

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doris Tafra

Izolacija i karakterizacija bakterije *Pseudomonas aeruginosa*
iz uzoraka vode

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije u Splitu, pod voditeljstvom dr.sc. Ane Kovačić, znanstvene suradnice i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.

ZAHVALE

Prvenstveno, zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Ani Kovačić na trudu, vremenu i strpljenju ukazanom pri izradi ovog diplomskog rada. Učinila je pisanje ovog rada vrlo ugodnim.

Zahvaljujem se suvoditeljici Prof. dr. sc. Jasni Hrenović na pomoći, savjetima i vremenu izdvojenom pri pisanju ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svima iz laboratorija za mikrobiologiju voda Nastavnog zavoda za javno zdravstvo u Splitu na pomoći i savjetima pri radu u laboratoriju.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojim roditeljima, bratu, obitelji i prijateljima na podršci i pomoći tijekom cijelog mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Izolacija i karakterizacija bakterije *Pseudomonas aeruginosa* iz uzoraka vode

Doris Tafra

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* je Gram-negativni aerobni štapić. Humani je patogen koji je široko rasprostranjen u prirodi. Nazivamo ga oportunističkim patogenom jer izaziva bolesti samo kod ljudi s oslabljenim imunitetom. Lako se širi u vlažnom okolišu i stvara biofilm te je upravo zato važno znati više o njegovoj otpornosti i preživljavanju u različitim uvjetima. *P. aeruginosa* su izdvojeni i biokemijski potvrđeni iz različitih uzoraka vode. Za 10 odabranih izolata praćeno je preživljavanje u sterilnoj vodi kroz 28 dana. Svi su izolati preživjeli tijekom ispitivanog perioda. Najveće preživljenje je imao izolat *P. aeruginosa* izdvojen iz vode broskog tanka, a najmanje izolat izdvojen iz uzorka boćate vode rijeke Cetine. Ostali izolati su pokazali ujednačeno preživljenje. *P. aeruginosa* posjeduje različite mehanizme koji joj omogućuju preživljenje u nepovoljnim životnim uvjetima, pogotovo onima kod manjka nutrijenata.

(26 stranica, 2 slike, 4 tablice, 68 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: patogen, biofilm, preživljenje, izolat, nutrijenti.

Voditeljica: Dr. sc. Ana Kovačić, znanstvena suradnica

Suvoditeljica: Dr. sc. Jasna Hrenović, prof.

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Jasna Hrenović, Izv. prof. dr. sc. Sven Jelaska, Izv. prof. dr. sc. Ana Galov.

Rad je prihvaćen: 02.11.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

Isolation and characterization of bacterium *Pseudomonas aeruginosa* from water samples

Doris Tafra

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Bacteria *P. aeruginosa* is a Gram-negative aerobic bacillus. It's a human pathogen that is widespread in nature. It's called an opportunistic pathogen because it causes disease only in people with impaired immunity. *P. aeruginosa* spreads easily in humid environment and has elaborate mechanisms for adhering to solid surfaces and establishing biofilms so it's important to find out more about its resistance and survival in different conditions. *P. aeruginosa* was isolated and biochemically confirmed from different water samples. We selected 10 isolates and monitored their survival in sterile water over a period of 28 days. All isolates survived during the examined period. *P. aeruginosa* from ship's tank survived the longest, and the shortest survival had *P. aeruginosa* from brackish water from river Cetina. Other isolates showed even survival rate. *P. aeruginosa* has various mechanisms that help her to survive in different conditions, especially those with a lack of nutrition.

(26 pages, 2 figures, 4 tables, 68 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: pathogen, biofilm, survival, isolate, nutrition.

Supervisor: Dr. Ana Kovačić, Scientific associate.

Cosupervisor: Dr. Jasna Hrenović, Professor.

Reviewers: Dr. Jasna Hrenović, Professor, Dr. Sven Jelaska, Assoc. Prof., Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 02.11.2017.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Mikrobiologija vode	1
1.2. Postupci mikrobiološke analize vode	2
1.3. Zdravstvena ispravnost vode za piće	4
1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
1.5. Cilj istraživanja.....	7
2. MATERIJALI I METODE	8
2.1. Materijali	8
2.1.1. Laboratorijski pribor	8
2.1.2. Mikrobiološke podloge	8
2.1.3. Kemikalije i mikrobiološki testovi.....	9
2.2. Metode	9
2.2.1. Priprema mikrobioloških podloga.....	9
2.2.2. Prikupljanje i obrada uzoraka	10
2.2.3. Preživljavanje odabranih sojeva <i>P. aeruginosa</i> u sterilnoj vodi.....	11
2.2.4. Statistička obrada podataka.....	12
3. REZULTATI.....	13
3.1. Izolati <i>P. aeruginosa</i> iz voda.....	13
3.2. Preživljavanje <i>P. aeruginosa</i> u vodi.....	13
4. RASPRAVA.....	16
5. ZAKLJUČAK	19
6. LITERATURA.....	20

KRATICE

CFU/ml- broj kolonija/ml (Colony forming units)

WHO -Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organization)

BPK- Biokemijska potrošnja kisika

1.UVOD

1.1. Mikrobiologija vode

Mikroorganizmi su sastavni dio okoliša koji nas okružuje. Mikrobiologija voda istražuje mikroorganizme i njihovo djelovanje u različitim vrstama voda kao što su jezera, rijeke, mora, oceani, bazeni i morska ušća (Duraković, 1996). Voda sadrži različite nutrijente: organske tvari kao što su ugljikohidrati, masti i proteini kao i one anorganske kao što su kalcij, kalij, magnezij, željezo, mangan (WHO, 2005). Koncentracija nutrijenata utječe na koncentraciju mikroorganizama u vodi te što je njihova koncentracija veća, bit će veća i koncentracija mikroorganizama. U vodi, osobito onoj s malom koncentracijom nutrijenata, mikroorganizmi uglavnom rastu blizu površine gdje imaju bolji dodir s nutrijentima, nego kada su nasumice suspendirani i slobodno plutaju u struji vode (Duraković, 1996).

Ukoliko je voda nečim onečišćena, kao što je npr. dotok otpadne vode ili dotok industrijskih produkata onda je u toj vodi prisutan veći broj mikroorganizama, pa kažemo da je ta voda mikrobno kontaminirana (Duraković, 1996). Kvaliteta vode je često određena sa brojem mikrobioloških agensa pronađenih u vodi, u skladu sa prihvatljivim odstupanjima utvrđenim zakonom i smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organization, WHO) (Traoré i sur., 2016). Zdravstveno ispravna voda mora biti bistra, bez boje, okusa i mirisa (Duraković, 1996). U slabije razvijenim zemljama pitka voda nije svima dostupna. Prema WHO (2008) oko 5 milijuna ljudi godišnje umre od bolesti uzrokovanih pijenjem zdravstveno neispravne vode, a 50 % njih je uzrokovano mikrobiološkim infekcijama. Oko 2,5 milijardi ljudi nema pristup zdravstveno ispravnoj vodi, i više od 1,5 milijuna djece godišnje umre od dijareje (Fenwick, 2006). Onečišćenje vode može biti različito. Prema Van der Perku (2013) razlikujemo fizičko, kemijsko, biološko te radiološko onečišćenje vode ili tla. Fizičko onečišćenje je promjena fizikalnih svojstava vode, a to su suspendirane čestice, temperatura, protok što dovodi do promjene pH, boje, mirisa i zamućenosti (Inamori i Fujimoto, 2009). Kemijsko onečišćenje uključuje unos različitih organskih i anorganskih tvari u vodu (Duraković, 1996). Biološko onečišćenje je uzrokovano organizmima koji se nalaze u vodi kao što su bakterije, alge, i različite vrste patogenih protozoa (Husain i Reddy, 2010). U to ubrajamo mikrobno onečišćenje odnosno onečišćenje mikroorganizmima koji se unose u vodu putevima kao što su kanalizacijski ispusti, razne industrije, zdravstvene ustanove i drugo (Duraković, 1996).

