UTJECAJ ESCHERICHIA COLI NA PREŽIVLJAVANJE I RAZMNOŽAVANJE FRANCISELLA NOVICIDA U VODI

Kolarić, Dominik

Master's thesis / Diplomski 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:184:464285

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNO INŽENJERSTVO

Dominik Kolarić

UTJECAJ *ESCHERICHIA COLI* NA PREŽIVLJAVANJE I RAZMNOŽAVANJE *FRANCISELLA NOVICIDA* U VODI

Diplomski rad

U Rijeci, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNO INŽENJERSTVO

Dominik Kolarić

THE INFLUENCE OF ESCHERICHIA COLI ON SURVIVAL AND REPLICATION OF *FRANCISELLA NOVICIDA* IN WATER

Diplomski rad

U Rijeci, 2019.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marina Šantić

Diplomski rad obranjen je dana _____ u/na

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima 71 stranica, 9 slika, 1 tablicu, 83 literaturnih navoda.

Zahvala

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Marini Šantić na idejama, savjetima, odgovorima te ukazanom strpljenju i vremenu pri izradi ovog diplomskog rada.

Veliko hvala asistentici Maši Knežević, Mateji Ožanič mag. sanit. ing. te Valentini Marečić mag. sanit. ing. na savjetima i pomoći kod praktičnog djela istraživanja kao i Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Posebnu zahvalnost iskazujem roditeljima, bratu i sestri kao i prijateljima koji su me podržavali i u ružnim i u lijepim trenucima.

SAŽETAK

Rod *Francisella* svrstava se u porodicu *Franciselaceae*, a dijeli se u pet različitih vrsta*: F. philomiragia, F. noatunensis, F. hispaniensis, F. tularensis* i *F. novicida*. Također, 3 su podvrste bakterije *F. tularensis*: *tularensis* (tip A), *holartica* (tip B) te *mediasiatica.* Tularemija, kao zoonozna bolest, najviše se pojavljuje na Sjevernoj zemljinoj polutci, a kao vodena bolest opisana je već 1930-te godine. Prijenos bolesti moguć je preko pitke, bočate i morske vode. Vrste *F. novicida* i *F. philomiragia* usko su povezane uz vodeni okoliš, a *F. novicida* izolirana je samo iz vodene niše kao jedinog rezervoara. Fakultativno-anaerobna, mezofilna *Escherichia. coli,* kao gram-negativna bakterija u obliku štapića, svrstana je u porodicu *Enterobacteriaceae*. Najznačajnija vrsta za humanu medicinu je *E. coli* koja se koristi kao indikator fekalnog zagađenja (FIB) u procjeni kakvoće vode i hrane, a normalno se nalazi u GI-sustavu ljudi i životinja. Cilj istraživanja bio je odrediti kako *Escherichia coli* utječe na preživljavanje i razmnožavanje *Francisella novicida* u vodenom okruženju, odnosno pratiti kinetiku rasta i uvidjeti razliku u kvantitativnoj analizi prilikom zajedničke kultivacije bakterija u slanoj i slatkoj vodi. Na preživljavanje bakterija utjecali su nedostatak hrane, temperatura te borba s autohtonom mikrobiotom u moru i jezeru, odnosno različiti biotski i abiotski faktori. Naši rezultati pokazuju da *F. novicida* preživljava bolje u sterilnom moru u odnosu na nesterilno, a ista je situacija i za slatkovodnu vodu iz jezera Potkoš. Uspoređujući slanu i slatku vodu, bilo u sterilnim ili nesterilnim uzorcima, *F. novicida* pokazala je da se bolje razmnožava i raste u moru, uzorkovanog iz Riječke luke. Još uvijek nije razjašnjeno preživljava li *E. coli* bolje u slanoj ili slatkoj vodi. Prema našim rezultatima bakterija bolje preživljava u nesterilnom jezeru u odnosu na nesterilno more, a isto tako bolje preživljava u sterilnim uzorcima u odnosu na nesterilne, što se poklapa i s prijašnjim istraživanjima. *F. novicida* i *E. coli*, inkubirane zajedno, i u sterilnom i u nesterilnom moru nemaju međusobni utjecaj na rast i razmnožavanje što može predstavljati različitu nutritivnu potrebu u različitim koncentracijama. *F. novicida* u sterilnom jezeru nije bilo moguće

izbrojati nakon 3 dana inkubacije. Mogući razlozi su grube pogrješke tijekom eksperimentalnog rada ili nemogućnost uočavanja i kvantifikacije kolonija *F. novicida* zbog prerastanja istih od strane *E. coli*. Određene genetske malformacije i mehanizme koji bakterijama omogućuju da opstanu u okolišu bez domaćina, posebice u vodenom okruženju, gdje nema velikih zaliha hrane, potrebno je dodatno istražiti za detaljno objašnjenje situacije.

KLJUČNE RIJEČI: *Francisella novicida*, *Escherichia coli*, kinetika rasta, morska i slatka voda

SUMMARY

The genus *Francisella* belongs to the family *Franciselaceae* and it is divided into five different species: *F. philomiragia, F. noatunensis, F. hispaniensis, F. tularensis* and *F. novicida*. In addition, there are 3 subspecies of *F. tularensis*: *tularensis* (type A), *holarctica* (type B) and *mediasiatica*. Tularemia, as a zoonotic disease, occurs the most in the Northern Earth's hemisphere, and was described as a waterborne disease in the early 1930s. The transmission of the disease is possible through fresh, brackish and seawater. *F. novicida* and *F. philomiragia* species are closely related to the aquatic environment, but *F. novicida* is isolated only from the water niche as the sole reservoir. Facultative-anaerobic, mesophilic *Escherichia coli*, as rod-shaped Gram-negative bacterium, is classified in the family of *Enterobacteriaceae*. The most important species for human medicine is *E. coli*, which is used as a fecal pollution indicator (FPI) in the assessment of water and food quality and is normally found in the GI system of humans and animals. The aim of the study was to determine how *E. coli* affects the survival and reproduction of *F. novicida* in an aquatic environment. In addition, the aim was to monitor growth kinetics and to see the difference in quantitative analysis between co-cultivating bacteria in salt and fresh water. Food shortages, temperatures and the fight against the indigenous microbiota in the sea and the lake, respectively various biotic and abiotic factors, influenced the survival of the bacteria. Our results show that *F. novicida* survives better in the sterile sea than non-sterile ones and it is the same for freshwater from Lake Potkoš. Comparing salt and freshwater, in either sterile or non-sterile samples, *F. novicida* showed that it reproduces and grows better in the sea, a sample from the port of Rijeka. It is still unclear whether *E. coli* survives better in salt or fresh water. According to our results, bacteria survive better in a non-sterile lake than a non-sterile sea but also survive better in sterile samples than non-sterile ones, which is consistent with previous research. *F. novicida* and *E. coli*, incubated together, in both sterile and non-sterile seas, do not interact on growth and reproduction, which may represent

different nutritional needs at different concentrations. *F. novicida* in a sterile lake could not be counted after 3 days of incubation. Possible reasons are gross mistakes during experimental work or an inability to detect and quantify *F. novicida* colonies due to their outgrowth by *E. coli*. Certain genetic malformations and mechanisms that allow bacteria to survive in a host-free environment, especially in an aquatic environment where there is no large food supply, need to be further investigated to explain the situation in detail.

KEY WORDS: *Francisella novicida*, *Escherichia coli*, growth kinetics, salt and freshwater

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Povijest roda Francisella 1

1.2. Vrste i podvrste roda Francisella 3

1.3. Sličnosti i razlike *F. tularensis* i *F. novicida* 7

1.4. Unutar stanični život roda *Francisella* 11

5. Virulencija i patogeneza 13

5.1. *Francisella* patogeni otok 13

5.2. Lipopolisaharid (LPS) 14

5.3 Pili 14

5.4 Kapsula 15

5.5 Patogeneza 16

6. Klinička slika 16

7. Terapija 18

8.1. Rezervoari *F. tularensis* 19

8.2. Preživljavanje u biofilmovima 21

8.3 Preživljavanje u komarcima 22

9. *Escherichia coli*: ekologija i javno zdravstvo 23

9.1 *E. coli* kao ljudski patogen 24

9.2 Rast i preživljavanje *E. coli* u prirodnom okolišu 26

10. Cilj rada 30

11.MATERIJALI I METODE 31

11.1 MATERIJALI 31

11.1.1.Bakterijski sojevi 31

11.1.2. Hranljive podloge 31

11.1.3. TTC (Triphenyltetrazolium chloride) Tergitol-7 agar 32

11.1.4. LES endo 33

11.1.5. Prilikom eksperimentalnog rada uz spomenute bakterijske vrste koristilo se slijedeće: 34

11.2. Metode 34

11.2.1. Postupak rada na Sartorius uređaju za membransku filtraciju 34

11.2.2. Priprema bakterijske suspenzije 35

11.2.3. Priprema uzoraka i nasađivanje bakterija na hranljive podloge 35

12. Rezultati 37

12.1. Kinetika rasta *Francisella novicida* i *Escherichia coli* u morskoj vodi uzgajane zasebno 37

12.1.1. Sterilno more (BCYE agar) 37
12.1.2. Nesterilno more (BCYE agar) 37
12.2 Kinetika rasta *Francisella novicida* i *Escherichia coli* u slatkovodnoj vodi uzgajane zasebno 39
12.2.1. Jezero sterilno (BCYE agar) 39
12.2.2. Nesterilno jezero (BCYE agar) 39
12.3. Kinetika rasta *Francisella novicida* i *Escherichia coli* uzgajane zajedno u morskoj vodi 41
12.3.1 Sterilno more 41
12.3.2. Nesterilno more 41
12.4. Kinetika rasta *Francisella novicida* i *Escherichia coli* uzgajane zajedno u slatkovodnoj vodi 43
12.4.1. Sterilno jezero 43
12.4.2. Nesterilno jezero 43
13. Rasprava 45
14. Zaključak 51
15. Literatura 53
16. Životopis 59

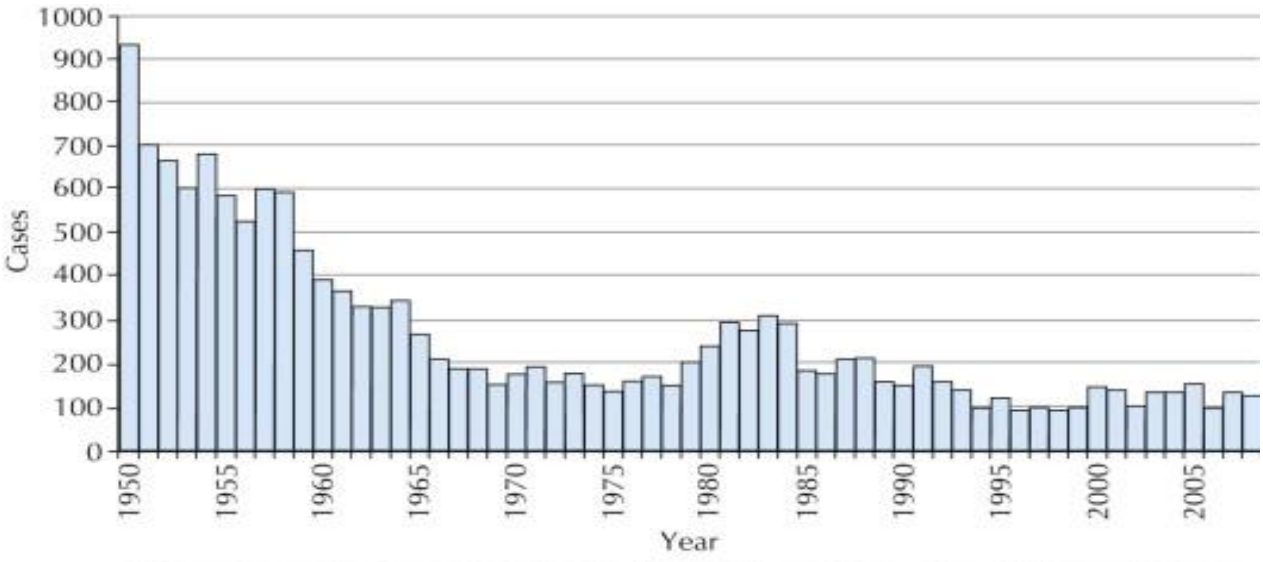
1.Uvod

1.1. Povijest roda Francisella

Visoko patogena za čovjeka i životinje te vrlo značajna za humanu medicinu vrsta je *Francisella tularensis,* mala asporogena, gram-negativna bakterija otkrivena davne 1911. godine. Samo tri godine kasnije u časopisu *The Journal of Infective Diseases* objavljen je prvi dokumentirani humani slučaj tularemije u Ohio-u čiji uzročnik je etiološki identificiran kao *Bacterium tularense*, a izoliran je pomoću kliničkih i mikrobioloških metoda sa konjuktivnog čira radnika restorana [1]. Također zabilježeni su redom slučajevi u Utahu 1908. godine, 1980-ih u Norveškoj gdje su bolest nazvali „bolest glodavaca" te jedno od najstarijih izvješća koje datira još iz 1818. godine pod naslovom „zečja bolest" [2,3,4]. Proučavajući kugu u vjevericama, znanstvenici George McCoy i Charles Chapin otkrili su da spomenuta bakterija uzrokuje drugačiju bolest te su je prvobitno nazvali *Bacterium tularense*. Tek je 1928. bakteriolog američke javne zdravstvene službe Edward Francis *B. tularense* povezao s bolešću koju i sama izaziva, tularemijom. Utvrdio je također prijenos bolesti sa životinje na čovjeka pomoću vektora kao što je krpelj, a isto tako i direktnim kontaktom s inficiranim glodavcem gdje bi najčešće stradali lovci [5]. Danas je poznato 14 vrsta krpelja kao vektora koji prenose tularemiju, a vrste koje dominiraju po američkom tlu su krpelj šikare *Dermacentor variabilis* i *Dermacentor andersonii* poznat kao šumski krpelj. Dvadesetih godina 20. stoljeća otkriva se da *F. tularensis,* kao parazit, ima sposobnost unutar staničnog preživljavanja u domaćinu te da se lako prenosi, kao zoonoza, ugrizom hematofagnog člankonošca [5]. Da se bakterijom može zaraziti ne samo preko hrane i zaraženih životinja već i preko kontaminirane vode dokazuju podatci iz 1930-ih gdje je u Europi i Rusiji zabilježen povišeni morbiditet. 1950. bakterija je izolirana iz slane vode iz Velikog slanog jezera u SAD-u. 1970-ih Švedsku i Rusiju zahvaća i atipični oblik bolesti čiji je glavni rezervoar bio pas [9]. 1974. godine bakterija je u čast znanstveniku Francisu za doprinos i unapređenje znanja o tularemiji preimenovana u *F. tularensis* dok drugi naziv imena potječe od male

pokrajine u Kaliforniji, Toulare Country, u kojoj je bolest bila endemična [6,7]. Početkom 21. stoljeća samo se nekoliko znanstvenika bavilo proučavanjem mehanizama patogeneze i virulencijom *F. tularensis*, međutim kako se otkrilo da tip A drži virulenciju biološkog oružja i mogućnost zlouporabe istog, interes za istraživanjem znatno je porastao, a posebno u SAD-u [8].

Pojavnost tularemije bila je mnogo češća u ranim godinama 20. stoljeća, nego što je to danas. Mnogi su lovački klubovi u 1920-ima i 1930-ima širili tularemiju uvozeći zaražene zečeve. Razlozi za veći pobol nekada u odnosu na sadašnjost: jesu urbanizacija ruralnih dijelova, manje prirodnih staništa za artropode i druge toplokrvne životinje kao rezervoara bakterije, smanjio se i broj ljudi koji borave u prirodi, a i seoba iz ruralnih u urbane dijelove doprinosi smanjenju tularemije (Slika 1)[76].



Slika 1. Prikaz pojavnosti slučajeva tularemije kroz 20. i 21. stoljeće. Grafikon prikazuje veći morbiditet u 20. u odnosu na 21. stoljeće. (Hofmann, J. (2012) Geographic distribution and magnitude of disease Burden. Netters Infectious Disease.)

1.2. Vrste i podvrste roda Francisella

Rod *Francisella* svrstava se u porodicu *Franciselaceae*, a dijeli se u pet različitih vrsta: *F. philomiragia, F. noatunensis, F. hispaniensis, F. tularensis* i *F. novicida*. Također, 3 su podvrste bakterije *F. tularensis*: *tularensis* (tip A), *holartica* (tip B) te *mediasiatica* (Tablica 1) [10]. Različite vrste roda *Francisella* možemo razlikovati PCR-om (PCR, eng. polymerase chain reaction), također na osnovi fermentacije glicerola, stupnju virulencije na životinjskim modelima, a nedavno su otkrivene i novije tehnike za diferenciranje podvrsta poput elektroforeza gel s pulsnim poljem (PFGE, *engl.* Pulsed-field gel electrophoresis), analiza ponovljenog tandema s višestrukim lokusom (MLVA, *engl.* Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) te varijacija pojedinačnih nukleotida [10]. Vrste iz roda *Francisella* dijele sličan genetski sadržaj, no pokazuju znatne razlike glede virulencije, geografske rasprostranjenosti, mehanizama patogeneze te biokemijskih testova po kojima ih razlikujemo [11]. Također, bakterije roda *Francisella* većinom obitavaju na području Sjeverne Zemljine polutke gdje je prema istraživanju Tip A od 1964. do 2004. izoliran najviše puta u Koloradu, dok je Tip B najzastupljeniji bio u Kentaki [10]. No potvrđeni su i slučajevi na Južnoj polutci poput *F. novicida* u Australiji te slučajevi na jugu Meksika, u Sjevernoj Africi, Venezueli (Slika 2) i drugim neočekivanim mjestima [1,12].

