 1.), broj bakterija smanjio se na  $3 \times 10^4$  CFU/ml. Slijedećeg dana (dan 2.), broj bakterija porastao je na  $5,7 \times 10^4$  CFU/ml. Zatim je slijedio pad broja bakterija; 3. dan iznosio je  $1,2 \times 10^4$  CFU/ml, 4. dan  $4 \times 10^3$  CFU/ml, te 5. dan iznosio je  $1 \times 10^3$  CFU/ml (Slika 5.).



**Slika 5. Preživljavanje *F. novicida* u vodi iz rijeke Čabranke.** Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na BCYE agaru, a njihov broj je praćen svakodnevno u periodu od 5 dana. Cijelo vrijeme tijekom trajanja pokusa, uzorak vode čuvan je u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C. Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

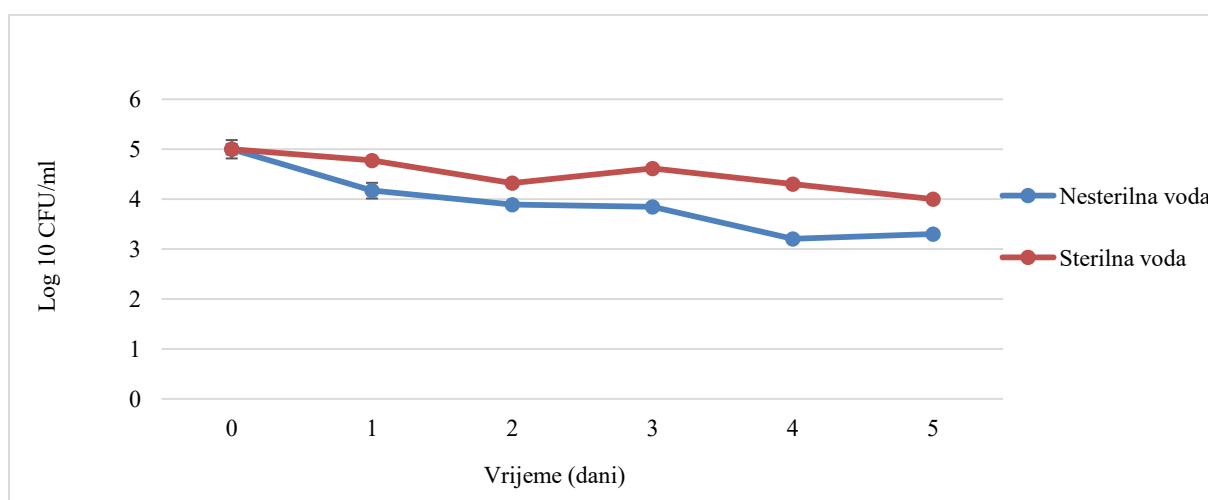
Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je u konačnici (5. dan) broj bakterija *F. novicida* manji nego na početku pokusa (0. dan). Također je iz slike vidljivo da *F. novicida* bolje preživljava u prethodno steriliziranom uzorku vode iz rijeke Čabranke, a slabije preživljava u nesteriliziranom uzorku. Iako se u nekim danima pojavljuje lagani porast broja bakterija, primjerice na prijelazu iz 1. u 2. dan (sterilna voda), u oba dva slučaja, broj bakterija se smanjuje u konačnici (Slika 5.).

#### 4.2. Preživljavanje *F. novicida* u vodi iz rijeke Kupice

Neposredno nakon inokulacije, broj bakterija u ispitivanom uzorku sterilne i nesterilne Kupice iznosio je  $1 \times 10^5$  CFU/ml, označeno kao nulti dan (Slika 6.). Nakon toga, praćeno je preživljavanje *F. novicida* u ispitivanom uzorku tijekom 5 dana.

U nesterilnom uzorku Kupice, nakon 48 sati od inokulacije *F. novicida* (označeno kao dan 1.), broj bakterija smanjio se na  $1,55 \times 10^4$  CFU/ml. Slijedećeg dana (dan 2.), broj bakterija pao je na  $8 \times 10^3$  CFU/ml. Pad broja bakterija nastavio se 3. dana, kada je iznosio  $7 \times 10^3$  CFU/ml, te 4. dana, kada je iznosio  $1,6 \times 10^3$  CFU/ml. Petog dana došlo je do laganog porasta broja bakterija u odnosu na 4. dana, a iznosio je  $2 \times 10^3$  CFU/ml (Slika 6.).

U steriliziranom uzorku Kupice, nakon 48 sati od inokulacije *F. novicida* (označeno kao dan 1.), broj bakterija smanjio se na  $6 \times 10^4$  CFU/ml. Slijedećeg dana (dan 2.), broj bakterija pao je na  $2,1 \times 10^4$  CFU/ml. Trećeg dana (3. dan), dolazi do laganog porasta broja bakterija u odnosu na 2. dan, a broj je porastao na  $4,1 \times 10^4$  CFU/ml. Četvrtog i petog dana broj bakterija ponovo opada. Četvrtog dana broj bakterija pao je na  $2 \times 10^4$  CFU/ml, a petog dana na  $1 \times 10^4$  CFU/ml (Slika 6.).



**Slika 6. Preživljavanje *F. novicida* u vodi iz rijeke Kupice.** Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na BCYE agaru, a njihov broj je praćen svakodnevno u periodu od 5 dana. Cijelo vrijeme tijekom trajanja pokusa, uzorak vode čuvan je u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C. Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