Biokemijska potrošnja kisika (BPK) je jedan od pokazatelja kvalitete i razine onečišćenja vode. To je količina otopljenog kisika koja je potrebna za oksidaciju svih biorazgradivih organskih spojeva u 1 dm³ vode. Izražava se u mg O₂/l, ili mg O₂/dm³ (Ponomareva i sur., 2011). BPK se provodi kao laboratorijski postupak za određivanje potrošnje kisika u analiziranoj vodi. Određen je promjenom sadržaja kisika u posebnim neprozirnim tikvicama s uzorcima vode koji se čuvaju tijekom 5 dana na 20 °C pri pH 6-8 (American Public Health Association, 1992). Heterotrofni organizmi u normalnim uvjetima razgrađuju organsku tvar do CO₂, vode i iskoristivih iona. U brzom protoku vode aeracija je stalna, a otpadne vode se brzo razrjeđuju i uklanjanju. Međutim, ako voda miruje ili prelazi preko otpadnih tvari, biološki materijal se ne razgrađuje pa se pretvara u onečišćenu vodu. Potrošnja kisika raste proporcionalno s povećanjem broja mikroorganizama i povećanjem koncentracije biološki razgradive tvari, odnosno onečišćenjem. Na osnovi BPK vrijednosti određuje se razina organskog opterećenja vode, odnosno onečišćenje vode (Duraković, 1996). Onečišćena voda može dovesti do različitih bolesti bilo njenom konzumacijom ili kontaktom sa takvom vodom koja se koristi za rekreaciju, kao što su bazeni (Hunter, 2003). Patogeni mikroorganizmi mogu imati akutne i kronične učinke na zdravlje, mogu se razmnožavati u okolišu (voda, tlo), koncentracije im variraju u vremenu, pa se vjerojatnost dosezanja infektivne doze ne može predvidjeti iz njihove prosječne koncentracije u vodi. Razvoj bolesti ovisi o dozi, invazivnosti, i patogenosti mikroorganizma te o imunitetu domaćina. Nakon što dođe do infekcije patogeni se umnožavaju u domaćinu. Određeni vodeni patogeni se mogu umnožavati u hrani, piću, sustavima tople vode i tako povećavaju vjerojatnost zaraze (WHO, 2011). Neki od poznatih patogenih mikroorganizama u vodi su: *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii*, *Heliobacter pylori*, *Klebsiella* spp. i *Pseudomonas aeruginosa* (WHO, 2017). Najpoznatije zarazne bolesti koje se prenose pijenjem onečišćene vode su kolera, trbušni tifus i bacilarna dizenterija čiji su uzročnici: *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhosa* (Duraković, 1996).

1.2. Postupci mikrobiološke analize vode

Postoje tri glavna postupka mikrobiološke analize vode: metoda membranske filtracije, metoda najvjerojatnijeg broja i metoda direktnog nacjepljivanja na hranjivi agar.

Membranska filtracija je jedan od osnovnih postupaka detekcije i izdvajanja mikroorganizama iz uzorka vode za piće. Uzorak ispitivane vode odgovarajućeg volumena se propušta kroz membranski filter veličine otvora pora od 0.2-0.45µm uz pomoć vakuum pumpe. Mikroorganizmi se zadržavaju na površini filtra koji se položi na odgovarajuću

selektivnu hranjivu podlogu (ovisno o mikroorganizmu kojeg želimo uzgojiti). Hranjiva podloga se inkubira na određenoj temperaturi te se nakon toga broje i potvrđuju izrasle kolonije. Dobiveni broj se izražava kao broj kolonija ili CFU (colony forming units) / volumen uzorka (WHO, 1997).

Metoda najvjerojatnijeg broja daje statističku procjenu broja mikroorganizama u uzorku vode. Najčešće se koristi za jako onečišćene uzorke kod kojih nije potrebno izraziti točan broj ispitivanih mikroorganizama (npr. površinske ili otpadne vode). Metoda najvjerojatnijeg broja je dugotrajnija od membranske filtracije i izvodi se u tri koraka. Najčešće se koristi za analizu koliformnih bakterija (kolimetrija). Kolimetrija se sastoji od prethodnog, potvrdnog i završnog testa. Uzorak vode (različitih volumena) se naciepljuje u epruvete sa tekućom mikrobiološkom podlogom koja sadržava laktozu i pepton te indikator pH vrijednosti (najčešće McConkeyev bujon ili slična tekuća podloga koja podržava rast koliformnih bakterija). Epruvete sadrže i Durchamove cjevčice koje služe za zadržavanje stvorenog plina. Prethodni test nam pokazuje prisutnost bakterija koje fermentiraju laktozu na $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 24-48 h. Ukoliko bakterije u epruveti fermentiraju laktozu, pH će se sniziti ispod 5,2 i boja pH-indikatora će promijeniti boju podloge iz ljubičaste u žutu, a u Durchamovoj epruvetici će se pojaviti mjehurić plina. Barem trećina cjevčice mora biti ispunjena plinom da bi se rezultat označio kao pozitivan. Nakon toga slijedi potvrdni test u kojem se dokazuje sigurna prisutnost koliformnih bakterija dokazanih prethodnim testom. U potvrdnom testu se iz jedne pozitivne epruvete s laktoza bujonom naciepi dio uzorka na čvrstu podlogu koja podržava rast koliforma kao što je Endo agar. Test će biti pozitivan ukoliko nakon inkubacije na čvrstoj podlozi narastu tipične kolonije koliforma. Treći korak je završni test koji podrazumijeva biokemijsku potvrdu i bojanje po Gram-u. Izračunavanje najvjerojatnijeg broja koliformnih bakterija se provodi na osnovi broja pozitivnih reakcija u nizu epruveta, ovisno o naciepljenom volumenu uzorka, prema McCradyjevim tablicama. Rezultat se izražava kao najvjerojatniji broj koliforma i to na temelju broja pozitivnih epruveta u kojima je potvrđeno prisustvo koliformnih bakterija (Hajsig i Delaš, 2016).

Metoda brojanja kolonija direktnim naciepljivanjem na hranjivi agar je metoda kojom uzorak vode naciepljujemo direktno na mikrobiološku podlogu koja ne sadrži inhibitorne tvari te dopušta rast svim vrstama bakterija. Hranjive podloge se inkubiraju te se broje izrasle kolonije kao ukupni broj bakterija. Ukoliko je voda dosta onečišćena, mogu se naciepiti i decimalna razrjeđenja uzorka vode (HRN EN ISO 6222: 2000).

1.3. Zdravstvena ispravnost vode za piće

Postoji više skupina bakterija koje se mogu pronaći u onečišćenoj vodi. Voda za piće se prema Pravilniku o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju (NN 125/13, 141/13 i 128/15) pretražuje na slijedeće mikroorganizme: ukupni broj bakterija na 37 °C i 22 °C, *E. coli*, crijevni enterokoki, ukupni koliformi, *Cl. perfringens* i *P. aeruginosa*. Voda također ne smije sadržavati patogene mikroorganizme.

Opći pokazatelji kvalitete odnosno onečišćenja vode su ukupni broj bakterija na 37 °C i 22 °C te ukupni koliformi (WHO, 2001). Općenito, koliformne bakterije su primarno nepatogene bakterije koje čine znatan dio fiziološke mikroflore završnog dijela probavnog sustava čovjeka i svih toplokrvnih životinja. Budući da se izlučuju izmetom, tako dospijevaju u okoliš (Hajsig i Delaš, 2016). Razlikujemo ukupne koliforme i fekalne koliforme. Ukupni koliformi su fakultativno anaerobni, Gram-negativni, nesporogeni bacili, koji fermentiraju laktozu i tvore plin i kiselinu tijekom inkubacije 24-48 h pri temperaturi od 35- 37 °C (Cabral, 2010). Ukupni koliformi uključuju vrste koje se nalaze u fecesu ljudi i životinja, ali i one vrste koje se prirodno mogu naći u okolišu te su se sposobne umnožavati u vodi i tlu. Ukupni koliformi mogu preživjeti u različitim vodoopskrbnim sustavima, posebno unutar biofilma (WHO, 2011). Fekalni ili tzv. termotolerantni koliformi su definirani kao koliformi koji fermentiraju laktozu na 44.5 °C u mediju sa žučnim solima (WHO,2008; Grabow i W.O.K., 1996; George i Servais, 2002; Payment i sur., 2003). U termotolerante koliforme spadaju *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* i *Klebsiella pneumoniae* (Cabral i Marques, 2006). Prisustvo fekalnog onečišćenja dokazujemo pretragom vode na tzv. indikatore fekalnog onečišćenja (Cabral, 2010). Da bi neki mikroorganizam bio indikator fekalnog onečišćenja ne bi trebao biti patogen, ali bi trebao biti prirodno prisutan u ljudskom i životinjskom fecesu u velikom broju. Indikatori se ne bi smjeli umnožavati u prirodnoj vodi, tamo bi trebali biti prisutni u većem broju od patogena, odgovarati na iste načine i tretmane liječenja kao i patogeni te biti jednostavno prepoznatljivi i uzgojivi na hranjivim podlogama (WHO, 2011). Indikatori fekalnog onečišćenja koji se koriste za ispitivanje zdravstvene ispravnosti vode za piće su crijevni enterokoki i *E. coli*. Crijevni enterokoki su fakultativno anaerobni, Gram-pozitivni mikroorganizmi koji rastu u prisutnosti 6,5 % NaCl pri 45 °C (Klein, 2003; Kuhn i sur., 2003). Prednost je što se većinom ne umnažaju u vodenom okolišu, prisutni su u velikom broju u ljudskom i životinjskom fecesu, kanalizaciji te onečišćenim vodama (WHO, 2011). Općenito, crijevni enterokoki duže žive i otporniji su na isušivanje i kloriranje od *E. coli* (WHO, 2008; Payment i sur., 2003). *E. coli* je oksidaza-negativna, katalaza-pozitivna i