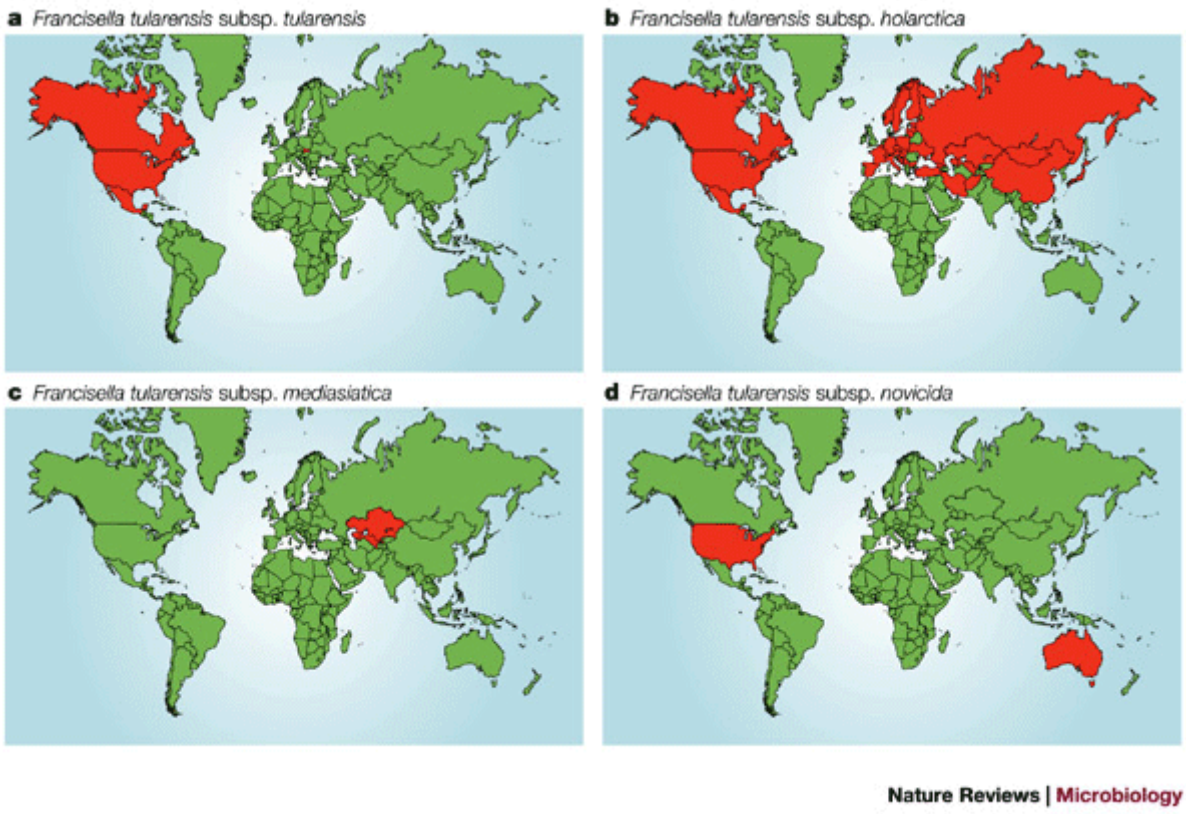
Tablica 1. Taksonomija roda *Francisella*

Rod	Vrsta	Podvrsta
Francisella	*tularensis*	*tularensis*
		holarctica
		mediasiatica
	novicida	
	hispaniensis	
	philomiragia	
	noatunensis	*noatunensis*
		orientalis

Biološko oružje klasificirano kao Tip A od strane Centra za kontrolu i prevenciju bolesti smatra se *F. tularensis* subsp. *tularensis* koja dominira u Sjevernoj Americi (Slika 2). Ne napada samo glodavce i njima srodne, već pokazuje visoku virulenciju i za ljude popraćenu s najčešće respiratornim bolestima [13]. Osim što je patogena za čovjeka, najugroženiji su glodavci poput štakora i kunića iz kojih potječu i mnogobrojni izolati, a napada i veće životinje poput ovaca, jelena, konja koji većinom budu zaraženi putem vektora. Bakterija se prenosi svim putevima prijenosa odnosno putem vode, hrane, aerosolom ili direktnim kontaktom pa je samo 10 njih dovoljno da izazove infekciju prilikom subkutanog unosa dok ih pri udisaju kontaminiranog aerosola treba nešto više, njih 25 [14,15]. Spomenutu podvrstu američki su znanstvenici podijelili u dvije genetski različite grupe poznatije kao tip A_1 i tip A_2. Prema američkom istraživanju, promatrajući oboljele od tularemije, tip A_1 nazvan je tip A- istok, a tip A_2 predstavljao je tip A-zapad gledajući istočno ili zapadno od stotog meridijana

na zemljopisnoj karti. Izvori izolata oboljelih najbrojniji su bili iz krvi i limfnih čvorova, nešto manje iz pluća, a u par slučajeva bakteriju su izolirali i iz cerebralne tekućine te oka. Isto tako, zaključili su da tip A-zapad izaziva blaže oblike bolesti, negoli A-istog i B tip koji predstavlja podvrstu *holarctica*. Infekcije tipom A bile su više povezane ugrizom artropoda, a manje izlaganjem lagomorfima i mačkama, dok infekcije tipom B više prate izlaganje glodavcima i domaćom životinjom mačkom [10]. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, poznata i kao tip B, rasprostranjena je gotovo po čitavoj Sjevernoj Polutci počevši od Japana i Europe pa do SAD-a (Slika 2). Tip B izaziva najčešći oblik bolesti, a to je ulceroglandularni oblik tularemije. Veći broj oboljelih bilježi Švedska gdje je glavni vektor bio komarac dok je u Turskoj popraćen veći morbiditet putem kontaminirane vode [16,17]. Podvrsta *holarctica* živi je atenuirani soj (LVS eng. live vaccine strain) te ujedno predstavlja i jedino dostupno cjepivo protiv tularemije. Kao virulentni soj izoliran je iz vodenog štakora u zemljama bivšeg Sovjetskog saveza te je jednostavnim bakteriološkim metodama proizvedeno cjepivo protiv tularemije [18]. Kako bakterija voli obitavati i u vodenoj niši u Sjevernoj Americi je najčešće povezujemo s glodavcima poput američkog dabra i muskarta [19]. Iako najmanje istražena, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* izolirana je u centralnoj Aziji , odnosno u određenim dijelovima Kazahstana i Turkmenistana te u jugozapadnoj Rusiji (Slika 2). Kao i *F. novicida* rijetko se povezuje s humanim infekcijama iako ima nekoliko slučajeva zaraze kod imunokompromitiranih, a za glodavce poput miševa može biti letalna i u manjim dozama [20]. Često otkrivanje *F. philomiragia* u uzorcima vode ukazuje da je vodeni okoliš primarni rezervoar bakterije, a zemljopisna joj je rasprostranjenost očito široka na što ukazuju dokumentirani slučajevi infekcija kod ljudi u Kanadi, Europi i Turskoj. Iako joj je slanost vode glavni element životnog ciklusa pronađena je i u izvorskoj vodi u SAD-u, u balastnoj vodi iz transportnih vozila te u rashladnim tornjevima u Kini, što je održavalo distribuciju u različitim vodenim okruženjima [33]. *F. philomiragia* rijedak je humani patogen za kojeg je zabilježeno samo 17 slučajeva infekcije u posljednjih 40-ak godina, a 15 od njih dogodio se u Sjevernoj Americi. To su uglavnom bile osobe koje su boravile u blizini vode ili su već

imale kronične granulomatozne bolesti. Spomenuta bakterija jest halofil te je možemo pronaći oko morskih staništa sjeverne Europe te Sjeverne Amerike. Iako su slučajevi zaraze uglavnom povezani sa slanom vodom, bakterija je također izolirana iz močvara, toplih izvora te slatkovodnih ribnjaka u SAD-u. Nije bilo sumnje da bi se spomenuta bakterija mogla prenositi ugrizom artropoda, no znanstvenici su nedugo zatim otkrili da je *Dermacentor reticulatus* (pseći krpelj) mogući prijenosnik infekcije u kojem je čak u 20% uzoraka pronađena *F. philomiragia* što je bilo dio francuske studije. Spomenuti vektor široko je rasprostranjen diljem Europe, kao i naši kućni ljubimci, pa ovo otkriće sugerira da bi mogao imati važnu ulogu u životnom ciklusu *F. philomiragia* [21]. *F. hispaniensis*, kao i *F. novicida*, obitava uglavnom u vodenoj niši, a izolirana je u određenim dijelovima Španjolske. Prvi slučaj tularemije uzrokovan od *F. novicida* zabilježen je 1951. godine u Ogden Bayu (Utah). Iako je u početku bila svrstana u rod Pasteurella, 1954. godine klasificirali su je u rod *Francisella*. Nekoliko desetljeća kasnije klasificirana je kao posebna vrsta roda *Francisella*. Također je utvrđeno da ima jednaku DNA kao i ostale vrste [22,23]. Vrsta *F. noatunensis* riblji je patogen koji najviše inficira vrste bakalara i tilapije, a dijeli se u dvije podvrste: *F. noatunensis* subsp. *orientalis* i *F. noatunensis* subsp. *noatunensis*. Podvrste su prilagođene različitim tjelesnim temperaturama pa subsp. *orientalis* izaziva granulome riba u toplih voda dok subsp. *noatunensis* više inficira ribe hladnijih voda [24].



Slika 2. Prikaz pojavnosti i geografske rasprostranjenosti različitih sojeva *F. tularensis* i vrste *F. novicida* diljem svijeta. (Oyston, Sjöstedt, Titball, (2004) Tularemia: bioterrorisam defence renews interest in *Francisella tularensis*. Nature Reviews Microbiology, 2: 967-978)

1.3. Sličnosti i razlike *F. tularensis* i *F. novicida*

Slična morfologija prilikom uzgoja, nepokretnost zbog neposjedovanja flagela, gram negativci bez sposobnosti da stvaraju spore te tanka, lipidima obložena, kapsula samo su neke od sličnosti *F. tularensis* i *F. novicida*. Kisik, aminokiselina cistein te željezo od esencijalne su važnosti za bakterijski rast i reprodukciju, a da bi preživjele u organizmu u kojem parazitiraju poprimaju koloidni oblik. U smrznutom mesu glodavaca, bakterija ima sposobnost preživjeti i nekoliko godina dok tjednima uspijeva opstati u vodi, zemlji, slami, pa čak i u prašini [25,26]. Starije kulture na izgled imaju oblik dužih štapića, a kolonije su glatke, vlažne i bijele te se već nakon 48 h na 37 °C lako

kultiviraju. BCYE i čokoladni agar, uz optimalni pH od 6.8 do 7.3, odlične su podloge za uzgoj obje vrste sadržavajući esencijalni cistein i animalne bjelančevine. Vrste dijele 97 % nukleotidni identitet stoga nije ni čudno što je nekad *F. novicida* bila podvrsta *F. tularensis*, a više je razloga zašto je klasificirana zasebno. Jedan od prvih razloga bio je različito vrijeme inkubacije na cistein-glukoza-krvnom agaru (CGBA) na kojem bi *F. novicida* porasla za jedan dan, dok bi *F. tularensis* trebalo 2 do 7 dana. Isto tako velika je razlika glede njihove virulencije gdje samo 10 bakterija *F. tularensis* uzrokuje zarazu kod ljudi i smrt kod životinjskih domaćina, dok je *F. novicida* potrebno 100 puta više bakterija [26]. Podvrste *holarctica* i *tularensis* razlikuju se od *F. novicida* po „O“ antigenu koji patogene vrste štiti od autofagične detekcije domaćina nakon što stignu do citosola. Kod *F. novicida* tri gena manje, njih 12, kodira „O“ antigen. Otkriveno je da *F. novicida* ima 11 različitih metaboličkih osobina koje nisu prisutne u podvrstama *F. tularensis*, a isto tako soj *F. novicida* U112 ima samo 3 nepotpuna procesa sinteze aminokiselina dok soj *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 ima 9 puteva sinteze što čini virulentnu razliku. 84 gena, koji kodira genom soja *F. novicida* U112, zaslužni su za bakterijski metabolizam ugljikohidrata, biosintezu aminokiselina, energetski metabolizam i njihov transport te modifikaciju DNA, dok su isti inaktivni u sojevima *tularensis* Schu S4 i *holartica* LVS. Upravo oni su glavni omogućitelji postojanja i opstanka *F. novicida* u okolišu, izvan domaćina. Da *F. novicida* u svom okruženju susreće i strane organizme govori podatak da je razvila 4 sustava barijera u svom genomu koji joj omogućuju zaštitu na način da smanjuju nakupljanje strane metilirane DNK. Za razvoj svojih restriktivnih barijera, sojevi *F. tularensis*, razvili su „glasnike“ odnosno pseudogene koji sugeriraju bakteriji, kada prelazi u intracelularni patogen, da sustav barijera više nije potreban za preživljavanje. Drugi način kojim *F. novicida* zadržava funkcije za opstanak jesu 5 gena (FTN_0451-0456) odgovornih za sintezu i raspad sekundarnog glasnika, bis-(3'-5') – ciklički dimer GMP (cdGMP). Prekomjerna proizvodnja cdGMP-a omogućuje stvaranje biofilma, a smanjenjem istog omogućava se bolje razmnožavanje bakterija unutar mišjih makrofaga [32]. Genomske analize ukazuju da su se *F. novicida* i *F. philomiragia* razvijale u drugačijem pravcu negoli

podvrste *F. tularensis*. Sojevi *F. tularensis* visoko su klonski i ne podliježu rekombinaciji kao što je to slučaj sa *F. novicida* i *F. philomiragia*. U 10 % gena jezgre 742 *Francisella* koji su testirani u 7 genoma *F. novicida* primijećena je rekombinacija dok nije bilo dokaza o rekombinaciji prilikom testiranja istih gena kod *F. tularensis*. Kod soja Schu S4 dokazano je da proliferacijom IS elemenata u genomu dolazi do inaktivacije najmanje 22 gena što se ujedno smatra odgovornim i za umnožavanje FPI patogenog otoka odgovornog za visoku virulentnost bakterije. Sveukupno gledano, vrste s užom bakterijskom nišom, poput unutar staničnog patogena *F. tularensis*, imaju tendenciju razvijati jednolične odnosno monomorfne genome, dok vrste poput *F. novicida* ili *F. philomiragia* da bi opstale u širokom krugu obitavanja, podvrgavaju vlastiti genom za preživljavanje u različitijim uvjetima [32]. *F. novicida* i *F. tularensis* dijele vrlo sličan genom, no unatoč ukupnoj genetskoj sličnosti homologni geni spomenutih vrsta imaju različitu ulogu i regulaciju, a posebice što se tiče patogeneze. Zato *F. tularensis* uspješno izbjegava imunološki odgovor domaćina dok to kod *F. novicda* nije tako. Knockout studije homolognih gena dokazale su različitu ekspresiju istih gena. Primjerice, inaktivacijom gena koji kodiraju regulator transkripcije IclR rezultirala je stagnaciju razmnožavanja kod *F. novicida* u mišjem modelu infekcije, ali ne i kod *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 [32]. Također, genetske varijacije mogu se zapaziti promatrajući njihove siderofore, kapsulu te pile zbog čega i postoji tolika razlika u virulenciji [27,28]. Iako *F. novicida* možemo pronaći u različitim uvjetima i na različitim staništima kao što su tlo, led, slana i boćata voda nije bilo zabilježenih slučajeva identifikacije kod divljih životinja što ukazuje da *F. novicida*, za razliku od *F. tularensis*, nije zoonotska bakterija. Također, *F. novicida* u prirodi nije nikada identificirana u člankonošcima što se ne prepisuje neadekvatnim metodama ispitivanja jer su mnogobrojni endosimbioti, *Franciselli* slični, izolirani i identificirani u krpeljima sekvenciranjem te PCR-om. *F. tularensis* uzrokuje zoonotsku tularemiju čija se klinička slika kod ljudi manifestira u različitim oblicima bolesti ovisno o putu ulaska bakterije. Ugrizi muha, komaraca ili krpelja, skidanje inficiranih životinja nakon lova, oralni unos kontaminirane vode (Slika 3) ili hrane ili pak udisanjem

aerosola samo su neki od primjera potencijalnih unosa bakterije u organizam. Prilikom infekcije spomenutim vektorima, kao posljedica se javlja čir na mjestu ugriza artropoda te nastupa ulceroglandularni tip tularemije, a ista klinička slika javlja se i nakon skinninga zaražene životinje. Onaj najteži oblik kojemu je teško, na temelju kliničke slike, identificirati uzrok bolesti, a samim time i liječiti istu je plućni oblik tularemije. Postoje i ostali oblici kao što je okuloglandularna, nastala izravnom inokulacijom oka te orofaringealna tularemija nastala prilikom konzumacije inficirane hrane ili vode. Dok *F. tularensis* itekako ima virulenciju da inficira zdrave pojedince, za *F. novicida* to slučaj nije. Infekcija *F. novicida* vrlo je rijetka te ju je teško i identificirati kao takvu [32]. Dokumentirano je svega 12 slučajeva infekcije *F. novicida* i to kod imunokompromitiranih osoba. Poznato je par slučajeva infekcije kao što je slučaj u Australiji, slučaj iz 2006. gdje se petnaesto-godišnji muškarac iz Arizone žali na mučninu, povraćanje, bolove u zglobovima te malaksalost [29], također se čulo i za bakterijemiju iz Južne Karoline nakon skorog utapanja 69-godišnjaka kojemu je, pomoću analize metil estera masne kiseline plinskom kromatografijom, otkrivena *Francisella*, a daljnjom analizom sekvenci gena 16S rDNA 100%-i identitet soja *F. novicida* Fx2 [30]. Poznati su i slučajevi izlaganja vrućoj izvorskoj vodi u blizini slanog jezera te vodi iz privatnog vodovoda, a posebnu pažnju privukao je i slučaj bakterijemije zatvorenika iz SAD-a koji su konzumirali led iz ledomata te je pomoću PCR-a detektirana DNA *F. novicida* [31]. Dokumentirana je i bakterijemija iz 2007. godine na Tajlandu kod žene koja je oboljela od raka jajnika [34], te kod alkoholičara s lošim imunološkim statusom u SAD-u [35].