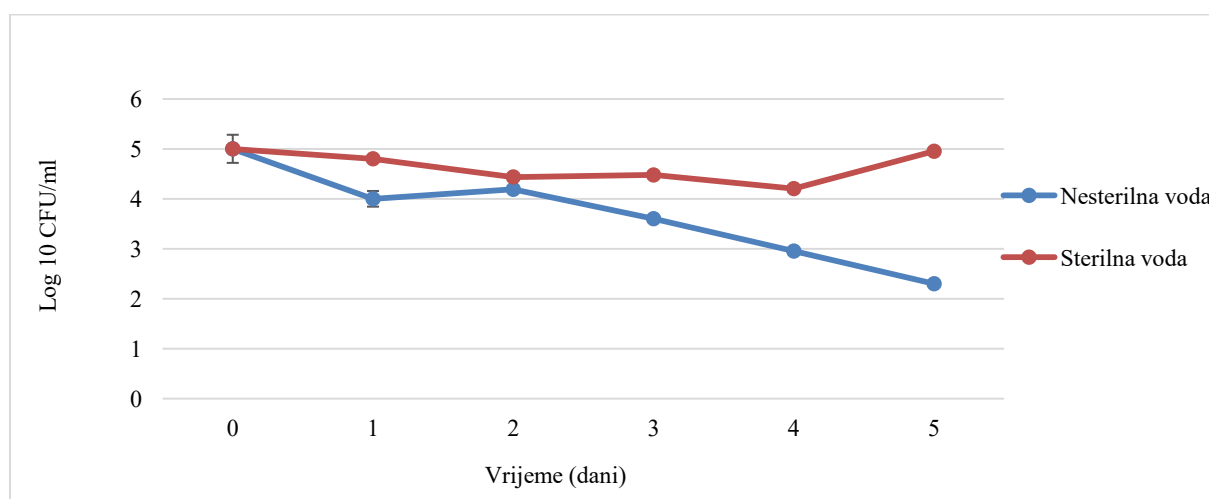
Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je u konačnici (5. dan) broj bakterija *F. novicida* manji nego na početku pokusa (0. dan), isto kao i kod rijeke Čabranke. Također je iz slike vidljivo da *F. novicida* bolje preživljava u prethodno steriliziranom uzorku vode iz rijeke Kupice, a slabije preživljava u nesteriliziranom uzorku. Iako se u nekim danima pojavljuje lagani porast broja bakterija, primjerice na prijelazu iz 2. u 3. dan (sterilna voda), u oba dva slučaja, broj bakterija se smanjuje u konačnici (Slika 6.).

### 4.3. Preživljavanje *F. novicida* u vodi iz rijeke Gerovčice

Neposredno nakon inokulacije, broj bakterija u ispitivanom uzorku sterilne i nesterilne Gerovčice iznosio je  $1 \times 10^5$  CFU/ml, označeno kao nulti dan (Slika 7.). Nakon toga, praćeno je preživljavanje *F. novicida* u ispitivanom uzorku tijekom 5 dana.

U nesterilnom uzorku Gerovčice, nakon 48 sati od inokulacije *F. novicida* (označeno kao dan 1.), broj bakterija smanjio se na  $1 \times 10^4$  CFU/ml. Slijedećeg dana (dan 2.), broj bakterija lagano je porastao na  $1,6 \times 10^4$  CFU/ml. Trećeg dana broj bakterija je počeo opadati, kada je iznosio  $4 \times 10^3$  CFU/ml, te 4. dana, kada je iznosio  $9 \times 10^2$  CFU/ml. Petog dana broj bakterija pao je na  $2 \times 10^2$  CFU/ml (Slika 7.).

U steriliziranom uzorku Gerovčice, nakon 48 sati od inokulacije *F. novicida* (označeno kao dan 1.), broj bakterija smanjio se na  $7 \times 10^4$  CFU/ml. Slijedećeg dana (dan 2.), broj bakterija pao je na  $2,75 \times 10^4$  CFU/ml. Trećeg dana (3. dan), dolazi do laganog porasta broja bakterija u odnosu na 2. dan, a broj je porastao na  $3 \times 10^4$  CFU/ml. Četvrtog dana broj bakterija ponovno opada na  $1,6 \times 10^4$  CFU/ml. Međutim, posljednji (5. dan) broj bakterija se povećao na  $9 \times 10^4$  CFU/ml, što je veći broj nego prvog dana, ali opet manji broj nego na samom početku pokusa (nulti dan) kada je broj bakterija iznosio  $1 \times 10^5$  CFU/ml (Slika 7.).



**Slika 7. Preživljavanje *F. novicida* u vodi iz rijeke Gerovčice.** Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na BCYE agaru, a njihov broj je praćen svakodnevno u periodu od 5 dana. Cijelo vrijeme tijekom trajanja pokusa, uzorak vode čuvan je u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C. Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

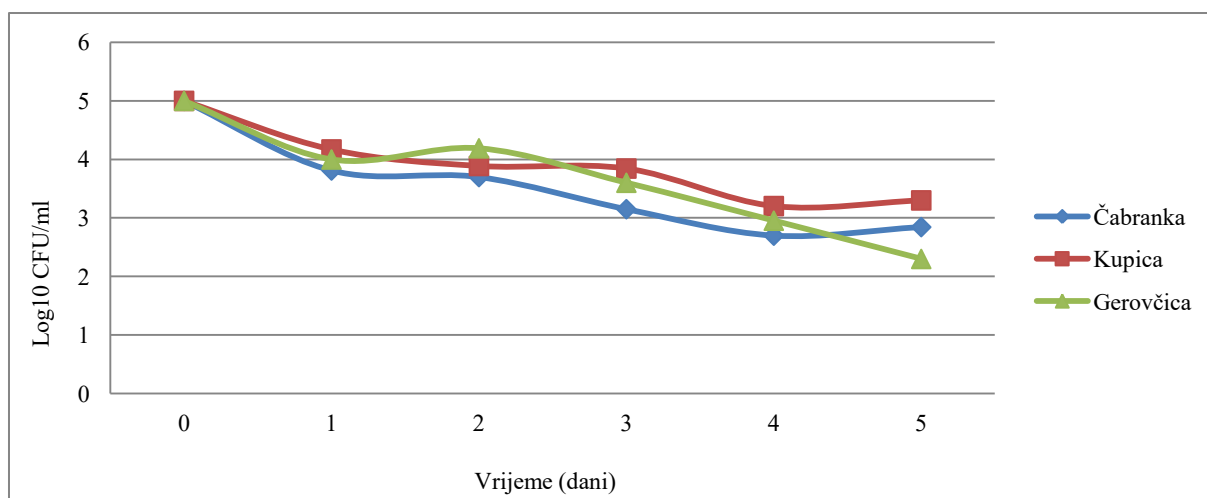
Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je u konačnici (5. dan) broj bakterija *F. novicida* manji nego na početku pokusa (0. dan), isto kao i kod rijeka Čabranke i Kupice. Također je iz slike vidljivo da *F. novicida* bolje preživljava u prethodno steriliziranom uzorku vode iz rijeke Gerovčice, a slabije preživljava u nesteriliziranom uzorku. Iako se u nekim danima pojavljuje lagani porast broja bakterija, primjerice na prijelazu iz 1. u 2. dan (nesterilna voda), u oba dva slučaja, broj bakterija se smanjuje u konačnici (Slika 7.). Međutim, kod rijeke Gerovčice posebnost je ta što je u sterilnoj vodi ovog uzorka posljednjeg dana došlo do većeg povećanja broja bakterija na  $9 \times 10^4$  CFU/ml, što je veći broj nego svih prethodnih dana, ali opet manji broj nego na samom početku pokusa (nulti dan) kada je broj bakterija iznosio  $1 \times 10^5$  CFU/ml (Slika 7.).