fermentira laktozu (Cabral, 2010). Ova bakterija sadrži enzim β -glukuronidazu koji se koristi za njenu identifikaciju (Rice i sur., 1990). U istraživanju koje su proveli Rice i sur. (1990) samo jedan od 620 sojeva identificiranih kao *E. coli* nije bio pozitivan na β -glukuronidazu. Stanice ne koriste citrat, ne proizvode H_2S i lipazu te ne hidroliziraju ureu (Holt i sur., 1994). Većina sojeva *E. coli* su nepatogeni, ali su neki njihovi podtipovi patogeni te izazivaju bolesti, kao npr. urinarne infekcije (Scheutz i Strockbine, 2005). Sulfitoreducirajuće klostridije odnosno bakterije roda *Clostridium* izlučuju se izmetom te tako dospijevaju u okoliš pa se također koriste kao indikatori fekalnog onečišćenja vode, tla i hrane. Sposobne su stvarati spore pa su dobar indikator redovitog održavanja vodoopskrbnog sustava. Široko su rasprostranjene u prirodi te posjeduju fiziološku osobinu da u anaerobnim uvjetima reduciraju sulfat do sumporovodika (Hajsig i Delaš, 2016).

1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa pripada carstvu *Bacteria*, koljenu *Proteobacteria*, razredu *Gammaproteobacteria* redu *Pseudomonadales*, porodici *Pseudomonadaceae*, rodu *Pseudomonas*. Ovaj rod je široko rasprostranjen u okolišu: zemlji, vodi, biljkama i životinjama. Predstavnici roda *Pseudomonas* su Gram-negativni, pokretni, aerobni bacili. Neki od njih stvaraju u vodi topljive pigmente kao što su plavo-zeleni pigment piocijanin, zeleni pioverdin, tamno crveni piorubin te crni piomelanin (Jawetz i sur., 2015). *P. aeruginosa* je glavni humani patogen unutar roda *Pseudomonas*. Može zaraziti niz organizama uključujući biljke, nematode, i razne sisavce (Rahme i sur., 2000; Tan i sur., 1999; Snouweart i sur., 1992; Colledge i sur., 1995; Potvin i sur., 2003). Pokretan je, štapićastog oblika veličine od 0,6-2 μ m. Dobro raste na 37-42 °C, a rast na 42 °C pomaže u njegovom razlikovanju od drugih vrsta unutar fluorescentne skupine (Jawetz i sur., 2015). *P. aeruginosa* najčešće proizvodi pigment piocijanin koji fluorescira pod UV svjetlom valne duljine 460 nm (Meyer i Abdallah, 1978). Od biokemijskih karakteristika značajne su pozitivna oksidaza, katalaza, proizvodnja amonijaka iz arginina te rast na citratu kao jedinom izvoru ugljika (WHO, 2017). Jedna od važnijih karakteristika ovog mikroorganizma je da može rasti u nepovoljnim životnim uvjetima kao što su niske koncentracije nutrijenata (Legnani i sur., 1999). Često je prisutan u prirodi, vlažnom okruženju i bolničkom okolišu (Jawetz i sur., 2015). Bolnički sustavi vode za piće su najčešći izvor nozokomijalnih patogena kao što je *P. aeruginosa* te ih je nužno strogo nadzirati (Felfoldi i sur., 2010). *P. aeruginosa* se naziva oportunističkim patogenom jer izaziva bolesti samo kod ljudi sa oslabljenim imunitetom (Mena i Gerba, 2009). Uzrokuje infekcije kože i opekline, zatim

blage infekcije zvučnikova u plivača i infekcije oka kod ljudi. U osoba koje imaju posebno slab imunitet i već boluju od neke bolesti može uzrokovati i veće probleme kao što je sepsa (Jawetz i sur., 2015). Može preživjeti u vodi dezinficiranoj klorom, u destiliranoj vodi, i pokazuje veliku otpornost na procese mehaničkog čišćenja (Guida i sur., 2016). Kontaminacija bazena i ostalih vodenih struktura u centrima za rekreaciju je najčešće uzrokovana s ovom bakterijom (Rice i sur., 2012; Roser i sur., 2014). Čest izvor infekcija sa *P. aeruginosa* je voda iz slavine, osobito ukoliko je u cijevima nastao biofilm. Tada, tijekom pranja ruku i kupanja, pogotovo u bolnicama, dolazi do širenja zaraze (Mena i Gerba, 2009). Biofilmovi sadrže različite mikroorganizme kao što su bakterije, kvasci, plijesni, alge, protozoe, ali mogu biti sastavljeni od samo jedne vrste mikrobnih stanice. Intenzitet pričvršćivanja, rast i razmnožavanje mikrobnih stanica ovisi o dostupnim hranjivim tvarima (Hajsig i Delaš, 2016). Biofilmovi različitih skupina mikrobnih stanica, ili pojedinačni kao što je biofilm bakterije *P. aeruginosa* nastaju na čvrstim površinama koje su u dodiru s vodom i koje imaju stalan dotok nutrijenata. U biofilmu se formiraju tanki slojevi koji se sastoje od diferenciranih struktura i struktura nalik stupićima odijeljenih vodom. Strukture sadrže vanstanični polisaharidni matriks ili glikokaliks u koji su ugrađene bakterijske stanice. Vanstanični polisaharidni matriks je vrlo važan jer drži bakterijske stanice na okupu pa one formiraju biofilm (Mena i Gerba, 2009). Vlažne površine predstavljaju idealan okoliš za formiranje biofilma, stoga je u bolnicama i sličnim okruženjima u kojima se najčešće događa infekcija s *P. aeruginosa* potrebno održavati čistoću i suhoću površina (Walker i Moore, 2015).

P. aeruginosa pokazuje rezistenciju na mnoge antibiotike. Može postati otporna na antibiotike koji se učestalo koriste za liječenje infekcije u bolesnika. Pri tom se može javiti višestruka otpornost na lijekove (MDR-multidrug resistance) i panrezistencija odnosno sveopća rezistencija na lijekove (Paterson, 2006). *P. aeruginosa* pokazuje najveću otpornost na fluorokinolone, a na ciprofloksacin i levofloksacin je otporno 20-35 % sojeva. Otpornost na gentamicin je 12-22 %, dok se najmanja otpornost pokazala na tobramicin i amikacin (Lister i sur., 2009). U Republici Hrvatskoj prema podacima CAMS (2015) bakterija *P. aeruginosa* je pokazala najveću rezistenciju na antibiotike ciprofloksacin, gentamicin i netilmicin, dok na kolistin nijedan izolat nije pokazao rezistenciju (Tablica 1). Većina cefalosporina, karbapenema, aminoglikozida i penicilina uspijevaju nadjačati obranu *P. aeruginosa* ali neki sojevi mutacijama ipak uspijevaju razviti rezistenciju (Livermore, 2002).

Tablica 1. Otpornost izolata bakterije *P.aeruginosa* na antibiotike u Hrvatskoj (CAMS, 2015).