1.4. Unutar stanični život roda *Francisella*

Još je davne 1920. Edward Francis dokazao da je *F. tularensis* unutar stanični patogen gdje bakterija ne samo da može preživjeti već se i uspješno razmnožava [36,37]. Brojna *in vitro* istraživanja pokazala su *F. tularensis* primarno napada makrofage, ali da se i uspješno razmnožava u plućnim stanicama epitela, hepatocitima, neutrofilima, stanicama mišjeg fibroblasta te protozoama gdje inducira upale, ometajući normalne funkcije domaćina [38]. Istraženi mehanizmi i činitelji virulencije poput toksina i određenih sekrecijskih sustava roda *Salmonella, Brucella, Yersinia, Shigela* ili *Legionela* nisu tipični za *Francisella*. Posebnim mehanizmima, ne do kraja istraženih, *F. tularensis* razvila je sustav za ulazak, preživljavanje i uspješno razmnožavanje u stanicama inficiranog, gdje pritom vrlo vješto izbjegava imunološku obranu domaćina [39]. Kako bi definirali unutar stanični život *Francisella,* znanstvenici su koristili različite stanične modele miševa i ljudskih makrofaga te podvrste, kao što su to *F. novicida,* atenuirani *holarctica* LVS soj te virulentni Schu S4 soj [40,41]. Široko proučavani tip stanica, makrofazi, primarni su dijelovi koje *Francisella* napada i u kojem ima jedinstveni životni ciklus, a on uključuje ulazak bakterije u stanicu domaćina [42], inhibiciju fuzije fagosoma i lizosoma i bijeg iz istog te uspješnu citosolnu replikaciju [43]. Ulazak bakterije fagocitozom u stanicu domaćina ključni je korak za unutar stanični životni ciklus pri čemu se aktiviraju receptori koji, poticavši specifične signale, omogućuju sazrijevanje fagosoma sprečavajući također, biocidni odgovor stanice domaćina [45]. Također je dokazano da *Francisella* ima mogućnost da se translocira iz citosola u vakuole imajući sposobnost da, već samo nekoliko sati nakon replikacije, izazove autofagiju stanica domaćina, no većina bakterija ipak ostaje u citosolu proliferirajući daljnju reprodukciju vlastitih stanica [46]. Različiti je put unutar staničnog razmnožavanja u stanicama sisavaca, negoli je to u protozoama. Dok je ključni korak ka uspješnom razmnožavanju bijeg iz spomenute vakuole, odnosno fagosoma u stanicama sisavaca, kod ameba ne samo da bakterija ne bježi iz fagosoma, već se u njemu i uspješno razmnožava [47]. Nakon što *Francisella* uđe u stanicu domaćina, bilo protozoe ili sisavca, prvo se mora pobrinuti da se opskrbi

svim, njoj potrebnim, nutrijentima koji nisu odmah na raspolaganju. Da bi se uspješno razmnožavala, bakterija koristi potrebne mehanizme za razgradnju glikogena, proteina te lipidnih kapljica u manje strukture kao što su masne kiseline, ugljikohidrati i aminokiseline, a sve već navedene esencijalne tvari za bakterijsku egzistenciju nalaze se u kompleksnim strukturama smještene u citosolu [48]. Nakon fagocitoze *Francisella*, boraveći u fagosomu manje od 2 sata, aktivno ispoljava mehanizme virulencije za konačni bijeg bakterije u citosol što je od esencijalne važnosti za daljnje preživljavanje i reprodukciju. U stanicama sisavaca, iz fagosoma u koji je ušla bakterija, sazrijevanjem nastaje oblik ranog endosoma (*engl.* Early Endosome, EE), a regulacijom istog pomoću Rab5 GTP-aznog proteina nastaje EEA-1 (*engl.* Early Endosomal Antigen, EEA-1), odnosno rani endosomalni antigen 1. Rani endosom prelazi u kasni (*engl.* Late Endosome, LE) producirajući endosomalne markere, odnosno lizosomske membranske proteine LAMP-1 i LAMP-2 (*engl.* Lysosomal-associated membrane protein) iz kojih bi morao nastati lizosom, međutim djelovanjem ATP protonske pumpe dolazi do acidifikacije fagosoma, gdje pH pada na 6,7 s odgodom interakcije s hidrolazama lizosoma. Navedeni proces je način da se stanica domaćina obrani od stranog organizma, a naziva se endosomalni lizosomalni degradacijski put. Aktivacijom gena za virulenciju *Francisella* razvija sposobnost, već nakon 30 min, da razori fagosom i uđe u citosol stanice, gdje se dalje razmnožava. Krug inficiranja zatvara se kada, zbog velikog broja namnoženih bakterija, nastupa apoptoza i daljnje inficiranje zdravih stanica domaćina. Da bi razorila membranu fagosoma bakterija koristi djelatne proteine, no njihova stvarna funkcija i sam mehanizam razgradnje fagosoma nije do kraja razjašnjen kao ni mnogobrojni mehanizmi i činitelji virulencije zbog kojih ovu bakteriju, s punim pravom, svrstavamo u bioružje tipa A [49,50,51,52].

5. Virulencija i patogeneza

Mali, gram negativni kokobacil, nepokretan i asporogen sadrži najpoznatijih 5 činitelja virulencije u koje svrstavamo: lipopolisaharid, pile, kapsulu, siderofore i *Francisella* patogeni otok [53].

5.1. *Francisella* patogeni otok

FPI (*engl.* F. tularensis phatogenity island) u većini sojeva pronađen je u dvije kopije, samo u *F. novicida* nalazi se u jednoj kopiji, a sastoji se od 16-19 gena. Brojne su funkcije *Francisella* spp. kodirane unutar FPI, a bijeg iz fagosoma i unutar stanični rast jesu najvažnije. FPI je otkriven slučajno, kada je došlo do transpozicijske mutageneze čiji je rezultat bio inaktivacija gena i nemogućnost daljnjeg razmnožavanja bakterije [54]. MglA protein, pokazuju istraživanja, veličine je 30 kb i ujedno glavni regulator virulencije, zadužen za aktivaciju procesa prepisivanja gena koje kodira FPI. Nakon infekcije stanica domaćina, primjerice humanog makrofaga, FPI potiče izlučivanje 8 proteina (IglE, IglC, IglI, IglJ, IglF, VgrF, PdpE i PdpA) koji služe za infekciju, razmnožavanje i „bježanje“ bakterijske stanice iz fagosoma. Najvažniji geni za održavanje toliko visoke virulencije *Francisella* spp. su iglABCD i pdpABCD [40,55]. Različite su funkcije navedenih proteina, pa primjerice, MglA i MglB proteini kodirani bicističnim operonom smješteni su izvan FPI i pokazuju sličnosti sa SspA i SspB proteinima *E. coli*, a drže funkciju regulatora stacionarne faze transkripcije. Zatim, IglA, IglC, IglD, PdP, PdpD, MglA i MglB proteini esencijalni su za bakterijsku reprodukciju unutar makrofaga te pojavu tularemije, kao bolesti, u miševima, a delecijom ili insercijom istih, *Francisella* spp. ne uspijevaju opstati unutar makrofaga [40,54]. Da je FPI jedan od glavnih činitelja virulencije govori istraživanje koje je pokazalo da se induciranom mutacijom FPI gena kod *F. tularensis* uvelike smanjuje virulentnost, a mutacijom IglA i IglB proteina bakterija gubi sposobnost razgradnje fagosomalne membrane te razmnožavanje u staničnom citosolu [54,56].

5.2. Lipopolisaharid (LPS)

Osnovnu građu i sastavni dio vanjske stjenke, gotovo svih gram negativaca, čini složena molekula lipopolisaharid koji dijeli naziv i endotoksin. Tri osnovne komponente čine strukturu lipopolisaharida, a to su: 1) lipid A koji je odgovoran za toksičnost, a ujedno i veže lipopolisaharid za vanjsku membranu; 2) središnji polisaharidni lanac; 3) oligosaharidni ili O-antigen koji sežu u bakterijsku unutrašnjost i specifični su za svaku vrstu gram-negativnih bakterija. LPS *Francisell* spp. jedinstveni je uspoređujući ga s ostalim gram-negativnim bakterijama, gdje je znanstveno dokazano, da podvrgnute velikim temperaturnim amplitudama, induciraju ekspresiju gena bitne za preživljavanje, dok vrste *Francisella,* kako bi opstale, potiču promjenu lipidne strukture koja im je od velike važnosti u nepovoljnim životnim uvjetima [57,58]. Struktura LPS-a *F. tuarensis* sadrži nekoliko prilagodba zbog kojeg bakterija vješto izbjegava imunološku reakciju domaćina. Manjak fosfata u strukturi LPS-a rezultira drugačijim rasporedom, duljinom i brojem lanaca masnih kiselina što dovodi do niske toksičnosti i odgođenog upalnog odgovora, što nije slučaj ostalim Gram-negativnim bakterijama [59]. Također, posjedovanje O-antigena još je jedna od prednosti za utišavanje imunoloških, a samim time i odgođenih upalnih odgovora domaćina. Gubitkom O-antigena bakterija gubi na virulentnosti i povećava vlastitu osjetljivost na baktericidno djelovanje serumskih i antimikrobnih peptida, koji inače reduciraju mogućnost bakterijskog razmnožavanja unutar stanica domaćina [60].

5.3 Pili

Francisella spp. izražava površinska vlakna koja pripadaju tipu IV strukturi pila (T4P). Pomoću prijenosne elektronske mikroskopije, odnosno TEM pretrage duž LVS-a, koji potječe iz soja *F. tularensis* subsp. *holarctica,* otkrivene su duge i tanke polarno lokalizirane strukture koje

imaju mogućnost formiranja snopova u međusobno povezanu mrežu pomoću kojih bakterija adherira za tkivo, formira biofilm te izmjenjuje vlastiti DNK. Isto tako, u visoko virulentnom soju Schu S4 oktriveni su geni koji kodiraju T4P s potvrdom da su ti isti geni eksprimirani i u LVS-u. BLAST analizom otkriveni su homologni geni za T4P i drugim patogenim bakterijama kao što su *Neisseria meningittidis* i *Pseudomonas aeruginosa*. Pili *Francisella* spp. kodirani su pomoću pilNOPQ gena koji dijele različite funkcije. PilQ tvori vanjski membranski kanal za izlučivanje pila na površini stanice dok lipoprotein PilP djeluje kao „pilot“ pri stabilizaciji sekreta na vanjskoj membrani kod podvrste *novicida*. Obzirom na to da su površinske strukture ključ virulencije u patogenim bakterijama, pili su definitivno jedan od faktora virulentnosti [61].

5.4 Kapsula

Znanstvenici su, kako bi otkrili je li kapsula također ključna u virulenciji, odvojili spomenutu strukturu od bakterijskih stanica i dokazali da iste nisu uzrokovale bolest kod namjerno inficiranih miševa i zamoraca, što je veliki dokaz da i kapsula ima svoj doprinos glede virulencije. Nekoliko je uloga koje se pripisuju kapsuli, a primarna je da ona štiti *F. tularensis* od nepovoljnih vanjskih uvjeta, također, od serumskih komponenti domaćina koje nastoje uništiti bakteriju, od fagocitoze te ima limitirajuću ulogu u broju transformacije DNA [61,62].

5.5 Patogeneza

Ključna uloga bakterije je da uđe u stanicu, razmnoži se i proširi na ostale zdrave stanice iz kojih će crpiti esencijalne hranljive tvari. Bakterija da bi ušla u organizam traži osjetljiva mjesta poput posjekotina kože na šakama, podlaktici, također, može uči preko spojnice oka, sluznica kao što je ždrijelo ili usna šupljina te isto tako, preko pluća i crijeva. Ovisno o primarnom mjestu infekcije, javljaju se lokalne promjene uz moguće nastajanje primarnog afekta, ulceracija na sluznici probavnog trakta i na koži, ulceromembranozne angine, konjuktivitisa, plućne žarišne promjene, a osim navedenih vidljivih promjena mogu nastati i one fizički nevidljive. Infekcija se uglavnom širi iz primarnog žarišta putem limfe, a zaustavlja se na regionalnim limfnim dijelovima kao što su vrat, pazusi, lakat gdje dolazi do oticanja. Kako *F. tularensis* ima sposobnost duljeg preživljavanja u stanicama domaćina, na posljetku se infekcija ispoljava kao bolest zvana tularemija, koja najčešće metastazira u periferne organe jetru, pluća, slezenu, abdomen i druge [63].

6. Klinička slika

Klinička manifestacija tularemije ovisi o mjestu ulaska bakterije u domaćina što daje različite kliničke slike oboljelih. Ukupno je poznato 7 oblika tularemije, a možemo ih podijeliti na unutarnje i vanjske. Unutarnje oblike čine: plućni, prilikom udisanja kontaminiranog zraka, tifoidni, ujedno i vrlo opasni septički oblik te abdominalni koji se dobije konzumacijom kontaminirane vode, odnosno hrane. Vanjski oblici pokazuju nešto lakšu kliničku sliku, a u njih ubrajamo: ulceroglandularni oblik zadobiven najčešće ugrizom ili preko nekog drugog kontakta s inficiranom životinjom, okuloglandularni koji bilježi kontakt oka s bakterijom najčešće preko vode ili nečistim rukama, glandularni te angiozni oblik s pratećim primarnim afektom na jednoj ili obje tonzile. Nakon inkubacije koja traje od 3-10 dana, javljaju se simptomi nalik gripi, gdje je veliki problem, ako se ne

liječi, visoka temperatura koja može trajati i 10-ak dana. Ubrzo se javljaju i lokalni simptomi koji ovise o, već spomenutim, putevim ulaska.

Limfadentitis vratnih limfnih čvorova klinička je slika glandularnog oblika tularemije, dok se kod ulceroglandularnog tipa lokalno javlja primarni afekt u obliku papule koja s vremenom nekrotizira odnosno dolazi do propadanja tkiva, a najčešće su zahvaćeni prsti.

Kod angioznog oblika javlja se ulceromembranozna ili nekrotična angina s izrazitim povećanjem limfnih čvorova vrata.

Plućni oblik, ujedno i najteži, popraćen je s atipičnom pneumonijom koja je inače karakteristična kod virusnih uzročnika bolesti. Gangrena, apsces, kaverna, pleuritis samo su neki od mogućih komplikacija, a dijagnosticira se obično rengenom s popraćenim mrljastim zasjenjenjima u plućima.

Pojava ulceracija na tankom i debelom crijevu popraćene oteklinama mezenterijalnih limfnih čvorova abdominalni je oblik tularemije. Prema kliničkoj slici bolest nalikuje trbušnom tifusu, odnosno sepsi, a čvorovi se mogu ponekad palpirati i preko trbušne stijenke.

Tifoidni oblik po kliničkoj slici nalikuje na sepsu uz moguću pojavu osipa što je dokaz ulaska bakterije u krv, odnosno bakterijemije [63,64].

7. Terapija

Danas postoje mnoge metode za dijagnosticiranje uzročnika *F. tularensis* kao što su na primjer, test aglutinacije u nizu epruveta, mikroaglutinacija te mnoge druge, no uobičajene metode kojima se često pristupa su specifične hranljive podloge, obogaćene esencijalnim tvarima za rast bakterije te PCR koji se često koristi za izolaciju bakterijske DNA [65]. Još od 1946. pripadnik skupine aminoglikozida – streptomicin pokazao se učinkovitim za sve oblike tularemije osim meningitisa, a može se primijeniti intramuskularno u dozi od 7,5-10 mg/kg tijekom 14 dana. Kod lakših oblika bolesti mogu se primijeniti stariji tetraciklini, a uzrok tome je toksičnost streptomicina. Gentamicin i kloramfenikol također su u upotrebi, a najbolje ih je primjenjivati u akutnoj fazi bolesti. Što se tiče cjepiva, ono je proizvedeno davne 1952. iz živog oslabljenog soja *F. tularensis* subsp. *holarctica*, no takozvano LVS cjepivo još uvijek nije odobreno zbog loše reakcije kod imunokomprimitiranih, a isto tako i nestabilnosti te podložnosti mutacijama [63,65]. U posljednje se vrijeme alternativa traži u model organizmu *F. novicida* u svrhu izrade kompletnog cjepiva za prevenciju humane tularemije [66].

8. Tularemija kao vodena bolest

Gram-negativna, unutar stanična bakterija koja izaziva zoonoznu bolest tularemiju, uglavnom u ljudski organizam ulazi izravnim kontaktom sa zaraženom životinjom ili ubodom krpelja. Međutim, u posljednjem desetljeću pojavljuju se epidemije širom svijeta, gdje je izvor tularemije upravo vodeni okoliš. Sa specifičnim kliničkim i epidemiološkim osobinama, infekcije predstavljaju veliki javno zdravstveni značaj, a kontaminacija ljudi obično nastupa pri konzumaciji vode kontaminirane *F. tularensis*, a isto tako, plivanjem i ribolovom. Pretpostavlja se da su stvaranje biofilma, interakcija s amebama te prijelaz u „hibernacijsko“ stanje kada se bakterija ne nalazi u domaćinu, samo neki od

mehanizama bakterijskog opstanka u vodenom okolišu, no potrebno je provesti još istraživanja da bi se potvrdio doprinos tih potencijalno mogućih mehanizama [67].

8.1. Rezervoari *F. tularensis*

Poznato je podosta rezervoara *F. tularensis*. Mnogo je životinja koje bakterija može inficirati, a primarni su izvori ljudskih infekcija lagomorfi i mali glodavci. Nadalje, krpelji *Ixodidae* su vektori, ali i vjerojatni rezervoari zbog poznatog transstadijalnog prenošenja između spomenutih člankonožaca. Iako se ne smatraju dugotrajnim rezervoarima ovog patogena, komarci i jelene muhe, također, su bakterijski prenositelji na ljudsku populaciju. Već 1930-ih u SSSR-u opisana je vodena tularemija, a vodena niša kao rezervoar bakterije. Posljednjih 20-ak godina bilježe tularemiju povezanu s pitkom vodom iz različitih zemalja, poput Kosova, Gruzije, Bugarske, Turske, Makedonije, Norveške i Švedske, te Italije i Njemačke. Izazvana vodom, epidemija je u Turskoj izbila 1988. godine s pojavom orofaringealne tularemije, a do 2018. godine prijavljeno je 28 slučajeva. U većini slučajeva izvori kontaminacije bili su izvorska voda, voda iz špine ili bunara te voda iz fontana. Pretpostavljalo se da su izvor kontaminacije vode bili zaražena životinjska trupla i njihove izlučevine. Iako su mnoge vrste ostale neidentificirane, subsp. *holarctica* najčešće je dijagnosticirana podvrsta koja je izazvala bolest. Ista bakterija izolirana je iz miša pronađenog u bunaru, na Kosovu 1999. godine kada su zemljom vladali, ratom izazvani, loši sanitarni uvjeti, gdje se pretpostavljalo da je izvor izbijanja orofaringealne tularemije bila voda. Uzročnik epidemije koja se dogodila u Bugarskoj i trajala 8 godina, do 2005., također je bila voda iz privatnih bunara, a slična situacija dogodila se i u Gruziji 2006. godine popraćena s 26 slučajeva orofaringeusa te Skandinaviji gdje je od iste bolovalo 39 osoba. Akvadukt te nepročišćena površinska voda bili su slučajevi kontaminacije u Italiji i Njemačkoj. DNA *F. tularensis* potvrđena je PCR analizom, a podvrste većinom nisu identificirane [67].

Također, poznati su i drugi sporadični slučajevi izbijanja tularemije povezani s vodenim izvorima. U Francuskoj i Finskoj zabilježeni su slučajevi gdje su pacijenti razvili pneumoniju nakon udisanja kontaminirane slatkovodne vode. Prilikom hvatanja slatkovodnih rakova, 19 pacijenata iz Španjolske razvilo je žljezdani i ulceroglandularni oblik tularemije preko ozljeda kože. Ozljeda prsta tijekom ribolova i čišćenja štuke dogodili su se u Kanadi i SAD-u, a tularemiju je izazvala F. *tularensis* subsp. *holarctica* [67].

Da je prevalencija tularemije povezana s prebivalištem u blizini obale, gdje ulogu potencijalnog rezervoara *F. tularensis* ima bočata voda, pokazala je kanadska studija na teritoriju Nunavika. Genetskim analizama ustanovljeno je da predci roda *Francisella* potječu iz morske vode [67].

Dvije vrste koje su usko povezane uz vodeni okoliš i uglavnom izazivaju bolest u osoba koje su lošeg imunostatusa te su izloženi vodi su *F. novicida* i *F. philomiragia*. Pregledom 14 slučajeva gdje su svi bili inficirani *F. philomiragia*, pokazalo se da su to pacijenti koji žive blizu morske obale. Zemljopisna rasprostranjenost široka je što se tiče *F. philomiragia* jer su infekcije opisane u Kanadi, Europi, SAD-u te Turskoj. Dvije norveške studije pokazale su da je *F. philomiragia* stanovnik samo slane i bočate vode, što sugerira da je salinitet glavni element životnog ciklusa iste, međutim *F. philomiragia* otkrivena je i u izvorskoj vodi u blizini slanog jezera u SAD-u. Uzrok tome prepisuje se da je vjerojatni rezervoar bio neki sisavac, a tome u prilog govori podatak da je ista izolirana u blizini iz krpelja *Dermacentor* [67].

