Utjecaj ekoloških čimbenika na faktore virulencije klinički značajne bakterije Acinetobacter baumannii

Dekić, Svjetlana

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:628881

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Svjetlana Dekić

UTJECAJ EKOLOŠKIH ČIMBENIKA NA FAKTORE VIRULENCIJE KLINIČKI ZNAČAJNE BAKTERIJE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Svjetlana Dekić

INFLUENCE OF ECOLOGICAL FACTORS ON VIRULENCE PROPERTIES OF CLINICALLY RELEVANT *ACINETOBACTER BAUMANNII*

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019

Ovaj je doktorski rad izrađen na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ovaj doktorski rad financiran je temeljem natječaja „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ DOK-2015-10-3123 i u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta IP-2014-09-5656 „Prirodno stanište klinički značajnih *Acinetobacter baumannii*“.



Izrada ovog rada potpomognuta je Nacionalnom stipendijom „Za žene u Znanosti“ pod pokroviteljstvom L’Oréal ADRIA d.o.o. i Hrvatskog povjerenstva za UNESCO pri Ministarstvu kulture.



Informacije of mentoru

Prof. dr. sc. Jasna Hrenović rođena je 17. 04. 1973. u Zagrebu. Diplomirala je 1996., magistrirala 1999., a doktorirala 2002. godine na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Trenutno je zaposlena u znanstveno-nastavnom zvanju redovite profesorice (područje prirodnih znanosti, polje biologija, grana mikrobiologija) pri Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. 22. 05. 2018. izabrana je u znanstveno zvanje znanstveni savjetnik u trajnom zvanju.

Od 1997. do danas aktivno sudjeluje u nastavi na Biološkom odsjeku PMF-a i do danas je održala ukupno 9592 norma sati nastave iz različitih kolegija iz područja mikrobiologije. Bila je mentor 17 završnih radova, 45 diplomska rada, 6 magistarskih radova i 4 doktorske disertacije.

Bila je voditelj 8 nacionalnih projekta financiranih od strane MZO, SuZ, Hrvatskih voda i Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo te suradnik na 4 nacionalna projekta. Trenutno je voditelj projekta Hrvatske zaklade za znanost br. IP-2014-09-5656 „Prirodno stanište klinički značajnih *Acinetobacter baumannii*“.

Znanstveni opus prof. dr. sc. Jasne Hrenović vezan je uz mikrobnu ekologiju, bakterijske biofilmove, primijenjenu mikrobiologiju i epidemiologiju. Objavila je ukupno 88 znanstvenih radova. Objavljeni znanstveni radovi ukupno su citirani 806 puta u bazi Web of Science uz h-indeks 15, 876 puta u bazi Scopus uz h-indeks 16 te 1423 puta u Google Scholar uz h-indeks 20. Prof. dr. sc. Jasna Hrenović koautorica je ili autorica 2 sveučilišna udžbenika i 4 poglavlja u knjigama. Na znanstvenim skupovima osobno je prezentirala 33 priopćenja (od ukupno 100).

Ovim putem iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasni Hrenović, na stručnom vodstvu, iskazanom razumijevanju, potpori i motivaciji pri izradi doktorske disertacije.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Tomislavu Ivankoviću i Renati Horvat na savjetima i tehničkoj pomoći prilikom izvedbe eksperimenata.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Ivani Goić-Barišić i prof. dr. sc. Darku Tibljašu na stručnim savjetima prilikom pisanja doktorske disertacije.

Hvala mojoj najužoj obitelji na strpljenju, ljubavi i podršci.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

UTJECAJ EKOLOŠKIH ČIMBENIKA NA FAKTORE VIRULENCIJE KLINIČKI ZNAČAJNE BAKTERIJE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Svjetlana Dekić

Bakterija *Acinetobacter baumannii* uzrokuje teške infekcije imunosuprimiranih bolesnika zbog otpornosti na antibiotike i dezinficijense te posjedovanja brojnih faktora virulencije. Multiplo-rezistentni sojevi ove bakterije osim u bolničkom, pojavljuju se i u izvanbolničkom okolišu. Cilj disertacije bio je definirati ekološke čimbenice koji uvjetuju preživljavanje klinički značajnih *A. baumannii* u okolišu. Ispitivano je preživljavanje okolišnih i kliničkih izolata *A. baumannii* u različitim abiotičkim (temperatura, pH, dostupnost nutrijenata, koncentracija otopljenog kisika, isušivanje) i biotičkim (interakcija s mikroskopskim organizmima) uvjetima. Također su kvantificirani faktori virulencije (biofilm, pelikula, površinska pokretljivost) kao mehanizmi koji pospješuju preživljavanje *A. baumannii*. Klinički značajni izolati *A. baumannii* posjeduju izražene faktore virulencije te su otporni na širok spektar okolišnih uvjeta. Prirodni zeoliti uspješno inhibiraju faktore virulencije *A. baumannii* te kao ekonomski prihvatljivi i dostupni materijali mogu pronaći primjenu u uklanjanju ovog patogena iz okoliša. Rezultati ovog istraživanja omogućuju predviđanje ponašanja *A. baumannii* u okolišu te pružaju osnovu za razvoj metoda uklanjanja ovog patogena iz okoliša.

(112 stranica, 34 slike, 13 tablica, 139 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: *Acinetobacter baumannii*, bakterije, okoliš, preživljavanje, faktori virulencije, prirodni zeoliti

Mentor: Jasna Hrenović, prof. dr. sc.

Ocjenjivači: Tomislav Ivanković, doc. dr. sc.

Ivana Goić-Barišić, izv. prof. dr. sc

Darko Tibljaš, prof. dr. sc.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

INFLUENCE OF ECOLOGICAL FACTORS ON VIRULENCE PROPERTIES OF CLINICALLY RELEVANT *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Svjetlana Dekić

Acinetobacter baumannii causes severe infections in immunosuppressed patients due to resistance to antibiotics and disinfectants. Multidrug resistant *A. baumannii* isolates are common in hospital setting but also in the environment. The aim was to determine which ecological factors contribute to the survival of clinically relevant *A. baumannii* in the environment. The survival of clinical and environmental *A. baumannii* isolates was tested under different abiotic (temperature, pH, starvation, dissolved oxygen concentration, dessication) and biotic (interaction with microscopic organisms) conditions. Virulence factors (biofilm, pellicle, surface motility) as survival mechanisms were also determined. Clinically relevant *A. baumannii* express strong virulence factors and are able to survive a wide array of ecological conditions. Natural zeolites successfully inhibit *A. baumannii* virulence factors and as economically accessible materials could find application in the removal of this pathogen from the environment. The results of this research provide insight into the behaviour of *A. baumannii* as well as a starting point for the development of methods to remove this pathogen from the environment.

(112 pages, 34 figures, 13 tables, 139 references, original in croatian)

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, bacteria, environment, survival, virulence factors, natural zeolites

Supervisor: Jasna Hrenović, prof., PhD

Reviewers: Tomislav Ivanković, assist. prof., Phd

Ivana Goić-Barišić, assoc. prof., Phd

Darko Tibljaš, prof., PhD

Sadržaj

1 Uvod ... 2
2 Literaturni pregled ... 3
2.1 Bakterije roda *Acinetobacter* ... 3
2.2 Vrsta *Acinetobacter baumannii* ... 4
2.2.1 Klinička značajnost *A. baumannii* ... 4
2.2.2 Rezistencija *A. baumannii* na antibiotike ... 6
2.2.3 Bakterija *A. baumannii* u okolišu ... 8
2.2.4 Preživljavanje *A. baumannii* u okolišu ... 10
2.2.5 Faktori virulencije *A. baumannii* ... 12
2.2.5.1 Biofilm ... 12
2.2.5.2 Površinska pokretljivost rojenjem i trzanjem ... 14
2.2.5.3 Inhibicija faktora virulencije ... 14
3 Ciljevi istraživanja ... 16
4 Materijal i metode ... 18
4.1 Organizmi ... 18
4.1.1 Bakterija *Acinetobacter baumannii* ... 18
4.1.1.1 Porijeklo ... 18
4.1.1.2 Profil antibiotske osjetljivosti ... 18
4.1.1.3 Molekularna karakterizacija ... 19
4.1.2 Bakterije *Escherichia coli* i *Enterococcus faecium* ... 19
4.1.3 Kolnjak *Adineta vaga* ... 20
4.1.4 Riba *Poecilia reticulata* ... 20
4.2 Hranjive mikrobiološke podloge ... 20
4.3 Vodeni mediji korišteni u eksperimentima ... 25
4.4 Tlo korišteno u eksperimentima ... 25
4.5 Prirodni zeolitni tuf ... 27
4.6 Izvedba eksperimenata ... 28
4.6.1 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije spoja ... 28
4.6.2 Utjecaj abiotičkih ekoloških čimbenika na preživljavanje *A. baumannii* ... 29
4.6.2.1 Temperatura ... 29
4.6.2.2 Vrijednost pH ... 29
4.6.2.3 Koncentracija otopljenog kisika ... 29
4.6.2.4 Preživljavanje u morskoj i riječnoj vodi ... 30
4.6.2.5 Preživljavanje u tlu ... 30

4.6.3 Utjecaj biotičkih ekoloških čimbenika na preživljavanje *A. baumannii* 31
4.6.3.1 Među-bakterijska interakcija 31
4.6.3.2 Grazing kolnjaka 31
4.6.3.3 Kolonizacijski potencijal *A. baumannii* 32
4.7 Faktori virulencije 33
4.7.1 Biofilm 33
4.7.2 Pelikula 34
4.7.3 Površinska pokretljivost 34
4.7.4 Hidrofobnost 34
4.7.5 Hrapavost kolonija 35
4.8 Mikroskopske analize 35
4.9 Statističke analize 35
5 Rezultati 38
5.1 Profil antibiotske rezistencije 38
5.1.1 Utjecaj abiotičkih ekoloških čimbenika 38
5.1.1.1 Temperatura 38
5.1.1.2 Vrijednost pH 44
5.1.1.3 Koncentracija otopljenog kisika 45
5.1.1.4 Preživljavanje u riječnoj i morskoj vodi 51
5.1.1.5 Preživljavanje u tlu 53
5.1.2 Utjecaj biotičkih ekoloških čimbenika 61
5.1.2.1 Među-bakterijska interakcija 61
5.1.2.2 Grazing kolnjaka 63
5.1.2.3 Kolonizacijski potencijal *A. baumannii* 67
5.2 Faktori virulencije 68
5.2.1 Biofilm i pelikula 68
5.2.2 Površinska pokretljivost rojenjem i trzanjem 71
6 Rasprava 75
6.1 Utjecaj abiotičkih čimbenika na preživljavanje *A. baumannii* 75
6.1.1 Temperatura i pH 75
6.1.2 Koncentracija otopljenog kisika 77
6.1.3 Preživljavanje u riječnoj i morskoj vodi 79
6.1.4 Preživljavanje u tlu 81
6.2 Utjecaj biotičkih čimbenika na preživljavanje *A. baumannii* 83
6.3 Kolonizacijski potencijal *A. baumannii* 85

6.4 Faktori virulencije 86
7 Zaključak 89
8 Popis literature 92
9 Životopis 106
10 Prilozi 108

Popis korištenih kratica

AMK	Amikacin
CFQR	Karbapenem i fluorokinolon rezistentni izolati (engl. *Carbapenem and Fluoroquinolone Resistant*)
CFU	engl. *Colony Forming Unit*
CIP	Ciprofloksacin (engl. *Ciprofloxacin*)
CLSI	Klinički i laboratorijski standardi (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*)
CST	Kolistin (engl. *Colistin*)
DNB	Hranjivi bujon razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:100 (engl. *Diluted Nutrient Broth*)
EPS	Izvanstanične polimerne tvari (engl. *Extracellular Polymeric Substances*)
ESKAPE patogeni	*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* sp.
EUCAST	engl. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
GC	Globalni klon (engl. *Global Clone*)
GEN	Gentamicin
GIM	Metalo-β-laktamaza (engl. *German imipenemase metallo-β-lactamase*)
Grazing	Hranjenje kolnjaka bakterijama filtriranjem suspenzije
IC	Internacionalni klon (engl. *International Clone*)
IMI	Imipenem
IMP	Metalo-β-laktamaza (engl. *Imipenemase metallo-β-lactamase*)
LB	Luria-Bertani hranjivi medij
LVX	Levofloksacin (engl. *Levofloxacin*)
MALDI TOF MS	Matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija s vremenom proleta (engl. *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time of Flight Mass Spectrometry*)
MBK	Minimalna baktericidna koncentracija

MDR	Multiplo-rezistentan izolat (engl. *Multidrug-resistant*)
MEM	Meropenem
MH	Mueller-Hinton agar
MHB	Mueller-Hinton bujon
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
MIN	Minocilin (engl. *Minocycline*)
MLM	Mješanoslojne gline (engl. *Mixed-Layer Clay Minerals*)
MLST	engl. *Multi-Locus Sequence Typing*
NDM	Metalo-β-laktamaza (engl. *New Delhi metallo-β-lactamase*)
NZ	Prirodni zeolitni tuf (engl. *Natural Zeolitic Tuff*)
PBS	Fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffered Saline*)
PCR	Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)
PDR	Sveopće-rezistentan izolat (engl. *Pandrug-resistant*)
PFGE	Elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)
PNAG	polisaharid poli-β-(1, 6)-N-acetilglukozamin
rep-PCR	engl. *Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction*
Rpm	Okretaji u minuti (engl. *Rounds Per Minute*)
S	Izolat osjetljiv na sve testirane antibiotike (engl. *Susceptible*)
SAM	Ampicilin/sulbaktam (engl. *Ampicillin*/*sulbactam*)
SEM	Skenirajući elektronski mikroskop (engl. *Scanning Electron Microscope*)
SIM	Metalo-β-laktamaza (engl. *Seoul imipenemase metallo-β-lactamase*)
SW	Komercijalno dostupna izvorska voda (engl. *Spring Water*)
SXT	Trimetroprim/sulfametoksazol (engl. *Trimethoprim/sulfamethoxazole*)
TEM	Transmisijski elektronski mikroskop (engl. *Transmission Electron Microscope*)
TIM	Tikarcilin/klavulanska kiselina (engl. *Ticarcillin/Clavulanic acid*)
TOB	Tobramicin (engl. *Tobramycin*)

VBNC	Vijabilno ali ne kulturabilno stanje (engl. *Viable But Not Culturable*)
VIM	Metalo-β-laktamaza (engl. *Verona integron encoded metallo-β-lactamase*)
WGS	Sekvenciranje cijelog genoma (engl. *Whole Genome Sequencing*)
XDR	Prošireno-rezistentan izolat (engl. *Extensively-Drug Resistant*)
WW	„Worldwide“ klon (engl. *Worldwide Clone*)

UVOD

1 Uvod

Bakterija *Acinetobacter baumannii* oportunistički je patogen koji uzrokuje bolničke epidemije i izvanbolničke sporadične infekcije. U imunosuprimiranih bolesnika uzrokuje pneumoniju, meningitis, infekcije krvožilnog sustava, urinarnog trakta i kože. Velik problem u bolnicama predstavljaju multiplo-rezistentni izolati (MDR) *A. baumannii* otporni na karbapenemske antibiotike. Otpornost na antibiotike i dezinficijense te brojni mehanizmi rezistencije osigurali su *A. baumannii* mjesto u grupi ESKAPE patogena (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* sp.). Svjetska zdravstvena organizacija svrstala je karbapenem rezistentne sojeve *A. baumannii* na prvo mjesto popisa opasnih patogena za koje je potrebno što prije pronaći nove metode liječenja.

Osim u bolnicama, dokazana je prisutnost klinički značajnih *A. baumannii* s karbapenemskom rezistencijom u okolišu kao posljedica odlaganja tekućeg i krutog otpada. Nalazi *A. baumannii* pronađeni su u komunalnim i bolničkim otpadnim vodama, uređajima za pročišćavanje otpadnih voda, rijekama i tlima. Također je dokazan prijenos klinički značajnih izolata *A. baumannii* iz bolnica u okoliš.

Bakterija *A. baumannii* opstaje u bolničkom i izvanbolničkom okolišu zbog sposobnosti preživljavanja u različitim okolišnim uvjetima. Najviše istraživanja usmjereno je na preživljavanje u sušnim uvjetima na različitim površinama poput stakla, plastike i keramike na kojima *A. baumannii* može preživjeti neočekivano dugo. Međutim, istraživanja koja se bave definiranjem utjecaja ekoloških čimbenika poput temperature, pH, koncentracije otopljenog kisika i interakcije s drugim organizmima nedostaju ili su vrlo ograničena. Sposobnost preživljavanja *A. baumannii* također je uvjetovana faktorima virulencije poput tvorbe biofilma na biotičkim i abiotičkim površinama, pelikule na granici voda-zrak te površinske pokretljivosti rojenjem i trzanjem. Cilj ovog rada je ispitati učinak abiotičkih i biotičkih ekoloških čimbenika na preživljavanje klinički značajnih okolišnih izolata *A. baumannii*. Zatim, odrediti faktore virulencije te ispitati učinak prirodnog zeolitnog tufa na ekspresiju istih.

2 Literaturni pregled

2.1 Bakterije roda *Acinetobacter*

Pripadnici roda *Acinetobacter* nesporogene su gram negativne bakterije (Lee i sur., 2017.). U logaritamskoj fazi rasta imaju oblik kratkog štapića, dok u stacionarnoj fazi preuzimaju oblik koka, mogu formirati kratke lance. Posjeduju aerobni metabolizam s kisikom kao terminalnim akceptorom elektrona, ne vrše fermentaciju (Garrity i sur., 2005.). Sposobni su koristiti široki raspon spojeva kao izvor ugljika i dušika, te nisu zahtjevni za uzgoj u laboratoriju. Većina sojeva raste između 20 i 37 °C s optimumom između 33 i 35 °C te vrijednosti pH između 5 i 8 s optimumom 6,5 (Garrity i sur., 2005.). Nepokretne su bakterije jer ne posjeduju flagele, stoga je za pospješivanje rasta kulture poželjno koristiti miješanje. Neki sojevi pokazuju površinsku pokretljivost trzanjem i rojenjem (Antunes i sur., 2011.; Eijkelkamp i sur., 2011a.; Vijayakumar i sur., 2016.). Bakterije roda *Acinetobacter* posjeduju enzim katalazu, no ne enzim oksidazu. Kolonije su nepigmentirane i sluzave, ukoliko se radi o sojevima koji posjeduju kapsulu (Garrity i sur., 2005.). Ubikvitarne su saprofitske bakterije koje žive u vodi, zemlji, kanalizaciji i hrani (Towner, 2006.). Smatra se da 0,001 % ukupnih heterotrofnih aerobnih bakterija izoliranih iz tla i vode pripada rodu *Acinetobacter*. Također naseljavaju kožu i respiratorni trakt ljudi. Smatra se da je koža 42,5 % zdravih ljudi, te 75 % hospitaliziranih pacijenata kolonizirana s bakterijama roda *Acinetobacter* (Doughari i sur., 2011.). Mogu uzrokovati infekcije kože, respiratornog i krvožilnog sustava te urinarnog trakta ljudi i životinja (Towner, 2009.). Bakterije roda *Acinetobacter* imaju široku primjenu u bioremedijaciji i industriji zbog svoje sposobnosti uklanjanja fosfora i teških metala iz otpadne vode te razgradnje salicilata, aromatskih ugljikovodika i fenola koji su toksični za većinu drugih bakterija. Također proizvode izvanstanične polimere koji emulgiraju masti i ulja te na taj način sudjeluju u njihovom uklanjanju (Doughari i sur., 2011.).