Antibiotik	Broj izolata	% rezistentnih (% intermedijarnih)	Raspon lokalnih rezultata
Piperacilin + tazobaktam	4521	11 (0)	3(0)-35 (0)
Ceftazidim	4511	14 (0)	2 (0)-24 (0)
Cefepim	4520	10 (0)	0 (0)-35 (1)
Imipenem	4522	18 (1)	0 (0)-50 (0)
Meropenem	4522	17 (3)	0 (0)-55 (0)
Ciprofloksacin	4514	24 (1)	4 (0)-47 (1)
Gentamicin	4523	23 (0)	2 (0)-44 (0)
Netilmicin	3843	23 (0)	0 (0)-45 (0)
Amikacin	4490	9 (2)	0 (0)-23 (0)
Kolistin	860	0 (0)	0 (0)-0 (0)

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je iz prikupljenih uzoraka vode s različitih lokacija izdvojiti i biokemijski potvrditi bakteriju *P. aeruginosa* te pratiti njeno preživljavanje u sterilnoj vodi. Bitno je utvrditi postoje li razlike u preživljavanju sojeva *P. aeruginosa* s obzirom na porijeklo uzorka vode iz kojeg dolaze.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Laboratorijski pribor

- Sterilne boce od 500 ml
- Sistem za membransku filtraciju
- Membranski filteri promjera 0,45 μm
- Petrijeve zdjelice
- Pincete
- Plamenik
- Jednokratne eze
- UV lampa
- Automatska pipeta
- Nastavci za automatsku pipetu
- Epruvete
- Kapaljke
- Vortex miješalica
- Brojač kolonija
- Inkubator na 36 °C

2.1.2. Mikrobiološke podloge

a) Pseudomonas agar (g/l):

želatina	16,0
hidrolizat kazeina	10,0
kalijev sulfat	10,0
magnezij klorid	1,4
agar	15,0
destilirana voda	1 l

pH 7.1 ± 0.2 pri 25 °C

b) Hranjivi agar (Tryptone Glucose Yeast Agar) (g/l):

tripton	5,0
ekstrakt kvasca	2,5
glukoza	1,0
agar	9,0
destilirana voda	1 l

pH 7.0 ± 0.2 pri 25 °C

2.1.3. Kemikalije i mikrobiološki testovi

Citokrom oksidaza test

- Dimetil p-fenilen diamin
- Mikrobiološka ušica
- Disk za citokrom oksidazu

API komercijalni test

- API ampule
- Mineralno ulje
- Fiziološka otopina.

2.2. Metode

2.2.1. Priprema mikrobioloških podloga

Mikrobiološke podloge su pripremljene prema uputama proizvođača na način da se propisana količina dehidrirane mikrobiološke podloge otopila u 1000 ml hladne, destilirane vode te se sve zagrijavalo uz miješanje dok se smjesa nije potpuna otopila. Tako pripremljena podloga se sterilizirala u autoklavu 15 minuta na 121 °C nakon čega se podesio pH.

2.2.2.Prikupljanje i obrada uzoraka

Prikupljeni su uzorci vode različitog porijekla (površinska voda, voda za piće, voda iz cisterni) u cilju izdvajanja bakterije *P. aeruginosa* (Tablica 2). Dio uzoraka je prikupljen pri standardnim uzorkovanjima Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, a dio uzoraka sam prikupila ja na terenu. Uzorci su prikupljeni u istom vremenskom periodu, u razdoblju od 08.03.2017. do 09.04.2017. Uzorci u količini od 500 ml su uzimani u sterilne staklene boce te su se u roku od 6 sati od uzorkovanja odnijeli u laboratorij i obradili prema normi Kakvoća vode-detekcija i brojenje *Pseudomonas aeruginosa* (HRN EN ISO 16266: 2008). Također, koristili smo soj *P. aeruginosa* izdvojen iz pacijenta kao kontrolni soj, jer je bio otporan na većinu antibiotika. Uzorci su obrađeni u laboratoriju metodom membranske filtracije. Količina od 100 ml uzorka je propuštena kroz membranski filter veličine pora 0,45 µm, koji smo stavljali na krutu mikrobiološku podlogu za uzgoj *P. aeruginosa*, Pseudo CN agar. Ova mikrobiološka podloga sadrži cetrimid koji omogućuje proizvodnju piocijanina. Uzorci su nakon toga inkubirani 37 °C/48 h te su sve plavo-zelene kolonije koje fluoresciraju pod UV svjetlom izdvojene i biokemijski potvrđene biokemijskim testovima.

Tablica 2. Uzorci voda odabrani za pokus

Uzorak br.	Lokacija uzorka	Datum uzorkovanja
1	Pacijent ¹	03.04.2017.
2	Otpadna voda (KBC Split) ²	21.03.2017.
3	Ušće rijeke Cetine (boćata voda) ³	08.03.2017.
4	Ušće rijeke Cetine (slatka voda) ³	12.03.2017.
5	Rijeka Cetina (Radmanove mlinice) ³	08.03.2017.
6	Bušotina (sirova voda) ²	22.03.2017.
7	Brodski tank (vodovodna voda) ²	28.03.2017.
8	Cisterna (kišnica) ²	10.03.2017.
9	Otpadna voda (privatni objekt) ²	13.03.2017.
10	Vodovodna voda ²	05.04.2017.

LEGENDA: ¹ kontrolni soj iz KBC Split; ² uzorci iz rutinskog rada laboratorija NZZJZS; ³ uzorci prikupljeni na terenu.

Za potvrdu sojeva smo koristili test na citokrom oksidazu te komercijalni biokemijski niz API 20E/NF (Slika 1). Citokrom oksidaza testom smo dokazivali proizvodnju enzima citokrom C oksidaze. Taj enzim, ukoliko je prisutan u ispitivanoj bakterijskom kulturi, u prisutnosti atmosferskog kisika katalizira oksidaciju fenilendiamina iz testa do tamnoljubičaste komponente indofenola (Stilinović i Hrenović, 2009). Test se izvodio na način da se malo bakterijske kulture mikrobiološkom ušicom nanijelo na disk natopljen sa dimetil p-fenilen diaminom. Pojava ljubičaste boje se smatrala pozitivnom reakcijom. API komercijalni test sadrži niz supstrata za određivanje biokemijskih reakcija te daje odgovor o kojoj je bakteriji riječ. API test se izvodio prema uputama proizvođača. Uzorkom bakterijske kulture su napunjene jažice sa supstratima te je test inkubiran 24 h na 37 °C, u vlažnom okolišu. Vlažan okoliš je postignut tako što su okolne jažice bile prelivene fiziološkom otopinom. Prema boji reakcija smo očitali rezultate te prema njima, u predviđenom komercijalnom programu (Apiweb, BioMerieux) pronašli o kojoj se bakteriji radi. Za pokus smo odabrali 10 različitih sojeva *P. aeruginosa* koji su potvrđeni API testom i testom na citokrom oksidazu, a izdvojeni su iz različitih uzoraka vode.



Slika 1. Izgled pozitivnog Api testa za *P. aeruginosa*.

2.2.3. Preživljavanje odabranih sojeva *P. aeruginosa* u sterilnoj vodi

Od svakog od odabranih 10 sojeva *P. aeruginosa* napravljena je početna suspenzija u fiziološkoj otopini, prema McFarland 1 (3×10^8 CFU/ml). Po 1 ml tako pripremljenih suspenzija nacijepio se u boce sa po 100 ml sterilne vode (destilirane), kako bi se u pokus išlo s jednakim brojem kolonija svakog izolata. Broj vijabilnih kolonija tijekom pokusa pratio se na način da su se svaki put napravila decimalna razrijeđenja te se po 1 ml iz svakog razrijeđenja naciepljivao na hranjivi agar. Hranjivi agar smo inkubirali na 37 °C/24 h i brojali izrasle kolonije bakterija s dva susjedna razrijeđenja. Konačan broj kolonija smo dobili

računajući aritmetičku sredinu broja kolonija dobivena iz dva susjedna razrjeđenja. Prvo mjerenje je provedeno nakon 24 h inkubacije, a slijedeća mjerenja nakon 2,7,14,21 i 28 dana inkubacije. Dobiveni broj kolonija se logaritmirao i izrazio kao logCFU po 1 ml. Preživljavanje je izračunato prema formuli: $(\log\text{CFU}/\text{ml}_{\text{vrijeme}} : \log\text{CFU}/\text{ml}_{\text{start}}) * 100$), gdje je $\log\text{CFU}/\text{ml}_{\text{vrijeme}}$ broj bakterija na dan mjerenja, a $\log\text{CFU}/\text{ml}_{\text{start}}$ početna koncentracija bakterija.