Nisu zabilježeni slučajevi identifikacije *F. novicida* kod člankonožaca i životinja, što sugerira da je jedini rezervoar ove vrste, vodeni okoliš. Zabilježeni su slučajevi zaraze putem slane, izvorske i bočate vode u SAD-u i Australiji [67].

Određene su studije utvrdile dugoročno preživljavanje *F. tularensis* u različitim uzgojnim uvjetima s ciljnim parametrima kao što je temperatura i slanost vode. Ovisno o uvjetima,

preživljavanje *F. tularensis* bilježi veliku vremensku amplitudu u rasponu od 1 do 70 dana. Soj *holarctica* opstaje na temperaturi vode od 5 °C samo jedan dan, a na 28 °C i do 8 dana. Na 21 °C tip A i tip B preživljavaju u slatkovodnoj vodi i do 10 dana, a u bočatoj do 42 dana. *F. novicida* je također dokazano da preživljava u bočatoj vodi 30-42 dana na 21 °C. Također, zabilježeno je da riblji patogeni, odnosno sojevi *noatunensis* i *orientalis* preživljavaju u vodi i bez odgovarajućeg domaćina. Soj *noatunensis* preživi u slatkoj vodi 2 dana, a u slanoj 3 dana, dok je *orientalis* dugovječnija bez domaćina pa u slatkoj vodi preživi 12 dana te i do 50 dana u morskom okolišu. Za soj *holarctica* dokazalo se da, kako bi se zaštitila od hipoosmotkog šoka prelaskom iz živućeg domaćina u vodu, posjeduje mehanosenzibilni kanal [68].

Zanimljivo je da *F. tularensis*, na agarskim pločama, nije bilo moguće kultivirati, no bakterija, nakon dugog boravka u vodi, i dalje zadržava metaboličku aktivnost i integritet što je definirano kao VBNC stanje. VBNC stanje definiramo kao „održivo“, ali „nekultivirajuće“, a upravo ono bi moglo biti uzrok dugoročnog opstanka bakterija u vodenoj niši. Osim toga, VBNC stanje može biti i reverzibilno, jer pod određenim uvjetima, na acelularnim medijima, bakterije mogu postati kultivabilne, a spomenuto stanje opisano je i kod vrsta *E. coli, Legionella pneumophila*, *Campylobacter* spp. i *Vibrio* spp. Ovisno o vrsti te bakterijskoj virulentnosti i patogenom potencijalu, Forsman i suradnici govore o tome kako *F. tularensis* VBNC stanice nisu bili u mogućnosti reanimirati te iste nisu pokazivale virulenciju kod miševa [67].

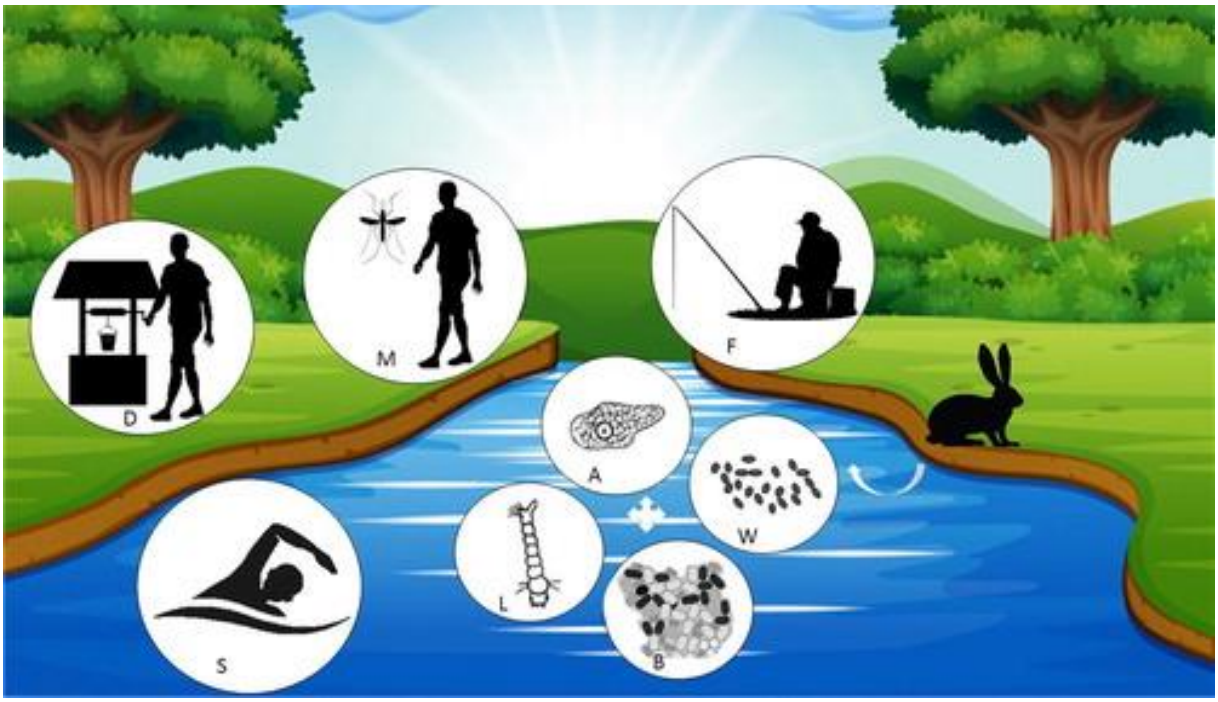
8.2. Preživljavanje u biofilmovima

Stvaranje biofilma, radi zaštite i opstanka samih bakterija, smatra se kao jedan od bitnih mehanizama za preživljavanje. Mnogo je vrsta koje u vodenom okolišu stvaraju biofilm nastojeći tako preživjeti, a neke od njih su *V. cholere*, *L. pneumophila, Helicobacter pylori* te *P. aeruginosa*. Dokazano je da su sojevi *holarctica, tularensis* te vrste *F. novicida* i *F. philomiragia* također

eksperimentalno sposobni da stvore biofilm. *F. novicda* sposobna je stvoriti biofilm (Slika 3) na plastici, dok *F. philomiragia* više stvara biofilm na 25 °C, nego na 37 °C, što se podudara s njezinim akvatičkim rezervoarom. Prema dosadašnjim saznanjima, u prirodnom vodenom mikrokozmosu *Francisella* biofilm još nije opisan [67].

8.3 Preživljavanje u komarcima

Jedan od dugotrajnih rezervoara *F. tularensis* predstavljaju i ličinke komaraca, gdje je pokazano da iste mogu progutati bakterija koja, zatim, preživljava različite faze sazrijevanja sve do odraslog komarca. Zemlje koje tijekom godina imaju problem s komarcima, kao prijenosnicima tularemije (Slika 3), su Finska i Švedska, no treba naglasiti da se odrasla jedinka komarca može zaraziti i putem kontaminirane krvi, gdje izvor tularemije nije više voda [67].



Slika 3. Prikaz potencijalnih izvora zaraze u vodenom okolišu, kao i određenih rezervoara *F. tularensis*. Čovjek se može zaraziti na različite načine: pijući kontaminiranu vodu (D), prilikom plivačkih aktivnosti (S), ugrizom komaraca (M) i putem ribolova (F). Bakterija preživljava u vodi (W), biofilmu (B), ličinki komarca (L) i u amebi (A). (Hennebique, Boisset, Maurin, 2019.)

9. *Escherichia coli*: ekologija i javno zdravstvo

Theodor Escherich je u svojoj publikaciji iz 1885. godine izvijestio o izolaciji kratkih štapića iz dječje stolice, nazvavši ih *Bacterium coli communne*, a 70-ak godina kasnije bakterija dobiva puno ime po kojemu je danas i raspoznajemo [70]. Fakultativno-anaerobna, mezofilna *E. coli*, kao gram-negativna bakterija u obliku štapića, svrstana je u porodicu *Enterobacteriaceae* u razred *Gammaproteobacteria*. Rod *Escherichia* sadrži nekoliko bakterijskih vrsta, no samo je jedna vrsta značajna za humanu medicinu, a to je *Escherichia coli*. Unutar spomenute vrste nalaze se mnogi, po ljude opasni, sojevi gdje neki od njih sadrže i kapsulu i flagele što povećava njihovu virulenciju i čini ih pokretnima. *E. coli* je danas dobro proučena bakterija i uvelike se koristi kao model kod genetskih manipulacija. Analiza sekvenci genoma PCR-om prvi je puta prijavljena 1997. i od tada bilježimo 4800 gena *E. coli*. Bakterija ima važnu ulogu u biološkom inženjerstvu jer je obično dobar model u rekombinantnoj tehnologiji, a jedan od prvih primjena iste je proizvodnja inzulina za dijabetičare pomoću genetske bakterijske manipulacije. Isto tako bakterija se može koristiti kao „tvornica“ za proizvodnju znatnih količina proteina i DNK. Bakterija ima karakteristike prilagodbe na različite životne uvjete i mogućnost brzog rasta, zbog čega je prikladna za izučavanje evolucije mikroorganizama. Iako su se prikupila opširna saznanja glede laboratorijskih istraživanja *E. coli*, znanje o ovoj bakteriji u okolišu i nije toliko široko. Kao koliformna bakterija i uobičajeni stanovnik gastrointestinalnog trakta ljudi i životinja, koristi se kao indikator fekalnog zagađenja (FIB) u procjeni kakvoće vode i hrane te potencijalni pokazatelj postojanja patogenih sojeva, odnosno patotipova. Međutim, određene su studije pokazale da specifični sojevi mogu stvarati mikrobne zajednice u okolišu i samim time stvaraju mogućnost dugoročnog preživljavanja u vanintestinalnom okruženju, što dovodi u pitanje pouzdanosti pokazatelja *E. coli* kao fekalnog indikatora. Iako je *E. coli* neškodljiv stanovnik crijeva, patogeni sojevi izazivaju različite probleme, a najčešće su to izvanintestinalna mjesta poput, krvotoka, središnjeg žičanog sustava ili mokraćnih puteva te

gastrointestinalnog trakta. Iako, nemaju svi patogeni jednak javnozdravstveni profil, svi oni predstavljaju izazove ljudskom zdravlju i veliki su potencijalni uzročnici bolesti [69,70].

9.1. *E. coli* kao ljudski patogen

E. coli ne uključuje samo komenzalne sojeve, već i patogene kao uzročnike različitih ljudskih bolesti. Patogenost određenog soja ovisna je o različitim čimbenicima virulencije, gdje se, na temelju površinskih antigena i mogućnosti stvaranja toksina, mogu dijagnosticirati. Patogeni se sojevi mogu podijeliti, na temelju kliničke slike i patoloških stanja koje uzrokuju, u dvije skupine, a to su crijevne i izvancrijevne infekcije [71]. Sojevi, kao uzročnici izvancrijevnih infekcija (*engl*. Exstraintestinal phatogenic *E. coli*, Expec), uglavnom su domaćini crijevne flore zdravih životinja, a možemo ih podijeliti u četiri serotipova: ptičji patogeni soj (*engl.* Avian phatogenic *E. coli,* APEC), uropatogeni soj (*engl*. Uropatogenic *E. coli,* UPEC), septikemijski soj (*engl.* Septicaemia associated *E. coli*, SePEC) i soj kao uzročnik meningitisa u djece (*engl.* Newborn meningitic *E. coli,* NMEC). Mogu uzrokovati infekcije mokraćnog sustava i rana, upalu pluća, meningitis kod novorođenčadi, osteomijelitis, apscese te sepsu. Crijevne patogene možemo klasificirati prema specifičnostima u njihovoj patogenezi, a posebno treba istaknuti one koji imaju mogućnost stvaranja citotoksina, kao inhibitora sinteze proteina u eukariotskih stanica, a uobičajeno ih nazivamo verotoksinima (VT) koji utječu na Vero stanice i Shiga toksinima (STX) koji su slični onima u *Shigella dysenteriae*. Sojevi koji stvaraju Shiga toksin nazivamo STEC (*engl.* STX producting *E.coli*), a one koji produciraju verotoksine VTEC (*engl.* VT producting *E. coli*). VTEC infekcije povezane su s verotiksičnom *E. coli* O 157:H7, a bolesti se manifestiraju posebice kod male djece i starijih osoba izazivajući hemoragijski kolitis te hemolitički uremijski sindrom [72].

Crijevni patogeni *E. coli* posjeduju određene čimbenike virulencije zbog čega ih i nazivamo patotipovi. U tu skupinu ubrajamo enterotoksičnu (ETEC), enteropatogenu (EPEC),

enteroagregativnu (EAEC), enteroinvazivnu (EIEC), enterohemoragičnu (EHEC,STEC) te difuzno adherentnu *E. coli* (DEAC) [71].

Enterotoksična *E. coli* (ETEC) posjeduje dva termolabilna toksina, kao činitelja virulencije, a uglavnom kolonizira tanko crijevo čovjeka, koza, goveda, psa te svinja. Klinička slika obično podrazumijeva vodenasti proljev kod dojenčadi i male djece, a posebno je česta za zemlje u razvoju. Poznata je i pod imenom „proljev putnika“, a prenosi se s kontaminiranom hranom ili vodom. Stečena imunost, na ovaj patotip, nije rijetkost pa pojavnost bolesti kod odraslih nije moguća [69,71].

Enteropatogeni tip (EPEC) na svojoj membrani posjeduju pile te protein intimin kao glavni i odgovorni za izazivanje dijareje. Domaćini su najčešće djeca na području razvijenih zemalja, a mogu biti i domaće životinje poput psa, mačke, konja ili kunića. Zbog obilnih proljeva može doći do dehidracije i naposljetku, smrti [71].

Enteroinvazivni soj (EIEC) uglavnom napada djecu mlađu od 5 godina, odrasle, imunokompromitirane te putnike. Nastanjuje debelo crijevo izazivajući vodenast proljev, s mogućnošću prelaska u dizenterični sindrom koji je popraćen krvlju u stolici. Također, ima potencijal da izazove hemolitički-uremički sindrom (HUS) [69,71].

Enteroagregativna *E. coli* (EAEC) i difuznoagregacijski sojevi (DAEC) posjeduju fimbrije kojima se bakterija uspješno adherira i vrši agregaciju na epitelne stanice tankog crijeva, a dodatni čimbenik virulencije im je i plazmidni toksin. Obično kolonizira probavni trakt kod male djece u nerazvijenim zemljama uz pojavu vodenastog proljeva, kojeg još nazivamo i proljevom putnika [71].

Enterohemoragična *E. coli* (EHEC) poznata kao i VTEC ili STEC posjeduje pile te Shiga-toksin 1 i 2 kao skupinu virulentnih čimbenika kojima izaziva vodenaste proljeve koji postaju krvavi (hemoragični kolitis), a u 10% slučajeva može nastati hemolitičko-uremijski sindrom (HUS) i naposljetku zatajenje bubrega [69,71].

Najpoznatiji serotip EHEC sojeva je zloglasna *E. coli* O157:H7 čiji je Shiga-toksin, kao produkt spomenutog serotipa, prepoznat tek 1982. te od tada postaje važan zdravstveni problem zbog učestale kontaminacije hrane i vode. Uz jake grčeve i proljev izaziva i hemolitički kolitis te HUS što se očituje kao sekundarna pojava trombocitopenije, hemolitičke anemije i zatajenja bubrega. Čvrsta potrbušnica primarni je dijagnostički pregled kod zaraze jer toksin uzrokuje crijevni vaskulitis i upalu. Epidemiološkim istraživanjima utvrdilo se da je glavni rezervoar serotipa upravo domaća stoka, nakon što je, posebice kod goveda, izbila enterohemoragična dijareja. Prenosi se feko-oralnim putem, a najčešće konzumacijom nedovoljno termički obrađenog mesa te mlijeka. Također mogući je i prijenos preko vode, povrća i voća te nepasteriziranih pića. Uzrok je tome sekundarno onečišćenje prilikom gnojidbe obradivih površina kontaminiranih sa serotipom O157:H7 [73].

9.2 Rast i preživljavanje *E. coli* u prirodnom okolišu

Donedavno se je smatralo da *E. coli* nema sposobnost preživljavanja, odnosno mogućnost razmnožavanja izvan domaćina, no određene su studije pokazale upravo suprotno. Istraživanja ističu da bakterija, izvan crijevnog trakta, može ne samo preživjeti, već se i razmnožavati u tlu, pijesku, te sedimentu tropskih, suptropskih i umjerenih klima. Određeni se tipovi *E. coli* mogu naturalizirati, odnosno postati dio normalne flore u sredinama u kojima se nalaze. Byappanahalli i suradnici otkrivaju jedan od najčešćih patogenih gena u okolišu koji kodira intimin EPEC-a, a to je *eaeA* gen koji je otkriven u morskoj vodi na nakupinama alga *Cladophora*. Isto tako, na morskim plažama, pomoću qPCR-a, otkriveni su *ftsZ, uidA* i *eaeA* geni specifični za *E. coli*, što sugerira da, kada uvjeti postanu povoljni, bakterija može rasti u takvim okruženjima i imati utjecaj na kakvoću morske vode. Primijećeno je da određeni enterički patogeni, koji se mogu naći na povrtnim biljkama, imaju sposobnost kolonizacije povrća jer uključuju slične gene koje su im potrebne pri kolonizaciji crijeva

domaćina [70]. Također, otkriveni su i različiti geni koji čine bakteriju otpornom na određene antibiotike. To su bili sojevi izolirani iz okoliša, odnosno iz rijeke Yeongsan u Južnoj Koreji. Znanstvenici su utvrdili da se serotipovi *E. coli,* koji se nalaze u samom sedimentu rijeke, genetski razlikuju od onih koji se nalaze slobodni u vodi. Isto tako, su primijetili da za vrijeme ljetnih mjeseci, odnosno za vrijeme kišne sezone kada je protok vode veći, dolazi do resuspendiranja sedimenta i same vode te bakterije imaju mogućnost da međusobno razmjenjuju gene, a samim time se povećava broj genotipova *E. coli*. Osim resuspendiranja sedimenta i vode, na veću raznolikost genotipova u ljeti u odnosu na zimske mjesece utječe temperatura i veći izvor hranljivih sastojaka. Osim toga, neprekidno unošenje fekalija, bilo ljudskih ili životinjskih, također može biti uzrok genetskih promjena, štoviše adaptivnih mutacija populacijske genetike *E. coli*. Međutim, podaci o tome kako se populacije *E. coli* prilagode ovisne o okolišu trenutno nisu dovoljni za potpuno objašnjenje situacije [74].

Nekoliko je važnih okolišnih faktora koji utječu na rast i preživljavanje *E. coli*, a oni mogu biti biotičke ili abiotičke prirode. Abiotski faktori uključuju dostupnost hranljivih tvari i vode, temperaturu, pH te sučevo UV zračenje. Biotski faktori, pak uključuju sposobnost bakterije da nabavlja hranu, prisutnost drugih mikroba i njihova međusobna borba te stvaranje biofilmova u okolišu koji ih okružuje [70].