Nizozemski znanstvenik Beijerinck 1911. godine prvi je puta izolirao bakteriju roda *Acinetobacter* te ju je imenovao *Micrococcus calcoaceticus*. Tijekom sljedećih 50 godina pripadnici roda *Acinetobacter* izolirani su nekoliko puta pod različitim imenima poput *Moraxella lwoffi*, *Mima polymorpha*, *Alcaligenes hemolysans*, *Mirococcus calcoaceticus* i *Herellea vaginicola* (Peleg i sur., 2008.). Brisou i Prevot su 1954. godine s obzirom na nedostatak pokretljivosti i pigmenta predložili svrstavanje svih dotadašnjih izolata u rod *Achromobacter*. Međutim, tek nakon publikacije Baumann i sur. 1968. godine prihvaćen je prijedlog za svrstavanje svih izolata u rod *Acinetobacter*. Značajan napredak u taksonomiji

roda *Acinetobacter* dogodio se 1980-ih godina koristeći DNA-DNA hibridizaciju što je rezultiralo podjelom pripadnika roda *Acinetobacter* u genomske grupe (Peleg i sur., 2008.).

Trenutno su bakterije roda *Acinetobacter* svrstane u Gamaproteobakterije, porodica Moraxellaceae i red Pseudomonadales (Asif i sur., 2018.). Zbog međusobne genomske sličnosti i teške identifikacije u literaturi čest je naziv *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* kompleks, sastavljen od *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii*, *A. dijkshoorniae* i *A. calcoaceticus* (Harding i sur., 2018.). Nalaze *A. baumannii* u radovima prije 2000. godine treba uzeti s rezervom zbog nepostojanja pouzdanih metoda identifikacije. Danas se koriste suvremene analitičke metode za pouzdanu identifikaciju i genotipizaciju vrsta poput MALDI-TOF MS (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization with Time of Flight Mass Spectrometry*), WGS (engl. *Whole Genome Sequencing*), PFGE (engl. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), analiza rpoB gena, rep-PCR (engl. *Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction*), MLST (engl. *Multilocus Sequence Typing*) (van der Kolk i sur., 2019.). Nove analitičke metode omogućile su pouzdanu identifikaciju novih vrsta unutar roda *Acinetobacter*, kojih prema bazi profesora Alexandra Nemeca, trenutno ima 60 imenovanih (http://apps.szu.cz/anemec/ Classification.pdf). Klinički najznačajniji patogen unutar roda *Acinetobacter* je *A. baumannii* (Towner, 2009.).

2.2 Vrsta *Acinetobacter baumannii*

Vrsta *A. baumannii* posjeduje iste karakteristike kao i drugi pripadnici istog roda s već opisanim karakteristikama. Na triptik soja agaru formira okrugle, konveksne, mliječne kolonije jasnih rubova promjera 1,5 – 2 mm nakon 24 h inkubacije, te 3 – 4 mm nakon 48 h izlaganja 30 °C. Temperaturni raspon rasta je 15 – 44 °C. Nekim sojevima potreban je metionin za rast na minimalnom mediju. U kompleksim medijima nitrati se ne reduciraju do nitrita. Većina sojeva proizvodi kiselinu iz D-glukoze. Nema hemolize na krvnom agaru. Ima sposobnost korištenja citrata (Garrity i sur., 2005.). Na podlozi Kliglerov željezni agar daje karakterističnu blago narančastu reakciju u dubini.

2.2.1 Klinička značajnost *A. baumannii*

Bakterija *A. baumannii* uzrokuje infekcije imunosuprimiranih bolesnika te se smatra oportunističkim patogenom. Najveću opasnost od infekcije ovim patogenom imaju pacijenti u jedinicama intenzivnog liječenja. Bakterija *A. baumannii* može uzrokovati pneumoniju, meningitis, infekcije urinarnog trakta, krvožilnog sustava i kože.

Bakterija *A. baumannii* klonalna je po prirodi. Molekularna analiza izolata *A. baumannii* iz raznih država Europske unije otkrila je postojanje tri europska klona (EU I-III). Upotrebom modernih metoda molekularne biologije poput WGS, dokazana je prisutnost osam klonova nazvanih „worldwide" klonovi (WW1-8) (Higgins i sur., 2010). Kasnije je došlo do promjene terminologije te su WW klonovi (engl. *Worldwide Clone*) preimenovani u globalne klonove (engl. *Global Clone*, GC) i naposlijetku u internacionalne klonove (engl. *Internacional Clone*, IC). U Europi 57 % *A. baumannii* izolata pripada IC2, 18 % IC1 te 1 % IC3 (Higgins i sur., 2010). Osim klonskih izolata *A. baumannii*, iz okoliša se ponekad mogu izdvojiti neklonski izolati koje ne pripadaju nijednom klonalnom tipu (Higgins i sur., 2018).

Najčešći način ulaza *A. baumannii* u tijelo pacijenta je kroz otvorene rane, katetere i tubuse za mehaničku ventilaciju. Kolonizirano osoblje te predmeti, koji su u svakodnevnoj upotrebi u bolnicama mogu biti potencijalan izvor *A. baumannii* (Towner, 2009.; McConnell i sur., 2013.; Antunes i sur., 2014.; Goić-Barišić, 2018.). Shamsizadeh i sur. (2017.) su istraživali prisutnost *A. baumannii* u bolničkom okolišu četiri bolnice. Bakterija *A. baumannii* zabilježena je u 11 % uzoraka bolničkog zraka, 17 % bolničkih kreveta i 2 % pitke vode iz slavine. Većina pozitivnih nalaza bila je iz jedinica za intenzivno liječenje. Nedvojbeno je da *A. baumannii* iz zaraženih pacijenata prelazi u bolnički okoliš, te da u bolničkom okolišu pacijenti dolaze u kontakt s *A. baumannii*.

Osim u bolnicama, zabilježene su izvanbolničke sporadične infekcije što upućuje na postojanje rezervoara *A. baumannii* u okolišu (Falagas i sur., 2007; Dexter i sur., 2015.). Izvanbolničke infekcije s *A. baumannii* zabilježene su većinom u tropskom i suptropskom podneblju u imunosuprimiranih bolesnika, te u alkoholičara i pušača. Najzastupljenije bolesti su pneumonija i bakteriemija (Falagas i sur., 2007; Dexter i sur., 2015.). Nakon prirodnih katastrofa poput potresa i tsunamija zabilježen je velik udio infekcija s *A. baumannii* (Eveillard i sur., 2013.). U Kini je nakon potresa 2008. godine izoliran *A. baumannii* iz rana, sputuma i krvi ozlijeđenih osoba (Eveillard i sur., 2013.). Bakterija *A. baumannii* također je najčešće izoliran mikroorganizam (63 %) iz rana američkih vojnika nakon povratka iz rata u Iraku i Afganistanu, te je dobio svojevrsni naziv „Iraqibacter". Smatra se da slabi higijenski uvjeti u bolnicama i često seljenje iz jednoga u drugi odjel tijekom kriznih situacija doprinose kolonizaciji i kasnijoj infekciji pacijenata u bolnicama (Camp i Tatum, 2010.).

2.2.2 Rezistencija *A. baumannii* na antibiotike

Bakterije roda *Acinetobacter*, pogotovo *A. baumannii*, su kao bolnički patogeni počeli dobivati pažnju 1970-ih godina (Towner, 2009.). U to vrijeme klinički izolati bili su osjetljivi na brojne antibiotike poput ampicilina, gentamicina, kloramfenikola i nalidične kiseline, te je liječenje infekcija uzrokovano tim bakterijama bilo relativno lako (Towner, 2009.). Međutim, u zadnja tri desetljeća rezistencija bakterija na antibiotike porasla je te su se pojavili multiplo-rezistentni (MDR) izolati. Nekontrolirana upotreba antibiotika širokog spektra uzrokovala je porast rezistencije na antibiotike (Towner, 2009.). Danas je značajna rezistencija bakterija na karbapenemske antibiotike.

Beta-laktamski antibiotici skupina su najkorištenijih antibiotika na svijetu, koja uključuje peniciline, cefalosporine, monobaktame i karbapeneme. U strukturi svi posjeduju β-laktamski prsten te djeluju na način da inaktiviraju penicilin-vezujuće proteine (engl. *Penicilin-binding proteins*) koji sudjeluju u sintezi stanične stjenke (Meletis, 2016.). Karbapenemi uz β-laktamski prsten posjeduju karbapenemski prsten. Jedinstvena struktura čini ih vrlo djelotvornima protiv širokog spektra bakterija, te se često koriste kao zadnja linija obrane protiv MDR bakterija (Meletis, 2016.). U zadnja dva desetljeća pojavljuje se rezistencija bakterija na karbapeneme što predstavlja velik javnozdravstveni problem. Mehanizmi rezistencije bakterija na karbapeneme uključuju: smanjenu propusnost karbapenema u stanicu izmjenom ili nedostatkom porina, pojačano izbacivanje karbapenema iz stanice putem efluks pumpi, te najučestalija produkcija enzima oksacilinaza koje hidroliziraju karbapeneme (Goić-Barišić, 2009.; Gordon i Wareham, 2010.; Meletis, 2016.).

Bakterija *A. baumannii* posjeduje urođenu rezistenciju na sljedeće antibiotike: ampicilin, amoksicilin-klavulanat, cefalozin, cefotaksim, ceftriakson, ceftazidim, aztreonam, ertapenem, trimetroprim, fosfomicin, tetraciklin, doksiciklin (EUCAST, 2016). Zbog svoje genomske plastičnosti, *A. baumannii*, brzo stječe otpornost na nove antibiotike te je pojava karbapenem rezistentnih izolata danas česta pojava. Na globalnom nivou 45 % svih izolata *A. baumannii* je MDR, dok je u Latinskoj Americi i Bliskom istoku 70 % (Harding i sur., 2018.). Uz MDR pojavljuju se prošireno-rezistentni (XDR) te čak sveopće-rezistentni (PDR) izolati koji su otporni na sve testirane antibiotike. Karbapenem rezistentni izolati *A. baumannii* prvi su na popisu opasnih patogena Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, 2017.) za koje je potrebno u što kraćem roku pronaći nove metode liječenja. Zbog visoke prilagodljivosti i otpornosti na antibiotike, *A. baumannii* spada u ESKAPE grupu patogena zajedno s

Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* sp. (Pendleton i sur., 2013.).

Najvažniji mehanizmi karbapenemske rezistencije u *A. baumannii* su produkcija β-laktamaza. Klasifikacijom po Ambleru za *A. baumannii* najznačajnije β-laktamaze su klase B, odnosno metalo-β-laktamaze i klase D, odnosno oksacilinaze koje hidroliziraju karbapeneme. Hidrolitička sposobnost metalo-β-laktamaza ovisi o interakciji β-laktama i cinka na aktivnim mjestima u enzimu. Najpoznatije metalo-β-laktamaze su IMP (engl. *Imipenemase metallo-β-lactamase*), VIM (engl. *Verona integron encoded metallo-β-lactamase*), GIM (engl. *German imipenemase metallo-β-lactamase*), SIM (engl. *Seoul imipenemase metallo-β-lactamase*) NDM (engl. *New Delhi metallo-β-lactamase*) (Queenan i Bush, 2007.; Santajit i Indrawattana, 2016.). U Hrvatskoj nisu zabilježene metalo-β-laktamaze te su s epidemiološkog značaja najvažnije β-laktamaze klase D, odnosno oksacilinaze koje hidroliziraju karbapeneme. *A. baumannii* može posjedovati urođenu i stečenu rezistenciju na karbapenemene. Oksacilinaze odgovorne za urođenu rezistenciju pripadaju skupini OXA-51-like. Poznato je da spomenute urođene oksacilinaze imaju slabu hidrolitičku sposobnost, no prisutnost insercijske sekvence ISAba1 uz $bla_{oxa\text{-}51\text{-}like}$ gen znatno povećava njegovu aktivnost i pospješuje rezistenciju na karbapeneme (Goić-Barišić, 2009.). Stečene oksacilinaze razvrstavaju se u sljedeće skupine: OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-143-like, OXA-235-like. OXA-23-like enzimi najraširenji su u *A. baumannii* te su zabilježeni na svim kontinentima (Pagano i sur., 2016.).

Prva istraživanja na području rezistencije *A. baumannii* u Hrvatskoj počela su 2002. godine na izolatima iz KBC Split. Genotipizacijom izolata sa smanjenom rezistencijom na karbapeneme, dokazana je prisutnost IC1 u razdoblju od 2002. do 2007. godine. Glavni mehanizam rezistencije bila je prisutnost urođene oksacilinaze OXA-107 iz skupine OXA-51-like s insercijskom sekvencom ISAba1 (Goić-Barišić, 2018.). Početkom 2009. godine premještanjem pacijenta iz Opće bolnice Mostar (Bosna i Hercegovina) u KBC Split, došlo je do širenja novog klona koji pripada IC2. Karakteristike novog klona su visoke vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK > 32 mg/L) za imipenem i meropenem, te rezistencija na aminoglikozide (gentamicin, netilmicin, djelomično amikacin) i kinolone (ciprofloksacin, norfloksacin i levofloksacin). Mehanizam rezistencije je prisutnost urođene oksacilinaze OXA-90 unutar OXA-51/66 skupine i stečene oksacilinaze OXA-72 unutar OXA-40 skupine. Mostarski klon danas je dominantan u većini zdravstvenih ustanova u

Hrvatskoj (Goić-Barišić, 2018.). U Hrvatskoj se karbapenemska rezistencija kod *A. baumannii* povećala s 10 % u 2008. do 86 % u 2016. godini (CAMS, 2017).

Za liječenje infekcija uzrokovanih karbapenem rezistentnim izolatima *A. baumannii* većinom se koriste kolistin (polimiksin E) i ampicilin/sulbaktam. Uporaba kolistina ograničena je zbog neurotoksičnosti i nefrotoksičnosti te zabilježene heterorezistentnosti. Heterorezistencija se pojavljuje u slučajevima kada je izolat prema MIK (Minimalna inhibitorna koncentracija) osjetljiv na kolistin, ali sadrži nekolicinu rezistentnih stanica, koje će se uslijed selektivnog pritiska umnožiti i producirati rezistentan fenotip (Li i sur., 2006.; Moffatt i sur., 2010.).

2.2.3 Bakterija *A. baumannii* u okolišu

Prirodni okoliš *A. baumannii* još uvijek je nepoznanica. Mnogi autori izolirali su *A. baumannii* iz različitih uzoraka, u potrazi za njegovim prirodnim rezervoarom u okolišu. Bakterija *A. baumannii* zabilježena je u tlu kontaminiranom organskim ugljikovodicima u Indiji i Francuskoj, zatim u 23 % uzoraka tla iz Hong Konga. Nadalje, *A. baumannii* izoliran je iz povrća u supermarketima, voćarnama i privatnim vrtovima (Eveillard i sur., 2013.). Osim povrća, pronađeni su i u komercijalnom mesu, od kojeg je meso peradi najviše bilo kontaminirano s *A. baumannii* (van der Kolk i sur., 2019.). Također je zabilježen na brojnim površinama koji su stalno u kontaktu s ljudima poput igraće konzole i stolova u parkovima. Osim neživih površina, *A. baumannii* je zabilježen i na rukama ljudi u izvanbolničkom okolišu (10,4 % ispitanika) (Eveillard i sur., 2013.). U navedenim slučajevima radi se o senzitivnim izolatima *A. baumannii* koji nisu srodni s kliničkim izolatima i kao takvi ne predstavljaju veliku javnozdravstvenu prijetnju.

Klinički značajni *A. baumannii* otporni na karbapeneme zabilježeni su u bolničkim otpadnim vodama. Ferreira i sur. (2011.) zabilježili su prisutnost tri MDR izolata *A. baumannii* s prisutnim bla_{oxa-23} genima u otpadnim vodama tri bolnice u Brazilu. Zhang i sur. (2013.) analizirali su otpadnu vodu iz četiri bolnice u Pekingu te su prije dezinfekcije zabilježili 9, a nakon dezinfekcije 1 MDR izolat *A. baumannii* s bla_{NDM-1} genom. Dezinfekcija je vršena kloriranjem što upućuje na to da *A. baumannii* može preživjeti proces dezinfekcije kloriranjem i dospjeti u prirodni okoliš. Na uređaju za pročišćavanje otpadnih voda, također je zabilježena prisutnost klinički značajnih *A. baumannii*. Hrenović i sur. (2016.) su s uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu 2014. godine izolirali 15 MDR *A. baumannii* iz ulazne i 6 iz izlazne vode. U nedavnom istraživanju Higgins i sur. (2018.) su s istog uređaja

izolirali klinički značajni *A. baumannii* iz svih stupnjeva pročišćavanja vode osim iz stabiliziranog mulja. Ukupno je izolirano 119 izolata od kojih je 38 % iz ulazne vode, 15 % iz aktivnog mulja, 17 % iz digestiranog mulja i 30 % iz izlazne vode. Ukupno 86 % izolata bilo je MDR, CFQR (karbapenem i fluorokinolon rezistentni) i PDR, dok je samo 14 % izolata bilo osjetljivo na sve testirane antibiotike. Jedan PDR izolat pronađen je u aktivnom mulju, dok je u izlaznoj vodi pronađeno čak 3 PDR izolata. Izlazna voda ispušta se u prirodni recipijent u kojem PDR izolati predstavljaju javnozdravstvenu prijetnju.

Potvrđen je prijenos klinički značajnih patogena iz bolničkog okoliša preko kanalizacije u prirodni okoliš. Kovačić i sur. (2017.) dokazali su prijenos klinički značajnih *A. baumannii* iz pacijenata u bolničku otpadnu vodu iz Kliničkog bolničkog centra, Split koja odlazi direktno u more bez pročišćavanja. Šeruga Musić i sur. (2017.) analizirali su otpadnu vodu iz Specijalne bolnice za plućne bolesti u Zagrebu te zabilježili 10 XDR izolata *A. baumannii*, od kojih su 2 izolata posjedovala heterorezistenciju na kolistin.