#### **4.4. Usporedba preživljavanja *F. novicida* u nesterilnim vodama iz rijeka Čabranka, Kupica, Gerovčica**

U ovome radu rezultati su također obrađeni na način da je uspoređeno preživljavanje *F. novicida* u sterilnim i nesterilnim vodama iz rijeka Čabranka, Kupica i Gerovčica. Dakle, početni broj *F. novicida* u svim uzorcima voda, neposredno nakon inokulacije, iznosio je  $1 \times 10^5$  CFU/ml i to smo označili kao početak pokusa odnosno nulti dan (dan 0.).

Uspoređujući preživljavanje *F. novicida* u nesterilnim vodama iz rijeka Čabranka, Kupica i Gerovčica, iz grafa vidimo (Slika 8.) da je posljednjeg dana (dan 5.) najveći broj bakterija bio u vodi iz rijeke Kupice, zatim iza nje slijedi voda iz rijeke Čabranke, te je najmanji broj u konačnici bio u vodi iz rijeke Gerovčice. Drugim riječima, broj bakterija posljednjeg dana očitavanja (5. dan) u rijeci Kupici iznosio je  $2 \times 10^3$  CFU/ml, u rijeci Čabranki iznosio je  $7 \times 10^2$  CFU/ml, a u rijeci Gerovčici iznosio je  $2 \times 10^2$  CFU/ml (Slika 8.).

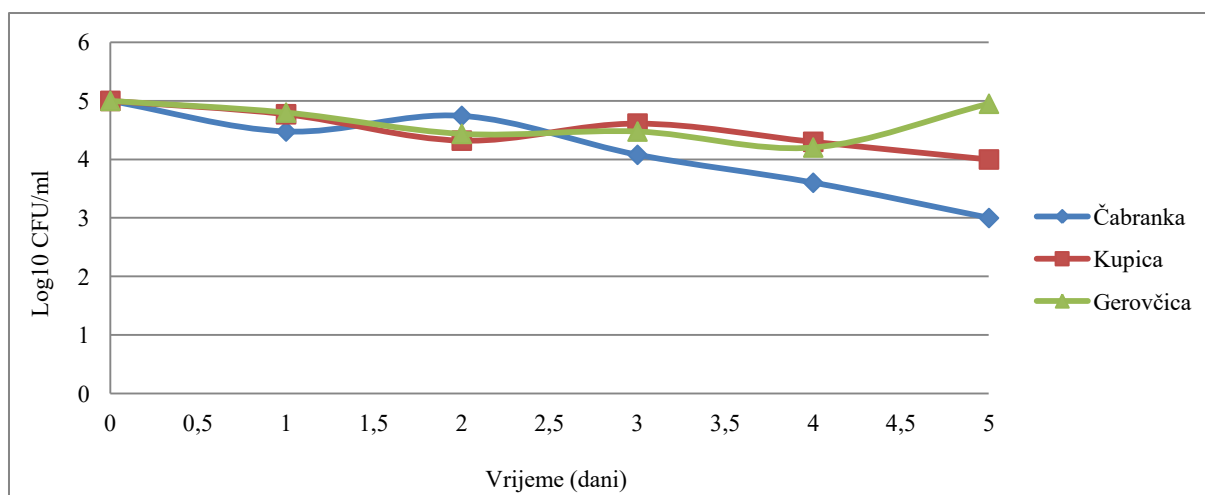




**Slika 8. Usporedba preživljavanja *F. novicida* u nesterilnim vodama iz rijeka Čabranka, Kupica, Gerovčica.**

#### **4.5. Usporedba preživljavanja *F. novicida* u sterilnim vodama iz rijeka Čabranka, Kupica, Gerovčica**

Promatrano je i preživljavanje *F. novicida* u sterilnim vodama. Uspoređujući preživljavanje *F. novicida* u sterilnim vodama iz rijeka Čabranka, Kupica i Gerovčica, iz grafa vidimo (Slika 9.) da je posljednjeg dana (dan 5.) najveći broj bakterija bio u vodi iz rijeke Gerovčice, zatim iza nje slijedi voda iz rijeke Kupice, te je najmanji broj u konačnici bio u vodi iz rijeke Čabranke. Drugim riječima, broj bakterija posljednjeg dana očitavanja (5. dan) u rijeci Gerovčici iznosio je  $9 \times 10^4$  CFU/ml, u rijeci Kupici iznosio je  $1 \times 10^4$  CFU/ml, a u rijeci Čabranki iznosio je  $1 \times 10^3$  CFU/ml (Slika 9.).



**Slika 9. Usporedba preživljavanja *F. novicida* u sterilnim vodama iz rijeka Čabranka, Kupica, Gerovčica.**

Ako usporedimo rezultate nesterilne i sterilne vode, vidimo da *F. novicida* najbolje preživljava u sterilnom uzorku Gerovčice (Slika 9.), a najslabije preživljava u nesterilnom uzorku Gerovčice (Slika 8.).

Što se tiče preživljavanja *F. novicida* u rijeci Čabranki, u nesterilnom uzorku vode, rijeka Čabranka nalazi se na drugome mjestu prema preživljavanju (Slika 8.), a u sterilnom uzorku vode na trećem, posljednjem mjestu (Slika 9.).

I na kraju, što se tiče preživljavanja *F. novicida* u rijeci Kupici, *F. novicida* najbolje preživljava u nesterilnom uzorku Kupice (Slika 8.). Međutim, u sterilnom uzorku vode, rijeka Kupica nalazi se na drugome mjestu prema preživljavanju *F. novicida* (Slika 9.).

#### **4.6. Mikrobiologija rijeka Čabranka, Kupica i Gerovčica prije i nakon dodatka *F. novicida***

Kao što je opisano u poglavlju „Materijali i metode; hranjive podloge“, u eksperimentalnom radu korištene su i mnoge druge hranjive podloge (osim BCYE agara) te je cilj korištenja ovih hranjivih podloga bio ispitati mikrobiologiju ispitivanih rijeka (Čabranka, Kupica, Gerovčica), prije i nakon dodatka *F. novicida*.