Kao najvažniji faktor koji utječe na rast i preživljavanje *E. coli* je temperatura. 36-40 °C optimalna je temperatura za stanični rast koje posjeduju i životinje i ljudi, no postoje temperaturne amplitude na koje se bakterija uspješno prilagodi. Kad se bakterija nađe u prirodnom okruženju, brže odumire na višim temperaturama (>30 °C), negoli na hladnim (<15 °C). Primjer toga je preživljavanje *E. coli* u liofiliziranim algama na 4°C pohranjene u plastične vrećice u razmaku od 6 mjeseci, što pokazuje da bakterija može preživjeti dugo vremena i na temperaturama nižim od onih u sisavaca. Isto tako, određeni sojevi u tlu preživljavaju dulje na fluktuirajućim temperaturama, nego na stalnim toplim temperaturama. Iako, fluktuacija temperatura i bakterijsko preživljavanje ovisi o serotipu, što

je i dokazano, jer *E. coli* O157:H7 ima veću stopu preživjelih na stalnim temperaturama bez velikih amplituda [70].

Previše soli ili šećera smanjuje aktivitet vode koji kontrolira mogućnost bakterijskog rasta. Poznato je da kod velikih suša baterije naprežu svoje mehanizme da bi prilagodile membranu i reguliraju gena koji bi im omogućili prilagodbu na surove uvjete. Ustanovljeno je da je isušeno tlo negativno utjecalo na bakterijski rast, dok je nakon rehidratacije bakterija pokazala pozitivni porast iz čega se da zaključiti da voda ima značajnu ulogu u životnom ciklusu *E. coli* [70].

Istraživanje, na divljem tipu *E. coli* i dvostrukom mutantu *E. coli* nakon što su ih podvrgnuli hipoosmotkom šoku, pokazalo je da stanice povećavaju svoj volumen koji je proporcionalan intezintetu šoka. Nadalje, kod koncentracije soli od 450 mM divlji tip uspijeva oporaviti vlastite stanice nakon svakog hipoosmotkog šoka, dok dvostruki mutant to ne uspijeva te na 650 mM NaCl stanice počinju odumirati. Kod divljeg tipa stanice gube prekomjernu količinu vode na spomenutoj koncentraciji od 650 mM NaCl koju zatim nadoknađuju uzimanjem kalija iz okoline i čime postepeno obnavljaju vlastiti volumen [80].

Dostupnost nutrijenata kao što su dušik, ugljik i fosfor od esencijalne je važnosti za opstanak bakterije. Prirodno okruženje nudi manje hrane, nego naprimjer, epitel crijeva domaćina, stoga je *E. coli* razvila mehanizme gdje može razgraditi čak i aromatske spojeve ne bi li došla do ugljikovih spojeva [70].

Određeni sojevi preživljavaju selektivno ovisno o pH okolišnog tla. Uglavnom sojevima *E. coli* odgovara viši pH, no to nije slučaj za serotip O157:H7. On više vole kiselu sredinu kao acidofilne bakterije. *E. coli,* da bi se oduprjela niskom pH koristi mehanizme kao što je sistem otpornosti na kiseline ovisne o dekarboksilazi / antiporistu [70].

Stvaranje biofilma u vodenom okruženju dobro je poznat čimbenik opstanka bakterije u takvom okolišu. Biofilm bakterije štiti od isušivanja, UV zračenja, raznih kemikalija i dezinficijensa te

protozao. Biofilm je, također jedna vrsta širenja samih bakterija po prirodnom staništu, što ukazuje da se bakterija može tako prenositi na alternativna mjesta bez određenog dokaza da je izvor toga fekalna kontaminacija [70].

Kada govorimo o utjecaju drugih mikroorganizama na postojanost *E. coli*, bitno je spomenuti da na broj *E. coli*, bilo u vodenom okolišu ili zemlji, utječu predatori poput protozoa i virusa koji imaju mogućnost lizirati bakterijske stanice te antagonizam i borba za hranljive tvari s drugim bakterijama. Prema određenim istraživanjima pokazalo se da *E. coli* u slatkovodnoj vodi slabije preživljava, negoli u morskoj vodi te da sunčeva svjetlost često bude glavni faktor kod ranih faza raspadanja dok je biotička uloga veća u kasnijim fazama odumiranja bakterija [75]. *E .coli* također se natječe s drugim mikrobama za izvore hranljivih tvari i brani se od antagonizma, a to potvrđuje i istraživanje da su vrste *E. coli* bolje rasle u sterilnom tlu, nego u sterilnom [70]. Isto tako, na genetske osobine *E. coli* utječu okolišni uvjeti u kojima bakterija obitava. Prema istraživanju okolišni se sojevi razlikuju od enteričkih, koji nastanjuju GI-sustav toplokrvnih sisavaca. Filogenetskom analizom genoma određenih sojeva ustanovljeno je da sojevi adaptirani na okolišne uvjete na koje utječu biotski i abiotski faktori, bolje preživljavaju u vanjskom okruženju nego u crijevu čovjeka. Pokazano je i da populacije okolišnih sojeva *E. coli* međusobno razmjenjuju gene, ali ne i sa sojevima unutar probavnog sustava čovjeka što ukazuje na moguće ekološke prepreke glede protoka gena [70].

Kao što je već navedeno, postoje ekološki sojevi koji su prilagođeni preživljavati i razmnožavati se u okolišu i oni fekalnog porijekla koji se međusobno genetski razlikuju. Prisutnost ekološke *E. coli* može dovesti u pitanje metodu za ispitivanje kakvoće vode u kojoj se *E. coli* koristi kao indikator fekalnog onečišćenja, jer trenutna metoda ne može razlikovati porijeklo *E. coli* i bilo bi je poželjno poboljšati radi kvantifikacije samo *E. coli* fekalnog porijekla [70].

10. Cilj rada

Cilj istraživanja bio je odrediti kako *Escherichia coli* utječe na preživljavanje i razmnožavanje *Francisella novicida* u vodenom okruženju.

Isto tako, pratila se kinetika rasta u sterilnim i nesterilnim uzorcima morske i slatkovodne vode s ciljem da se utvrdi razmnožava li se *F. novicida* i *E. coli* bolje u prisutnosti autohtone mikrobiote ili bez prisutnosti ostalih mikroorganizama.

Također, prateći kinetiku rasta u sterilnim uzorcima, cilj je bio uvidjeti vlada li određeni komenzalizam prilikom zajedničkog uzgoja obiju vrsta ili *F. novicida* i *E. coli* bolje uspijevaju zasebno.

11. Materijali i metode

11.1 Materijali

11.1.1.Bakterijski sojevi

Prilikom izvedbe eksperimentalnog rada koristio sam bakterijski soj *F. novicida* U112. Bakterijski soj U112 vrlo je pogodan za laboratorijska istraživana ne pokazujući virulentnost prema ljudima čime ne predstavlja opasnost za osoblje. *F. novicida* kao visoko virulentna za zamorce i miševe odličan je model prilikom istraživanja humane tularemije. Isto tako koristio sam bakterijsku vrstu *E. coli* čiji soj nismo identificirali.

11.1.2. Hranljive podloge

Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar

Za uzgoj bakterijskog soja U112 koristio sam BCYE agar (*engl.* Buffered Charcoal Yeast Extract). Agar pogoduje rastu *F. novicida* jer sadrži, kao važan izvor energje i ugljika, aminokiseline treonin i L-cistein. Sadrži i kvaščev ekstrakt koji služi kao izvor proteina i vitamina te aktivni ugljen koji sprečava oksidaciju L-cisteina i detoksicira te apsorbira produkte razgradnje masnih kiselina. Za dodatnu modifikaciju hranljive podloge pobrinuo se Edelstein koji mu je dodao tvar α-ketoglutarat čime medij postaje više osjetljiv stimulirajući pritom veći rast bakterija. Agar također sadrži i ACES (N-2-acetomido-2-aminoetan sulfonska kiselina), željezov pirosulfat i colistin koji dodatno pospješuju rast bakterija (Slika 4) [81].



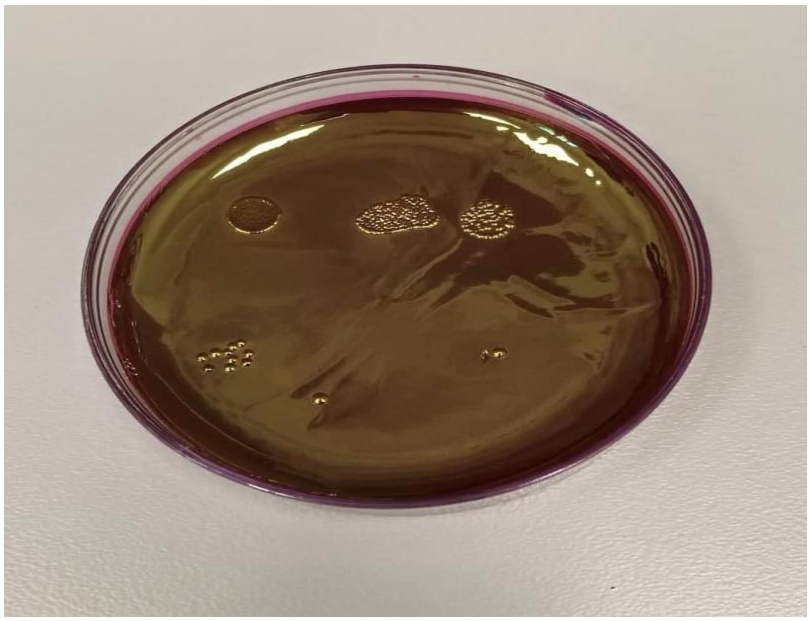
Slika 4. Prikaz pozitivnog porasta *F. novicida* i *E. coli* na BCYE podlozi

11.1.3. TTC (Triphenyltetrazolium chloride) Tergitol-7 agar

TTC agar selektivna je podloga za brojanje koliformnih bakterija, a samim time i *E. coli* čiju izolaciju je dodatno razvio Chapman poboljšavši spomenutu podlogu. Chapmanova formula za pripremu medija sadrži Tergitol 7, proteozni pepton br. 3, ekstrakt kvasca, laktozu i bromotimol plavo čime se postiže neograničeni razvoj koliforma i pritom inhibira rast gram pozitivaca i *Proteus spp*. Medij se obično koristi prilikom izolacije koliforma iz hrane i vode. Za vodeni medij koristi se membranska filtracija koja se bazira na prolaženju određene količine uzorka vode kroz filter koji se zatim stavlja na TTC agar te se na taj način kvantifikaciju bakterije. Agar sadrži natrij heptadecil sulfat (Tergitol-7) kao selektivno sredstvo koje djeluje inhibitorno na gram pozitivne bakterije, bromtimol plavo koji služi kao indikator prilikom fermentacije laktoze i trifenil tetrazolijev klorid koji se može reducirati u formazan. Nastale laktoza pozitivne kolonije inkubirane na 37 °C tijekom 24 h daju specifičnu žuto-narančastu boju jer slabo reduciraju TTC za razliku od gram- pozitivnih bakterija koje reducirajući ga daju tamno-crvene kolonije [82].

11.1.4. LES endo

Mikrobiološki medij svijetlo ružičaste boje prvenstveno se koristio za izolaciju *Salmonella typhi*, a danas se koristi za određivanje broja ukupnih koliforma. Većina gram-negativnih bakterija ima pozitivan porast dok rast gram-pozitivaca bude inhibiran. Podloga sadrži vitamine, minerale, dušik te peptone kao izvor ugljika. Za rast bakterija potreban je vitamin B-kompleksa, a izvor istog ekstrakt je kvasca. Fosfat u obliku K_2HPO_4 djeluju kao pufer dok natrij-klorid održava osmotsku ravnotežu medija. Kao pH indikator dodaje se fuksin, a za dekolorizaciju istog koristi se natrij-sulfit. U ovom mediju koliformi fermentiraju laktozu, stvarajući zeleni metalni sjaj (npr. *E. coli*) dok laktoza nefermentirajuće bakterije tvore bezbojne i čiste kolonije. Aldehid, kao produkt laktoza fermentirajućih bakterija, vrlo brzo razlaže laktozu pri čemu nastaje specifični metalni sjaj (slika 5) [83].



Slika 5. Prika pozitivnog porasta *E. coli* na Les endo podlozi

11.1.5. Prilikom eksperimentalnog rada uz spomenute bakterijske vrste koristilo se slijedeće:

- uzorak morske vode (Jadransko more)
- uzorak slatkovodne vode iz jezera Potkoš
- Sartorius uređaj za membransku filtraciju vode
- Vakuum pumpa
- Membranski filter
- Bunsenov plamenik
- Multikanalna pipeta od 200 µL
- Pipeta od 20 µL
- Tresilica
- Spektrofotometar (Eppendorf, Biophotometar)
- Mikrotitarska pločica
- Kivete i epruvete

11.2. Metode

11.2.1. Postupak rada na Sartorius uređaju za membransku filtraciju

Prije postupka membranske filtracije iz uzoraka mora i jezera izdvojili smo po dvije litre iz svakog te stavili u autoklav na sterilizaciju pri 121 °C na 15 minuta da bi dobili sterilnu vodu potrebnu za daljnja istraživanja. Da bi filtracija bila uspješna potrebno je prije postupka sterilizirati uređaj za filtraciju pri čemu smo koristili Bunsenov plamenik. Sam postupak membranske filtracije koristio se kako bi se iz prikupljenih uzoraka izolirao koliform *E. coli* potreban za daljnja istraživanja.

Plamenom se sterilizira svaki dio lijevka, poklopca, držača filtera te frita. Zatim je potrebno staviti membranski filter (0,45 μm) na središte frita, vratiti lijevak na držač te usuti 100 mL svakog uzorka u dva lijevka. Nakon toga otvaramo ručkice i uključujemo vakuum pumpu. Pri završetku filtracije isključujemo vakuum pumpu te uklanjamo filtere s držača, a sterilnom pincetom stavljamo filter na TTC hranljivu podlogu. Postupak se za oba uzorka ponovio dva puta. Nakon 48 h na temperaturi od 37 °C porasle bakterije *E. coli* koriste se za pripremu bakterijske suspenzije.

11.2.2. Priprema bakterijske suspenzije

Bakterijski soj *F. novicida* U112 izvadi se s temperature skladištenja od -78 °C te se nasadi pomoću sterilne eze na BCYE agar i nakon 48 h pri temperaturi od 37 °C koristi se za pripremu suspenzije. Mala količina poraslih kolonija uzima se brisnim štapićem i umuti u 3 mL fiziološke otopine, a zatim se 450 μL prenosi u kivetu da bi se izmjerila apsorbancija. Kao slijepa proba koristi se sama fiziološka otopina. Spektrofotometrom izmjerena apsorbancija suspenzije s bakterijskim sojem *F. novicida U112* iznosila je 1,001 dok je apsorbancija bakterijske suspenzije *E.coli* iznosila 1,069. Optička gustoća („OD“) približna je broju 1 u obje suspenzije, odnosno broj bakterija je $\approx 10^9$ CFU/mL. Nakon pripremljene suspenzije izračunao se volumen od 50 μL koliko je bilo potrebno dodati u 50 mL uzorka da bi uzorci sadržavali željenih 10^6 CFU/mL. U svaki uzorak, od ukupno 12, dodane su zasebno i u kombinaciji pripremljene suspenzije.

11.2.3. Priprema uzoraka i nasađivanje bakterija na hranljive podloge

Uzorci vode uzorkovani su s jezera Potkoš (Fužine) te iz mora u blizini Riječke luke. Na početku samog eksperimentalnog dijela od svakog uzorka izdvojili smo 2 L i sterilizirali u autoklavu 15 minuta na 121 °C. Također, pomoću Sartorius uređaja za membransku filtraciju izolirali smo *E.*

coli iz uzorka mora koja je porasla na TTC agaru, dok je TTC podloga s uzorkom jezera bila negativnog porasta. Bakterijski soj *F. novicida* U112 sa -78 °C gdje je čuvan u glicerolu, odmrznuli smo na 25 °C i nasadili na BCYE podlogu. Nakon pripremljenih suspenzija potrebno je bilo prirediti 12 uzoraka. Svaki uzorak morske i slatkovodne vode dodan je u epruvetu od 50 mL u koju se zatim inokulirala određena bakterijska vrsta u količini od 50 µL iz prethodno pripremljenih suspenzija. Šest uzoraka pripremljeno je sa sterilnom, a sljedećih šest s uzorkovanom morskom i jezerskom vodom. U triplet uzoraka sterilizirane morske vode dodane su bakterije *F. novicida* i *E. coli*. U prvi uzorak dodana je samo *F. novicida*, u drugi samo *E. coli*, dok su u treći dodane u kombinaciji. Istim redom dodavane su tako u 3 uzorka sterilizirane vode iz jezera, a isto tako u prikupljene uzorke morske i slatkovodne vode koje nisu bile sterilne. Nakon tako pripremljenih uzoraka radila su se deseterostruka razrjeđenja u triplikatima mikrotitar jažica. U prvi red jažica dodalo se 200 µL od svakog od ukupno 12 uzoraka što je predstavljalo nulto razrjeđenje. Zatim se u ostale jažice dodalo 180 µL fiziološko otopine, a potom se iz prvog reda jažica, multikanalnom pipetom, pipetiralo po 20 µL iz reda u red ne bi li razrijedili uzorke i lakše pratili kinetiku rasta bakterija. Nakon toga se po 10 µL nanosi na BCYE i Les endo agar krenuvši od najniže koncentracije prema najvišoj, a prije svakog nanošenja potrebno je resuspendirati uzorak. Isti postupak ponavlja se svakih 24 sata narednih 5 dana te se prati kinetika rasta. Na BCYE agar nanosilo se svih 12 uzoraka svakih 24 sata, dok su se na Les endo nanosili isključivo uzorci koji su sadržavali *E. coli* radi praćenja kinetike rasta iste i mogućnosti usporedbe rezultata dobivenih na BCYE podlozi. Na Les endo podlogu u volumenu od 10 µL nanosili su se redom uzorci: sterilizirani uzorak mora s inokuliranom *E. coli*, nesterilni uzorci mora sa *E. coli* i kombinacija *E. coli* i *F. novicida*, sterilan uzorak jezera s dodanom *E. coli* te uzorkovano jezero sa inokuliranom *E. coli* i kombinacijom *E. coli* te *F novicida*. Svaki dan kvantitativno se pratila kinetika rasta i bilježili rezultati.

12. Rezultati

12.1. Kinetika rasta *Francisella novicida* i *Escherichia coli* u morskoj vodi uzgajane zasebno

Bakterijski soj *F. novicida* U112 i *E. coli*, koju smo izolirali membranskom filtracijom iz morske vode, inkubirali smo na 37 °C u razmaku od 4 dana odnosno 5 brojanja. Iz uzoraka morske i slatkovodne vode pratili smo kinetiku rasta u sterilnim i nesterilnim uzorcima, od čega ih je ukupno bilo 12. Uzorci su sadržavali zasebno inokulirani soj *F. novicida* U112, zatim *E. coli* te obje bakterijske vrste zajedno koje smo nasađivali na BCYE i Les endo agar.