Prvi klinički značajni izolat *A. baumannii* u akvatičkom okolišu zabilježen je u rijeci Seni (Girlich i sur., 2010.). Šeruga Musić i sur. (2017.) pronašli su u Savi četiri XDR izolata *A. baumannii* te dokazali njihovu srodnost s kliničkim izolatima. Nedavno je u rijeci Krapini pronađen jedan karbapenem rezistentan izolat *A. baumannii* na utoku bolničke otpadne vode u Zaboku (Hrenović i sur., 2019). Tijekom ekspedicije na Dunavu 2013. godine (Joint Danube Survey) prikupljeno je ukupno 262 izolata bakterija roda *Acinetobacter* od čega je 135 izolata identificirano kao *A. baumannii*. Ostale vrste bile su *A. johnsonnii* (62 izolata), *A. haemolyticus* (19), *A. junii* (17), *A. lwoffii* (16) *A. radioresistens* (4), *A. ursingii* (2) i *Acinetobacter* sp. (7). Samo 5 izolata *A. baumannii* (3 kod Beograda, 2 kod Bukurešta) posjedovala su karbapenemsku rezistenciju (Kittinger i sur., 2018.).

U tlu su također zabilježeni klinički značajni *A. baumannii*. Hrenović i sur. (2014.) otkrili su jedan MDR izolat *A. baumannii* u paleotlu kamenoloma Tri jezerca u Istri. Isti izolat pokazao je 87 % sličnosti s kliničkim izolatom *A. baumannii* iz bolnice u Puli. Autori pretpostavljaju da je *A. baumannii* dospio u tlo s ilegalno odbačenim otpadom te se pomoću oborina procijedio u dublji sloj tla. Nadalje, Hrenović i sur. (2017.) analizirali su tehnotlo bogato naftnim ugljikovodicima na lokalitetu Sovjak blizu Rijeke gdje se od 1955. do 1990. godine odlagao opasni industrijski otpad. U tehnotlu pronašli su 2 MDR i 1 XDR izolat *A. baumannii* kao posljedicu naknadnog odlaganja ilegalno odbačenog otpada.

Bakterija *A. baumannii*, osim kod ljudi, izaziva infekcije kod imunosuprimiranih domaćih životinja (stoka, perad, kućni ljubimci) te se smatra opasnim patogenom u veterinarskim klinikama. U svinja i krava uzrokuje mastitis, pneumoniju i sepsu. Kod konja zabilježene su infekcije rana, septikemija, pneumonija, neonatalna encefalopatija i infekcije oka. Također u mačaka i pasa uzrokuje infekcije rana, krvožilnog sustava i urinarnog trakta (van der Kolk i sur., 2019.; Wareth i sur., 2019.). Osim toga, zabilježene su infekcije riba na ribljim farmama (Xia i sur., 2008.; Behera i sur., 2017.). U veterinarskim klinikama zabilježena je pojava MDR izolata *A. baumannii* (van der Kolk i sur., 2019.; Wareth i sur., 2019.). Ewers i sur. (2017.) analizirali su 223 izolata *A. baumannii* prikupljenih iz veterinarskih klinika u Njemačkoj u periodu od 2000. do 2013. godine. Otkrili su da izolati *A. baumannii* prikupljeni iz kućnih ljubimaca (pas, mačka, zec, zmija, štakor, patka, tvor) posjeduju iste mehanizme rezistencije na antibiotike te da su srodni ljudskim izolatima *A. baumannii*, što upućuje na razmjenu patogenih bakterija između vlasnika i kućnih ljubimaca.

Wilharm i sur. (2017.) pronašli su senzitivne izolate *A. baumannii* u trahealnim i rektalnim brisevima kokoši (3 %), gusaka (8 %) i mladunaca bijele rode (25 %), te predložili da perad i divlje ptice mogu biti potencijalan rezervoar i vektor širenja *A. baumannii*. Nadalje, Faulde i Spiesberger (2013.) analizirali su 271 primjerak septičke muhe (Diptera: Psychodidae) iz 4 bolnice u Njemačkoj kao potencijalnog vektora za širenje patogena. Septičke muhe obitavaju u vlažnim prostorijama poput kupaonica, kuhinja, spremišta te se razmnožavaju u slabo održavanim sudoperima, tuš kabinama, pisoarima i mjestima gdje voda curi iz cijevi. Autori su pronašli *A. baumannii* u koncentraciji 2,0 x 10^3 CFU (engl. *Colony Forming Unit*) po muhi. Nadalje, *A. baumannii* pronađen je u ušima tijela i glave, koji kao nametnici također mogu biti vektori širenja (La Scola i Raoult, 2004.; Kempf i sur., 2012a.).

2.2.4 Preživljavanje *A. baumannii* u okolišu

Brojni nalazi *A. baumannii* u bolnicama i okolišu posljedica su njegove prilagodljivosti na razne okolišne uvjete. Antunes i sur. (2011.) pokazali su da klinički izolati *A. baumannii* optimalno rastu na temperaturama od 25 do 45 °C, s maksimalnom stopom rasta pri 37 °C. Obeidat i sur. (2014.) pokazali su da *A. baumannii* može preživjeti u destiliranoj i vodovodnoj vodi, te fiziološkoj otopini (0,9 % NaCl) do 23 dana pri rasponu pH 4,5 do 8 i temperaturama 18 do 37 °C. Wendt i sur. (1997.) među prvima su ispitivali otpornost *A. baumannii* na isušivanje te su dokazali da *A. baumannii* može preživjeti na različitim površinama kao što je keramika, PVC, guma i čelik preko 100 dana. Jawad i sur. (1998.) pokazali su da *A. baumannii* može preživjeti od 21 do 32 dana u sušnim uvjetima na

stakalcima te da ne postoji značajna razlika u preživljavanju epidemičnih i sporadičnih izolata. Taj period značajno je duži u odnosu na *A. baumannii* ATCC 19606 koji preživljava do 6 dana. Antunes i sur. (2011.) su prema istom protokolu zabilježili preživljavanje jednog kliničkog MDR izolata *A. baumannii* preko 100 dana u sušnim uvjetima. Nadalje, zaključili su da vrijeme preživljavanja nije za sve testirane izolate isto te da je ovisno o soju. Espinal i sur. (2012.) otkrili da su *A. baumannii* koji formira biofilm duže preživljava na stakalcima u odnosu na one izolate koji ne formiraju biofilm. Nadalje, Chapartegui-González i sur. (2018.) ispitivali su preživljavanje 4 klinička izolata *A. baumannii* u uvjetima gladovanja u fiziološkoj otopini i isušivanja na komadiću laboratorijske kute, plastici i stakalcima te su zabilježili uspješno preživljavanje svih izolata do 60 dana praćenja. Nakon izlaganja nepovoljnim uvjetima *A. baumannii* zadržava sposobnost virulentnosti što je testirano *Galleria mellonella* modelom (Chapartegui-González i sur., 2018.). Bravo i sur. (2016.) zaključili su da u nepovoljnim uvjetima *A. baumannii* nužno ne ulazi u vijabilno ali nekulturabilno stanje (VBNC) kao npr. *P. aeruginosa* (Khan i sur., 2010.). Učestala strategija preživljavanja *A. baumannii* je „bust and boom“ koja uključuje preživljavanje dijela bakterijske populacije te život na račun mrtvih stanica. Također je zabilježen dimorfizam kolonija, odnosno pojava malih prozirnih kolonija *A. baumannii*, koje se pojavljuju kao odgovor na okolišni stres uz normalne mliječne kolonije (Tipton i sur., 2015; Chin i Tipton, 2018.).

U literaturi postoji vrlo malo navoda koji se odnose na interakciju *A. baumannii* s drugim organizmima. Repizo i sur. (2015.) pokazali su sposobnost *A. baumannii* DSM30011 da nadvlada *A. baumannii* ATCC17978 zatim *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa* kroz nekoliko sati na 37 °C koristeći sekrecijski sustav tipa 6. Međutim, navedeni mehanizam među-bakterijske kompeticije nije primjenjiv za sve sojeve *A. baumannii* kao ni za okolišne uvjete. Lastoria i sur. (2014.) analizirali su podatke iz bolnice u Brazilu u periodu od 2005. do 2010. godine te su otkrili da infekcije s *A. baumannii* negativno koreliraju sa *S. aureus* i *Enterobacter* sp. infekcijama i nekolicinom manje zastupljenih gram negativnih patogena (*Serratia* sp., *Citrobacter* sp. i dr.). Zaključili su da postoji kompeticija među bolničkim patogenima te da se interakcije među bakterijama trebaju uzeti u obzir pri planiranju mjera za kontrolu infekcija. Nadalje, Cateau i sur. (2011.) otkrili su da se *A. baumannii* unutarstanično uspješno umnaža u amebama vrste *Acanthamoeba castellanii* i *A. culbertsoni*. Amebe su bakterivorni organizmi koji obitavaju u vodovodnoj vodi i bazenima. Osim *A. baumannii*, amebe mogu pospješiti širenje i preživljavanje drugih patogena poput vrsta *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* sp., *P. aeruginosa* i *Stenotrophomonas maltophilia* (Cateau i sur., 2014.).

2.2.5 Faktori virulencije *A. baumannii*

2.2.5.1 Biofilm

Brojni faktori virulencije zaslužni su za uspješno preživljavanje *A. baumannii* u okolišu te njegovu visoku prilagodljivost na nove uvjete unutar i izvan domaćina. Jedan od najvažnijih faktora virulencije je tvorba biofilma.

Biofilm je nakupina stanica okružena izvanstaničnim polimernim tvarima (engl. EPS, *Extracellular Polymeric Substances*) (Donlan, 2002.). Biofilmovi se mogu tvoriti na različitim čvrstim biotičkim i abiotičkim površinama. U prirodi je biofilm kompleksna struktura sastavljena od čestica supstrata, dijatomeja i filamentoznih bakterija, dok je biofilm u bolničkom okolišu na medicinskim aparatima sastavljen isključivo od nakupina jednog tipa mikroorganizma okruženog EPS-om (Donlan, 2002.). Idealni uvjeti za nastanak biofilma su kontakt čvrste površine i tekućeg medija (voda, krv). Tvorba biofilma ovisi o svojstvima supstrata (tekstura, hidrofobnost materijala, kondicionirani film od tekućine s kojom je supstrat u kontaktu), svojstvima tekućine (brzina toka, pH, temperatura, prisutnost kationa) i svojstvima stanice (produkcija EPS-a, prisutnost pila, površinska hidrofobnost stanice) (Donlan, 2002.). EPS je sastavljen većinom od polisaharida, proteina, nukleinskih kiselina i lipida (Nait Chabane i sur., 2014.). Glavna strukturna jedinica biofilma je mikrokolonija, odnosno nakupina stanica koje su s drugim mikrokolonijama povezane EPS-om. Između mikrokolonija su praznine tzv. vodeni kanali kroz koje teče tekućina omogućavajući difuziju nutrijenata i kisika. Biofilm je kompleksna trodimenzionalna struktura koja se prostorno i vremenski mijenja zbog unutarnjih i vanjskih procesa. Štiti od isušivanja, djelovanja dezinficijensa i antibiotika te omogućuje povoljnu sredinu za izmjenu gena (Hathroubi i sur., 2017.). Biofilm formiran na granici voda – zrak nazivamo pelikulom (Martí i sur., 2011.; Nait Chabane i sur., 2014.).

Tvorba biofilma zahtjeva formiranje sekrecijskog sustava tipa 1 (Csu pili) potrebnog za prianjanje na abiotičke površine (Tomaras i sur., 2003). Određeni sojevi *A. baumannii* produciraju kratke pile koji su odgovorni za pričvršćivanje na biotičke površine poput ljudskih respiratornih stanica (de Breij i sur., 2009). Neki sojevi kodiraju protein Bap koji je odgovoran za stabilizaciju zrelog biofilma na biotičkim i abiotičkim površinama (Loehfelm i sur., 2008). Protein OmpA također igra važnu ulogu u tvorbi biofilma, pričvršćivanju na epitelne stanice i apoptozi stanica domaćina (Gaddy i sur., 2009), kao i polisaharid poli-β-(1, 6)-N-acetilglukozamin (PNAG) koji drži stanice na okupu unutar biofilma (Choi i sur, 2009).

Bakterija *A. baumannii* uspješno tvori biofilm na abiotičkim površinama poput tubusa za respiraciju, katetera i druge medicinske opreme, te na biotičkim površinama poput ljudskih epitelnih stanica (McConnell i sur., 2013.; Longo i sur., 2014.). Stvoreni biofilmovi mogu predstavljati rezervoar *A. baumannii* u bolničkom okolišu uzrokujući povremene epidemije. Martí i sur. (2011.) pokazali su da klinički izolati *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* kompleksa proizvode snažniji biofilm i pelikulu (81-91 %) nego drugi pripadnici roda *Acinetobacter* (5-24 %). Također su zabilježili snažniju formaciju biofilma i pelikule pri 25 °C nego 37 °C što je značajno za opstanak *A. baumannii* u bolničkom okolišu. S druge strane, De Breij i sur. (2010.) pokazali su da ne postoji razlika u tvorbi biofilma između *A. baumannii, A. calcoaceticus* niti *A. junii* te da epidemični i sporadični izolati *A. baumannii* tvore biofilm podjednako. Giles i sur. (2015.) zabilježili su tvorbu robusne pelikule samo kod 8 od ukupno 54 testirana klinička izolata *A. baumannii*, sugerirajući da tvorba pelikule nije univerzalno svojstvo svih izolata.

U sušnim uvjetima izolati koji tvore biofilm preživljavaju znatno duže (36 dana) nego izolati koji ne tvore biofilm (15 dana) (Espinal i sur., 2012.). Ivanković i sur. (2017.) pokazali su da biofilm doprinosi otpornosti *A. baumannii* na komercijalno dostupne dezinficijense benzalkonij klorid i klorheksidin glukonat. Otpornost na dezinficijense veća je kada stanice tvore biofilm na keramičkim pločicama u odnosu na staklene, te je time stavljen naglasak na interakciju dezinficijensa s materijalom osim s bakterijama (Ivanković i sur., 2017.). Imane i sur. (2014.) dokazali su da *A. baumannii* bolje tvori biofilm na silikonu i lateksu nego na polivinil kloridu. Prema nekim autorima, tvorba biofilma povezana je s profilom antibiotske rezistencije. Izolati *A. baumannii* koji imaju senzitivni fenotip tvore snažniji biofilm od MDR izolata što upućuje na to da bakterije u biofilmu ne trebaju iste mehanizme rezistencije kao planktonske bakterije (Espinal i sur., 2012.; Kaliterna i sur., 2015.; Perez, 2015.; Qi i sur., 2016. Krzyściak i sur., 2017.). S druge strane, u literaturi postoje navodi da rezistencija na antibiotike nije povezana s tvorbom biofilma (De Breij i sur., 2010.; Vijayakumar i sur., 2016.) Sposobnost izolata da tvori biofilm ovisna je i o njegovu porijeklu. Vijayakumar i sur. (2016.) testirali su sposobnost tvorbe biofilma 60 kliničkih izolata *A. baumannii* iz krvi i sputuma te su zaključili da izolati iz sputuma tvore snažniji biofilm, dok su izolati iz krvi pokretniji. Kaliterna i sur. (2015.) dokazali su snažniju tvorbu biofilma u izolata izdvojenih iz respiratornog sustava i rana nego izolata iz krvi i urina.

Također je uočena razlika u tvorbi biofilma između izolata različite klonske pripadnosti. Izolati *A. baumannii,* koji pripadaju u IC1 tvore slabiji biofilm od IC2 i IC3, dok

između IC2 i IC3 ne postoji razlika (De Breij i sur., 2010.). Eijkelkamp i sur. (2011a.) su također pokazali da IC2 i neklonski izolati tvore snažniji biofilm od IC1. S druge strane, postoje radovi u kojima nije potvrđena veza između klonske pripadnosti i tvorbe biofilma (Wroblewska i sur., 2008.; Kaliterna i sur., 2015.).

2.2.5.2 Površinska pokretljivost rojenjem i trzanjem

Vrsta *A. baumannii* prvotno se smatrala nepokretnom bakterijom (grč. akinetos – nepokretan), no u literaturi je zabilježena površinska pokretljivost *A. baumannii* rojenjem (engl. *Swarming*) i trzanjem (engl. *Twitching*). Rojenje podrazumijeva pokretljivost bakterija po polu-čvrstim površinama, dok trzanje podrazumijeva pokretanje bakterija na čvrstim površinama (Antunes i sur., 2011.; Eijkelkamp i sur., 2011a.; Vijayakumar i sur., 2016.). Smatra se da trzanjem bakterije koloniziraju nove površine što predstavljala potencijalni način širenja u bolnicama. Eijkelkamp i sur. (2011a.) testirali su pokretanje rojenjem i trzanjem 52 klinička izolata na Luria-Bertani (LB) i Mueller-Hinton (MH) agaru s različitim koncentracijama agara pri 25, 30 i 37 °C. Rojenje je bilo najintenzivnije na LB mediju s najnižom koncentracijom agara (0,25 %) pri 37 °C, dok je trzanje bilo najizraženije na MH mediju s 1 % agara pri 37 °C. Također je dokazano da su rojenje i trzanje dva faktora virulencije *A. baumannii* koji se međusobno isključuju. Oni sojevi koji se dobro pokreću rojenjem, ne trzaju i obrnuto (Eijkelkamp i sur., 2011a.). Aktivacija sekrecijskog sustava tipa IV odgovorna je za pokretljivost *A. baumannii* (Antunes i sur., 2011.; Eijkelkamp i sur., 2011a.).

2.2.5.3 Inhibicija faktora virulencije

Razvoj biofilma može se inhibirati antibioticima, no postoji opasnost od razvoja rezistencije te se zato pribjegava novim metodama. Jedni od obećavajućih agenasa su bizmutovi tioli, koji se mogu koristiti u kombinaciji s antibioticima, zatim ioni srebra u obliku premaza za medicinske uređaje i cjevčice (Hathroubi i sur., 2017.). Nadalje, kationski antimikrobni peptidi, derivati tiazolidin-2,4-diona (Hathroubi i sur., 2017.) i aminokiselina D-tirozin (Milenković i sur., 2014.) pokazuju snažna svojstva protiv tvorbe biofilma. Jednom formirani biofilm teško je uništiti, no obećavajuća je primjena proteaza hidrolizirajućih enzima, DNAza i proteaza u raznim komercijalnim preparatima kao i primjena bakteriofaga (Hathroubi i sur., 2017.).

U literaturi je dokazana inhibicija površinske pokretljivosti trzanjem pomoću plavog svjetla (Mussi i sur., 2010) te rojenja u uvjetima smanjene dostupnosti željeza (Eijkelkamp i

sur., 2011b.). U realnim okolišnim uvjetima teško je postići spomenute uvjete te je potrebno razviti nove metode inhibicije faktora virulencije.