2.2.4. Statistička obrada podataka

Prilikom obrade podataka korišten je program Microsoft Excel 2010. Napravljen je izračun srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaki analizirani izolat.

3. REZULTATI

3.1. Izolati *P. aeruginosa* iz voda

U periodu od 08. 03. 17 do 09. 04. 2017g. prikupila sam 31 uzorak vode na različitim lokacijama u blizini Omiša kao što su potoci, rijeka Cetina, bare, more itd. Od 31 prikupljenog uzorka u 3 uzorka smo pronašli i biokemijski potvrdili *P. aeruginosa*. U ostalim uzorcima *P. aeruginosa* nije nađena. Za istraživanje smo koristili ova 3 izolata i preostalih 7 koji su izdvojeni tijekom rutinskih analiza na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo.

3.2. Preživljavanje *P. aeruginosa* u vodi

Izolat 1 je izdvojen iz pacijenta, te se njegov postotak preživljavanja tijekom 28 dana postupno smanjivao (Tablica 3 i 4, Slika 2). Izolat 2 je izdvojen iz otpadne vode bolnice u Splitu. Njegovo preživljenje je drugi dan iznosilo 93 %, a sedmi dan 66 %. Nakon 28 dana je preživljavanje ovog izolata iznosilo 66 % (Tablica 3 i 4, Slika 2). Izolat 3 je izdvojen iz uzorka vode sa ušća rijeke Cetine (boćata voda). Drugi dan je njegovo preživljenje iznosilo 90 %, sedmi dan 83 %, 21 dan 45 %, a posljednji dan 36 % (Tablica 3 i 4, Slika 2). Izolat 4 koji je izdvojen iz uzorka vode s ušća rijeke Cetine (slatka voda) prva dva mjerenja je pokazao blagi porast, nakon čega se njegov broj smanjivao te je preživljavanje posljednjeg dana iznosilo 89 % (Tablica 3 i 4, Slika 2). Peti soj smo također izdvojili iz rijeke Cetine na lokaciji Radmanove mlinice. Taj soj je pokazao dosta blagih oscilacija tijekom mjerenja. Drugi dan se broj bakterija povećao, 21. dan također, ali na kraju istraživanja njegovo preživljenje je iznosilo 92 % te se može vidjeti da je veliki broj bakterija preživio vrijeme istraživanja (Tablica 3 i 4, Slika 2). Izolat 6 je izoliran iz uzorka vode iz bušotine. Drugi dan je zabilježen njegov blagi porast, nakon čega je uslijedilo smanjivanje broja bakterija te je njegovo preživljenje 28. dan iznosilo 84 % (Tablica 3 i 4, Slika 2). Izolat 7 je izdvojen iz uzorka vode iz brodskog tanka. Broj ovih bakterija je tijekom 28 dana oscilirao, ali na kraju istraživanja je postotak preživjelih bakterija iznosio 98 % (Tablica 3 i 4, Slika 2). Soj 8 koji je pronađen u kišnici iz cisterne je drugi dan pokazao blago smanjenje, a sedmi dan povećanje broja bakterija nakon čega se njihov broj kontinuirano smanjivao (Tablica 3 i 4, Slika 2). Izolat 9 je pokazivao oscilacije tijekom mjerenja. Drugi dan je njegovo preživljavanje iznosilo 91 %. Taj soj je izoliran iz uzorka otpadne vode privatnog objekta. Posljednji izolat, br. 10 je izdvojen iz uzorka vodovodne vode. Prva dva mjerenja se broj bakterija povećao, ali se na

kraju smanjio u odnosu na prvo mjerenje te je njegovo preživljavanje 28. dan iznosilo 94 % (Tablica 3 i 4, Slika 2).

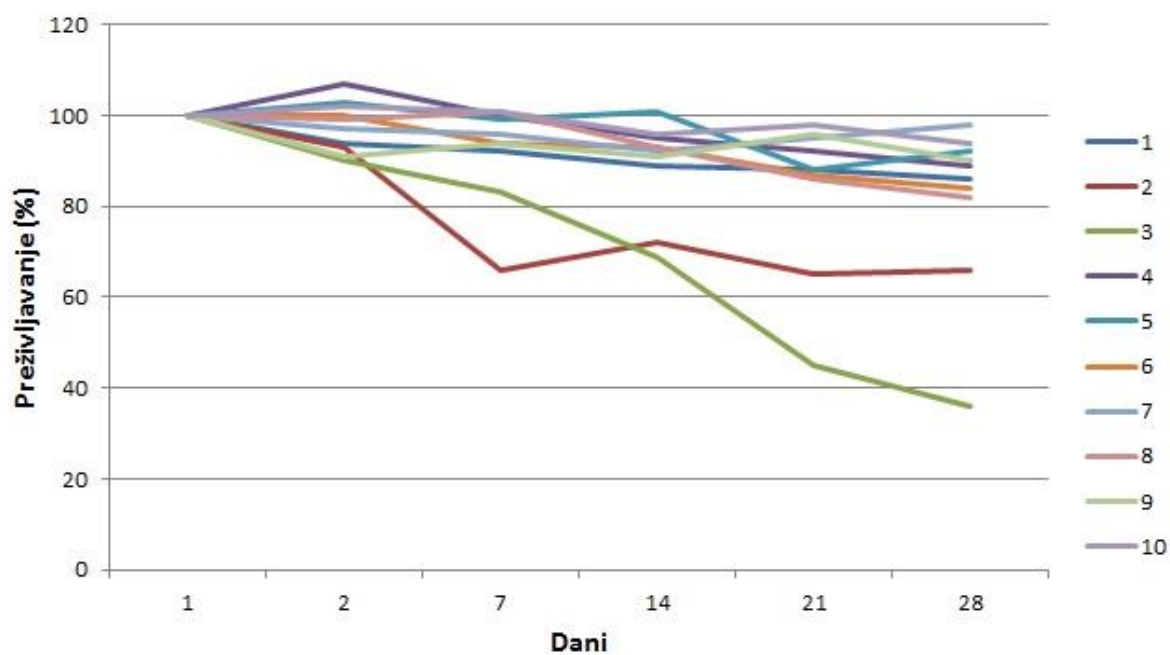
Tablica 3. Broj *P. aeruginosa* na određeni dan mjerenja, prikazan kao srednja vrijednost (logCFU/1ml) i standardna devijacija.

Br. izolata/dan mjerenja	1	2	7	14	21	28
1	5,9±0,08	5,5±0,10	5,5±0,02	5,2±0,12	5,2±0,08	5,0±0,02
2	6,2±0,12	5,8±0,12	4,1±0,14	4,5±0,02	4,0±0,03	4,0±0,08
3	5,8±0,22	5,2±0,15	4,8±0,21	4,0±0,09	2,6±0,03	2,1±0,24
4	6,0±0,08	6,5±0,10	6,1±0,02	5,8±0,61	5,6±0,03	5,4±0,17
5	6,3±0,05	6,4±0,08	6,2±0,10	6,3±0,02	5,6±0,20	5,8±0,09
6	6,5±0,12	6,5±0,13	6,1±0,26	6,1±0,08	5,6±0,07	5,5±0,13
7	6,5±0,02	6,3±0,29	6,2±0,16	6,0±0,13	6,1±0,08	6,3±0,16
8	6,2±0,51	6,2±0,20	6,3±0,24	5,7±0,30	5,3 ±0,05	5,1±0,05
9	6,4±0,10	6,0±0,04	6,0±0,28	5,8±0,13	6,1±0,67	5,8±0,08
10	6,0±0,08	6,1±0,86	6,1±0,23	5,7±0,03	5,9±0,06	5,6±0,08

Tablica 4. Preživljavanje (%) *P. aeruginosa* u vodi kroz 28 dana praćenja, prikazano kao srednja vrijednost postotka preživljavanja.

Br. izolata/dan mjerenja	1	2	7	14	21	28
1	100	94	92	89	88	86
2	100	93	66	72	65	66
3	100	90	83	69	45	36
4	100	107	100	95	92	89
5	100	103	99	101	88	92
6	100	100	94	93	87	84

7	100	97	96	92	95	98
8	100	99	101	93	86	82
9	100	91	94	91	96	90
10	100	102	101	96	98	94



Slika 2. Preživljavanje (%) izolata *P. aeruginosa* (1-10) u periodu od 28 dana praćenja.