Tablica 2., 3. i 4. prikazuju broj bakterija u 100 ml pojedinog uzorka vode. Rezultati su izraženi kao broj kolonija u 100 ml uzorka vode (engl. Colony Forming Units, CFU), poraslih na pojedinoj vrsti agara, prije i nakon dodatka *F. novicida*. Dakle, uzorci su analizirani metodom membranske filtracije na samom početku pokusa, kada *F. novicida* nije još bila dodana. Nakon inokulacije *F. novicida*, uzorci voda čuvani su pohranjeni u hladnjaku 48 sati. Nakon 48 sati od inokulacije uzorci voda ponovno su analizirani metodom membranske filtracije. Na taj način dobiveni su rezultati mikrobiologije rijeka Čabranke (Tablica 2.), Kupice (Tablica 3.) i Gerovčice (Tablica 4.), prije i nakon dodatka *F. novicida*.

**Tablica 2. Mikrobiologija rijeke Čabranke prije i nakon dodatka *F. novicida***

| <b>ČABRANKA</b>                              |                                                                   |                                                              |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <b><i>BROJ KOLONIJA/<br/>100 ml vode</i></b> | <b>POČETAK POKUSA,<br/><i>FRANCISELLA</i> NIJE<br/>JOŠ DODANA</b> | <b>NAKON DODATKA<br/><i>FRANCISELLA</i><br/>(nakon 48 h)</b> |
| <b>LES</b>                                   | 400                                                               | 224                                                          |
| <b>m-FC</b>                                  | 100                                                               | 4                                                            |
| <b>SB → KEA</b>                              | 190 → 28                                                          | 4 → 4                                                        |
| <b>TTC</b>                                   | 30                                                                | nema porasta                                                 |
| <b>TSN</b>                                   | nema porasta                                                      | nema porasta                                                 |
| <b>PY</b>                                    | 25                                                                | nema porasta                                                 |

Mikrobiologija rijeke Čabranke prije i nakon dodatka *F. novicida* bila je slijedeća: na Les endo agaru je prije nego je *F. novicida* dodana poraslo 400 kolonija ukupnih koliforma, a nakon što je dodana *F. novicida* porasle su 224 kolonije (crveno obojene kolonije s metalnim sjajem). Nadalje na m-FC agaru je prije dodatka *F. novicida* poraslo 100 kolonija fekalnih koliforma, a nakon dodatka 4 kolonije (plavo obojene kolonije). Na SB agaru je prije dodatka *F. novicida* poraslo 190 kolonija, a nakon dodatka 4 kolonije (tipične crveno obojene kolonije). U slučaju da na SB agaru narastu tipične crveno obojene kolonije, radi se potvrdni test. Potvrdni test radi se na način da se membrana premjesti na KEA agar (opisano u poglavlju *Hranjive podloge*). Na KEA agaru je prije dodatka *F. novicida* poraslo 28 kolonija enterokoka, a nakon dodatka 4 kolonije (tamne crne kolonije). Zatim, na TTC agaru je prije dodatka *F. novicida* poraslo 30 kolonija *E. coli* (žuto-narančaste kolonije), a nakon dodatka *F. novicida* nijedna kolonija *E. coli* nije porasla. Na TSN agaru prije i nakon dodatka *F. novicida* nije porasla nijedna kolonija *C. perfringens* (općenito, pozitivan porast

vidimo u obliku crnih kolonija). Te na kraju, na *Pseudomonas* agaru je prije dodatka *F. novicida* poraslo 25 kolonija *Pseudomonas* spp. (plavo obojene kolonije), a nakon dodatka *F. novicida* nije porasla nijedna kolonija (Tablica 2.).

**Tablica 3. Mikrobiologija rijeke Kupice prije i nakon dodatka *F. novicida***

| <b>KUPICA</b>                                |                                                                   |                                                              |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <b><i>BROJ KOLONIJA/<br/>100 ml vode</i></b> | <b><i>POČETAK POKUSA,<br/>FRANCISELLA NIJE<br/>JOŠ DODANA</i></b> | <b><i>NAKON DODATKA<br/>FRANCISELLA<br/>(nakon 48 h)</i></b> |
| <b>LES</b>                                   | 50                                                                | 1 400                                                        |
| <b>m-FC</b>                                  | nema porasta                                                      | nema porasta                                                 |
| <b>SB → KEA</b>                              | 1 → 1                                                             | nema porasta                                                 |
| <b>TTC</b>                                   | 2                                                                 | nema porasta                                                 |
| <b>TSN</b>                                   | nema porasta                                                      | nema porasta                                                 |
| <b>PY</b>                                    | 6                                                                 | nema porasta                                                 |

Mikrobiologija rijeke Kupice prije i nakon dodatka *F. novicida* bila je sljedeća: na Les endo agaru je prije nego je *F. novicida* dodana poraslo 50 kolonija ukupnih koliforma, a nakon što je dodana *F. novicida* poraslo je 1 400 kolonija. Nadalje na m-FC agaru prije i nakon dodatka *F. novicida* nije porasla nijedna kolonija fekalnih koliforma. Na SB agaru je prije dodatka *F. novicida* porasla 1 kolonija, a nakon dodatka *F. novicida* nije porasla nijedna kolonija. U slučaju da na SB agaru narastu tipične crveno obojene kolonije, radi se potvrdni test. Potvrdni test radi se na način da se membrana premjesti na KEA agar (opisano u poglavlju *Hranjive podloge*). Na KEA agaru je prije dodatka *F. novicida* porasla 1 kolonija enterokoka, a nakon dodatka *F. novicida* nije porasla nijedna kolonija. Zatim, na TTC agaru su prije dodatka *F. novicida* porasle 2 kolonije *E. coli*, a nakon dodatka *F. novicida* nijedna kolonija *E. coli* nije porasla. Na TSN agaru prije i nakon dodatka *F. novicida* nije porasla nijedna kolonija *C. perfringens*. Te na kraju, na *Pseudomonas* agaru je prije dodatka *F. novicida* poraslo 6 kolonija *Pseudomonas* spp. (plavo obojene kolonije), a nakon dodatka *F. novicida* nije porasla nijedna kolonija (Tablica 3.).