Lako dostupni prirodni zeoliti mogli bi imati potencijal u inhibiciji faktora virulencije. Zeoliti su hidratizirani alumosilikati koji se pojavljuju kao prirodni minerali u izmijenjenim bazičnim magmatskim stijenama i tufovima, očvrsnulim vulkanskim pepelima procesima alteracije, dijageneze i niskog stupnja metamorfizma. Prirodni zeoliti široko su rasprostranjeni minerali. Ležišta prirodnih zeolita nađena su diljem svijeta; Sjeverna Amerika, Kuba, Japan, Sjeverna Koreja, Kina, Italija, Turska, Grčka, Danska, Češka, Bugarska, Mađarska, Srbija, Rusija, Armenija, Azerbajđan (Gevorkyan i sur., 2001). U Hrvatskoj se značajna nalazišta nalaze u Hrvatskom zagorju (Donje Jesenje, Macelj) (Tibljaš i Šćavničar, 2007.).

Prema habitusu, prirodni zeoliti svrstavaju se u tri skupine: kockasti (habazit, philipsit), vlaknasti (natrolit, laumontit) i listićasti (heulandit, stilbit). Češće tvore zrnate, vlaknaste i listićaste agregate nego zasebne kristale. U šupljinama i kanalima kristalne strukture zeolita nalazi se voda, koja zagrijavanjem lako izlazi iz nje, te se isto tako s lakoćom vraća natrag. Tvrdoća po Mohsu iznosi $3\frac{1}{2}$ do $5\frac{1}{2}$, te relativna gustoća 2,1-2,4. Najučestalija vrsta zeolita koja se uglavnom nalazi u sedimentnim stijenama vulkanskog porijekla je klinoptilolit, zeolit iz skupine heulandita, za kojeg je svojstven odnos Si/Al ≥ 4,0 (Coombs i sur., 1997.). Klinoptilolit je najzastupljeniji mineral u nalazištima zeolita kraj Donjeg Jesenja (Tibljaš i Šćavničar, 2007.).

Zeoliti posjeduju mikroporoznu strukturu s mnogobrojnim kanalima molekularnih dimenzija, koji variraju u veličini što dopušta zadržavanje molekula ili iona u šupljinama ili prolaz kroz njih. Specifična struktura zeolita omogućuje im da služe kao selektivni katalizator, ionski izmjenjivač, adsorbent ili molekularno sito (Ribeiro i sur., 1995.). Zbog svojih jedinstvenih svojstava zeoliti pronalaze primjenu u agrikulturi, industriji i okolišu. U hortikulturi se zeoliti koriste za zadržavanje vlage u tlu, dodaju se u zemljišna gnojiva, životinjsku hranu, higijenske produkte, produkte za kontrolu mirisa, mineralna punjenja, medije za filtraciju zraka i sredstva za ionsku izmjenu. Također se koriste u proizvodnji naftnih derivata, na odlagalištima radioaktivnog otpada, u uklanjanju ulja s vodenih površina, te za obradu voda (Armbruster, 2001.). Također je dokazana imobilizacija bakterija na zeolite (Hrenović i sur., 2005.; Hrenović i sur., 2011.), zbog čega bi mogli uspješno inhibirati faktore virulencije.

3 Ciljevi istraživanja

U literaturi postoji vrlo malo podataka o utjecaju ekoloških čimbenika na preživljavanje *A. baumannii*. Dosadašnja istraživanja većinom su fokusirana na kliničke izolate, te je vrlo malo navoda o okolišnim izolatima *A. baumannii*. Stoga je cilj istraživanja odrediti ekspresiju faktora virulencije i sposobnost preživljavanja klinički značajnih okolišnih izolata *A. baumannii* u različitim ekološkim uvjetima u svrhu razumijevanja i predviđanja ponašanja ovog patogena u bolničkom i izvanbolničkom okolišu. U istraživanju će se ispitivati sljedeće:

1. Utjecaj temperature, vrijednosti pH, koncentracije otopljenog kisika i dostupnosti nutrijenata na preživljavanje *A. baumannii* u simuliranim vodenim medijima
2. Preživljavanje *A. baumannii* u realnim vodenim medijima (riječna i morska voda)
3. Preživljavanje *A. baumannii* u suhom i vlažnom tlu
4. Interakcija *A. baumannii* s drugim bakterijama
5. Utjecaj kolnjaka na preživljavanje *A. baumannii*
6. Potencijal *A. baumannii* da kolonizira slatkovodne ribe
7. Faktori virulencije poput tvorbe biofilma, pelikule te površinska pokretljivost *A. baumannii*
8. Utjecaj prirodnog zeolitnog tufa na ekspresiju faktora virulencije.

MATERIJAL I METODE

4 Materijal i metode

4.1 Organizmi

4.1.1 Bakterija *Acinetobacter baumannii*

4.1.1.1 Porijeklo

Izolati *A. baumannii* korišteni u eksperimentima pohranjeni su na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Korišteno je ukupno 26 okolišnih te 1 klinički izolat (Prilog 1). Okolišni izolati su tijekom 2015. i 2016. godine izdvojeni iz ulazne (influent) i izlazne (efluent) otpadne vode, te aktivnog i digestiranog mulja na uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu prema Hrenović i sur. (2016.). Ulazna otpadna voda prolazi kroz prvi stupanj pročišćavanja koji uključuje odvajanje krupnog otpada, te pjeskolov i mastolov. Otpadna voda zatim prolazi drugi stupanj pročišćavanja u bazenu s aktivnim muljem u kojemu mikroorganizmi uklanjaju otopljene nutrijente. Višak mulja prolazi mezofilnu anaerobnu digestiju i stabilizaciju vapnom, dok se pročišćena voda ispušta u prirodni recipijent rijeku Savu. U eksperimentima je također korišten jedan klinički izolat *A. baumannii* (OB4138) izoliran iz aspirata bronha pacijenta koji je bolovao od bolnički stečene upale pluća u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti u Zagrebu. U eksperimentu za ispitivanje kolonizacijskog potencijala *A. baumannii* korišten je jedan izolat *A. baumannii* izdvojen iz rijeke Save opisan u Šeruga Musić i sur. (2017.).

4.1.1.2 Profil antibiotske osjetljivosti

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) *A. baumannii* izolata određene su pomoću Vitek2 sustava (Biomerieux) koristeći AST-XN05 i AST-N233 kartice za sljedeće antibiotike: karbapeneme (MEM - meropenem, IMI - imipenem), fluorokinolone (CIP - ciprofloxacin, LVX - levofloxacin), aminoglikozide (TOB - tobramicin, GEN - gentamicin, AMK - amikacin), tetracikline (MIN - minociklin), peniciline/β-laktamske inhibitore (SAM – ampicilin/sulbactam, TIM – tikarcilin/klavulanska kiselina), inhibitore folne kiseline (trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) i polimixin (CST - kolistin). Kolistinska rezistencija potvrđena je koristeći E-test (Biomerieux) i diluciju u bujonu preporučenu od EUCAST-a (engl. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). MIK vrijednosti interpretirane su prema EUCAST (2018.) kriterijima za sve antibiotike s definiranim vrijednostima za *Acinetobacter* spp., dok su za minociklin korišteni CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.) kriteriji. Izolati su s obzirom na testirane antibiotike svrstani u jednu od sljedećih kategorija (Magiorakos i sur., 2012.): senzitivan (S – osjetljiv na

sve testirane antibiotike), multiplo-rezistentan (MDR – rezistentan na barem jedan antibiotik u tri ili više klase antibiotika), prošireno-rezistentan (XDR – rezistentan na sve antibiotike osim na one iz jedne ili dvije klase antibiotika) i sveopće-rezistentan (PDR – rezistentan na sve testirane antibiotike).

4.1.1.3 Molekularna karakterizacija

Molekularna karakterizacija napravljena je za 5 odabranih izolata *A. baumannii*, koji su korišteni u eksperimentima preživljavanja. Klonska pripadnost i sekvencijski tip određeni su MLST metodom (engl. *Multi-Locus Sequence Typing*) te su geni koji kodiraju za karbapenemaze određeni pomoću PCR metode (engl. *Polymerase Chain Reaction*) (Higgins i sur., 2018.) (Tablica 1).

Tablica 1. Molekularna karakterizacija odabranih 5 *A. baumannii* izolata. ST- sekvencijski tip prema Oxford ili Pasteur klasifikaciji; IC – internacionalni klon.

Izolat	Datum izolacije	ST-Oxford	ST-Pasteur	Klonska pripadnost	Stečena karbapenemaza	Profil antibiotske osjetljivosti
OB4138	2.10.2015	ST-195	ST-2	IC2	OXA-23	XDR
IN39	28.10.2015	ST-195	ST-2	IC2	OXA-23	MDR
EF7	9.9.2015	ST-195	ST-2	IC2	OXA-23	PDR
EF8	23.9.2015	ST-195	ST-2	IC2	OXA-23	XDR
EF11	18.11.2015	ST-1523	ST-647	neklonski	-	S

4.1.2 Bakterije *Escherichia coli* i *Enterococcus faecium*

Bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*) i *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) izolirane su iz efluenta uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu. Otpadna voda uzorkovana je aseptično te dostavljena u laboratorij unutar 1 h. Uzorak je razrijeđen u fiziološkoj otopini i filtriran kroz sterilne membranske filtre promjera pora 0,45 μm (Ahlstrom ReliaDisc CN-Filter). Filtri su prebačeni na selektivne ploče. Bakterija *E. coli* kultivirana je na EC X-GLUC agaru (Biolife, Italija) na 44 °C/48 h, dok je bakterija *E. faecium* kultivirana na Slanetz-Bartley agaru (Biolife, Italija) na 37 °C/72 h i potvrđena na Bile esculin azide agaru (Biolife, Italija) na 44 °C/4 h. Identifikacija bakterija potvrđena je MALDI TOF masenom spektrometrijom (verzija softvera 3.0, Microflex LT, Bruker Daltonics). Osjetljivost bakterija na antibiotike tesirana je pomoću disk difuzije i Vitek2 sustavom (Biomerieux, Francuska).

Rezultati su interpretirani prema EUCAST kriterijima za kliničke izolate *E. coli* ili *E. faecium* (EUCAST, 2017). Oba izolata bila su osjetljiva na sve testirane antibiotike.

4.1.3 Kolnjak *Adineta vaga*

Kolnjaci (koljeno Rotifera) su eukariotski vodeni organizmi mikroskopske veličine. Svojom brojnošću, raznolikošću i prilagodbama sudjeluju u oblikovanju vodenog ekosustava. Iz stupca vode filtriraju suspendirane organske čestice, alge i bakterije te utječu na njihovu brojnost. Bdeloidni kolnjaci razmnožavaju se partenogenetski te se u vodenim tijelima nalaze u velikom broju. Sposobni su preživjeti sušne periode ulazeći u dormantno stanje (anhidrobioza). Kolnjak *Adineta vaga* korišten u eksperimentima pripada u skupinu bdeloidnih rotifera te je uzgojen iz klonalne kulture. S obzirom na vrlo kratko generacijsko vrijeme, genetičku uniformnost i jednostavnost uzgoja, *A. vaga* čest je modelni organizam u genetičkim istraživanjima (Wallace i sur., 2006).

4.1.4 Riba *Poecilia reticulata*

Slatkovodna riba vrste *P. reticulata* (porodica Poeciliidae), zvana „gupi“, omiljena je akvarijska vrsta zbog svog šarenog izgleda, ponašanja i lakoće uzgoja. Vrlo često se koristi kao modelni organizam u raznim istraživanjima. Glavna karakteristika ove skupine riba je unutarnja oplodnja i rađanje žive mladunčadi (ovoviviparija). *P. reticulata* korištena u eksperimentima uzgojena je u akvariju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za potrebe izvođenja eksperimenta s vrstom *P. reticulata* ishođena je dopusnica Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (urbroj: 251-58-10617-18-3, 16.01.2018., Zagreb).

4.2 Hranjive mikrobiološke podloge

Hranjivi agar i bujon

Hranjivi agar i bujon (Biolife, Italija) neselektivni su peptonski mediji za uzgoj ukupnih heterotrofnih bakterija. Sastav podloga prikazan je u Tablici 2. Goveđi ekstrakt i peptoni su izvori ugljika, dušika i drugih biogenih elemenata potrebnih za rast većine bakterija. Hranjivi agar i bujon prvi su mediji korišteni u mikrobiologiji, koji se i dalje rutinski koriste u bakteriološkoj analizi okolišnih uzoraka i hrane. Ovi neselektivni mediji mogu poslužiti kao baza u koju se dodaju ugljikohidrati, soli, boje itd. da bi se pripremile selektivne i diferencijalne podloge.

Tablica 2. Sastav hranjivog agara i bujona (Biolife, Italija) za kultivaciju heterotrofnih bakterija (pH= 7,0 ± 0,2).

Sastav podloge (g/L)	Hranjivi agar	Hranjivi bujon
Goveđi ekstrakt	3	3
Pepton	5	5
Agar	15	-

Mueller-Hinton agar i bujon

Mueller-Hinton agar i bujon (Biolife, Italija) neselektivni su mediji za uzgoj heterotrofnih bakterija. Sastav je prikazan u Tablici 3. Goveđi ekstrakt i kiseli hidrolizat kazeina su izvor ugljika, dušika i drugih biogenih elemenata. Škrob služi za apsorbciju toksičnih metabolita bakterija, ali i kao hrana jer hidrolizom škroba nastaje dekstroza. Mueller-Hinton agar i bujon prvotno su korišteni za kultivaciju patogenih bakterija roda *Neiserria*. Danas se većinom rutinski koriste za kultivaciju bakterija iz okoliša i hrane te za testiranje osjetljivosti bakterija na antibiotike disk difuzijom i dilucijom u bujonu.

Tablica 3. Sastav neselektivnog Mueller-Hinton agara i bujona (Biolife, Italija) za kultivaciju heterotrofnih bakterija (pH= 7,3 ± 0,2).

Sastav podloge (g/L)	Mueller-Hinton agar	Mueller-Hinton bujon
Goveđi ekstrakt	2	3
Kiseli hidrolizat kazeina	17,5	17,5
Škrob	1,5	1,5
Agar	17	-

CHROMagar Acinetobacter

CHROMagar Acinetobacter (CHROMagar, Francuska) je selektivno-diferencijalni kromogeni medij za izolaciju bakterija roda *Acinetobacter*. Sastav podloge prikazan je u Tablici 4. Bakterije roda *Acinetobacter* obojene su crveno, dok su druge gram negativne bakterije većinom inhibirane ili su plave. Neke bakterije iz porodice Enterobacteriales pokazuje plavo obojenje. Gram pozitivne bakterije i plijesni većinom su inhibirane. Usprkos visokoj selektivnosti podloge moguće je da bakterije roda *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas* pokazuju crveno obojenje slično kao i *Acinetobacter* spp. čak i uz dodatak CR102. Hrenović i

sur. (2016.) uspješno su riješili ovaj problem inkubirajući ploče na 42 °C/24 h i dodajući antibiotik cefsulodin (15 mg/L) kako bi dobili selektivni porast *A. baumannii* iz okolišnih uzoraka.

Tablica 4. Sastav selektivno-diferencijalne podloge CHROMagar Acinetobacter (CHROMagar, Francuska) za kultivaciju *A. baumannii* (pH= 7,0 ± 0,2).

CHROMagar Acinetobacter	**Sastav podloge**	
Baza	Ekstrakt peptona i kvasca (g/L)	12
	Sol (g/L)	4
	Kromogena mješavina (g/L)	1,8
	Agar (g/L)	15
Dodatak 1 (092)	Faktori rasta (mL/L)	4
Dodatak 2 (CR102)	Mješavina antibiotika za selektivni uzgoj karbapenem rezistentnih bakterija (mL/L)	5

EC X-GLUC agar

EC X-GLUC (Biolife, Italija) je kromogeni selektivno-diferencijalni medij za izolaciju *E. coli*. Sastav je prikazan u Tablici 5. Gram pozitivne bakterije su inhibirane dodatkom žučnih soli. Dodatak X-GLUC spoja (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-glukuronid) omogućuje detekciju aktivnosti enzima β-glukuronidaze, koju među pripadnicima porodice Enterobacteriales posjeduje samo *E. coli* i neki sojevi bakterija roda *Salmonella* i *Shigella*. Za potvrdu *E. coli* provodi se indol test kapanjem Kovacszevog reagensa direktno na porasle kolonije. Ukoliko bakterije produciraju indol, Kovacszev reagens će pocrvenjeti. Kolonije bakterija koje su β-glukuronidaza pozitivne obojene su plavo, dok su kolonije β-glukuronidaza negativnih bakterija bezbojne. *E. coli* se inkubira na 44,5 °C/24 h.

Tablica 5. Sastav selektivno-diferencijalne podloge EC X-GLUC agar (Biolife, Italija) za kultivaciju *E. coli* (pH= 7,0 ± 0,2).

Sastav podloge (g/L)	**EC X-GLUC agar**
Tripton	20
Ekstrakt kvasca	5
Žučne soli	1,5
Na_2HPO_4	5
KH_2PO_4	1,5
NaCl	5
X-GLUC	0,06
Triptofan	1
Agar	12

Slanetz-Bartley agar

Slanetz-Bartley agar (Biolife, Italija) je selektivna podloga za kultivaciju crijevnih enterokoka. Sastav podloge prikazan je u Tablici 6. Natrijev azid inhibira druge bakterije, dok je trifenitetrazolij klorid (TTC) indikator čijom redukcijom nastaje formazan, koji daje kolonijama crveno obojenje. Crijevni enterokoki se inkubiraju na 37 °C/72 h nakon čega slijedi potvrda hidrolizom eskulina na Bile Eskulin Azide agaru (Biolife, Italija) 44 °C/ 4 h.

Tablica 6. Sastav selektivne podloge Slanetz-Bartley agar (Biolife, Italija) za kultivaciju crijevnih enterokoka (pH= 7,2 ± 0,1).

Sastav podloge (g/L)	**Slanetz-Bartley agar**
Triptoza	20
Ekstrakt kvasca	5
Glukoza	2
K_2HPO_4	4
Natrijev azid	0,4
TTC	0,1
Agar	10

Bile Esculin Azide agar

Bile Esculin Azide agar je selektivno-diferencijalna podloga za kultivaciju i potvrdu crijevnih enterokoka. Sastav podloge prikazan je u Tablici 7. Selektivni sastojci su žučna sol za inhibiciju rasta gram pozitivnih bakterija i natrijev azid za inhibiciju gram negativnih bakterija. Podloga sadrži eskulin, kojeg crijevni enterokoki hidroliziraju pomoću enzima eskulinaze do eskuletina (6,7-dihidroksi-kumarin), pri čemu se oko kolonije stvori tamno obojenje.

Tablica 7. Sastav selektivno-diferencijalne podloge Bile Esculin Azide agar (Biolife, Italija) za potvrdu crijevnih enterokoka (pH= 7,2 ± 0,2).

Sastav podloge (g/L)	**Bile Esculin Azide agar**
Goveđi ekstrakt	5
Hidrolizat kazeina	17
Eskulin	1
Željezo amonijev citrat	0,5
Oxgall (žučna sol)	10
Proteoza pepton	3
Natrijev azid	0,15
NaCl	5
Agar	15

Luria-Bertani agar

Luria-Bertani agar neselektivna je hranjiva podloga pogodna za razvoj širokog spektra bakterija. Sastav podloge je: tripton 10 g/L (Biolife, Italija), ekstrakt kvasca 5 g/L (Biolife, Italija), NaCl 10 g/L (Carlo Erba Reagents, Francuska), agar 20 g/L (Biolife, Italija).