4. RASPRAVA

U ovom istraživanju se mjerilo preživljavanje bakterije *P. aeruginosa* u sterilnoj destiliranoj vodi. Od 10 odabranih izolata nakon 28 dana istraživanja svi izolati su bili vijabilni. Izolat 1 koji je, zbog svoje otpornosti na antibiotike, uzet od pacijenta kao kontrolni soj pokazao je preživljavanje od 86 % nakon 28 dana. Čak pet izolata (4, 5, 7, 9, 10) su pokazali veće preživljavanje od njega što ukazuje na njihovu dobru prilagodbu uvjetima okoliša. Najveći postotak preživljenja je pokazao izolat br. 7 koji je pronađen u vodi iz broskog tanka. Taj soj je u više navrata izdvojen iz tanka, čak i nakon postupka dezinfekcije vode kloriranjem, što ukazuje na njegovu otpornost. Možemo pretpostaviti da je ovaj soj razvio različite mehanizme prilagodbe na nepovoljne uvjete okoliša koji bi mogli uključivati i otpornost prema visokoj koncentraciji klora. Poznato je da *P. aeruginosa* može stvarati glikokaliks koji ovim bakterijama omogućuje preživljavanje u nepovoljnim životnim uvjetima kao što su visoke koncentracije klora (Mena i Gerba, 2009). Prema Legnani i sur., (1999) *P. aeruginosa* ima sposobnost preživjeti i rasti u mineralnoj vodi koja sadrži vrlo nisku razinu otopljenih tvari i organskih spojeva što potvrđuje njegovu mogućnost prilagodbe i rasta u okolišu sa vrlo niskom koncentracijom nutrijenata. U istraživanju koje su proveli Tamagnini i Gonzalez, (1997) flaširana voda je sterilizirana i skladištena u plastične ambalaže od 5 i 25 l te je čuvana 30 dana. Nakon 30 dana koliformi i *E. coli* nisu pronađeni, a *P. aeruginosa* je pronađen u 1 od 3 analizirana uzorka. Nutritivna svestranost *P. aeruginosa* (Holt i sur., 1994) joj omogućuje umnažanje koristeći dostupne tragove nutrijenata prisutne u vodi, ako se unesu iz plastičnih ambalaža (Tamagnini i Gonzalez, 1997). Neke druge bakterije kao što je primjerice *K. pneumoniae* isto tako dugo preživljavaju u vodi, čak i u uvjetima manjka nutrijenata. Prema istraživanju koje su proveli Štimac i sur. (2009) *K. pneumoniae* je pokazala najveće preživljavanje u destiliranoj vodi. Nakon 194 dana broj ovih bakterija se smanjio sa početne vrijednosti od oko 10^6 CFU/ml na 10^5 CFU/ml. Prirodna izvorska voda se pokazala kao najnepovoljniji medij za razmnožavanje ovih mikroorganizama te nakon 142 dana *K. pneumoniae* više nije bila prisutna u uzorku. Usporedimo li to sa istraživanjem Legnani i sur. (1999) gdje je soj *P. aeruginosa* preživio dulje od 5 godina u prirodnoj mineralnoj vodi, možemo zaključiti da je otporniji na uvjete i da mu je potrebno manje nutrijenata za preživljavanje nego što treba *K. pneumoniae*. Prema istraživanju u Grčkoj (Papapetropoulou i sur., 1994), 9% uzoraka vode sa slavine je sadržavalo *P. aeruginosa* u srednjoj koncentraciji od 7 CFU/100ml, a u 18,8% uzoraka flaširana vode je ova bakterija nađena u srednjoj

koncentraciji od 1,000 CFU/100 ml. Ovi izolati su bili otporni i na antibiotike kao što su tetraciklini i streptomycin (Mena i Gerba, 2009).

Najmanji postotak preživljavanja je imao *P. aeruginosa* iz uzorka br. 3. Već nakon prvog tjedna je uslijedilo značajnije smanjenje njegovog broja, sve do 36 % na 28. dan istraživanja. Ovaj soj je izdvojen iz uzorka bočate vode na ušću rijeke Cetine. Možda je upravo povećani salinitet imao utjecaj na njegovu slabiju otpornost, odnosno da je njegovo preživljavanje bilo najslabije. Različiti čimbenici kao što su temperatura, pH, količina svjetla, prisutstvo soli utječu na preživljavanje bakterija u vodi (Wcisło i Chróst, 2000). U istraživanju Hrenović i Ivanković (2009) mjereno je preživljavanje *E. coli* i *Acinetobacter junii* u različitim koncentracijama NaCl. Obje bakterije su, u uvjetima uzgoja na mediju bogatom nutrijentima, pokazale da se mogu umnožavati: *E. coli* do koncentracije NaCl od 5 % a *A. junii* do koncentracije od 3,5 %. Preživjele su do 48 h pri koncentraciji od 30 % NaCl, te 72 h pri koncentraciji od 20 % NaCl. Kada su uzgajane u mediju siromašnom nutrijentima umnožavale su se na koncentraciji od 0 % NaCl (*A. junii*) i od 0,4 % NaCl (*E. coli*). U mediju siromašnom nutrijentima pri višim koncentracijama NaCl od 0% NaCl (*A. junii*), te od 0,4 % NaCl (*E. coli*) bakterije su se prestale umnožavati. *E. coli* je uspjela preživjeti dulje od 72 h u višim koncentracijama NaCl (20%, 30%) u mediju siromašnom nutrijentima, vjerojatno zato što nije dolazilo do umnažanja bakterija pa je to omogućilo dulje preživljavanje istih. U mediju bogatom nutrijentima nakon 72 h nije zabilježena bakterijska aktivnost. Budući da se u mediju siromašnom nutrijentima bakterije nisu razmnožavale u koncentraciji soli iznad 0,4 % ne može ih se nazvati osmotolerantnim bakterijama. Tu se može vidjeti kako preživljavanje bakterija ovisi i o količini dostupnih nutrijenata te o količini soli, ali i o njihovim odnosima. Odnosno, u morskoj vodi može doći do ugibanja ovih bakterija upravo zbog kombinacije velikih koncentracija soli i manjka nutrijenata (Hrenović i Ivanković, 2009). Nakon izolata 3 najmanje preživljenje je uočeno kod izolata 2 koji je izdvojen iz otpadne vode. Ako pogledamo vrijednosti preživljenja može se jasnije vidjeti da su ostali izolati više manje pokazali ujednačeno preživljavanje, dok se razlika uočava u izolata 2 i 3.

Različite karakteristike vodenog okoliša utječu na prilagodbu bakterija tom okolišu. Tako npr. pH, koncentracija nutrijenata i temperatura imaju ulogu i u prihvaćanju bakterija za supstrat odnosno u stvaranju biofilma (Donlan, 2002). Nekoliko studija je dokazalo da sezonske promjene utječu na formaciju biofilma u različitim vodenim sustavima (Donlan i sur., 1994; Fera i sur., 1989). *P. aeruginosa* ima veliki broj gena koji omogućuju razgradnju