**Tablica 4. Mikrobiologija Gerovčice prije i nakon dodatka *F. novicida***

| <b>GEROVČICA</b>                             |                                                                   |                                                              |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <b><i>BROJ KOLONIJA/<br/>100 ml vode</i></b> | <b>POČETAK POKUSA,<br/><i>FRANCISELLA</i> NIJE<br/>JOŠ DODANA</b> | <b>NAKON DODATKA<br/><i>FRANCISELLA</i><br/>(nakon 48 h)</b> |
| <b>LES</b>                                   | 150                                                               | 440                                                          |
| <b>m-FC</b>                                  | nema porasta                                                      | nema porasta                                                 |
| <b>SB → KEA</b>                              | 11 → 8                                                            | 53 → 53                                                      |
| <b>TTC</b>                                   | 10                                                                | nema porasta                                                 |
| <b>TSN</b>                                   | nema porasta                                                      | nema porasta                                                 |
| <b>PY</b>                                    | nema porasta                                                      | 4                                                            |

Mikrobiologija rijeke Gerovčice prije i nakon dodatka *F. novicida* bila je slijedeća: na Les endo agaru je prije nego je *F. novicida* dodana poraslo 150 kolonija ukupnih koliforma, a nakon što je dodana *F. novicida* poraslo je 440 kolonija. Nadalje na m-FC agaru prije i nakon dodatka *F. novicida* nije porasla nijedna kolonija fekalnih koliforma. Na SB agaru je prije dodatka *F. novicida* poraslao 11 kolonija, a nakon dodatka *F. novicida* porasle su 53 kolonije. U slučaju da na SB agaru narastu tipične crveno obojene kolonije, radi se potvrdni test. Potvrdni test radi se na način da se membrana premjesti na KEA agar (opisano u poglavlju *Hranjive podloge*). Na KEA agaru je prije dodatka *F. novicida* poraslo 8 kolonija enterokoka, a nakon dodatka *F. novicida* porasle su 53 kolonije. Zatim, na TTC agaru je prije dodatka *F. novicida* poraslo 10 kolonija *E. coli*, a nakon dodatka *F. novicida* nijedna kolonija *E. coli* nije porasla. Na TSN agaru prije i nakon dodatka *F. novicida* nije porasla nijedna kolonija *C. perfringens*. Te na kraju, na Pseudomonas agaru je prije dodatka *F. novicida* nije porasla nijedna kolonija *Pseudomonas* spp., a nakon dodatka *F. novicida* porasle su 4 kolonije *Pseudomonas* spp. (Tablica 4.).

Iz tablica 2., 3. i 4. možemo zaključiti da se mikrobiologija uzorka rijeka promijenila nakon dodatka *F. novicida*. Uz poneku iznimku (npr. povećanje broja bakterija kod Les endo agara, rijeka Kupica, (Tablica 3.)) , možemo reći da se broj gotovo svih vrsta bakterija smanjio nakon dodatka *F. novicida* u uzorke rijeka Čabranka, Kupica i Gerovčica.

## 5. RASPRAVA

Za izradu ovog završnog rada kao model je izabran bakterijski soj *F. novicida* U112 iz nekoliko razloga. Prvi razlog je taj što bakterija ne predstavlja opasnost za čovjeka te s njom nije potrebno raditi u laboratoriju visokog stupnja zaštite, međutim, za životinje je opasna jer uzrokuje tularemiju kakvu bi vrsta *F. tularensis* uzrokovala kod čovjeka. Iz tog je razloga vrlo pogodna za laboratorijska istraživanja tularemije. Drugi razlog je taj što je *F. novicida* genetski vrlo slična s *F. tularensis*, zoonozom koja je vrlo opasna i uzrokuje tularemiju i u životinja i u čovjeka.

Općenito, bakterija *F. novicida* se povezuje sa vodenim ekosustavima, bočatim i slanim vodama, ledom te vlažnim tlom. Ta staništa se smatraju pogodnim za njen opstanak i preživljavanje.

Iako za sada postoji vrlo malo istraživanja i podataka gdje je francisela izolirana u vodama, ipak se poneko može pronaći. Primjerice, skupina istraživača iz SAD-a su 2001. godine izolirali vrste iz roda *Francisella* spp. iz dva prirodna topla izvora u Utahu (SAD). Ukupno je izolirano 39 francisela izolata iz dva izvora, Wasatch Hot Spring i Hobo Warm Spring, sjeverno od Salt Lake Cityja, Utah. Pokazalo se kako u uzorcima voda, od ukupno 39 izolata *Francisella* spp., 79% izolata pripada vrsti *F. philomiragia*, a 21% vrsti *F. novicida*. Ovaj rad ističe da je moguća prisutnost održivih, potencijalno patogenih vrsta francisella koje žive u vodenim ekosustavima poput prirodnih toplih izvora (79).

Također, u još jednom istraživanju iz SAD-a iz 2009. godine izolirane su vrste iz roda *Francisella* spp. prisutne u vodi, sedimentu i tlu na području aktivnog prirodnog žarišta tularemije u Massachusettsu (SAD) tijekom višegodišnjeg izbijanja plućne tularemije. Uzorci su prikupljeni iz ribnjaka i raznih bočatih voda te su otkrivene različite vrste iz roda *Francisella* spp. poput *F. tularensis* i *F. novicida*. Ovaj rad ističe kako je *F. novicida* obično povezana s vodenim okolišem poput bočatih voda. (80)

Cilj rada bio je ispitati preživljavanje bakterije *F. novicida* u vodama iz rijeka Gorskog kotara: Čabranka, Gerovčica i Kupica. Za sada ne postoje znanstvena istraživanja provedena na tim rijekama te je to bio dodatni motiv da se istraži nešto više o vodama zelenog srca Hrvatske. Određena koncentracija *F. novicida* ubačena je u uzorke voda te je praćena njena sposobnost preživljavanja u periodu od 5 dana.

Rezultati ovog rada pokazuju da u rijekama Gorskog kotara: Čabranka, Gerovčica i Kupica *F. novicida* preživljava, ali se broj s vremenom smanjuje. Iako se u sva tri slučaja u nekim danima pojavljuju lagani porasti broja bakterija, ipak je broj bakterija manji u konačnici nego na početku pokusa, kada je iznosio  $1 \times 10^5$  CFU/ml. Kod rijeke Gerovčice uočeno je da se broj bakterija posljednjeg, petog dana naglo povećao na  $9 \times 10^4$  CFU/ml, što je veći broj nego svih prethodnih dana, ali ipak manji broj nego na samom početku pokusa (nulti dan).