Peptonska voda

Peptoni su mješavina polipeptida i aminokiselina nastalih djelomičnom hidrolizom proteina. Peptonska voda/bujon neselektivni je medij za uzgoj širokog spektra bakterija. Može poslužiti kao baza u koju se dodaju drugi spojevi. Sastav podloge je: pepton 10 g/L (Biolife, Italija) i NaCl 5 g/L (Carlo Erba Reagents, Francuska).

4.3 Vodeni mediji korišteni u eksperimentima

U eksperimentima preživljavanja korištena je komercijalno dostupna izvorska voda (SW), pripremljeni hranjivi bujon razrijeđen (1:100) s destiliranom vodom (DNB), te riječna i morska voda. Uzorak vode rijeke Save prikupljen je uzvodno od Zagreba nakon utoka rijeke Krapine u ljeto 2018. Morska voda uzorkovana je u trajektnoj luci Split u zimu 2016. godine. Suhi ostatak slane vode bio je 38,52 g/L, što odgovara salinitetu 38 ‰. Fizikalno-kemijska svojstva korištenih medija određena su prema Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA i sur. 2005., Tablica 8).

Tablica 8. Fizikalno-kemijska svojstva vodenih medija korištenih u pokusima. SW - komercijalno dostupna izvorska voda; NB - hranjivi bujon razrijeđen (1:100) s destiliranom vodom. Parametri morske vode, osim pH, nisu određeni zbog velike interferencije s otopljenim solima.

Kemijski parametri	**SW**	**NB**	**Sava**	**More**
pH	8,1	6,9	7,7	7,9
Kemijska potrošnja kisika (mg/L COD)	3	99	10	-
Ukupni organski ugljik (mg/L C)	<1	44	6,5	-
Ukupni dušik (mg/L N)	0,7	13,2	2,7	-
Ukupni fosfor (mg/L P)	0,1	1,1	0,3	-

4.4 Tlo korišteno u eksperimentima

Tri tipa tala/paleotala korištena u eksperimentima uzorkovana su na tri lokaliteta u Istri. Crveno paleotlo, Terra Rossa i zeleno-sivo paleotlo nalaze se na karbonatnim naslagama kredne starosti. Ovi tipovi tala reprezentativni su predstavnici alkalnih, slabo kiselih i snažno kiselih tala. Iskopane su male pedološke jame dubine 50 cm, te su uzorci tala sakupljeni iz iskopanog tla/paleotla s gornjih 30 cm dubine. Uzorci su aseptično prikupljeni i preneseni u laboratorij kroz 24 h nakon uzorkovanja.

Vrijednost pH mjerena je s WTWSenTix81 elektrodom nakon suspenzije tla u destiliranoj vodi u omjeru 1:2,5 (Prilog 2). Mjerenje pH provedeno je u triplikatu. Kemijski i mineralni sastav proveo je Laboratorij za analizu geoloških materijala Rudarsko-geološko-naftnog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Tablice 9-11).

Tablica 9. Kemijski sastav istraživanih tala (tež.%).

Uzorak	SiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	MnO	MgO	CaO	Na_2O	K_2O	TiO_2	P_2O_5	LOI[a]	Suma
Crveno paleotlo	57.56	15.62	6.16	0.12	1.54	4.62	0.66	1.72	0.88	0.09	10.8	99.77
Terra Rossa	62.52	16.55	6.59	0.20	0.55	0.32	0.51	1.33	1.21	0.14	9.8	99.72
Zeleno-sivo paleotlo	44.42	23.56	3.68	<0.01	2.40	3.00	0.14	3.98	1.27	<0.01	17.3	99.75

[a] gubitak žarenjem (1000°C).

Tablica 10. Sadržaj sumpora, ugljika i elemenata u tragovima u istraživanim tlima. Sumpor i ugljik izraženi su u tež.%; Elementi od As do Zn izraženi su u mg/kg.

Uzorak	S	C	As	Ba	Bi	Cd	Co	Cu	Hg	Mo	Ni	Pb	Sb	U	V	Zn
Crveno paleotlo	<0.02	1.42	14.9	294	0.5	0.5	19	22.8	0.04	1.3	80	23.3	0.2	2.9	162	55
Terra Rossa	0.02	1.19	16.7	322	0.6	0.4	29.9	53.7	0.05	3.0	84	39.8	0.5	4.9	226	33
Zeleno-sivo paleotlo	2.30	0.04	9.9	250	0.4	0.1	12.1	8.1	0.01	13.2	156	14.4	<0.1	8.3	201	46

Tablica 11. Semi-kvantitativan mineralni sastav frakcije manje od 2 mm istraživanih tala. U tablicu su integrirani i rezultati istraživanja frakcije čestica manje od 2 μm. X – relativna brojnost minerala dobivena rendgenskom difrakcijom. MLM – mješanoslojne gline.

Uzorak	Kvarc	Kalcit	Dolomit	Plagioklas	K-feldspar	Getit	Hematit	Pirit	Gips	Jarosit	Tinjac/ Ilitični materijal	Kaolinit	Klorit	Smektit i/ili vermikulit	MLM
Crveno paleotlo	XXX	X	X	X	X	X	X				XX	X	X	X	X
Terra Rossa	XXX			X	X	X	X				XX	XXX			X
Zeleno-sivo paleotlo	X							X	X	X	XXXX				XXX

Kemijski sastav (frakcija < 2 mm) određen je komercijalnim Bureau Veritas Mineral Laboratories, Canada. Oksidi i elementi u tragovima određeni su pomoću ICP-ES/MS-a. Udio sumpora i ugljika određen je pomoću Leco analizatora. Mineralni sastav određen je rendgenskom difrakcijskom analizom koristeći Philips difraktometar (grafitni monokromator, CuKμ zračenje, proporcionalni brojač) na frakciji čestica manjoj od 2 mm (praškasti uzorak) i frakciji čestica manjoj od 2 μm (orijentirani uzorak). Frakcija čestica manja od 2 μm dobivena je primjenom metode izvlačenja (Stokesov zakon). Za svaki uzorak (frakcija čestica manja od 2 μm) napravljeni su orijentirani preparati na keramičkim pločicama. Za svaki orijentirani uzorak napravljeni su sljedeći tretmani: (1) tretiranje uzorka s $MgCl_2$, (2) tretiranje uzorka s KCl, (3) saturacija s etilen-glikolom uzoraka tretiranih s magnezijem, (4) saturacija s etilen-glikolom uzoraka tretiranih s kalijem, (5) saturacija s dimetilsulfoksidom uzoraka tretiranih s kalijem, (6) žarenje uzoraka tretiranih s magnezijem na 350°C, (7) žarenje uzoraka tretiranih s kalijem na 350°C, (8) žarenje uzoraka tretiranih s magnezijem na 550°C i (9) žarenje uzoraka tretiranih s kalijem na 550°C. Mineralne faze identificirane su koristeći Powder Diffraction File (1996) data system i Panalytical XPert HighScore (v. 1.0d) programski paket. Identifikacija minerala glina bazirana je na metodama prema Moore i Reynolds (1989.). Termin MLM (engl. *Mixed-layer Clay Minerals*) korišten je za mješanoslojne gline kojima nije pouzdano određen sastav.

4.5 Prirodni zeolitni tuf

Prirodni zeolit iz Donjeg Jesenja (Hrvatsko zagorje) zdrobljen je i prosijan te je veličinska frakcija 0.122 – 0.263 mm korištena u eksperimentima. Uzorak je ispran s destiliranom vodom, osušen na 105 °C/1 h i steriliziran autoklaviranjem (121 °C/20 min) prije početka eksperimenta. Mineraloška analiza prirodnog zeolitnog tufa napravljena je rendgenskom difrakcijskom analizom na praškastim uzorcima koristeći Philipsov difraktometar (Hrenović i sur., 2011.). Prirodni zeolitni tuf sastoji se većinom od klinoptilolita (50-55 %) s većim udjelom celadonita, plagioklasa, feldspata i opala-CT (svaki 10 – 15 %). U tragovima su prisutni analcim i kvarc (Hrenović i sur., 2011.).

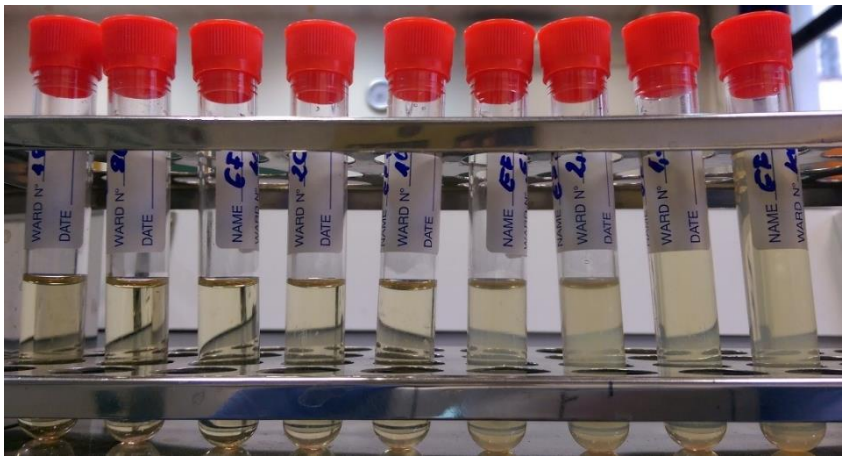
4.6 Izvedba eksperimenata

4.6.1 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije spoja

U slučaju da izolat putem Vitek2 sustava pokazuje visoku vrijednost MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) na kolistin (EF7), potrebno je, prema uputama EUCAST-a, provesti naknadno testiranje dilucijom u bujonu (ISO 20776-1). Jedna puna eza od 10 µL prekonoćne kulture *A. baumannii* (EF7) suspendirana je u 10 mL sterilne fiziološke otopine. Jedan mL bakterijske suspenzije inokuliran je u 100 mL Mueller Hinton bujona (MHB). Epruvete su označene sa 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 i 1,25 mg/L (Slika 1). U prvu epruvetu prebačeno je 10 mL bakterijske suspenzije u MHB, u sljedeće epruvete prebačeno je po 5 mL suspenzije. U prvu epruvetu dodan je kolistin do koncentracije 160 mg/L, promiješan s pipetom, te je po 5 mL suspenzije s kolistinom prebačeno u naredne epruvete u seriji smanjujući koncentraciju kolistina. Na taj način je dobivena serija dvostrukih razrjeđenja kolistina. Također je postavljena pozitivna kontrola s 10 mL bakterijske suspenzije u epruveti bez kolistina. Uslijedila je inkubacija na 36 °C, 18 ± 2 h.

Nakon inkubacije, očita se MIK kao prva bistra epruveta u nizu. Za očitanje MBK (minimalna baktericidna koncentracija) potrebno je iz svake epruvete nacijepiti 10 µL na hranjivi agar te inkubirati u istim uvjetima. MBK se nakon inkubacije očita kao prva koncentracija pri kojoj nema porasta bakterija na ploči.

Kako bi se ispitao antimikrobni utjecaj željeza prisutnog u ispitivanim tlima određen je MIK i MBK Fe po istom protokolu dodatkom soli $Fe(NO_3)$ x $9H_2O$. Također je korišten *A. baumannii* izolat EF7. Bakterijska suspenzija napravljena je u 100 mL prirodne izvorske vode umjesto u MHB. Testirane koncentracije Fe bile su 1000, 500, 250, 125, 62 i 31 mg/L.



Slika 1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije spoja dilucijom u bujonu.

4.6.2 Utjecaj abiotičkih ekoloških čimbenika na preživljavanje *A. baumannii*

Za ispitivanje učinka abiotičkih čimbenika na preživljavanje *A. baumannii*, izabrano je 5 izolata (Tablica 1). Utjecaj temperature, vrijednosti pH i otopljenog kisika na preživljavanje *A. baumannii* ispitivani su u komercijalno dostupnoj izvorskoj vodi (SW) i hranjivom bujonu (DNB) razrijeđenom s destiliranom vodom u omjeru 1:100 (Tablica 8). Prekonoćna kultura *A. baumannii* uzgojena je na hranjivom agaru na 42 °C/18 h. Jedna puna eza od 10 μL bakterijske biomase suspendirana je u fiziološkoj otopini (0,8 % NaCl) te su napravljene bakterijske suspenzije svakog od 5 izolata.

4.6.2.1 Temperatura

Volumen od 1 mL bakterijske suspenzije inokuliran je u Shott boce s 200 mL SW i DNB od čega je 40 mL prebačeno u epruvete i inkubirano na sljedećim temperaturama: -20, 4, 22, 35, 44 do 5 mjeseci te 50, 63, 72 i 80 °C do uginuća svih vijabilnih bakterija. Temperature iznad 50 °C postignute su u vodenoj kupelji, dok su temperature od -20 i 4 održavane u hladnjaku. Broj *A. baumannii* praćen je na početku eksperimenta, nakon 1, 2 te kasnije svakih 7 dana izlaganja na Mueller-Hinton agaru na 42 °C/24 h u tehničkom triplikatu.

4.6.2.2 Vrijednost pH

Prije početka eksperimenta, 200 mL SW i DNB prebačeno je u Shott boce te je pH namješten (WTW pH 330/SET-1) na 2, 5, 7, 10 i 12 s 1 M NaOH i 1 M HCl. Kako bi se vrijednost pH namjestila na 2 i 12 korištena je koncentrirana HCl i granule NaOH. Pripremljene otopine su autoklavirane i inokulirane s 1 mL bakterijske suspenzije te inkubirane na sobnoj temperaturi 22 °C tijekom 5 mjeseci. Broj *A. baumannii* praćen je na početku eksperimenta, nakon 1, 2 te kasnije svakih 7 dana izlaganja na Mueller-Hinton agaru na 42 °C/24 h u tehničkom triplikatu.

4.6.2.3 Koncentracija otopljenog kisika

Praćeno je preživljavanje *A. baumannii* pri tri različite koncentracije otopljenog kisika. Pripremljene su Shott boce s 200 mL SW i DNB te je u svaku inokuliran 1 mL bakterijske suspenzije. U triplikatu je 40 mL suspenzije raspoređeno u epruvete. Procedura je ponovljena za svih 5 izolata *A. baumannii*. Aerobni uvjeti postignuti su pomoću akvarijskih pumpi na koje je bila nataknuta serološka pipeta s vatenim filtrom i nesterilnim membranskim filtrom koji sprječavaju unos mikroorganizama (sterilni zrak upuhivan stopom od 1 L/min).

Intermedijarni uvjeti postignuti su u stacionarnom sustavu u zatvorenim epruvetama. Anaerobni uvjeti postignuti su u komercijalnom Anaerocult A sistemu (Merck Millipore). Pripremljene inokulirane epruvete inkubirane su na 22 ± 2 °C kroz 50 dana praćenja.

Koncentracija kisika mjerena je dezinficiranom WTW Oxi 330i elektrodom. U aerobnim uvjetima koncentracija kisika bila je 8,4 mg/L (zasićenost kisikom 96%), u intermedijarnim uvjetima 4,6 mg/L (zasićenost kisikom 56%). U Anaerokultu A anaerobni uvjeti su postignuti 3 h nakon zatvaranja posude. Broj *A. baumannii* praćen je na početku eksperimenta, nakon 1, 2 te kasnije svakih 7 dana izlaganja na Mueller-Hinton agaru na 42 °C/24 h u tehničkom triplikatu.

4.6.2.4 Preživljavanje u morskoj i riječnoj vodi

Prekonoćna kultura *A. baumannii* (izolati EF7 i OB4138) kultivirana na hranjivom agaru pri 42 °C/18 h suspendirana je u 10 mL fiziološke otopine. Jedan mL bakterijske suspenzije svakog izolata prebačen je u 40 mL autoklavirane riječne i morske vode. Epruvete su rotirane koristeći Stuart Tube Rotator SB3 (3 rpm). Broj *A. baumannii* praćen je na početku eksperimenta, nakon 1, 2 te kasnije svakih 7 dana izlaganja do 50 dana na Mueller-Hinton agaru na 42 °C/24 h u tehničkom triplikatu.

4.6.2.5 Preživljavanje u tlu

Preživljavanje *A. baumannii* u tlu ispitano je u crvenom paleotlu, Terra Rossi i zeleno-sivom paleotlu različite vlažnosti i vrijednosti pH. Karakterizacija korištenih tala dana je u Tablicama 9-11. Napravljena je bakterijska suspenzija od prekonoćne kulture 3 izolata *A. baumannii* (EF7, EF8, OB4138) u 200 mL SW u Shott boci. Masa od 300 g svakog tla odvagana je u staklenu čašu i sterilizirana autoklaviranjem, te je zalijevana s bakterijskom suspenzijom svakog izolata do maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode i dobro promiješana. Čaše su pokrivene medicinskom gazom i ostavljene na zraku u mraku da se suše na 22 ± 2 °C. Kad je vlažnost tla pala ispod 5 % (maseni udio vode), tlo u čašama se nastavilo sušiti u eksikatoru sa silika gelom. Isti proces ponovljen je sa nesterilnim tlom. Tijekom eksperimenta mjerena je vlažnost tla i broj *A. baumannii*. Vlažnost i pH tla mjereni su prema protokolu opisanom u Prilogu 2.

Za usporedbu s preživljavanjem u suhom nativnom nesterilnom tlu, praćeno je i preživljavanje u vlažnom nesterilnom crvenom paleotlu. Korišten je izolat EF7 te je vlažnost održavana do maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode u tlu (30 %) povremenim dodatkom sterilne izvorske vode. Vijabilni broj *A. baumannii* određen je iz 1 g tla nakon suspediranja i

vortexiranja (3 min/45 Hz) u sterilnoj fiziološkoj otopini (0,8% NaCl). Bakterijska suspenzija je dalje razrijeđena i inokulirana na selektivni medij CHROMagar Acinetobacter sa dodatkom CR102 (CHROMagar) na 42 °C/24 h. U nesteriliziranom tlu određen je broj heterotrofnih bakterija po 1 g uzorka na neselektivnom hranjivom agaru (Biolife) na 22 °C/72 h. Broj bakterija izražen je kao log CFU po 1 g vlažne mase. U nesteriliziranom tlu nije bilo heterotrofnih bakterija koje mogu rasti u istim selektivnim uvjetima kao i *A. baumannii* što je omogućilo njegovo nesmetano brojanje. Morfološki različite kolonije heterotrofnih bakterija iz crvenog paleotla su identificirane pomoću MALDI-TOF MS. Tlo je prije početka pokusa pregledano pod svjetlosnim mikroskopom te nije uočena prisutnost kolnjaka, praživotinja ni oblića koji bi mogli potencijalno utjecati na broj bakterija.