različitih supstrata i katalizu, što ih čini sposobnim da koriste različite sastojke kao hranjive tvari, a samim time i visoku ekološku prilagodbu (Stanier i sur., 1966). Njihovi poželjni izvori ugljika i dušika su kratki lanci masnih kiselina, aminokiseline i poliamini (Stanier i sur., 1966; Lessie i Neidhardt, 1967; Meile i sur., 1982; Tricot i sur., 1994), dok su manje poželjni više metabolizirani šećeri (Entner i Doudoroff, 1952; Goldbourt i sur., 2007). Prema istraživanju Frimmersdorf i sur., (2010) gdje su dva različita soja *P. aeruginosa* uzgajana na mikrobiološkoj podlozi sa različitim izvorom ugljika (kadaverin, casamino kiseline, citrat, glukoza, sukcinat, triptofan), najmanji rast je zabilježen na mediju sa kadaverinom kojim su imitirani uvjeti sa niskom koncentracijom nutrijenata, a najveći sa triptofanom koji je predstavljao veću koncentraciju nutrijenata. Prema Frimmersdorfu (2010) dokazano je da u uvjetima manjka nutrijenata *P. aeruginosa* aktivira svoje posebne metaboličke puteve povezane sa prethodno dostupnim izvorima ugljika. Ta strategija prilagodbe u kombinaciji sa nepromjenjivim metabolizmom jezgre može predstavljati temelj za metaboličku svestranost ovog organizma i njegovo prilagođavanje različitim okolišnim uvjetima (Frimmersdorf i sur., 2010). U stresnim uvjetima promjene u razini ekspresije pojedinih gena potiču fenotipske promjene kao odgovor na promjene u okolišu, i tako omogućuju njihovu prilagodbu (Storz i Hengge, 2010). U istraživanju Mendis i sur., (2014) *P. aeruginosa* je uzgajana u Fraquil mediju koji sadrži soli i metale u tragovima (Morel i sur., 1975). Mjereno je preživljavanje sa većim i manjim početnim brojem *P. aeruginosa*. U takvom mediju *P. aeruginosa* je preživjela najmanje 45 dana, bez smanjenja kultivabilnosti. Broj *P. aeruginosa* se u tom mjeranju smanjio otprilike sa 9,8 log CFU/ml na 9,4 log CFU/ml kod većeg početnog broja bakterija, a kod manjeg broj je ostao skoro isti (Mendis i sur., 2014). Kod nekih bakterija izloženost niskoj koncentraciji nutrijenata rezultira njihovim ulaskom u vijabilno, nekultivabilno stanje, odnosno bakterije su vijabilne ali se ne mogu dobiti u kulturi (Li i sur., 2014). Prema Mendis i sur., (2014) za *P. aeruginosa* u Fraquil mediju tijekom 45 dana nije došlo do nekultivabilnog stanja, budući da su bakterije toliko dugo preživjele u mediju siromašnom nutrijentima. U drugim istraživanjima je dokazano da prisutnost bakra u vodi sa slavine izaziva vijabilno ali nekultivabilno stanje kod *P. aeruginosa* već nakon 24 h (Dwidjosiswojo i sur., 2011). Također u Fraquile mediju *P. aeruginosa* ne stvara biofilm. Pretpostavlja se da je razlog tome što je koncentracija nutrijenata premala za proizvodnju ekstracelularnog matriksa koji je nužan za stvaranje biofilma, pa *P. aeruginosa* ostaje u planktonskom, životnom obliku (Coggan i Wolfgang, 2012).

5. ZAKLJUČAK

P. aeruginosa je široko rasprostranjena u okolišu pa je tako možemo pronaći u vodama različitog porijekla. U ovom radu je izolirana bakterija *P. aeruginosa* iz različitih uzoraka vode. Postotak preživljenja *P. aeruginosa* u oligotrofnim uvjetima, kao što je sterilna voda se razlikuje ovisno o vrsti vode koju je nastanjivala. Kontrolni izolat izdvojen iz pacijenta koji je višestruko otporan na antibiotike, nije pokazao značajnije razlike u preživljenju u odnosu na ispitivane sojeve iz vode. Trebalo bi dodatno istražiti postoji li povezanost između preživljenja bakterija u vodi i njihove otpornosti na različite antibiotike. Nakon 28 dana u svim izolatima smo još uvijek imali vijabilne stanice *P. aeruginosa*. Ova bakterija je inače veoma prilagodljiva raznovrsnim okolišnim uvjetima, posebice manjku nutrijenata. Aktiviranjem različitih metaboličkih puteva postaje sposobna koristiti različite sastojke kao hranjive. Prema brojnim istraživanjima često se uspijeva prilagoditi novim životnim uvjetima i preživljava duže nego neke druge bakterije. Ispitivane bakterije su pokazale smanjivanje broja tijekom perioda od 28 dana. Izolat 7 koji je izdvojen iz vode broskog tanka, koja se višekratno klorirala, pokazao je najviši postotak preživljenja. Postoji mogućnost da je postupak dezinfekcije klorom pogodovao aktivaciji posebnih mehanizama otpornosti na nepovoljne uvjete kao što je oligotrofija pa je zato ovaj izolat pokazao najveće preživljenje. Povećani salinitet vode, s druge strane, možda iscrpljuje i slabi bakterije *P. aeruginosa* pa je stoga preživljenje soja iz boćate vode rijeke bilo najlošije. Ove pretpostavke bi se također trebale potvrditi daljnjim istraživanjem. Nove spoznaje o načinima prilagodbe ovih bakterija na nepovoljne životne uvjete i njihovom preživljavanju u istima, bile bi dragocjene u otkrivanju učinkovitih metoda njihove eliminacije iz bolnica gdje su često uzročnici ozbiljnih infekcija.

6. LITERATURA

- American Public Health Association, Greenberg, Arnold E., Eaton, Andrew D., Clesceri, Lenore S., American Water Works Association et al. (1992): Standard methods for the examination of water and wastewater (18th ed). American Public Health Association, Washington, DC. 1100.
- Antolović R., Frece J., Gobin I., Hrenović J., Kos B., Markov K., Mlinarić-Missoni E., Novak J., Ožanić M., Pinter Lj., Plečko V., Pleško S., Šantić M., Šegvić Klarić M., Šeruga Musić M., Škorić D., Šušković J. (2016): Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije. Hajsig D., Delaš F., ur. Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo. 172.
- Cabral J. P. S. (2010): Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. International Journal of Environmental Research and Public Health. 7: 3657-3703.
- Coggan K. A., Wolfgang M. C. (2012): Global regulatory pathways and crosstalk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. Curr. Issues Mol. Biol. 14: 47-70.
- Colledge W.H., Abella B.S., Southern K.W., i sur. (1995): Generation and characterization of a DeltaF508 cystic fibrosis mouse model. Nat Genet. 10: 445–452.
- Donlan R. M., Pipes W. O., Yohe T. L. (1994): Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems. Water Res. 28: 1497–1503.
- Donlan R.M. (2002): Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases. 8 (9): 881-890.
- Duraković S. (1996): Opća mikrobiologija. Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb. 462.
- Duraković S. (1996): Primjenjena mikrobiologija. Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb. 327.
- Dwidjosisiwojo Z., Richard J., Moritz M. M., Dopp E., Flemming H. C., Wingender J. (2011): Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water environments. Int. J. Hyg. Environ. Health. 214: 485-492.

- Entner N., Doudoroff M. (1952): Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. J BiolChem. 196: 853–862.
- Felföldi T., Heeger Z., Vargha M., Marialigheti K. Detection of potentially pathogenic bacteria in the drinking water distribution system of a hospital in Hungary. (2010): Clin. Microbiol. Infect. 16: 89-92.
- Fenwick A. (2006): Waterborne Diseases-Could they be Consigned to History?. Science. 313: 1077-1081.
- Fera P., Siebel M. A., Characklis W. G., Prieur D. (1989): Seasonal variations in bacterial colonization of stainless steel, aluminum, and polycarbonate surfaces in a seawater flow system. Biofouling. 1: 251–61.
- Frimmersdorf E., Horatzek S., Pelnickevich A., Wiehlemann L., Schomburg D. (2010): How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. Environmental Microbiology. 12 (6): 1734-1747.
- George I., Servais P. (2002): Sources et Dynamique des Coliformes dans le Bassin de la Seine. Rapport de Synthèse, Février. 46.
- Goldbourn A., Day L.A., McDermott A.E. (2007): Assignment of congested NMR spectra: carbonyl backbone enrichment via the Entner-Doudoroff pathway. J Magn Reson. 189: 157–165.
- Grabow W.O.K. (1996): Waterborne Diseases: Update on Water Quality Assessment and Control. Water SA. 22: 193-202.
- Guida M., Di Onofrio V., Galle F., Gesuele E., Valeriani F., Liguori R., Spica R.V., Liguori G. (2016): *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pool water: Evidences and perspectives for new control strategy. International journal of Environmental Research and Public Health. 13 (9): 919-921.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition. Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 754.
- Hrenović J., Ivanković T. (2009): Survival of *Escherichia coli* and *Acinetobacter junii* at various concentrations of sodium chloride. EurAsian Journal of BioSciences. 3: 144-151.