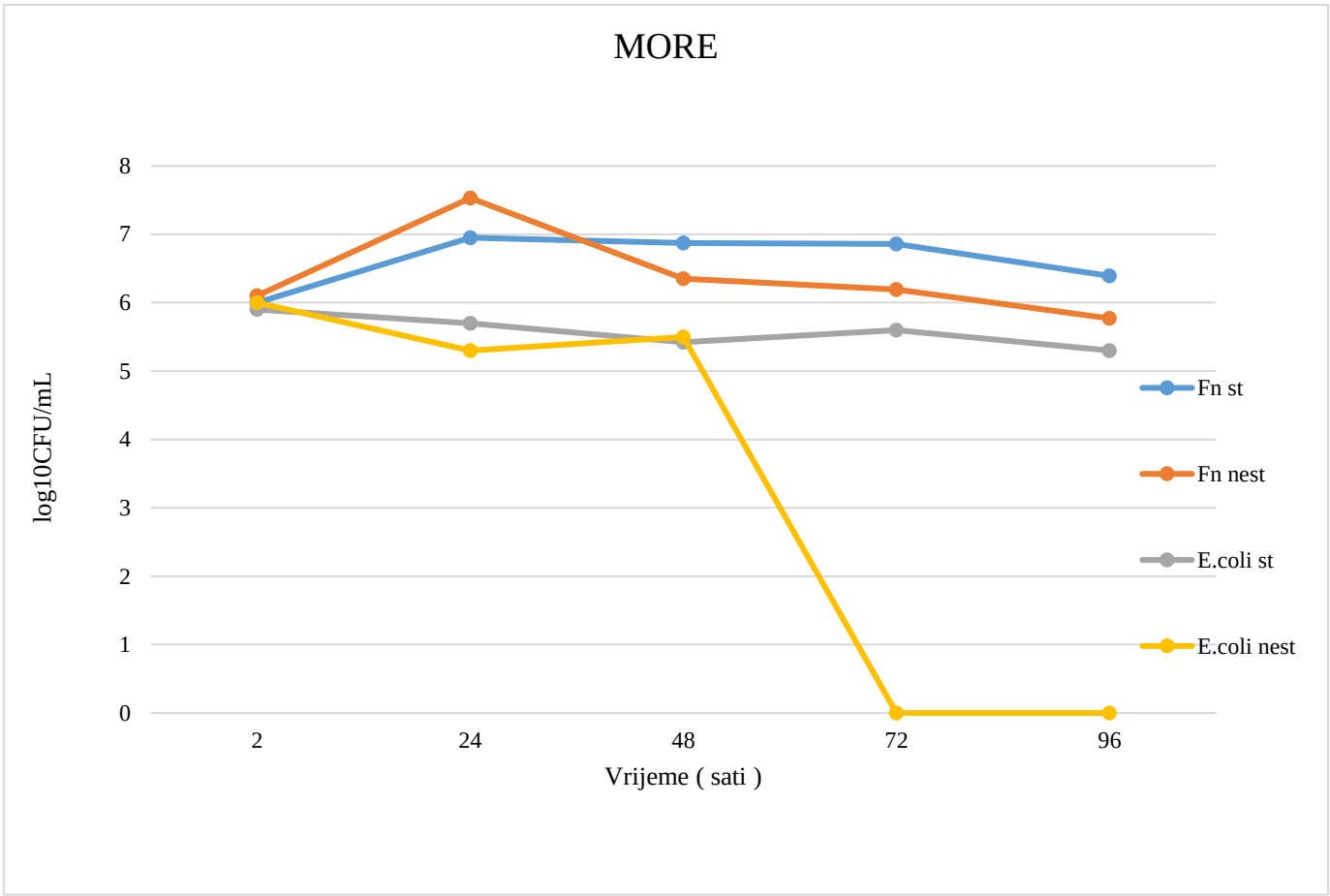
12.1.1. Sterilno more (BCYE agar)

Početna koncentracija bakterija, kojom je započeo eksperimentalni dio, iznosila je približno 10^6 CFU/mL. Dva sata nakon kultivacije na BCYE podlozi broj *F.novicida* u sterilnom moru iznosi 1,0x10^6 CFU/mL dok je *E. coli* nešto manje, 0,9x10^6 CFU/mL. 24 h nakon kultivacije vidljiv je porast broja *F. novicida* na 9,0x10^6 CFU/mL, dok je broj *E. coli* pao na 5,0 x10^5 CFU/mL. 2 dana nakon kultivacije uviđamo smanjenje broja *F. novicida* te 72 sata nakon inkubacije iznosi 5,5 x10^6 CFU/mL, dok je *E.coli* 4,0 x10^5 CFU/mL. 96 sati bilo je potrebno da bi broj *F. novicida* pao na 2x10^6 CFU/mL, a *E. coli* na 2x10^5 CFU/mL (Slika 6).

12.1.2. Nesterilno more (BCYE agar)

Nakon 2 sata inkubacije broj *F. novicida* i *E.coli* bio je 1,0x10^6 CFU/mL. Dan nakon, broj *F. novicida* iznosio je 3,4x10^7 CFU/mL, a broj *E. coli* je pao na 2,0x10^5 CFU/mL. Dva dana nakon inkubacije vidljivo je da broj *F. novicida* polako opada na 2,0x10^6 CFU/mL, dok broj *E. coli* varira i porasta na 5,0x10^5 CFU/mL. Broj *F. novicida* nakon 3 dana uzgoja opada na 5,0 x10^6 CFU/mL, a *E.*

coli više nije moguće izbrojiti. Četvrti dan uzgoja *F. novicida* broj se smanjuje na 2,9x10^5 CFU/mL, a negativni porast ostaje i dalje za *E. coli* (Slika 6).



Slika 6. Pokus je rađen u triplikatu, a grafikon prikazuje kinetiku rasta *E. coli* i *F. novicida* zasebno u sterilnom i nesterilnom moru u razmaku od 4 dana..

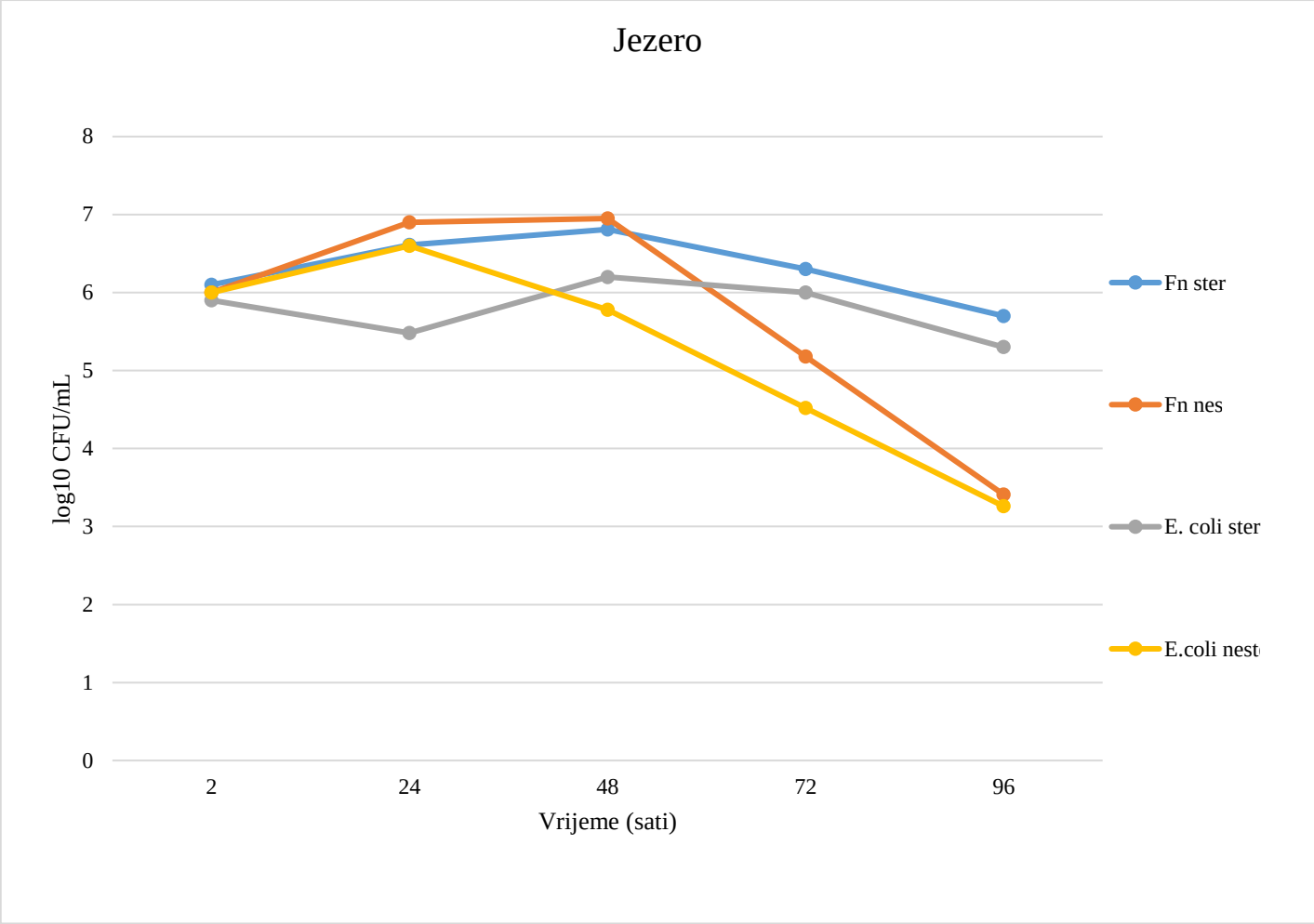
12.2 Kinetika rasta *Francisella novicida* i *Escherichia coli* u slatkovodnoj vodi uzgajane zasebno

12.2.1. Jezero sterilno (BCYE agar)

2 sata nakon inkubacije broj *F. novicida* iznosio je $1{,}1x10^6$ CFU/mL, a *E. coli* $0{,}9x10^6$ CFU/mL. 24 sata nakon bilježimo porast broja *F. novicida* na $4{,}1x10^6$ CFU/mL, dok broj *E. coli* pada na $5{,}0x10^5$ CFU/mL. $6{,}5x10^6$ CFU/mL bio je porast *F. novicida* nakon 2 dana, a vidljiv je i porast broja *E. coli* koji iznosi $1{,}6x10^6$ CFU/mL. Proteklih 2 dana vidljiv je pad broja u obje vrste te je 4 dan inkubacije broj *F. novicida* iznosio $5{,}1x10^5$ CFU/mL, a broj *E. coli* $2{,}0x10^5$ CFU/mL (Slika 7).

12.2.2. Nesterilno jezero (BCYE agar)

Broj *F. novicida* i *E. coli* nakon 2 sata inkubacije iznosio je $1{,}0x10^6$ CFU/mL. Dan nakon *F. novicida* brojčano raste na $8{,}0x10^6$ CFU/mL, a broj *E. coli* $4{,}0x10^6$ CFU/mL. 48 sati kasnije vidljiv je porast *F. novicida* na $9{,}0x10^6$ CFU/mL, dok broj *E. coli* opada na $6{,}0x10^5$ CFU/mL. Vidljivo je da nesterilno jezero ne pogoduje rastu bakterija pa broj *F. novicida* nakon 4 dana uzgoja pada na niskih $2{,}6x10^3$ CFU/mL, a *E. coli* bude još manje, svega $1{,}05x10^5$ CFU/mL (Slika7).



Slika 7. Pokus je rađen u triplikatu, a grafikon prikazuje kinetiku rasta *E. coli* i *F. novicida* zasebno u sterilnom i nesterilnom jezeru u razmaku od 4 dana.

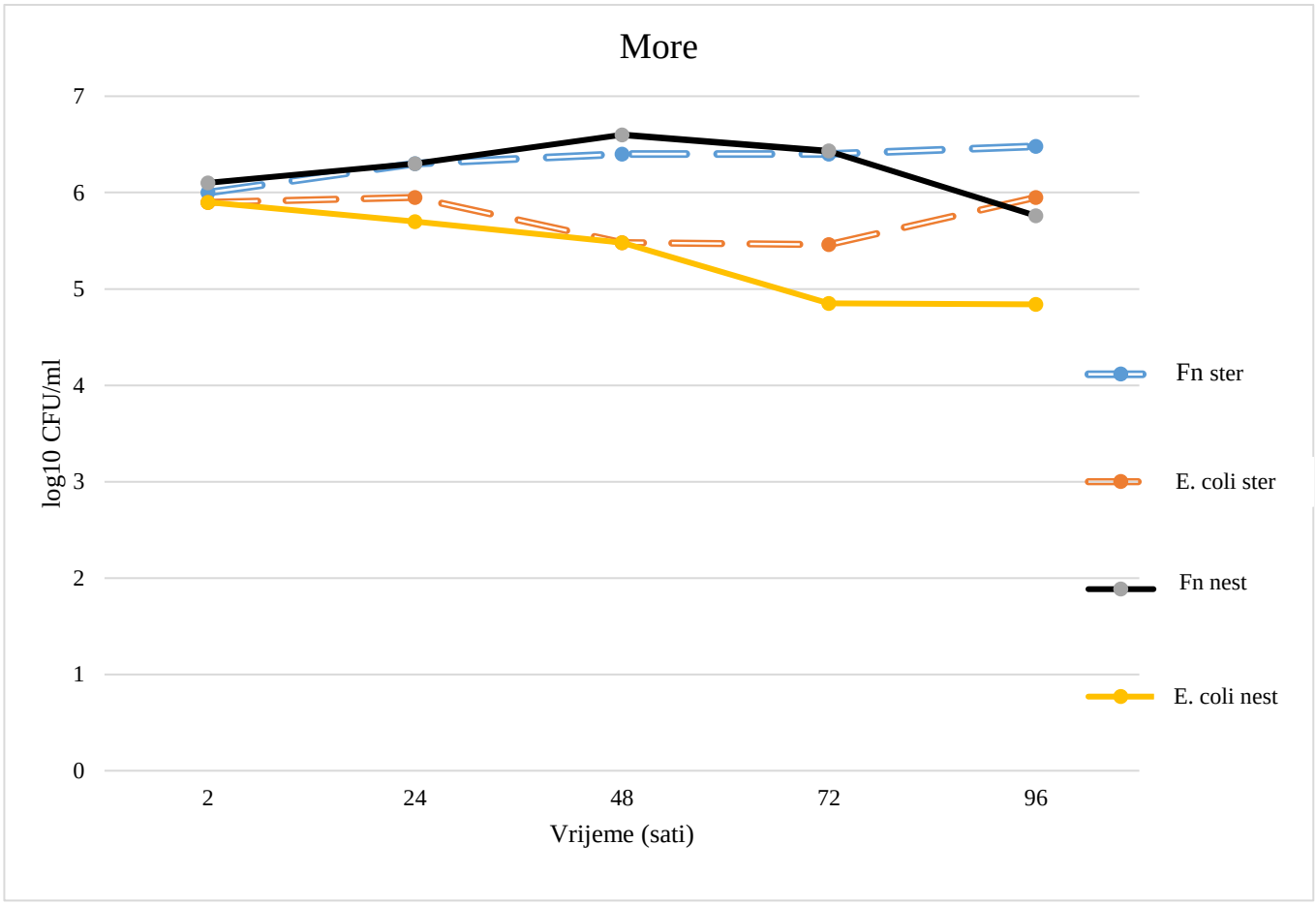
12.3. Kinetika rasta *Francisella novicida* i *Escherichia coli* uzgajane zajedno u morskoj vodi

12.3.1 Sterilno more

Pračenjem kinetike rasta *F. novicida* i *E. coli* može se primijetiti pozitivni porast u steriliziranom moru i zaključiti da takavo okruženje odgovora objem vrstama. 2 sata nakon inkubacije približno je broj i *F. novicida* i *E. coli* iznosio $1{,}0x10^6$ CFU/mL. Slijedećih je 24 sata broj *F. novicida* narastao nešto više ($2{,}0\ x10^6$ CFU/mL), nego *E. coli* čiji broj je iznosio $9{,}0x10^5$ CFU/mL. U narednih dva dana broj *F. novicida* neznatno je porastao na $2{,}5x10^5$ CFU/mL, dok je broj *E. coli* varirao i pao na $3x10^5$ CFU/mL. Zadnji dan inkubacije broja *F. novicida* iznosio je $3{,}0x10^6$ CFU/mL, a *E. coli* $9{,}0x10^5$ CFU/mL (Slika 8).

12.3.2. Nesterilno more

U nesterilnim uzorcima broj *F. novicida* i *E. coli* s vremenom opada. Nakon proteklih 24 sata inkubacije broj *F. novicida* iznosio je $2{,}0x10^6$ CFU/mL, a broj *E. coli* $5{,}0x10^5$ CFU/mL. Drugi je dan *F. novicida* bilo nesto više $4{,}0x10^6$ CFU/mL, dok broj *E. coli* pao na $3{,}0x10^5$ CFU/mL. U narednih dva dana broj bakterija vidno opada pa brojimo *F. novicida* $5{,}75x10^5$ CFU/mL, dok je brojčano *E. coli* još manje, a iznosi $7{,}0x10^4$ CFU/mL (Slika8).



Slika 8. Pokus je rađen u triplikatu, a grafikon prikazuje kinetiku rasta *E. coli* i *F. novicida* inkubirane zajedno u sterilnom i nesterilnom moru u razmaku od 4 dana.

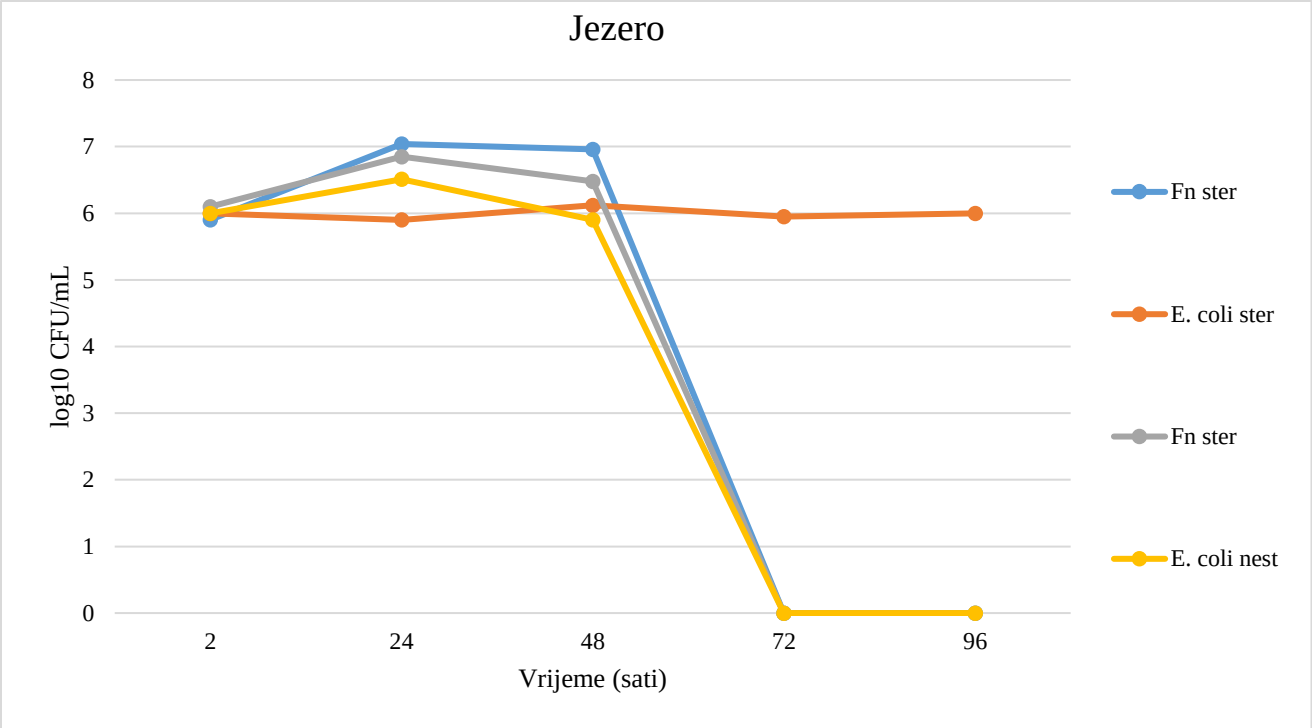
12.4. Kinetika rasta *Francisella novicida* i *Escherichia coli* uzgajane zajedno u slatkovodnoj vodi

12.4.1. Sterilno jezero

Nakon 2 sata inkubacije izbrojali smo *F. novicida* 0,9x10^6 CFU/mL, a *E.coli* 1,0x10^6 CFU/mL. 24 sata nakon pobrojano je *F. novicida* 11x10^6 CFU/mL te *E.coli* 8 x10^6 CFU/mL. Nakon proteklih 48 sati *F. novicida* je bilo 9,0x10^6 CFU/mL, a *E. coli* 1,3x10^6 CFU/mL CFU/mL. Treći i četvrti dan *F. novicida* više nije bilo moguće izbrojati, dok je broj *E. coli* porastao na 1,15x10^6 CFU/mL CFU/mL (Slika 9).