4.6.3 Utjecaj biotičkih ekoloških čimbenika na preživljavanje *A. baumannii*

4.6.3.1 Među-bakterijska interakcija

Praćena je interakcija 3 izolata *A. baumannii* (EF7, EF11, OB4138) s izolatima *E. coli* i *E. faecium* u izvorskoj vodi i hranjivom bujonu razrijeđenom s destiliranom vodom (1:100) kroz 50 dana na 22 ± 2 °C. Prekonoćne kulture bakterija uzgojene su na selektivnim podlogama te je puna eza od 10 µL bakterijske biomase svakog izolata suspendirana u 10 mL fiziološke otopine. Jedan mL bakterijske suspenzije svakog od 3 izolata *A. baumannii* inokuliran je posebno u epruvete s 40 mL SW i NB u koju je dodan 1 mL bakterijske suspenzije *E. coli* (odvojeni mikrokozmosi *E. coli* s EF7, EF11, OB4138). Procedura je ponovljena s 1 mL *E. faecium* (odvojeni mikrokozmosi *E. faecium* s EF7, EF11, OB4138). Epruvete su rotirane koristeći Stuart Tube Rotator SB3 (3 rpm).

Kontrola *A. baumannii* označava srednju vrijednost log CFU/mL čiste kulture sva tri *A. baumannii* izolata bez interakcije s fekalnim bakterijama, budući da su se ponašali slično. *E. coli* i *E. faecium* kontrola srednje su vrijednosti čistih kultura *E. coli* i *E. faecium* bez interakcije s *A. baumannii*. Brojnost bakterija mjerena je na početku eksperimenta, nakon 1, 2 i svakih 7 dana na CHROMagar Acinetobacter 42 °C/24 h (*A. baumannii*), EC X-Gluc 44,5 °C/24 h (*E. coli*) i Slanetz-Bartley agar 37 °C/72 h (*E. faecium*). Svi eksperimenti provedeni su u triplikatu.

4.6.3.2 Grazing kolnjaka

Praćeno je uklanjanje *A. baumannii* (OB4138) grazingom kolnjaka vrste *A. vaga* kroz 50 dana. Termin grazing (tzv. ispaša) odnosi se na prehranu kolnjaka, te označava ingestiju bakterija filtriranjem suspenzije. Prije početka eksperimenta kolnjaci su isprani i hranjeni

sterilnom ribljom hranom da se spriječi unos heterotrofnih bakterija. Utjecaj kolnjaka na *A. baumannii* praćen je u Shott bočicama koje su sadržavale 50 mL SW i NB na sobnoj temperaturi (22 ± 2° C). Uspostavljena su tri mikrokozmosa: 1) Mikokozmos 1 – kolnjaci s *A. baumannii*; 2) Mikrokozmos 2 – kolnjaci s *A. baumannii* i *E. coli*; 3) Mikrokozmos 3 – kolnjaci s *A. baumannii* i *E. faecium*.

Prvotni broj kolnjaka na početku eksperimenta bio je 20 životinja po mL. Brojnost kolnjaka analizirana je svjetlosnom mikroskopijom (Olympus CX21, povećanje 100x). Jedan mL iz svakog mikrokozmosa decimalno je razrijeđen u fiziološkoj otopini i inokuliran na selektivne hranjive podloge. Brojnost *A. baumannii* mjerena je na CHROMagar Acinetobacter (42 °C/24h), *E. coli* na EC X-Gluc (44,5 °C/24 h), te *E. faecium* na Slanetz-Bartley agaru (37 °C/72 h). Brojnost bakterija i kolnjaka mjerena je na početku eksperimenta, te nakon 1, 3 i svakih 7 dana. Svi eksperimenti provedeni su u triplikatu.

4.6.3.3 Kolonizacijski potencijal *A. baumannii*

Ispitan je potencijal *A. baumannii* da kolonizira slatkovodne ribe vrste *P. reticulata*. Korišten je okolišni izolat *A. baumannii* izdvojen iz rijeke Save (Sava 4). Pripremljene su 3 različite koncentracije *A. baumannii* u 500 mL SW u 3 staklene čaše (sustav 1-3). Inicijalna koncentracija *A. baumannii* u vodi namještena je na: 1,0 log CFU/mL (sustav 1); 3,1 log CFU/mL (sustav 2); 5,7 log CFU/mL (sustav 3). Negativna kontrola bio je sustav 4 bez *A. baumannii*. Šest zdravih riba vrste *P. reticulata* iz laboratorijskog uzgoja stavljene su u svaki sustav (1-4). Sustavi su umjereno aerirani (1 L/min)i inkubirani na 25 °C/12 dana. Ribe su hranjene svaki drugi dan sa suhom hranom te izložene režimu 12 h dan/12 h noć. Tijekom eksperimenta praćeno je preživljavanje *P. reticulata* kao i znakovi infekcije (gubitak sluzi, lezije na koži, promjene na škrgama). Nakon 1. i 12. dana izlaganja 3 ribe iz svakog sustava prebačene su u svježu komercijalnu izvorsku vodu i ostavljene da plivaju 2 h kako bi se isprale slabo pričvršćene bakterije s integumenta. Ribe su eutanazirane pomoću 0.05 mL/L MS-222 (trikain metansulfonat, Merck, Njemačka). Pojedina cijela riba secirana je sterilnim škarama, prebačena u epruvetu s 9 mL sterilne peptonske vode. Sadržaj epruvete maceriran je sterilnim staklenim štapićem, vorteksiran (5 min/45 Hz, Kartell TK3S, Italija) da se dobije heterogena smjesa te ostavljen 1 min da se staloži.

Brojnost *A. baumannii* po jednoj cijeloj ribi određena je filtracijom ribljeg tkiva kroz sterilne membranske filtre (promjer pora 0,45 μm). Filteri su prebačeni na CHROMagar Acinetobacter s CR102 dodatkom i inkubirani na 42 °C/24 h. U vodi u kojoj su se nalazile

ribe određen je broj *A. baumannii* i aerobnih ukupnih heterotrofnih bakterija prije i nakon razrjeđenja u peptonskoj vodi. Brojnost heterotrofnih bakterija određena je samo u vodi na hranjivom agaru na 22 °C/72 h. Prije početka eksperimenta u korištenoj komercijalnoj izvorskoj vodi i na *P. reticulata* nije detektiran *A. baumannii* po 100 mL vode i jednoj cijeloj ribi.

4.7 Faktori virulencije

4.7.1 Biofilm

Sposobnost bakterija da stvaraju biofilm testirana je pomoću testa s kristal violetom prema (Kaliterna i sur., 2015.). Prekonoćne bakterijske kulture svih 27 izolata *A. baumannii* uzgojene su na hranjivom agaru na 42 °C/18 h. Jedna puna eza od 10 µL bakterijske biomase svakog izolata zasebno suspendirana je u 10 mL hranjivog bujona. Bakterijska suspenzija inokulirana je u kivete s 25 mL hranjivog bujona, čija je apsorbancija namještena na 0,1 pri 600 nm koristeći DR/2500 Hach spektrofotometar. Po 10 mL bakterijske suspenzije iz kiveta prebačeno je u polipropilenske epruvete te inkubirano na 37 °C/48 h bez miješanja. Nakon inkubacije, planktonske bakterije su odstranjene, te su epruvete nježno isprane s PBS-om (engl. *Phosphate-buffered saline*). Formirani biofilm obojan je s 9 mL 0,5 %-tnog kristal violeta te inkubiran na 37 °C/20 min s miješanjem (150 rpm). Nakon inkubacije, epruvete su isprane destiliranom vodom, te je preostala boja otopljena u 10 mL 96%-tnog etanola pri 37 °C/20 min uz miješanje (200 rpm), nakon čega je biofilm kvantificiran pri apsorbanciji 550 nm. Na temelju rezultata izolati su podijeljeni u kategorije: $A_{550} < 0,3$ tvorba slabog biofilma; $0,3 < A_{550} < 1$ tvorba srednje jakog biofilma; $A_{550} > 1$ tvorba jakog biofilma.

Za ispitivanje utjecaja prirodnog zeolitnog tufa (NZ) na tvorbu bakterijskog biofilma, u polipropilenske epruvete odvagan je 0,1 g NZ nakon čega je dodano 10 mL (1 %) bakterijske suspenzije namještene apsorbancije. Odabrani izolati, koji tvore snažan biofilm ispitivani su i s dodatkom 1 g NZ (10 %). Nakon inkubacije (37 °C/48 h bez miješanja), planktonske bakterijske stanice zajedno su s NZ nježno isprane PBS-om. Daljnja procedura bojanja kristal violetom, ekstrakcije etanolom i kvantifikacije spektrofotometrijski ista je kao i za eksperiment bez NZ. Na kraju eksperimenta izračunat je postotak smanjenja faktora virulencije prema formuli [1].

4.7.2 Pelikula

Stvaranje pelikule testirano je prema protokolu opisanom u Nait Chabane i sur. (2014.). Dva mL prekonoćne bakterijske kulture u Mueller Hinton bujonu s namještenom apsorbancijom na 0,01 pri 600 nm (DR/2500 Hach spektrofotometar) inokulirano je u polistirenske epruvete bez NZ, s 1 % NZ i 10 % NZ (za odabrane izolate), te inkubirano na 25 °C/72 h. Stvaranje pelikule određeno je vizualno, te je njezina konzistencija određena okretanjem epruvete. Izolati su podijeljeni u tri grupe: bez stvaranje pelikule (0), slaba pelikula (1), jaka pelikula (2).

4.7.3 Površinska pokretljivost

Sposobnost bakterija da se kreću po površini trzanjem i rojenjem testirana je prema protokolu u Antunes i sur. (2011.). Korišten je Luria-Bertani medij s dodatkom 0,5 % agaroze. Prekonoćne bakterijske kulture suspendirane su u 1 mL PBS-a, nakon čega je s nastavkom za pipetu 10 µL inokulirano u poluskrutnuti medij do dna polistirenske petrijeve zdjelice, koje su čvrsto omotane s parafilmom i inkubirane u vlažnoj atmosferi na 37 °C/24 h. Rojenje je opaženo na kontaktu zrak-hranjivi medij, te je kvantificirano direktnim mjerenjem najdužeg promjera. Trzanje je određeno nakon odstranjivanja hranjivog medija bojanjem petrijeve zdjelice s 0,5 %-tnim kristal violetom u trajanju od 10 min, nakon čega je izmjeren najduži promjer. Izolati su prema prosječnim vrijednostima pokretljivosti grupirani u tri kategorije. Izolati koji su imali vrijednosti manje od 25 mm smatraju se slabo pokretnima, oni s vrijednosti između 25 i 50 mm smatraju se srednje pokretnima, dok se oni izolati s vrijednosti iznad 50 mm smatraju visoko pokretnima. Eksperimenti su ponovljeni s dodatkom 1 i 10 % prirodnog zeolitnog tufa na način da je NZ dodan direktno u Luria-Bertani medij te dobro promiješan, nakon čega je uslijedilo izlijevanje medija u petrijevke i inokulacija bakterijske suspenzije.

4.7.4 Hidrofobnost

Hidrofobnost bakterija mjerena je pomoću BATH testa (Rosenberg i sur., 1980.) s malim izmjenama. Test se bazira na afinitetu bakterija prema organskom ugljikovodiku kao što je heksadekan. Hidrofobne bakterije migriraju u sloj heksadekana, što rezultira smanjenjem koncentracije bakterija u vodenom stupcu. Prekonoćna bakterijska kultura suspendirana je u 10 mL PBS-a, u koju je dodan 1 mL n-heksadekana. Kivete su protrešene i ostavljene 2 min bez micanja da se dvije faze uspješno odvoje. Smanjenje bakterijske koncentracije mjereno je spektrofotometrijski (DR/2500 Hach spektrofotometar) prije i nakon

dodavanja n-heksadekana pri apsorbanciji od 410 nm. Izračunat je postotak smanjenja bakterija prije i nakon dodatka heksadekana prema formuli [1]. Bakterije se smatraju hidrofobnima, ako je postotak smanjenja bakterijskih stanica veći od 40 %.

4.7.5 Hrapavost kolonija

Hrapavost kolonija odnosi se na grudanje biomase i vrlo teško postizanje homogene bakterijske suspenzije nakon miješanja. Uzgojene su svježe kulture *A. baumannii* (svih 27 izolata) na hranjivom agaru pri 42 °C/24 h. Nakon inkubacije, s ezom od 10 µL pokupljena je bakterijska biomasa te promatrano stvaranje grudica ili razvlačenje biomase u obliku sluzi. Suspektni izolati suspendirani su u 5 mL destilirane vode te vorteksirani 10 sekundi. Ukoliko se biomasa gruda, te izolati vrlo teško stvaraju homogenu suspenziju nakon vorteksiranja, smatra se da formiraju hrapave kolonije.

4.8 Mikroskopske analize

Bakterijske stanice promatrane su svjetlosnim mikroskopom (Olympus CX21, povećanje 1000x). Za provjeru čistoće kulture, stanice su u eksperimentima bojane po Gramu. Za detekciju izvanstaničnih polimernih tvari koristila se Alcian blue boja. Protokol bojenja prikazan je u prilogu 3 i 4.

Analiza bakterijskih stanica pomoću skenirajuće (SEM) i transmisijske (TEM) elektronske mikroskopije provedena je u Laboratoriju za mikroskopiju i mikroanalizu na Sveučilištu u Pretoriji, Južna Afrika. Uzorci su fiksirani u 2,5 %-tnoj otopini glutaraldehida u PBS-u. Nakon otklanjanja fiksativa, uzorci su isprani u PBS-u, naknadno fiksirani u 1%-tnoj otopini osmijeva tetroksida u PBS-u, ponovno isprani u PBS-u te potom dehidrirani u seriji etanola različite koncentracije do apsolutnog etanola. Za SEM stanice su osušene s heksametildisilazanom i presvučene ugljikom prije promatranja pri niskoj voltaži (0,5 kV) s Zeiss Ultra PLUS FEG SEM. Uzorci za TEM uklopljeni su u epoksi smolu. Promatrani su ultratanki prerezi na 200 kV s Jeol 2100F TEM.

4.9 Statističke analize

Apsolutna brojnost bakterija je logaritmirana i izražena kao Colony Forming Unit (CFU) po 1 mL ili 1 g. U eksperimentu s kolonizacijskim potencijalom riba brojnost *A. baumannii* izražena je kao log CFU/mL ili log CFU po jednoj ribi. Brojnost kolnjaka je logaritmirana i izražena kao log N/mL. Izračunate su vrijednosti redukcije faktora virulencije [1] i redukcije broja bakterija i [2].

Statistička analiza provedena je pomoću računalnog programa Statistica 13.3 (TIBCO Software, Inc.). Varijable su uspoređene koristeći Factorial ANOVA i Duncan post hoc test. Korelacije među varijablama određene su koristeći Pearsonov i Spearmanov test. Statistički značajnom smatra se razlika od 5 % ($p<0,05$).

Izračuni:

$$Redukcija\ faktora\ virulencije = \left(\frac{Početna\ apsorbancija - Finalna\ apsorbancija}{Početna\ apsorbancija}\right) * 100 \quad [1]$$

$$Redukcija\ bakterija = \log CFU/mL\ ili\ g_{(početni\ broj)} - \log CFU/mL\ ili\ g_{(finalni\ broj)} \quad [2]$$

Na temelju dostupnih podataka izrađeni su regresijski modeli koji predviđaju ponašanje *A. baumannii* u određenim abiotičkim uvjetima. Da bi se pristupilo izradi regresijskog modela, potrebno je utvrditi postoji li linearan ili nelinearan odnos među varijablama, što se postiže preliminarnim Pearsonovim testom. Nadalje, potrebno je odrediti koji tip krivulje najbolje odgovara podacima crtanjem grafova (engl. *Scatterplot*). Također je potrebno paziti da varijable, ukoliko ih postoji više u modelu, ne koreliraju jedna s drugom. U tom slučaju može doći do pojave multikolinearnosti i pogrešno postavljenog modela. Kada je krivulja u grafu zakrivljena (kurvilinearna), linearan regresijski model ($y = a + bx$) neće biti osobito snažan. Stoga je potrebno podatke transformirati (izvaditi korijen, kvadrirati, kubirati, logaritmirati). Rezultati su prethodno logaritmirani i naknadno kvadrirani, stoga je korištena nelinearna polinomna regresija drugog stupnja ($y = a + bx + bx^2$). R^2 je koeficijent determinacije koji pokazuje podobnost izrađenog modela.

REZULTATI

5 Rezultati

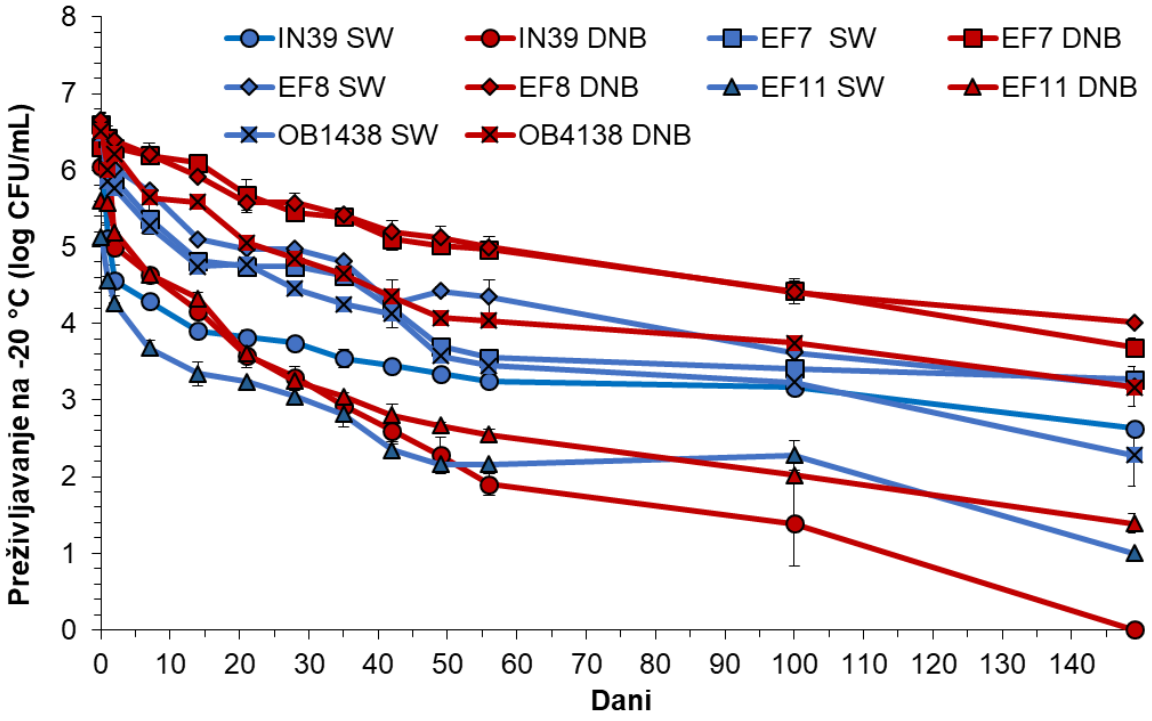
5.1 Profil antibiotske rezistencije

Profil antibiotske rezistencije testiranih *A. baumannii* izolata prikazan je u Prilogu 5. Deset izolata pripada skupini izolata osjetljivih na sve testirane antibiotike (S), 3 izolata su multiplo-rezistentna (MDR), 13 pripada skupini proširenо-rezistentnih (XDR) te je 1 izolat sveopće-rezistentan (PDR). Svi MDR, XDR i PDR izolati iskazuju rezistenciju na karbapeneme (imipenem i meropenem) s MIK vrijednosti $\geq$ 16 mg/L. Svi testirani izolati osjetljivi su na kolistin s MIK od $\leq$ 0.5 mg/L osim sveopće-rezistentnog izolata EF7 kojemu je MIK određen Vitek 2 sustavom > 16 mg/L te potvrđen dilucijom u bujonu s vrijednosti od 20 mg/L.