Uspoređivano je i preživljavanje *F. novicida* u prethodno steriliziranim uzorcima voda sa nesteriliziranim uzorcima. U slučaju rijeke Čabranke *F. novicida* bolje preživljava u prethodno steriliziranom uzorku vode, a slabije preživljava u nesteriliziranom uzorku. Također, i kod rijeka Kupice i Gerovčice *F. novicida* bolje preživljava u prethodno steriliziranom uzorku vode. Možemo pretpostaviti da *F. novicida* slabije preživljava u nesteriliziranim uzorcima voda jer djeluju na nju ostale bakterije koje su dio prirodne mikroflore tih voda tj. te bakterije „dominiraju“ nad *F. novicidom*.

Također se htjelo vidjeti u kojoj će od ispitivanih voda (Čabranka, Kupica i Gerovčica) *F. novicida* najbolje preživljavati. U nesteriliziranim vodama, *F. novicida* najbolje preživljava u vodi iz rijeke Kupice, zatim slijedi Čabranka, te se na posljednjem mjestu nalazi rijeka Gerovčica. S druge strane, u prethodno steriliziranim uzorcima voda, *F. novicida* najbolje preživljava u vodi iz rijeke Gerovčice, zatim slijedi rijeka Kupica te na kraju rijeka Čabranka. Najmanji broj bakterija *F. novicida* zabilježen je u nesteriliziranom uzorku Gerovčice ( $2 \times 10^2$  CFU/ml), a najveći broj bakterija *F. novicida* zabilježen je u prethodno steriliziranom uzorku Gerovčice ( $9 \times 10^4$  CFU/ml).

Za kraj se željelo istražiti kako će dodatak *F. novicide* utjecati na prirodnu mikrobiologiju ispitivanih uzoraka rijeka. Uspoređivana je mikrobiologija rijeke Čabranke, Kupice i Gerovčice prije i nakon dodatka *F. novicide*. Uočeno je da se mikrobiologija uzoraka rijeka promijenila nakon dodatka *F. novicida*. U sva tri uzorka se broj gotovo svih vrsta bakterija, uz poneku iznimku, u konačnici smanjio. Pošto je prethodno uočeno da bakterije koje su dio prirodne mikroflore ispitivanih voda „dominiraju“ nad *F. novicidom*, vjerojatni razlog smanjenja broja bakterija je nedostatak hranjivih tvari u vodi potreban za rast tih bakterija, koje su se u razdoblju od 5 dana počele sve više smanjivati.

## 6. ZAKLJUČAK

S obzirom na dobivene rezultate tijekom izrade ovog završnog rada, doneseni su slijedeći zaključci:

- U rijekama Gorskog kotara: Čabranka, Gerovčica i Kupica *F. novicida* preživljava, ali se broj s vremenom smanjuje,
- Bakterija *F. novicida* bolje preživljava u prethodno steriliziranim uzorcima voda iz rijeka, a slabije preživljava u nesteriliziranim uzorcima,
- Bakterije prirodne mikrobiologije ispitivanih uzoraka voda iz rijeka Čabranke, Gerovčice i Kupice „dominiraju“ nad *F. novicida* tj. sprječavaju njeno daljnje razmnožavanje i preživljavanje,
- Od svih ispitivanih uzoraka rijeka, bakterija *F. novicida* najbolje preživljava u prethodno steriliziranom uzorku rijeke Gerovčice, a najslabije preživljava u nesteriliziranom uzorku rijeke Gerovčice,
- Prirodna mikrobiologija uzoraka ispitivanih rijeka mijenja se dodatkom bakterije *F. novicida*. Dodatkom *F. novicide* dolazi do smanjenja ostalih vrsta bakterija u uzorcima rijeka. Međutim, pošto je prethodno zaključeno da bakterije prirodne mikrobiologije ispitanih rijeka „dominiraju“ nad *F. novicida*, vjerojatni razlog smanjenja njihova broja nije dodatak *F. novicida*, nego nedostatak hranjivih tvari koji se u uzorcima voda s vremenom smanjuje.



## 7. LITERATURA

1. McCoy G. W., Chapin C. C. Studies of plague, a plague-like disease and tuberculosis among rodents in California. (1912) *J. Infect. Dis.*; VI, 170–180.
2. Francis E. Tularemia. *J.* (1925) *Am. Med. Assoc.*; 84, 1243–1250.
3. Nylund, A., Ottem, K. F., Watanabe, K., Karlsbakk, E. & Krossoy, B. (2006). *Francisella* sp (family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. *Arch Microbiol* 185,383–392.
4. Ellis, J., Oyston, P. C. F., Green, M. & Titball, R. W. (2002). Tularemia. *Clin Microbiol Rev* 15, 631–646.
5. Forsman, M., Sandstrom, G. & Sjostedt, A. (1994). Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int J Syst Bacteriol.* 1994 Jan;44(1):38-46.
6. Sjostedt, A. (2005). Family XVII. Francisellaceae, genus I. *Francisella*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 200–210.
7. Olsufiev NG, Emelyanova OS, Dunayeva TN. (1959) Comparative study of strains of *B. tularensis* in the old and new world and their taxonomy. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 3:138-49.
8. Kugeler K. J., Mead P. S., Janusz A. M., Staples J. E., Kubota K. A., Chalcraft L. G., et al. (2009). Molecular epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 48, 863–870 10.1086/597261.
9. Wu, T. H., J. A. Hutt, K. A. Garrison, L. S. Berliba, Y. Zhou, and C. R. Lyons. (2005). Intranasal vaccination induces protective immunity against intranasal infection with virulent *Francisella tularensis* biovar A. *Infect. Immun.* 73:2644-2654.
10. Titball, R. W. & Petrosino, J. F. (2007). *Francisella tularensis* genomics and proteomics. *Ann N Y Acad Sci* 1105, 98–121.
11. Sjöstedt, A. (2007) Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. New York Academy of Sciences. Doi: 10.1196/annals.1409.009
12. Willke A, Meric M, Grunow R, Sayan M, Finke EJ, Splettstosser W, et al. (2009) An outbreak of oropharyngeal tularaemia linked to natural spring water. *Journal of medical microbiology.* 58(Pt 1):112-6.
13. Green M, Choules G, Rogers D, Titball RW. (2005) Efficacy of the live attenuated *Francisella tularensis* vaccine (LVS) in a murine model of disease. *Vaccine.* 23(20):2680-6.
14. Eigelsbach HT, Downs CM. (1961) Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig. *J w* 87:415-25.
15. Oyston PC. (2008) *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *Journal of medical microbiology.* (Pt 8):921-30.
16. Larson CL, Wicht W, Jellison WL. *Public Health Rep.* (1955); 70(3):253-8