- HRN EN ISO 6222: 2000: Kakvoća vode-Brojenje uzgojenih mikroorganizama-Broj kolonija nacjepljivanjem na hranjivi agar (ISO 6222:1999; EN ISO 6222:1999).
- HRN EN ISO 16266: 2006: Kakvoća vode-Detekcija i brojenje *Pseudomonas aeruginosa*-Metoda membranske filtracije.
- Hunter P.R. (2003): Climate change and waterborne and vector-borne disease. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 37-46.
- Husain A., Reddy G.P. (2010): Biological Contamination of Water. Desalination and Water Resources, Physical, Chemical and Biological Aspects. *Encyclopedia of Desalination and Water Resources (DESWARE)*. 18-24.
- Inamori Y., Fujimoto N. (2009): Physical/Mechanical Contamination of Water. *Water Quality and Standards-Volume 2. Encyclopedia of Life Support Systems*. 204-211.
- Jawetz, Melnick, Adelberg. (2015): *Medicinska mikrobiologija*. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split. 864.
- Klein G. (2003): Ecology and Antibiotic Resistance of Enterococci from Food and the Gastro-Intestinal Tract. *International Journal Food Microbiology*. 88: 123-131.
- Kuhn I., Iversen A., Burman L.G., Olsson-Liljequist B., Franklin A., Finn M., Aarestrup F., Seyfarth A.M., Blanch A.R., Vilanova X., Taylor H., Caplin J., Moreno M.A., Dominguez L., Herrero I.A., Mollby R. (2003): Comparison of Enterococcal Populations in Animals, Humans, and Environment-an European Study. *International Journal Food Microbiology*. 88: 133-145.
- Legnani P., Leoni E., Rapuano S., Turin D., Valenti C. (1999): Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water-a 5 year study. *International Journal of Food Microbiology*. 53: 153-158.
- Lessie, T.G., Neidhardt F.C. (1967): Formation and operation of the histidine degrading pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 93: 1800-1810.
- Li L., Mendis N., Trigui H., Olive J. D., Facuher S. P. (2014): The importance of the viable but non culturable state in humane bacterial pathogens. *Front. Microbiol*. 5: 258.

- Livermore David M. (2002): Multiple mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare ?. Antimicrobial Resistance. 34: 634-640.
- Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D. (2009): Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. Clinical Microbiology Reviews. 22 (4): 582-610.
- Meile L., Soldati L., Leisinger T. (1982): Regulation of proline catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Arch Microbiol. 132: 189-193.
- Mena K.D., Gerba C.P. (2009): Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 201: 71-115.
- Mendis N., Lin R. Y., Faucher S. P. (2014): Comparison of virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to water and grown in rich broth. Can. J. Microbiol. 60: 777-781.
- Meyer J.M., Abdallah M.A. (1978): The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. Society for General Microbiology. 107: 319-328.
- NN 125/13, 141/13 i 128/15.
- Paterson D. L. (2006): The Epidemiological Profile of Infections with Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Species. Clinical Infectious Diseases. 43 (2): 43-48.
- Papapetropoulou M., Iliopoulou J., Rodopoulou G. (1994): Occurrence of antibiotic resistance of *Pseudomonas* species isolated from drinking water in southern Greece. J Chemother. 6: 111-116.
- Payment P., Waite M., Dufour A. (2003): Introducing parameters for the assessment of drinking water quality. In Assessing Microbial Safety of Drinking Water. Improving Approaches and Method; WHO & OECD. IWA Publishing, London. 295.
- Ponomareva O.N., Arliapov V.A., Alferov V.A., Reshetilov A.N. (2011): Microbial Biosensors for Detection of Biological Oxygen Demand (a review). Applied Biochemistry and Microbiology. 47: 1-11.

- Potvin E., Lehoux D.E., Kukavica-Ibrulj I., Richard K.L., Sanschagrin F., Lau G.W., Levesque R.C. (2003): In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ Microbiol* 5: 1294-1308.
- Rahme L.G., Ausubel F.M., Cao H. i sur. (2000): Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *P Natl Acad Sci USA*. 97: 8815–8821.
- Rice E. W., Allen M. J., Edberg S. C. (1990): Efficacy of 1-Glucuronidase Assay for Identification of *Escherichia coli* by the Defined-Substrate Technology. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (5): 1203-1205.
- Rice S.A., Van den Akker B., Pomati F., Roser D. A. (2012): Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools: A review. *J. Water. Health*. 10: 181–196.
- Roser D.J., Van den Akker B., Boase S., Haas C.N., Ashbolt N.J., Rice S.A. (2014): *Pseudomonas aeruginosa* dose response and bathing water infection. *Epidemiol. Infect.* 142: 449–462.
- Scheutz F., Strockbine N.A. (2005): Genus *Escherichia*. In Beegey`s Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. Springer, New York. 2: 607-623.
- Snouwaert J.N., Brigman K.K., Latour A.M., Malouf N.N., Boucher R.C., Smithies O., Koller B.H. (1992): An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science*. 257: 1083–1088.
- Stanier R.Y., Palleroni N.J., Doudoroff M. (1966): The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol*. 43: 159–271.
- Štilinović B., Hrenović J. (2009): Praktikum iz bakteriologije. Kugler, Zagreb. 199.
- Storz G., Hengge R. (2010): Bacterial Stress Response. American society for Microbiology press. 506.
- Štimac I., Marchesi Vasiljev V., Tomljenović M., Rukavina T. (2009): Preživljavanje vrste *Klebsiella pneumoniae* u različitim uzorcima voda. Hrvatske vode. 71: 13-18.

- Tambić Andrašević T., Tambić T., Katalinić- Janković V., Payerl Pal M., Bukovski S., Butić I., Šoprek S., Lucić S. (2015): Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2015.g. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske. 110.
- Tamagnini L. M., Gonzalez R.D. (1997): Bacteriological stability and growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water. *Journal of Applied Microbiology*. 83: 91-94.
- Tan M.W., Mahajan-Miklos S., Ausubel F.M. (1999): Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *P Natl Acad Sci USA*. 96: 715–720.
- Tricot C., Wauven C.V., Wattiez R., Falmagne P., Talon, V. (1994): Purification and properties of a succinyl-transferase from *Pseudomonas aeruginosa* specific for both arginine and ornithine. *Eur J Biochem*. 224: 853–861.
- Traore N. A., Mulaudzi K., Chari J.E.G., Foord H.S., Mudau S. L., Barnard G. T., Potgieter N. (2016): The Impact of Human activities on Microbial Quality of Rivers in the Vhembe District, South Africa. *International journal of Enviromental Research and Public Health*. 13 (8): 817.
- Van der Perk M. (2013): *Soil and Water contamination*, 2nd ed. CRC Press/ Balkema. 416.
- Walker J., Moore G. (2015): *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water systems: biofilms, guidelines, and practicalities. *Journal of Hospital Infection*. 89 (4): 324-327.
- Weisło R., Chróst R.J. (2000): Survival of *Escherichia coli* in Freshwater. *Polish Journal of Environmental Studies*. 9 (3): 215-222.
- World Health Organization. (1997): *Guidelines for drinking-water quality*, 2nd ed., Vol. 3: Surveillance and control of community supplies. World health organization. 238.
- World Health Organization. (2001): *Water quality: Guidelines, Standards and Health*. IWA publishing, London. 438.
- World Health Organization. (2005): *Nutrients in drinking water*. World Health Organization. 210.

World Health Organization. (2008): Guidelines for Drinking-water Quality, Incorporating 1st and 2nd Addenda. World Health Organization, Geneva. 1 (3). 515.

World Health Organization. (2011): Guidelines for drinking water quality: fourth edition. World Health Organization. 564.

World Health Organization. (2017): Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first addendum. World Health Organization. 631.

ŽIVOTOPIS

Osobni podaci :

- **Ime i prezime:** Doris Tafra
- **Datum i mjesto rođenja:** 14. 10. 1993., Split
- **Adresa:** Brus 5 Svinišće, 21208 Kučiće
- **Telefon:** 092 184 3574
- **E-mail:** doris.tafra1@gmail.com

Školovanje:

2015.-2017. : Diplomski studij Ekologije i Zaštite prirode, kopno (Prirodoslovno Matematički fakultet, Zagreb).

2012.-2015. : Preddiplomski studij Biologije i ekologije mora (Odjel za studije mora, Split).

2008.-2012.: Jezična gimnazija (Srednja škola Jure Kaštelan, Omiš).

2000.-2008.: Osnovna škola Josip Pupačić, Kučiće.

Vještine:

- Korištenje MS Office paketa.
- Engleski jezik: aktivno u govoru i pismu.
- Talijanski jezik: pasivno u govoru i pismu.

Ostalo:

- Vozačka dozvola B kategorije.