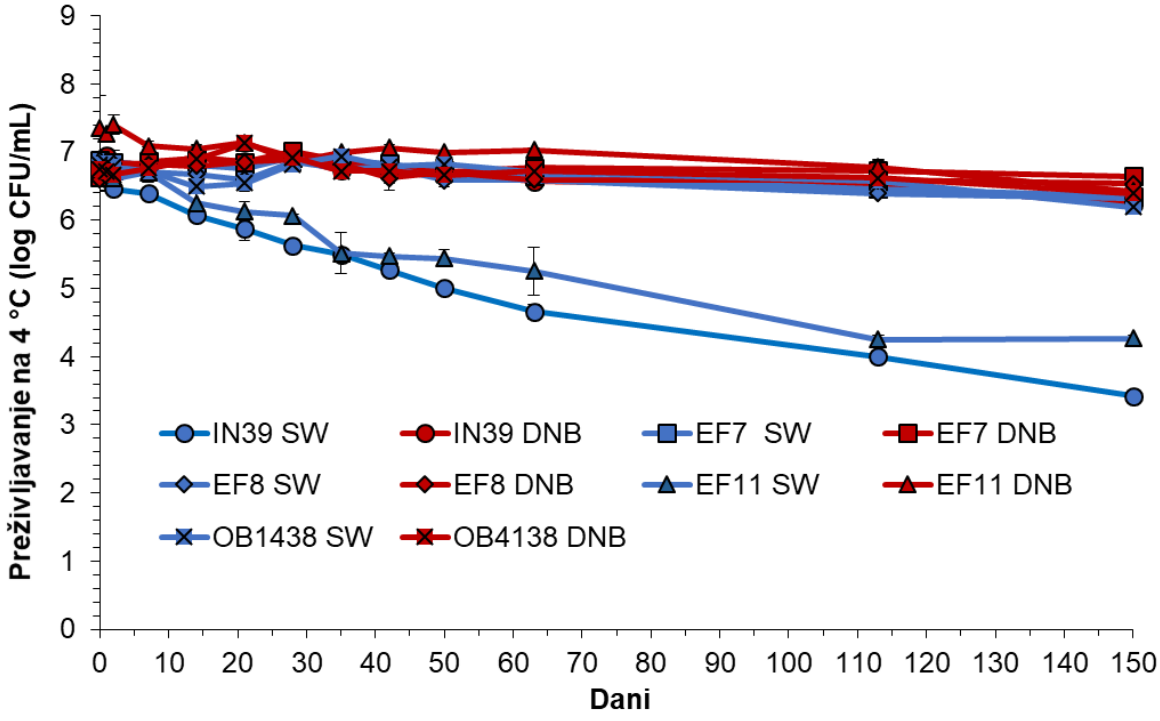
5.1.1 Utjecaj abiotičkih ekoloških čimbenika

5.1.1.1 Temperatura

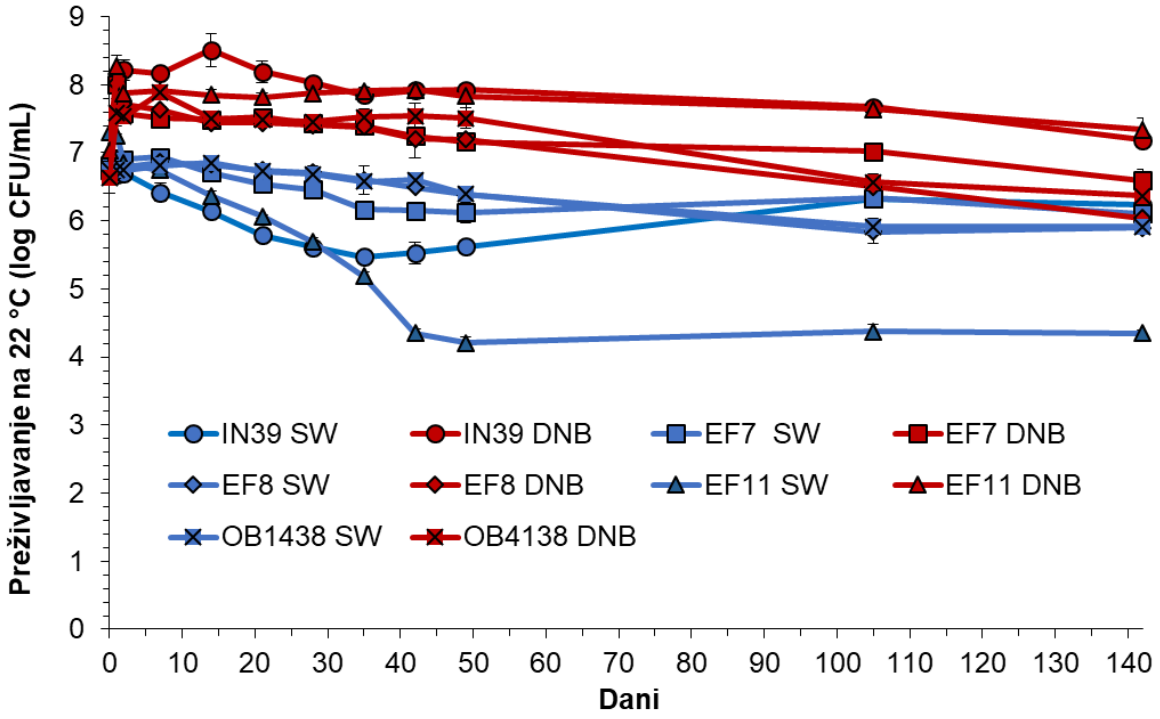
Rezultati koji prikazuju preživljavanje *A. baumannii* ovisno o temperaturi prikazani su na slikama 2-6. *A. baumannii* uspješno preživljava na -20, 4, 22, 35 i 44 °C kroz 5 mjeseci praćenja. Bakterije se nisu umnažale u komercijalno dostupnoj izvorskoj vodi (SW), dok je do umnažanja došlo u razrijeđenom hranjivom bujonu (DNB) samo na 22, 35 i 44 °C. Pri niskim temperaturama nema velikih odstupanja u krivulji preživljavanja. Na -20 °C brojnost bakterija pada polako i ravnomjerno te dostiže najniže vrijednosti (Tablica 12, Slika 2). Na 4 °C brojnost bakterija je konstantna u oba medija, s vrlo malim vrijednostima redukcije bez statističke značajnosti (Tablica 12, Slika 3). Najveću vrijednost redukcije brojnosti imali su izolati IN39 (3,3 log CFU/mL) i EF11 (2,6 log CFU/mL). Pri 22 °C bakterije su najbrojnije s vrlo niskim vrijednostima redukcije brojnosti bez statističke značajnosti (Tablica 12, Slika 4). Najveće odstupanje imao je izolat EF11 u SW s redukcijom od 2,9 log CFU/mL. Vrijednost redukcije brojnosti bakterija pri 35 °C podjednaka je u oba medija, dok je na 44 °C znatno veća (Tablica 12, Slika 5). Pri 44 °C u SW izolat IN39 nestaje iz sustava 63. dan, dok izolat EF11 opstaje do 100. dana. Krivulja preživljavanja pri 44 °C vrlo je nepravilna s naglim povećanjima i padovima (Slika 6). U koncentraciji od 10^5 log CFU/mL *A. baumannii* preživljava ekstremne temperature: 50 °C = 5 dana; 63 °C = 2h; 72 °C = 10 min; 80 °C = 5 min. Najbolje preživljavanje *A. baumannii* s najmanjim vrijednostima redukcije brojnosti zabilježeno je pri 4 i 22 °C (Tablica 12). *A. baumannii* bolje preživljava u DNB u odnosu na SW kroz 5 mjeseci, što je statistički značajno samo pri 22 ($p<0,001$) i 44 °C ($p<0,001$). Izolat EF11 značajno se razlikuje od svih ostalih izolata u SW (EF7 $p=0,018$; EF8 $p=0,014$; OB4138 $p=0,031$) osim od IN39 ($p=0,476$), dok se u DNB oba izolata ponašaju kao i ostali.



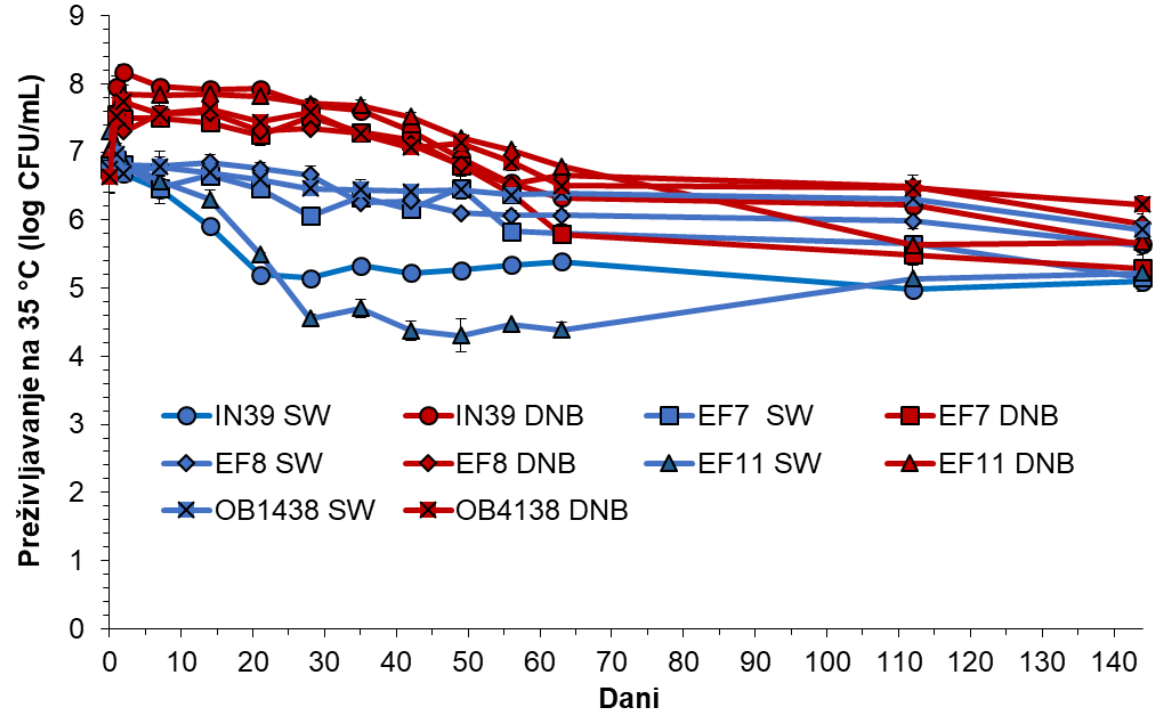
Slika 2. Preživljavanje *A. baumannii* izolata kroz 5 mjeseci praćenja na -20 °C. SW – komercijalno dostupna izvorska voda; DNB – razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom (1:100).



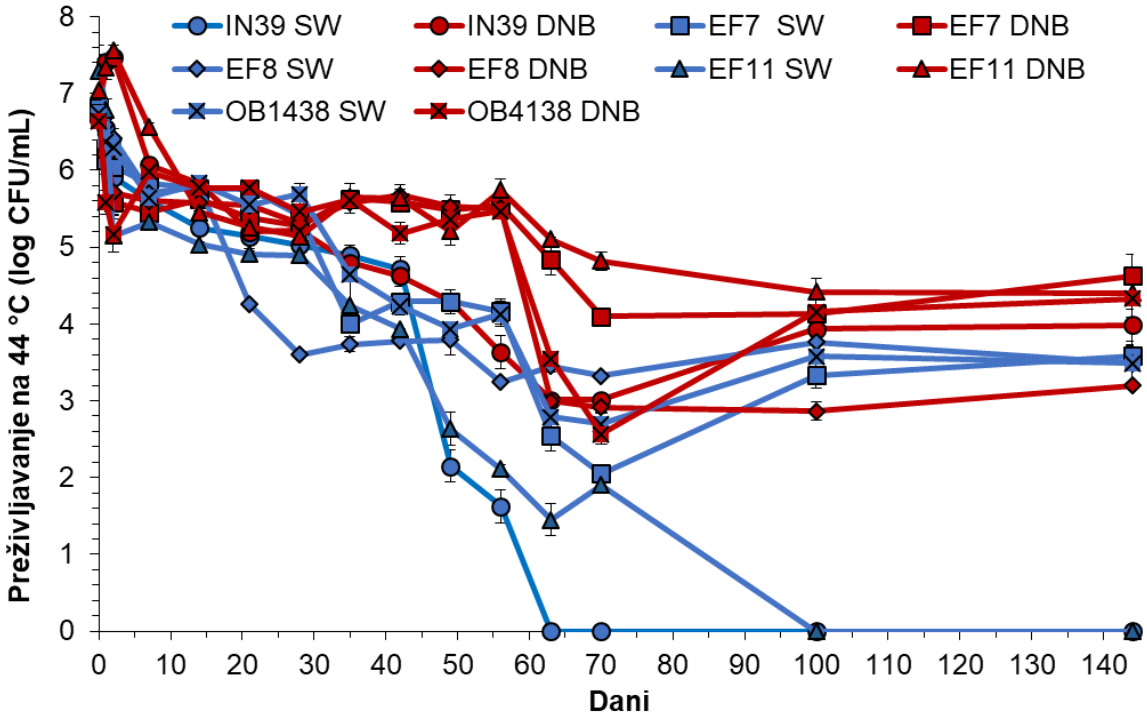
Slika 3. Preživljavanje *A. baumannii* izolata kroz 5 mjeseci praćenja na 4 °C. SW – komercijalno dostupna izvorska voda; DNB – razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom (1:100).



Slika 4. Preživljavanje *A. baumannii* izolata kroz 5 mjeseci praćenja na 22 °C. SW – komercijalno dostupna izvorska voda; DNB – razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom (1:100).



Slika 5. Preživljavanje *A. baumannii* izolata kroz 5 mjeseci praćenja na 35 °C. SW – komercijalno dostupna izvorska voda; DNB – razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom (1:100).

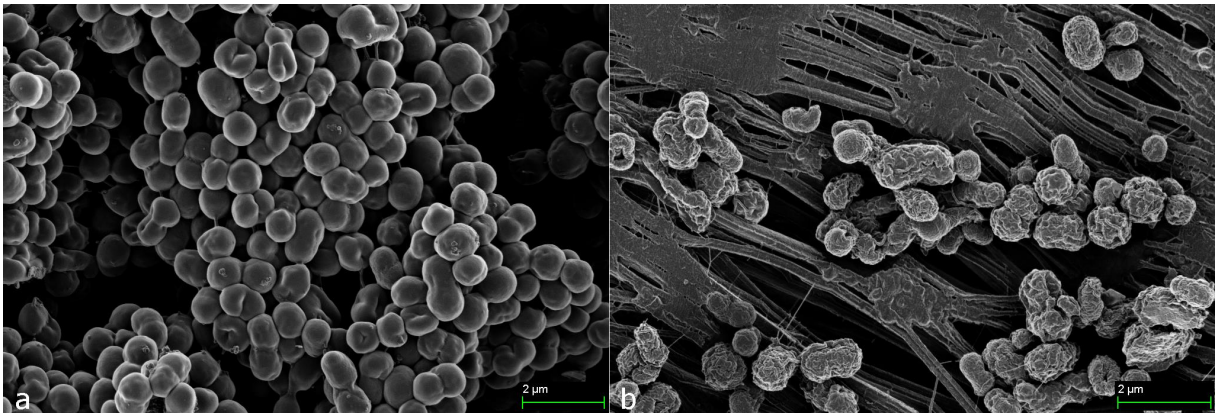


Slika 6. Preživljavanje *A. baumannii* izolata kroz 5 mjeseci praćenja na 44 °C. SW – komercijalno dostupna izvorska voda; DNB – razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom (1:100).

Tablica 12. Srednje vrijednosti redukcije brojnosti bakterija izražene kao redukcija log CFU/mL na svim testiranim temperaturama ($\log CFU_{početni\ broj\ bakterija} - \log CFU_{finalni\ broj\ bakterija}$). SW – komercijalno dostupna izvorska voda; DNB – razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom (1:100). Vrijednosti za izolate koje imaju ekstremno odstupanje nisu uvrštene.

Temperatura (°C)	Medij	
	SW	DNB
-20	3,7 ± 0,4	3,8 ± 1,4
4	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,4
22	0,7 ± 0,2	0,1 ± 0,4
35	1,5 ± 0,5	1,0 ± 0,4
44	3,2 ± 0,0	2,7 ± 0,5

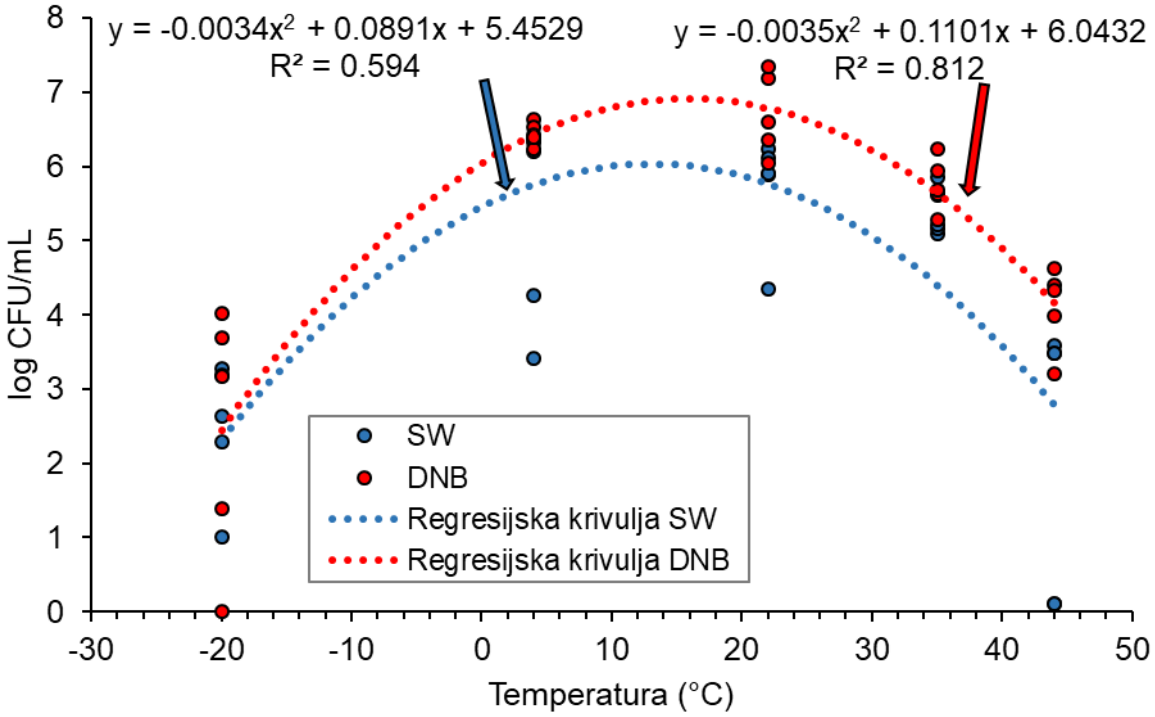
Rezultati SEM analize pokazuju naborane stanice nakon 5 mjeseci izlaganja na 44 i 4 °C u oba testirana medija (Slika 7), što ukazuje na gubitak osmotske aktivnosti bakterijskih stanica. Nakon 5 mjeseci na 22 °C stanice su bile osmotski stabilne te su izgledale kao iste s početka eksperimenta.