17. Owen CR, Buker EO, Jellison WL, Lackman DB, Bell JF. Comparative studies of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*.
18. Birdsell, Dawn (2009). "Francisella tularensis subsp. novicida isolated from a human in Arizona." BMC Research Notes. 2: 223.
19. "Outbreak of Francisella novicida Infections Among Occupants at a Long-Term Residential Facility". (1964) Julie Hand, MSPH; Christine Scott-Waldron, MSPH; Gary Balsamo, DVM MPH & TM J Bacteriol.:676-83.
20. Whipp, M. J., Davis, J.M., Lum, G., de Boer, J., Zhou, Y., Bearden, S.W., Petersen, J. M., Chu, M. C. & Hogg, G. Characterization of a novicida like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. J of Med Microbiol (2003), 52: 839-842.
21. Rohmer L, Fong C, Abmayr S, et al. (2007). Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. Genome Biol. 8(6):R102.
22. Gallagher, L.A., McKevitt, M., Ramage, E.R., Manoel, C. (2008). Genetic dissection of the *Francisella novicida* restriction barrier. J Bacteriol. 190(23):7830-7
23. Transformation and allelic replacement in *Francisella* spp. (1991) Anthony LS, Gu MZ, Cowley SC, Leung WW, Nano FEJ Gen Microbiol; 137(12):2697-703
24. McCrumb F. R. (1961). Aerosol infection of man with *Pasteurella tularensis*. Bacteriol. Rev. 25, 262–267
25. Levesque, B., de Serres, G., Higgins, R., D'Halewyn, M. A. Atsorb, H., Grondin, J., Major, M., Garvie, M. & Duval, B. (1995). Seroepidemiologic study of three zoonoses (leptospirosis, Q fever, and tularemia) among trappers in Que'bec, Canada. Clin Diagn Lab Immunol 2, 496–498.
26. Ohara, Y., Sato, T., Fujita, H., Ueno, T. & Homma, M. (1991). Clinical manifestations of tularemia in Japan - analysis of 1355 cases observed between 1924 and 1987. Infection 19, 14–17.
27. Helvacı, S., Gedikoglu, S., Akalin, H. & Oral, H. B. (2000). Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. Eur J Epidemiol 16, 271–276.
28. Steinemann, T. L., Sheikholeslami, M. R., Brown, H. H. & Bradsher, R. W. (1999). Oculoglandular tularemia. Arch Ophthalmol 117, 132–133.
29. Matyas, B. T., Nieder, H. S. & Telford, S. R., III (2007). Pneumonic tularemia on Martha's Vineyard - clinical, epidemiologic, and ecological characteristics. Ann N Y Acad Sci 1105, 351–377.
30. Dennis, D. T., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Fine, A. D., Friedlander, A. M., Hauer, J. & other authors (2001). Tularemia as a biological weapon: Medical and Public Health Management. JAMA 285, 2763–2773.
31. Brett M., Doppalapudi A., Respicio-Kingry L. B., Myers D., Husband B., Pollard K., et al. (2012). *Francisella novicida* bacteremia after a near-drowning accident. J. Clin. Microbiol. 50, 2826–2829 10.1128/JCM.00995-12
32. Behr M. Laboratory-acquired lymphadenopathy in a veterinary pathologist. (2000) Lab Anim (NY);29:23–25.
33. Teutsch SM, Martone WJ, Brink EW, et al. (1979) Pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. N Engl J Med;301:826–828.

34. Gustafson BW, DeBowes LJ. Tularemia in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* (1996) ;32:339–341
35. Johnson HN. Natural occurrence of tularemia in dogs used as a source of canine distemper virus. (1944) *J Lab Clin Med*;29:906–915
36. Woods JP, Panciera RJ, Morton RJ, et al. Feline tularemia. (1998) *Compend Contin Educ Pract Vet*;20:442–457.
37. Nayar GPS, Crawshaw GJ, Neufeld JL. Tularemia in a group of nonhuman primates. (1979) *J Am Vet Med Assoc*;175:962–963.
38. Waggle K, Day-Lollini P, Murphy-Hackley P, et al. (1997) Diagnostic exercise: illness, cutaneous hemorrhage, and death in two squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Lab Anim Sci*;47:647–649
39. Tarnvik, A. & Chu, M. C. (2007). New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann N Y Acad Sci* 1105, 378–404.
40. Johansson, A., Berglund, L., Sjostedt, A. & Tarnvik, A. (2001). Ciprofloxacin for treatment of tularemia. *Clin Infect Dis* 33, 267–268
41. Titball, R. W. & Petrosino, J. F. (2007). *Francisella tularensis* genomics and proteomics. *Ann N Y Acad Sci* 1105, 98–121.
42. Burke, D. S. (1977). Immunization against tularemia: analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory-acquired tularemia. *J Infect Dis* 135, 55–60.
43. Oyston, P. C. F., Sjostedt, A. & Titball, R. W. (2004). Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol* 2, 967–978.
44. Barker, J. H., Weiss, J., Apicella, M. A. & Nauseef, W. M. (2006). Basis for the failure of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to prime human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 74, 3277–3284
45. Wang, X., Ribeiro, A. A., Guan, Z., McGrath, S. C., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. H. (2006). Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. *Biochemistry* 45, 14427–14440.
46. Thomas, R. M., Titball, R. W., Oyston, P. C. F., Griffin, K., Waters, E., Hitchen, P. G., Michell, S. L., Grice, I. D., Wilson, J. C. & Prior, J. L. (2007). The immunologically distinct O antigens from *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *Francisella novicida* are both virulence determinants and protective antigens. *Infect Immun* 75, 371–378.
47. Clemens, D. L., Lee, B. Y. & Horwitz, M. A. (2005). *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun* 73, 5892–5902.
48. Thakran, S., Li, H., Lavine, C. L., Miller, M. A., Bina, J. E., Bina, X. R. & Re, F. (2007). Identification of *Francisella tularensis* lipoproteins that stimulate the Toll-like receptor (TLR) 2/TLR1 heterodimer. *J Biol Chem* 283, 3751–3760.
49. Barel M, Hovanessian AG, Meibom K, Briand JP, Dupuis M, Charbit A. A novel receptor - ligand pathway for entry of *Francisella tularensis* in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu. *BMC microbiology*.2008;8:145.