12.4.2. Nesterilno jezero

Brojeći bakterije *E. coli* i *F. novicida* nakon 2 sata inkubacije broj je iznosio 1,0x10^6 CFU/mL. Nakon proteklog dana broj *F. novicida* iznosio je 7,0x10^6 CFU/mL dok je *E. coli* bilo nešto manje, 3,25x10^6 CFU/mL. *F. novicida* je porasla na 3,0x10^6 CFU/mL nakon 48 sati inkubacije, a *E. coli* bilo je 9,77x10^5 CFU/mL. Proteklih 2 dana bakterije više nije bilo moguće izbrojati, odnosno broj *F. novicida* i *E. coli* pada na nulu (Slika 9).



Slika 9. Pokus je rađen u triplikatu, a grafikon prikazuje kinetiku rasta *E. coli* i *F. novicida* inkubirane zajedno u sterilnom i nesterilnom jezeru u razmaku od 4 dana.

Les endo podloga koristila se za uzgoj *E. coli* u sterilnom i nesterilnom moru i u sterilnom i nesterilnom jezeru te isto tako za nesterilne uzorke mora i jezera u koje su *F. novicida* i *E. coli* inokulirane zajedno. Kvantifikacija *E. coli* na spomenutoj podlozi poslužila je kao proba, odnosno usporedba broja bakterija sa onima kultiviranim na BCYA podlozi. Mnogi su se rezultati podudarali, a neki od njih poslužili su u praćenju kinetike rasta gdje nebi bilo moguće izbrojati bakterije zbog prevelike koncentracije istih i međusobnog prerastanja kolonija.

13. Rasprava

Nešto što je započelo, prije gotovo jednog stoljeća, opreznim istraživanjem bolesti nalik kugi pronađenoj u vjevericama iz kalifornijskog okruga Tulare, pokrenulo je niz kontinuiranih istraga koje ne prestaju ni danas. Sve je to dovelo do otkrića novog, jedinstvenog patogena *F. tularensis*. Opisuje se nova bolest koja se prenosi na sve moguće načine s različitom ekspresijom i pratećom kliničkom slikom. Isto tako, daju se odrađena objašnjenja prijenosa bakterije člankonošcima te pojašnjava životni ciklus i ljudske aktivnosti koje olakšavaju prijenos i postojanost patogena. Rod *Francisella* svrstava se u porodicu *Franciselaceae*, a dijeli se u pet različitih vrsta*: F. philomiragia, F. noatunensis, F. hispaniensis, F. tularensis* i *F. novicida*. Također, 3 su podvrste bakterije *F. tularensis*: *tularensis* (tip A)*, holartica* (tip B) te *mediasiatica* [10]. Brojna *in vitro* istraživanja pokazala su *F. tularensis* primarno napada makrofage, ali da se i uspješno razmnožava u plućnim stanicama epitela, hepatocitima, neutrofilima, stanicama mišjeg fibroblasta te protozoama gdje inducira upale, ometajući normalne funkcije domaćina zbog čega na posljetku i predstavlja javno zdravstveni problem izazivajući različite kliničke slike [38]. Kako bi definirali unutar stanični život *Francisella*, znanstvenici su koristili različite stanične modele miševa i ljudskih makrofaga te podvrste, kao što su to *F. novicida,* atenuirani *holarctica* LVS soj te virulentni Schu S4 soj [40,41]. Već 1930-ih u SSSR-u opisana je vodena tularemija, a vodena niša kao rezervoar bakterije. Posljednjih 20-ak godina bilježe slučajeve tularemije povezane s pitkom vodom, bočatom te morskom vodom iz mnogih različitih zemalja [67]. Najviše slučajeva bude na Sjevernoj polutci, koja je i glavno obitavalište za vrste iz roda *Francisella*. Dvije vrste koje su usko povezane uz vodeni okoliš i uglavnom izazivaju bolest u osoba koje su lošeg imunostatusa te su izloženi vodi su *F. novicida* i *F. philomiragia*. Nisu zabilježeni slučajevi identifikacije *F. novicida* kod člankonožaca i životinja, što sugerira da je jedini rezervoar ove vrste, vodeni okoliš. Zabilježeni su slučajevi zaraze putem slane, izvorske i bočate vode [68]. Također, isključivi domaćini organizama iz vodenog

okoliša su sojevi *noatunesis* i *orientalis* koji mogu preživjeti samostalno u vodi i nekoliko tjedana [68]. Istraživanja su pokazala da tip A i tip B te *F. novcida* preživljavaju relativno dugo u bočatoj vodi uz odgovarajuću temperaturu kao bitnog faktora, a pomoću određenih metoda utvrđeno je da su preci roda *Francisella* porijeklom iz morske vode [68]. Nekoliko je važnih okolišnih faktora koji utječu na rast i preživljavanje bakterija, a oni mogu biti biotičke ili abiotičke prirode. Abiotski faktori uključuju dostupnost hranljivih tvari i vode, temperaturu, pH te sučevo UV zračenje. Biotski faktori, pak uključuju sposobnost bakterije da nabavlja hranu, prisutnost drugih mikroba i njihova međusobna borba te stvaranje biofilmova u okolišu koji ih okružuje [70]. Prateći kinetiku rasta, naši rezultati pokazuju da brojčano ima najviše *F. novicida* u sterilnom moru, što potkrjepljuje postavljenu hipotezu. Kvantifikacijom *F. novicida* u nesterilnom moru, u kojoj je prisutna autohtona mikribiota Riječke luke iz kojeg se i vršilo uzorkovanje, pobrojano je manje kolonija u odnosu na sterilno more, što se i očekivalo obzirom da na broj bakterija utječu navedeni kako biotički tako i abiotički čimbenici. Iz navedenog, može se zaključiti da se mikroorganizmi međusobno bore za hranljive tvari, da vlada grabljivost i antagonizam posebice ako u vodama ima protozoa koje mogu lizirati bakterije. Da je bilo različitih vrsta mikroorganizama u našim prikupljenim uzorcima, pokazala je i membranska filtracija na Sartorius uređaju te pozitivan porast istih na TTC podlozi, ali nije se identificirala mikrobiota i moguća postojanost protozoa. Slična je situacija i kod slatkovodne vode uzorkovane iz jezera Potkoš. Sterilni uzorci sa inokuliranom *F. novicida*, gledajući rezultate, preživjeli bi duže i u većem broju u odnosu na nesterilno jezero. Također, može se primijetiti veći broj preživjelih *F. novicida* uspoređujući općenito slanu i slatku vodu, bila ona sterilna ili ne, iz čega se opet da zaključiti kako morski okoliš ima vrlo važan utjecaj na životni ciklus *Francisella*.

Naši se rezultati podudaraju s istraživanjem Berrande i Telforda iz američke savezne države Massachusets, koji su htjeli otkriti izvor pneumonične tularemije na otoku Marthas Vineyard (MV) i opstanak tipa A u bočatoj vodi. Dokazali su da salinitet pozitivno utječe na životni ciklus *Francisella*. Naime, usporedili su preživljavanje tipa A (SSTR9) i tipa B (LVS) te *F. novicida* U112 u bočatoj i

slatkovodnoj vodi te fiziološkoj otopini (0,9% NaCl). Prikupljeni uzorci iz površinskih voda MV dali su slijedeće rezultate. U slatkovodnoj vodi sva tri soja preživjeli su relativno kratko te su pokazivali negativni porast već nakon 8-10 dana. U bočatoj vodi najduže preživlajvaju sva tri soja, dok se tip B ističe kao najizdržljiviji, preživjevši 42 dana. U fiziološkoj otopini sojevi su preživjeli nešto manje u odnosu na bočatu vodu, a najdulje je živio tip A u razmaku od 24 dana. Da bi dobili odgovore na pitanje zašto je tome tako, analizirali su kvantitetu nutrijenata u slatkoj i bočatoj vodi te zaključili da bočata voda ima mnogo više magnezija, kalija, kalcija, natrija te sumpora negoli slatkovodna voda [68]. Relativno velike koncentracije sumpora, koji je bitan jer ga sadržavaju esencijalne aminokiseline cistin i cistein koje bakterije rabe kao hranu, objašnjavaju zašto sojevi dulje preživljavaju u bočatoj vodi nego u slatkoj, odnosno fiziološkoj otopini. Fiziološka otopina jest sterilna gdje druga mikrobiota nema utjecaj na preživljavanje sojeva, ali je relativno siromašna hranljivim tvarima. Primjećuje se i da divlji sojevi tip A i tip B duže preživljavaju u vodenom okruženju u odnosu na soj U112 kao laboratorijski model.

Da *Francisella* bolje preživljava u moru nego u slatkoj vodi te da je temperatura jedan od važnih čimbenika za opstanak, pokazuje istraživanje Revana i Sota. Oni su proučavali kako temperatura te filtrirana i nefiltrirana slatka, odnosno slana voda utječe na preživljavanje *F. noatunensis* subsp. *orientalis* izolirana iz bakalara i lososa. Kao parazit slatkovodnih riba, podvrsta *orinetalis* u razmaku od 334 sati najbolje raste na 20°C u slanoj vodi u odnosu na slatku vodu i temperature od 25°C i 30°C. Isto tako, zaključili su da bakterije bolje rastu u filtriranoj slanoj i slatkoj vodi u odnosu na nefiltrirane uzorke u kojima ima drugih mikroba, a moguće i virusa te protozoa koje napadaju bakterije [77].

Fakultativno-anaerobna, mezofilna *E. coli*, kao gram-negativna bakterija u obliku štapića, svrstana je u porodicu *Enterobacteriaceae* u razred *Gammaproteobacteria*. Rod *Escherichia* sadrži nekoliko bakterijskih vrsta, no samo je jedna vrsta značajna za humanu medicinu, a to je *Escherichia coli*. Iako su se prikupila opširna saznanja glede laboratorijskih istraživanja *E. coli*, znanje o ovoj

bakteriji u okolišu i nije toliko široko. Kao koliformna bakterija i uobičajeni stanovnik gastrointestinalnog trakta ljudi i životinja, koristi se kao indikator fekalnog zagađenja (FIB) u procjeni kakvoće vode i hrane te potencijalni pokazatelj postojanja patogenih sojeva, odnosno patotipova [69,70]. Crijevni patogeni *E. coli* posjeduju određene čimbenike virulencije zbog čega ih i nazivamo patotipovi. U tu skupinu ubrajamo enterotoksičnu (ETEC), enteropatogenu (EPEC), enteroagregativnu (EAEC), enteroinvazivnu (EIEC), enterohemoragičnu (EHEC,STEC) te difuzno adherentnu *E. coli* (DEAC) [71]. Najpoznatiji serotip EHEC sojeva je zloglasna *E. coli* O157:H7 koja producira Shiga-toksin, kao produkt spomenutog serotipa, a može izazvati hemolitički kolitis i zatajenje bubrega [73]. Znanstveno je utvrđeno da se bakterijski sojevi vrlo dobro prilagođavaju na okruženje u kojem se nalaze. Isto tako, utvrđene se adaptivne mutacije ovisno o tome nalaze li se sojevi u sedimentu rijeka/jezera ili slobodno žive u vodi. Prilagodba gena očituje se ovisno o temperaturnim uvjetima, pH okoliša te izvoru hranljivih tvari, a isto tako je prepoznata genetska raznolikost u sojeva koji su stanovnici GI-sustava te onih koji žive u okolišu. Međutim, podaci o prilagodbi populacija *E. coli*, ovisne o okolišu, trenutno nisu dovoljni za potpuno objašnjenje situacije [74]. Ustanovljeno je da je isušeno tlo negativno utjecalo na bakterijski rast, dok je nakon rehidratacije bakterija pokazala pozitivni porast iz čega se da zaključiti da voda ima značajnu ulogu u životnom ciklusu *E. coli* [70].

Preživljava li *E. coli* bolje u slatkim ili slanim vodama još nije do kraja razjašnjeno. Neki autori navode da to ovisi o sojevima i genetskoj adaptaciji na okruženje. Nayak i suradnici proučavali su postojanost genetskog markera LA35, kao indikatora fekalija peradi, uz patogene sojeve i FIB (enterokoki i *E. coli*) u optjecajnim vodama te su zaključili da se koncentracija *E. coli* u slatkoj i slanoj vodi nije previše razlikovala, odnosno u razdoblju od 7 dana broj bakterija je padao. U slatkovodnoj vodi bilježilo se nešto više bakterija u odnosu na slanu. Usporedivši s našim rezultatima, ne uočavaju se znatne razlike. U nesterilnim uzorcima morske vode broj *E. coli* pada na nulu već nakon 3 dana, dok je u jezeru moguća kvantifikacija i 96 sati nakon inkubacije. Razlika u

preživljavanju *E. coli* moguća je zbog spomenute genetske adaptacije na uvjete u kojima se bakterija nalazila prije nego je izolirana i podvrgnuta laboratorijskom istraživanju, a bitno je istaknuti da važnu ulogu ima i autohtona mikrobiota te nedostatak hranljivih tvari [78]. U vidu našeg eksperimentalnog rada soj *E. coli* nije identificiran.

Naši rezultati pokazuju da bakterija *E. coli* u sterilnom moru te sterilnom jezeru preživljavaju bolje u odnosu na nesterilne uzorke što opet potvrđuje našu hipotezu da uloga hrane i biote ima ulogu u preživljavanju.

Studija iz Sveučilišta Južne Floride ukazuje da prirodna mikrobiota u slatkovodnoj vodi nije utjecala na rast odnosno raspadanje patogenog serotipa O 157:H7. U razmaku od 5 dana pratili su kinetiku rasta spomenutog patogena i *E. coli* porijeklom iz fekalija. Riječni sediment te vodu dezinficirali su temperaturom, filtracijom i kanamicinom. Dezinfekcija vode u kojoj nije bilo strane mikrobiote, povećala je broj O 157:H7 i FIB-a, no dezinfekcija sedimenta povećala je samo broj FIB-a, ali ne i patogena. Zaključujemo da vrsta, odnosno soj bakterije te lokacija mogu utjecati na preživljavanje više, nego konkurencija same mikrobiote [79]. Istraživanje možemo povezati s našim rezultatima, gdje u sterilnom moru zajedno inokulirane *F. novicida* i *E. coli* nemaju međusobni utjecaj na rast i razmnožavanje što može predstavljati različitu nutritivnu potrebu u različitim koncentracijama. Međutim, trajanje eksperimentalnog rada nije bilo duže od 4 dana, stoga ne bi trebalo generalizirati donesene zaključke na osnovi dobivenih eksperimenata ograničenih na laboratorijske uvijete koji ne mogu pružiti one kakvi su u prirodnom okruženju.

Zajedno inokulirane *F. novicida* i *E. coli* u nesterilno more pokazuju pozitivan porast i nakon četvrtog dana inkubacije. Opet je moguće uočiti da morska voda odgovara životnom ciklusu *F. novicida*, što su potvrdile i prijašnje studije te je vidljivo da *E. coli* ne utječe na rast i razmnožavanje *F. novicida*.

Zajedničko uzgajanje *F. novicida* i *E. coli* u nesterilnom jezeru ponudilo je oscilirajuće i neočekivane rezultate. Rezultati se uvelike razlikuju od kvantitativne analize spomenutih vrsta u morskim uzorcima. Obje vrste pokazivale su negativni porast nakon 3 dana i moguće je da jezero nudi manje nutrijenata, nego more te da vlada surovija mikrobiota koja igra važnu ulogu u razmnožavanju i rastu *E. coli* i *F. novicida*. Da bi obje vrste trebale nesmetano rasti u sterilnim uvjetima bilo je za očekivati, međutim *F. novicida* nakon trećeg dana više nije bilo moguće izbrojati. Odgovor, zašto *F. novicida* u sterilnom jezeru nije moguće izbrojati nakon 3 dana inkubacije, proizlazi iz mogućih grubih pogrješaka tijekom eksperimentalnog rada ili nismo bili u mogućnosti uočiti i kvantificirati kolonije *F. novicida* zbog prerastanja istih od strane *E. coli*.

Mnogo je još pitanja koja traže odgovor. Stvaranje biofilma, izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina, preživljavanje bakterija izvan domaćina, interakcija s amebama, VBNC stanje samo su neki od potencijalnih mehanizama koje je potrebno dodatno istražiti kako bi do kraja životni ciklus *Francisella* bio shvaćen. Isto tako, bitno je, u budućim studijima, istražiti kako autohtona mikrobiota u različitim vodenim staništima utječe na propadanje fekalnih indikatora, a isto tako identificirati ključne taksone uključene u biotske interakcije antagonizma ili mogućeg komenzalizma. Određene genetske malformacije i mehanizme koji omogućuju da *E. coli* opstane u okolišu bez domaćina, posebice u vodenom okruženju gdje nema velikih zaliha hrane, potrebno je dodatno istražiti za detaljno objašnjenje situacije.