50. Melillo A, Sledjeski DD, Lipski S, Wooten RM, Basrur V, Lafontaine ER. Identification of a *Francisella tularensis* LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. *FEMS microbiology letters*. 2006 Oct;263(1):102-8.
51. Geier H, Celli J. Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of *Francisella tularensis*. *Infection and immunity*. 2011 Jun;79(6):2204-14.
52. Tamilselvam B, Daefler S. *Francisella* targets cholesterol-rich host cell membrane domains for entry into macrophages. *J Immunol*. 2008 Jun 15;180(12):8262-71.
54. Acid Resistance in *Francisella tularensis* Noreen J Adcock, Brian J Morris and Eugene W Rice- Abstract
53. Shaun, S.; Brunton, J., Ziehr, B., Taft-Benz, S., Moorman, N., Kawula, T.. *F. tularensis* Harvest Nutrients Derived via ATG5-Independend Autophagy to Support Intracellular Growth. *PLOS. Pathogens*. 2013. 9; 8.
54. Deretic, V., Levine, B. (2009). Autophagy, immunity and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 5(6): 527-549.
55. Meijer, A.J., codogno, P., (2011). Autophagy: Regulation by energy sensing. *Curr Biol* 21(6): R227-229.
56. Keim, P., Johansson, A., Wagner, D. M. (2007) Molecular epidemiology, evolution and ecology of *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci* 1105: 30-66.
57. Saslaw, S., Eigelsbach, H. T., Prior, J. A., Wilson, H. E., Carhart, S. (1961) Tularemia vaccine study. II respiratory challenge. *Arch Intern Med* 107: 702-714.
58. Gray, C. G., Cowley, S.C., Cheung, K. K. M., Nano, F. E. (2002) . The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol Lett* 215, 53-56.4
59. Chong, A., Celli, J. The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Frontiers in Microbiol*. 2010. (1) 138.
60. Šantić, M., Molmeret, M., Abu Kwaik, J. Modulation of biogenesis of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida*-containing phagosome in quiescent human macrophages and its maturation into a phagolysosome upon activation by IFN- $\gamma$ . *Cell Microbiol* (2005) 7(7), 957-967.
61. Baron, G. S., Francis, E. N. MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol Microbiol* (1998) 29(1), 247-259.
62. Lauriano, C. M., Barker, J. R., Francis, E. N., Arulanandam, B. P., Hassett, D. J., Klose, K. E. MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *PNAS*. (2004)111(12), 4246-4249.
63. Ojeda, S. S., Mares, C. A., Alvarez, J. I., Qun Li, Orihuela, C. J., Teale, J. M. Virulence factors involved in passage of *Francisella tularensis* subsp. *novicida* through an air blood barrier model. *Bioterr Biodef*. 2011, S3.
64. Maggio, S., Takeda, K., Stark, F., Meierovics, A. I., Yabe, I., Cowley, S. C. Control of *Francisella tularensis* intracellular growth bypulmonary epithelial cells. *PLOS ONE* (2015).

65. Šantić, M., Molmeret, M., Barker, J. R., Klose, K. E., Dekanić, A., Dorić, M., Abu Kwaik, Y. (2007). A Francisella tularensis pathogenicity island protein essential for bacterial proliferation within the host cell cytosol. *Cell Microbiol* 9, 2391-2403.
66. Bröms, J.E., Meyer, L., Sun, K., Lavander, M., Sjöstedt, A., (2012). Unique substrates secreted by the type VI secretion system of Francisella tularensis during intramacrophage infection. *PLoS One*. 7(11):e50473.
67. Lauriano, C. M., et al. (2004). MglA regulates transcription of virulence factors necessary for Francisella tularensis intramacrophage and intramacrophage survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:4246–4249.
68. Santic, M., et al. (2005). The Francisella tularensis pathogenicity island protein IglC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell. Microbiol.* 7: 969–979.
69. Tomac Kapelan I., Šafar J., Crnić A., Frković A., Heski T., Janeš J. i sur., *GORSKI KOTAR*, Delnice, Fond knjige „Gorski kotar“, 1981.
70. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=13107> (25.6.2019.)
71. Ćuzela-Bilać D., Piškur V., *Zdravstvena ispravnost vode za piće na području Primorsko-goranske županije u 2005. godini*, Zdravlje u Primorsko-goranskoj županiji, 2007.; Vol 3, broj 9:
72. <http://www.zzjzpgz.hr/vode/index.php> (26.6.2019.)
73. <http://www.zabok-ribolov.com/fczagorje/index.php/8-rijeke/55-kupica-fly-fishing> (26.6.2019.)
74. <https://www.scribd.com/document/392163432/2-1-Tehni%C4%8Dki-opis-primjer-gerov%C4%8Dica-pdf> (26.6.2019.)
75. <http://pdtuhobic.hr/planinarski-dom/> (26.6.2019.)
76. [http://hjp.znanje.hr/index.php?show=search\\_by\\_id&id=eFvWxc%253D](http://hjp.znanje.hr/index.php?show=search_by_id&id=eFvWxc%253D) (27.6.2019.)
77. 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.
78. [http://www.oxid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0559&c=UK&lang=EN](http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0559&c=UK&lang=EN) (25.6.2019.)
79. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22283482> (21.8.2019.)
80. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2836248/> (21.8.2019.)

## **8. KRATKI ŽIVOTOPIS PRISTUPNIKA**

### **OSOBNJE INFORMACIJE:**

**IME I PREZIME:** Ivan Žagar

**DATUM ROĐENJA:** 10.9.1997.

**ADRESA STANOVANJA:** Školska 21, Smrečje, 51304 Gerovo (Hrvatska)

**KONTAKT:** +385 99/769 93 59

**MAIL:** zagarivan03@gmail.com

### **OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE:**

**2004. – 2012.:** Osnovna škola „Petar Zrinski“, Područna škola Gerovo (Hrvatska)

**2012. – 2016.:** Srednja škola „Vladimir Nazor“, Čabar

**2016. – 2019.:** Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

Medicinski fakultet Rijeka (Hrvatska)