14. Zaključak

- Biotički faktori (hrana, prisutnost drugih mikroorganizama, stvaranje biofilma) te abiotički faktori (temperatura, pH, UV-zračenje) utječu na rast i razmnožavanje *F. novicida* i *E. coli*
- Broj *F. novicida* u sterilnom moru veći je u donosu na broj iste u nesterilnom moru zbog prisutnosti autohtone mikrobiote i nedovoljno hrane
- *F. novicida* u sterilnim uzorcima jezera Potkoš preživljava duže i u većem broju u odnosu na nesterilne uzorke
- Uspoređujući slanu i slatku vodu, bilo u sterilnim ili nesterilnim uzorcima, zaključujemo da slana voda ima važan utjecaj na životni ciklus *F. novicida* što utječe na bolji rast i reprodukciju iste.
- *E. coli* bolje preživljava u nesterilnom jezeru u odnosu na nesterilno more. Razlika u preživljavanju *E. coli* moguća je zbog genetske adaptacije na uvjete u kojima se bakterija nalazila prije nego je izolirana i podvrgnuta laboratorijskom istraživanju, a bitno je istaknuti da važnu ulogu ima i autohtona mikrobiota te nedostatak hranljivih tvari.
- *E. coli* bolje preživljava u sterilnom moru i jezeru u odnosu na nesterilne vode.
- *F. novicida* i *E. coli,* inkubirane zajedno u sterilnom moru, nemaju međusobni utjecaj na rast i razmnožavanje što može predstavljati različitu nutritivnu potrebu u različitim koncentracijama.
- Zajedno inokulirane *F. novicida* i *E. coli* u nesterilnom moru pokazuju pozitivan porast i nakon četvrtog dana inkubacije. Opet je moguće uočiti da morska voda odgovara životnom ciklusu *F. novicida*, što su potvrdile i prijašnje studije te je vidljivo da *E. coli* ne utječe na rast i razmnožavanje *F. novicida.*
- Uzgajane zajedno u nesterilnom jezeru, *F. novicida* i *E. coli* odumiru već nakon 3 dana. Mogući razlozi tome su surova mirkobiota te nedostatak esencijalnih nutrijenata .

- *F. novicida* u sterilnom jezeru nije bilo moguće izbrojati nakon 3 dana inkubacije. Mogući razlozi su grube pogrješke tijekom eksperimentalnog rada ili nemogućnost uočavanja i kvantifikacije kolonija *F. novicida* zbog prerastanja istih od strane *E. coli*.

15. Literatura

1. Wherry, W. B., and Lamb, B. H. (1914) Infection of man with *Bacterium tularense*, J. Infect. Dis, 15(2): 331-340

2. Pearse, R. A. (1911) Insect bites. Northwest, Med, 3: 81-82

3. Mölner, T. (1992) The ecology of tularemia, Rev. Sci. Tech, 11: 1123-1130

4. Ohara, S. (1954) Studies on yato – byo (Ohara′ s disease, tularemia in Japan), J. Jpn. J. Exp. Med. 24: 69-79

5. Francis E. (1921) The occurrence of tularemia in nature as a disease of man. Public Health Reports. 36: 1731-1753.

6. McCoy, G.W. & Chapin, C.W. (1912) Further observations plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, *Bacterium tularense*. J Infect Dis 10: 61-72.

7. Ožanič M., Marečić M., Gobin I., Šantić M. (2016) Intracellular life of francisella tularensis. Intracellular life of Francisella and Legionella within amoebae cells. Hrčak, 52 (1):49-54

8. Denis, D. T. (2001) Tularemia as a biological weapon: medical and public health management, J. Am. Med. Assos. 285: 2763-2773

9. Petersen, J. M., Kingry, L. C. (2014) Comparative review of Francisella tularensis and Francisella novicida. Front Cell Infect Microbiol, 4(35)

10. Staples, J. E. (2006) Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, Emerg. Infect. Dis. 12: 1113-1118

11. Svensson, K., Larsson, P., and Johansson, D. (2005) Evolution of Subspecies of *Francisella tularensis*, J. Bacteriol. 187: 3903 – 3908

12. Whipp, M.J., Davis, J.M., Lum, G., et al (2003). Characterization of a novicida like subspecies of Francisella tularensis isolated in Australia. J of Med Microbiol. 52: 839-842.

13. Sjöstedt, A. (2001) „Family XVII. Francisellaceae Genus I. Francisella," in Bergey′s Manual of Systemic Bacteriology, ed. D. J. Brenner (New York: Springer), 1: 200-210

14. Saslow, S. (1961) Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge, Arch. Intern. Med. 107 :702-714

15. Saslow, S. (1961) Tularemia vaccine study. I. Intracutaneus challenge, Arch. Intern. Med. 107: 689-701

16. S. Cavalli-Bjorkman Hellstorm (2013). *Francisella tularensis subsp. holartica: The Curious Case of a Water – and Mosquito Associated Bacterium in Sweden.* SLU.

17. Ulu Kilic, A., Kilic, S., Sencan, I., *et al* (2011). *A water- bone tularemia outbreak caused by Francisella tularensis subsp. holartica in Central Anatolia region*. Mikrobiyol Bul.

18. Eigelsbach, H. T., and Down, C. M. (1961) Prophylactic effectivencess of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig, J. Imunol. 87: 415-425

19. Hopla, C. E. (1974) The ecology of tularemia, Adv. Vet. Comp. Med. 18: 25-53

20. Timofev, V. et. al. (2017) Russian isolates enlarge the known geographic diversity of Francisella tularensis subsp. mediasiatica, Journal List. 12(9)

21. Kreitmann L, Terriou L, Launay D, Caspar Y, Courcol R, Maurin M, et al. (2015) Disseminated Infection Caused by Francisella philomiragia, France, Emerg Infect Dis. 21(12): 2260-2261.

22. Forsman, M., Sandstrom, G., and 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. 44: 38-46

23. Larson, P., Elfsmark, D., Svensson, K., Wikström, P., Forsman, M., Brettin, T., Keim, P., and Johansson, A. (2009) Molecular evolutionary consequences of niche restriction in Francisella tularensis, a facultative intracellular pathogen, PloS Pathog. 5: e1000472

24. Schrallhammer, M., Schweikert, M., Vallesi, A., Verni, F., and Petroni, G. (2011). Detection of a Novel Subspecies of *Francisella noatunensis* as Endosymbiont of the Ciliate Euplotes raikovi. Microb. Ecol, 61(2): 455–464

25. Gurycova, D. (1998) First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. Eur J Epidemiol, 14(8): 797-802

26. Ožanič M., Marečić M., Gobin I., Šantić M. (2016) Intracellular life of francisella tularensis. Intracellular life of Francisella and Legionella within amoebae cells. Hrčak, 52 (1) :49-54

27. Brudal, E., Ulanova, L. S., Lampe, E. O., Rishovd, A. L., Griffitsh, G., Larsen, H. C. W. (2014) Establishment of Three Francisella Infections in Zebrafish Embryos at Different Temperatures. Infect Immun, 82(6)

28. Sullivan, J. T., E. F. Jeffery, J. D. Shannon, and G. Ramakrishnan (2006) Characterization of the siderophore of Francisella tularensis and role of fls A in siderophore production. J Bacteriol, 188 (11)

29. Stewart, T. et. al. (2009) *Francisella tularensis* subsp. *novicida* isolated from a human in Arizona. Bio Med Centar, 2(223)

30. Brett, M. (2012) Francisella novicida Bacteriemia after Near-Drowning Accident, J Clin Microbiol., 50(8): 2826-2829

31. Whitehouse, C. A., et. al. (2012) Identification and characterization of *Francisella* species from natural warm springs in Utah. Sfam, 54(4): 313-24

32. Kingry. C. L., Petersen. J. M. (2014) Comparative rewiev of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*, 4(35)

33. Brinkmeyer. R. (2016) Diversity of bacteria in ships ballast water as revealed by next generation DNA sequencing, Marine Plution Bulletin, 107(1)

34. Leelaporn, A. et. al. (2008) Emergence of *Francisella novicida* Bacteriemia, Thailand, Emerging Infectious Diseases, 14(12): 1935-1937

35. Hollis, D. et. al. (1989) *Francisella philomiragia* comb. Nov. (formerly Yersinia philomiragia) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. J. Clin. Microbiol. 27(7) 1601-1608

36. Francis, E., (1927) Microscopic changes of tularemia in the tick Dermacentor andersoni and the Cimex lectularius, Public Health Rep. 42: 2763-2772

37. Golovliov, I., Baranov, V., Krocova, Z., Kovarova, H., and Sjöstedt, A. (2003) An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium Francisella tularensis can escape the phagosome of monocytic cells, Infect. Immun. 71: 5940-5950

38. Titball, R. W., A. Johansson, and M. Forsman. (2003) Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved?. Trends in Microbiol, 11(3): 118-1123

39. Sandstrom, G., Lofgren, S., Tarnvik, A. (1988). A capsule-deficient mutant of Francisella tularensis LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 56:1194–1202

40. Santic, M., Molmeret, M., Barker, J. R., Klose, K. E., Dekanic, A., Doric, M., and Abu Kwaik, Y. (2007) A Francisella tularensis pathogenicity island protein essential for bacterial proliferation within the host cell cytosol, Cell. Microbiol. 9: 2391-2403

41. Santic, M., Molmeret, M., and Abu Kwaik, Y. (2005a) Modulation of biogenesis of the Francisella tularensis subsp. novicida- containing phagosome in quiscent human macrophages and its modulation into a phagolysosome upon activation by IFN-gamma, Cell. Microbiol. 7: 957-967

42. Geier, H., Celli, J. (2011). Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of Francisella tularensis. Infect. Immun. 79: 2204–2214.

43. Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. J. Cell Biol. 124: 677–688.

44. Clemens, D. L., Lee, B. Y., Horwitz, M. A. (2004). Virulent and avirulent strains of Francisella tularensis prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. Infect. Immun. 72: 3204–3217.

45. Chong, A., Wehrly, T. D., Nair, V., Fischer, E. R., Barker, J. R., Klose, K. E., and Celli, J. (2008) The early phagosomal stage of Francisella tularensis determines optimal phagosomal escape and Francisella pathogenicity island protein expression, Infect. Immun. 76: 5488-5499
46. Checroun, C., Wehrly, T. D., Fischer, E. R., et al (2006). Autophagy-mediated reentry of Francisella tularensis into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103: 14578–14583
47. Checroun, C., Wehrly, T. D., Fischer, E. R., et al (2006). Autophagy-mediated reentry of Francisella tularensis into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103: 14578–14583
48. Deretic, V., Levine, B. (2009). Autophagy, immunity and microbal adaptations. Cell Host Microbe 5(6): 527-549.
49. Clemens, D. L., Lee, B. Y., and Horwitz, M. A. (2004) Virulent and avirulent strains of Francisella tularensis prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages, Infect. Immun. 72: 3204-3217
50. Santic, M., Molmeret, M., Klose, K. E., and Abu Kwaik, Y. (2006) Francisella tularensis travels a novel, twisted road within macrophages, Trends. Microbiol. 14: 37-44
51. Chong, A., Wehrly, T. D., Nair, V., Fischer, E. R., Barker, J. R., Klose, K. E., and Celli, J. (2008) The early phagosomal stage of Francisella tularensis determines optimal phagosomal escape and Francisella pathogenicity island protein expression, Infect. Immun. 76: 5488-5499
52. Maggio, S., Takeda, K., Stark, F., et al (2015). Control of Francisella tularensis intracellular growth bypulmonary epithelial cells. PLOS ONE (2015)
53. Sullivan, J. T., E. F. Jeffery, J. D. Shannon, and G. Ramakrishnan. (2006) Characterization of the siderophore of Francisella tularensis and role of fslA in siderophore production. J Bacteriol, 188: 3785–3795
54. Nano, F. E., N. Zhang, S. C. Cowley, K. E.Klose, K. K. M. Cheung, M. J. Roberts, J. S. Ludu, G. W. Letendre, A. I. Meierovics, G. Stephens, and K. L. Elkins. (2004) A Francisella tularensis Pathogenicity Island Required for Intramacrophage Growth Journal of Bacteriology. 186: 6430–6436
55. Chakraborty, S., M. Monfett, T. M. Maier, H. L. Benach, D. W. Frank, and D. G. Thanassi. (2008) Type IV Pili in Francisella tularensis: Roles of pilF and pilT in Fiber Assembly, Host Cell Adherence, and Virulence, Infection and Immunity. 76: 2852-2861.
56. Lindgren, H., Golovliov, I., Baranov, V., Ernst, R.K., Telepnev, M., et al (2004). Factors affecting the escape of Francisella tularensis from the phagolysosome. J Med Microbiol. 53(10): 953–958
57. Shaffer, S. A., Harvey M.D., Goodlett, D. R., Ernst, R. K. (2007) Structural Heterogeneity and Environmentally Regulated Remodeling of Francisella tularensis subspecies novicida Lipid A

Characterized by Tandem Mass Spectrometry. Journal od the American Society for Mass Spectrometry. Elsevier Inc, 18(6): 1080-92

58. Okan, N.A., Kasper, D.L. (2013). The atypical lipopolysaccharide of Francisella. Carbohydr Res. (2013) 378: 79–83.

59. Neumeister, B., S. Schoniger, M. Faigle, M. Eichner, and K. Dietz. (1997) Multiplication of different Legionella species in mono Mac 6 cells and Acanthamoeba castellanii. Appl Envirom Microbiol 63:1219-24

60. Gunna, S.J., Ernst, K.R. (2007). The Structure and Function of Francisella Lipopolysaccharide. Ann N Y Acad Sci. (2007) 1105: 202–21

61. Gil, H., Benach, J. L., and Thanassi, D. G. (2004) Presence of Pili on the Surface of Francisella tularensis, Infect. Immun. 72: 3042 – 3047

62. Barker, J. R., and K. E. Klose. 2007. Molecular and Genetic Basis of Pathogenesis in Francisella tularensis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1105: 138-159

63. Ellis, J., Oyston, P. C. F., Green, M., and Titball, R. W. (2002) Tularemia, Clinical Microbiol. Rev. 631-646

64. Sviben, M., Horvat-Krejči, D., Mlinarić Missoni, E. (2007). Infekcije uzorkovane slobodnoživućim amebama – etiologija, kliničke osobitosti, dijagnostika, terapija i prevencija. Medicina. 43: 27-33

65. Fong, W.I., Alibek, K. (2009) Bioterrorism and Infectious Agents: A New Dilemma or the 21st Century; Hodges, L., Penn, L.R.: Tularemia and Bioterrorism. 3. poglavlje; 71-95

66. Cunningham, A.L, Guentzel, M.N., et al (2015). Vaccination with the Live Attenuated Francisella novicida mutant FTN0109 protects against pulmonary tularemia. World Jun of Vaccines. 5: 25-36

67. Hennebique, A., Boisset, S., Maurin, M. (2019) Tularemia as a waterborne disease: a review. Emerg Microbes Infect, 8(1): 1027-1042

68. Berrada, Z., L., Telford, S., R. (2011) Survival of *Francisella tularensis* Type A in Brackish water. Arch. Microbial, 193(3): 223-226

69. Croxen, MA. et. al. (2013) Recent advences in understanding enteric phatogenic *Ecserichia coli*. Clinical Microbial Reviews, 26(4): 822-880

70. Hur, HG. et. al. (2017) Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications-a review, 123(3): 570-581

71. Humski, A. (2011) Escherichia coli. Opomena sustavu kontrole sigurnosti hrane. Veterinarska stanica, 42(4)

72. Lozica, L., Gottstein, Ž., Tomić D., H. (2017) Molekulska karakterizacija APEC sojeva *E. coli* izdvojenih na farmama peradi Republike Hrvatske. Veterinar, 55(2)
73. Gossman, W., Wasey A., Salen, P. (2019) Escherichia coli (E. coli O157:H7) . StatPearis.
74. Jang, J. et. al. (2015) Dynamic changes in the population structure of *Escherichia coli* in the Yeongsan River basin of South Korea. FEMS Microbiool Ecol, 91(11)
75. Korajkic, A. et. al. (2013) Differential Decay of Enterococci and *Escherichia coli* Originating from Two fecal Pollution Sources. Appl Environ Microbiol, 79(7): 2488-2492
76. Hofmann, J. (2012) Geographic distribution and magnitude of disease Burden. Netters Infectious Disease.
77. Soto, E., Revan, F. (2012) Culturability and persistence of *Francisella noatunesis* subsp. *orientalis* in sea and freshwater microsoms. Micrb. Ecol, 63(3): 398-404
78. Nayak, B., et. al. (2015) LA35 Poultry fecal marker Persistence is correlated with that of indicators and pathogenes in environmental waters. Appl. Environ. Microbiol, 81(14): 4616-4625
79. Wanjuqi, P., Harwood, VJ. (2013) The influence od predation and competition on the survival of commensal and pathogenic fecal bacteria in aquatic habitats. Environ Microbiol, 15(2): 517-526
80. Buđa, R. (2014) Odgovor na stres *E. coli* kod *in vivo* hipoosmotskog šoka. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet
81. Feeley, J. C., R. J. Gibson, G. W. Gorman, N. C. Langford, J. K. Rasheed, D. C. Mackel, and W. B. Baine. 1979. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for Legionella pneumophila. J. Clin. Microbiol, 10:437–441
82. Chapman, G.H. 1951. A Culture Medium for Detecting and Confirming Escherichia coli in Ten Hours. Am. J. Public Health, 41:1381
83. Šantić, M. et. al. (2014) Mikrobiologija hrane i vode za studente preddiploskog studija sanitarnog inženjerstva: Priručnik za vježbe iz Mikrobiologije hrane i Mikrobiologije vode. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju. Rijeka

16. Životopis

Curriculum vitae

PERSONAL INFORMATION **Dominik Kolarić**

Marka Kovača 10 A, 40 000 Čakovec (Croatia)

+385958299476

dkolaric95@gmail.com

Sex Male | Date of birth 29 Jun 1995 | Nationality Croatian

WORK EXPERIENCE

1 Mar 2019–Present — Shop salesperson
Zara Hrvatska DOO, Rijeka (Croatia)

Oct 2018–Nov 2018 — Hand to hand Flyer distributor
Udruženje Pčelarskih udruga PGŽ, Rijeka (Croatia)

Jul 2017–Sep 2018 — Manufacturing labourer
Perutnina Ptuj Pipo d.o.o., Rijeka (Croatia)

EDUCATION AND TRAINING

2 Oct 2017–Present — Master of Environmental and Public Health — EQF level 7
Faculty of Medicine, University of Rijeka, Rijeka (Croatia)

6 Oct 2014–21 Sep 2017 — University Bachelor of Environmental and Public Health — EQF level 6
Faculty of Medicine, University of Rijeka, Croatia, Rijeka (Croatia)

6 Sep 2010–16 May 2014 — High School - General gymnasium — EQF level 4
High School Čakovec, Rijeka (Croatia)

10 Sep 2001–18 Jun 2010 — Elementary School — EQF level 1
Elementary School - Strahoninec, Čakovec (Croatia)

PERSONAL SKILLS

Mother tongue(s) Croatian

Foreign language(s)

	UNDERSTANDING		SPEAKING		WRITING
	Listening	Reading	Spoken interaction	Spoken production	
English	B2	B2	B1	B1	B2

First Certificate in English

Levels: A1 and A2: Basic user - B1 and B2: Independent user - C1 and C2: Proficient user
Common European Framework of Reference for Languages

Communication skills Communicative and social person

Job-related skills -The desire for learning and progress

-I do my best to perform the default tasks

Digital skills

SELF-ASSESSMENT				
Information processing	Communication	Content creation	Safety	Problem-solving
Proficient user	Proficient user	Independent user	Proficient user	Proficient user

Digital skills - Self-assessment grid