Slika 7. SEM analiza *A. baumannii* uzoraka a) na početku eksperimenta b) nakon 5 mjeseci na 44 °C u razrijeđenom hranjivom bujonu.

Model preživljavanja *A. baumannii* pomoću nelinearne polinomne regresije drugog stupnja u testiranim medijima nakon 150 dana pri različitim temperaturama izrađen na finalnim brojevima bakterija prikazan je na Slici 8. R^2 je koeficijent determinacije koji određuje u kojoj mjeri se podaci poklapaju s regresijskom krivuljom, odnosno podobnost regresijskog modela. U DNB R^2 iznosi 81,2 % dok je u SW 59,4 %. Regresijske krivulje imaju oblik parabole te se jasno vidi optimum preživljavanja *A. baumannii* u SW oko 10 °C, te u DNB oko 20 °C. Također je vidljivo bolje preživljavanje u DNB koje je izraženije pri višim temperaturama.

Primjer predviđanja: Kolika će biti brojnost *A. baumannii* (log CFU/mL) u DNB nakon 150 dana izlaganja temperaturi od 10 °C pri istim eksperimentalnim uvjetima? Regresijska jednadžba glasi: $y = -0{,}0035x^2 + 0{,}1101x + 6{,}0432$. Na mjesto x uvrsti se željena temperatura, te se dobije vrijednost od 6,8 log CFU/mL.

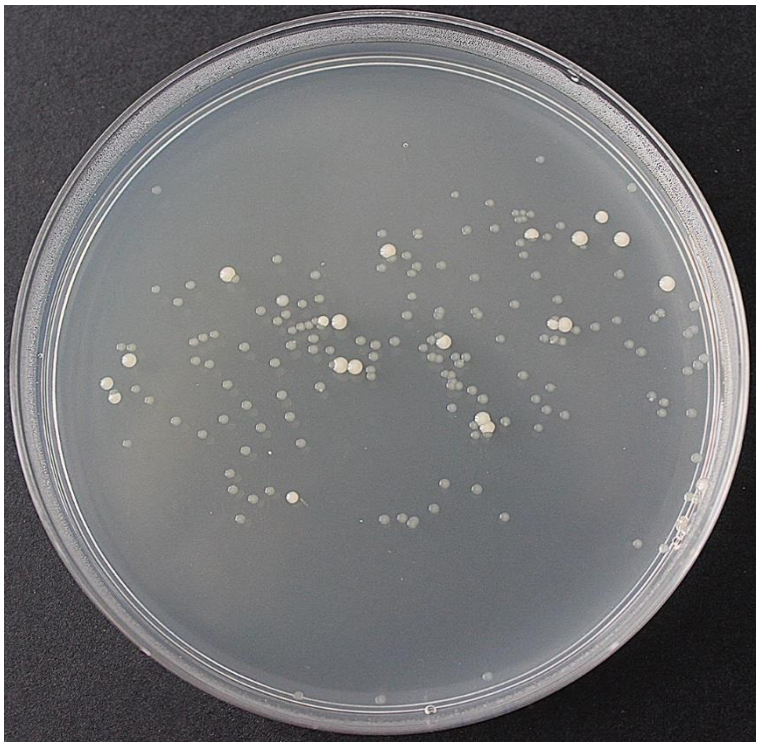


Slika 8. Model preživljavanja *A. baumannii* nakon 150 dana u SW (komercijalno dostupna izvorska voda) i DNB (razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom) na različitim temperaturama. Model je izrađen koristeći nelinearnu polinomnu regresiju drugog stupnja na finalnim brojevima bakterija (nakon 150 dana izlaganja). R^2 – koeficijent determinacije određuje podobnost modela. Početni broj bakterija bio je 6,7 ± 0,4 log CFU/mL.

5.1.1.2 Vrijednost pH

Bakterija *A. baumannii* uspješno je preživjela u DNB (pH 6,9) i SW (pH 8,1) nemodificirane vrijednosti pH kroz 5 mjeseci. U DNB su se bakterije umnažale dok u SW nije bilo umnažanja. Vrijednost pH otopina koje su namještene na 5 i 10 promijenila se nakon 2 dana te je, uslijed velikog puferskog kapaciteta otopina, postala pH neutralna. Stoga je izloženost *A. baumannii* vrijednosti pH 5 i 10 trajala samo 2 dana. U tom kratkom periodu nije došlo do umnažanja, ali ni do opadanja brojnosti bakterija. Pri vrijednosti pH 12 bakterija *A. baumannii* je uspjela preživjeti do 3 h u SW i 5 h u DNB. Nadalje, jedan izolat u DNB (EF11) preživio je 24 h pri pH 12. Vrijednost pH 2 bila je najsmrtonosnija s vremenom preživljavanja u oba testirana medija do 3 h.

Pri ekstremnim temperaturama (-20, 4, 44, 50, 63, 72, 80 °C) i vrijednostima pH (2,12) dio populacije *A. baumannii* formirao je male prozirne kolonije (Slika 9). Male kolonije su potvrđene kao *A. baumannii* koristeći MALDI-TOF MS.

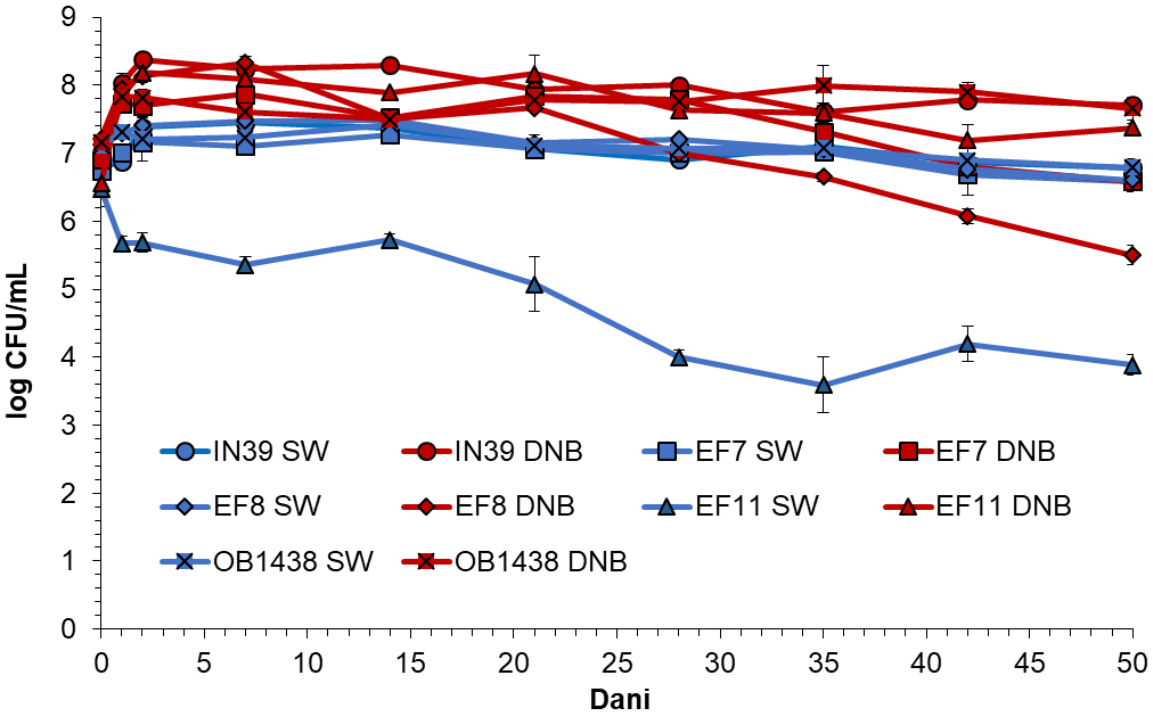


Slika 9. Male prozirne i velike mliječne *A. baumannii* kolonije uzgojene na Mueller-Hinton agaru nakon izlaganja nepovoljnim okolišnim uvjetima.

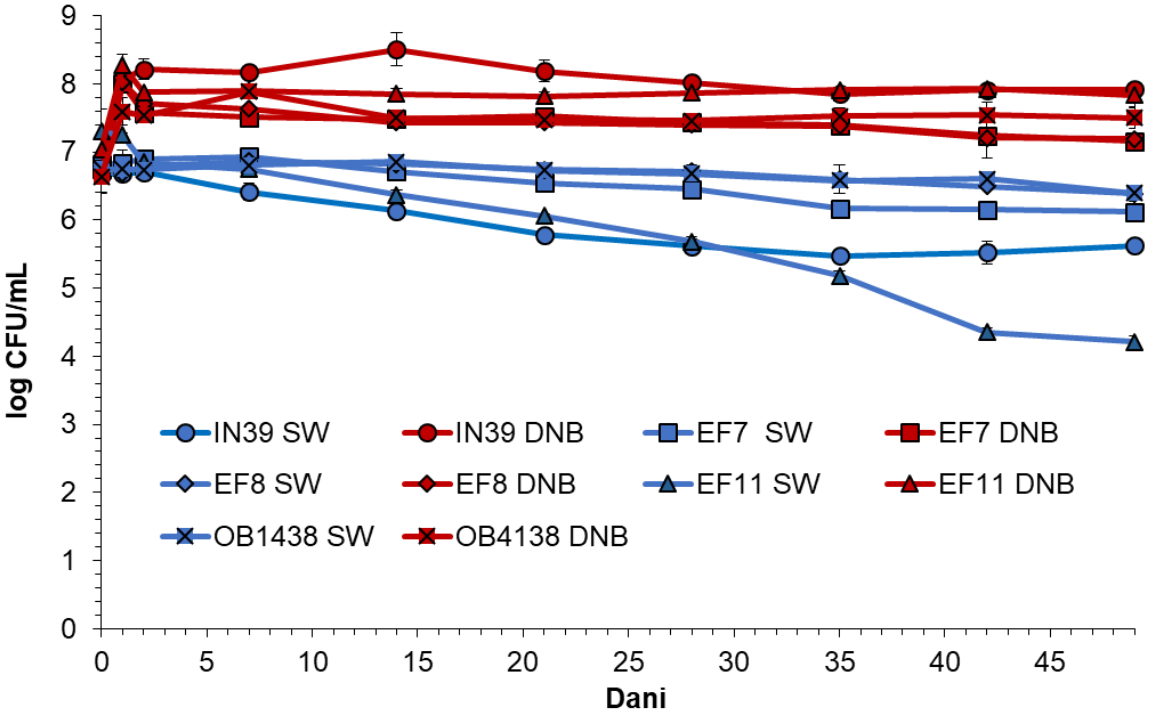
5.1.1.3 Koncentracija otopljenog kisika

Svih 5 testiranih izolata uspješno je preživjelo aerirane, intermedijarne i anaerobne uvjete kroz 5 mjeseci praćenja (Slike 10-12). Tijekom prva 2 dana inkubacije u DNB, bakterije su se umnažale u aeriranim i intermedijarnim uvjetima, te u manjoj mjeri tijekom prvog dana u anaerobnim uvjetima, dok u SW nije bilo umnažanja bakterija. U SW nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju izolata između aeriranih, intermedijarnih i anaerobnih uvjeta. Srednja vrijednost redukcije brojnosti bakterija u SW u svim istraživanim uvjetima bila je 0,4 ± 0,3 log CFU/mL izuzevši ekstremnu vrijednost EF11 u SW koji je imao najviše vrijednosti redukcije broja bakterija (redukcija log CFU/mL aeracija 2,6; intermedijarno 3,1; anaerobno 2,4). U DNB nije bilo razlike između preživljavanja EF11 i ostalih izolata. Najbolje preživljavanje bilo je u aeriranim i intermedijarnim uvjetima u DNB pri kojima je prosječna redukcija brojnosti bila -0,4 ± 0,8 log CFU/mL (negativna vrijednost redukcije označava porast broja bakterija). Naime, preživljavanje u anaerobnim uvjetima u DNB bilo je statistički značajno slabije od aeriranih ($p=0,007$) i intermedijarnih ($p<0,001$) uvjeta. Preživljavanje *A. baumannii* u DNB statistički pozitivno korelira s koncentracijom otopljenog kisika ($R=0,448$; $p=0,013$), dok preživljavanje u SW ne pokazuje značajnu korelaciju. U anaerobnim DNB uvjetima nakon oštrog pada log CFU/mL kroz prvih 9 dana, krivulja rasta *A. baumannii* postaje nepravilana s naglim padovima i porastima brojnosti vijabilnih bakterija (Slika 12).

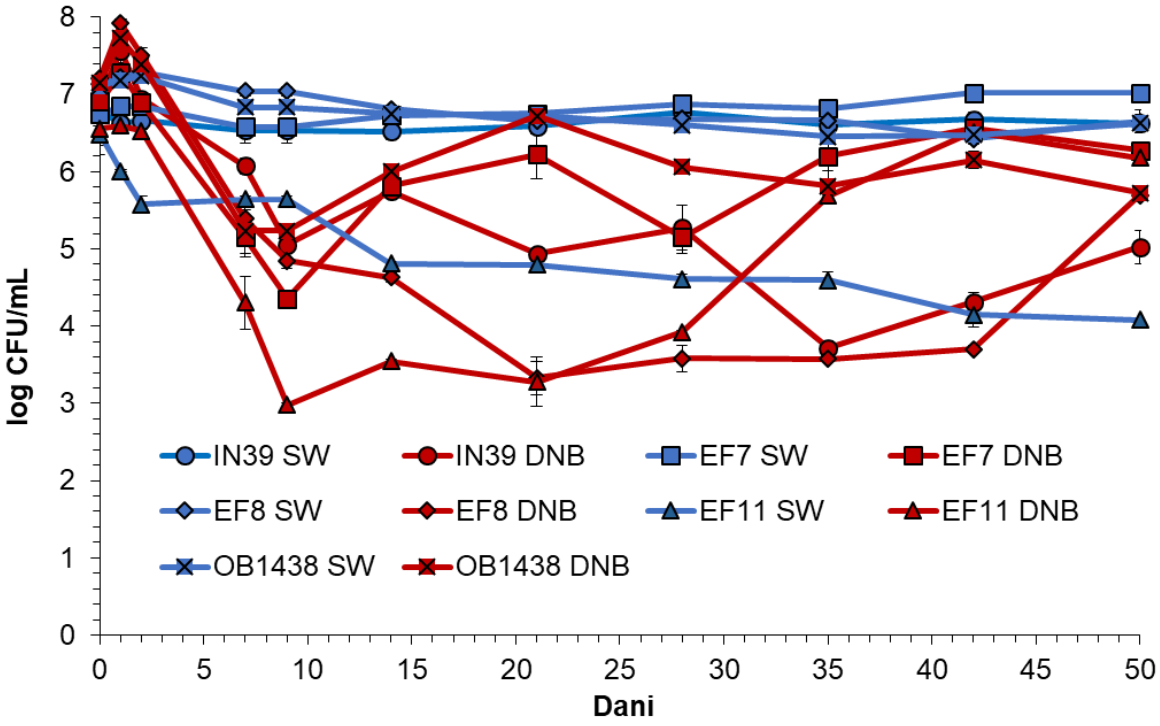
Nadalje, u anaerobnim uvjetima formirane su male prozirne kolonije zajedno uz uobičajene velike mliječne kolonije (Slika 9). Male kolonije pojavljivale su se nepravilno, ali konstantno na Mueller-Hinton agaru, nakon samo jednog dana inkubacije u anaerobnim uvjetima, bez obzira na izolat i testirani medij. Male kolonije su potvrđene kao *A. baumannii* koristeći MALDI-TOF MS. U aeriranim i intermedijarnim uvjetima male prozirne kolonije nisu opažene.



Slika 10. Preživljavanje *A. baumannii* izolata kroz 5 mjeseci praćenja u aeriranim uvjetima (zasićenost kisikom 96 %). SW – komercijalno dostupna izvorska voda; DNB – razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom (1:100).

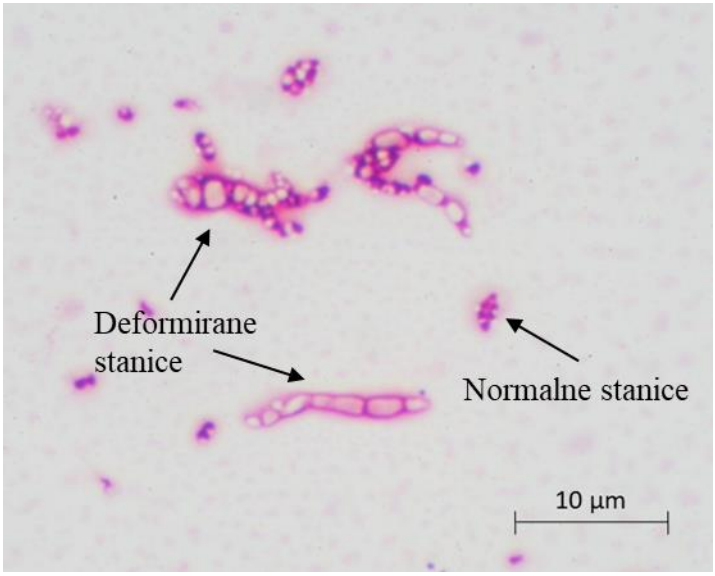


Slika 11. Preživljavanje *A. baumannii* izolata kroz 5 mjeseci praćenja u intermedijarnim uvjetima (zasićenost kisikom 56 %). SW – komercijalno dostupna izvorska voda; DNB – razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom (1:100).



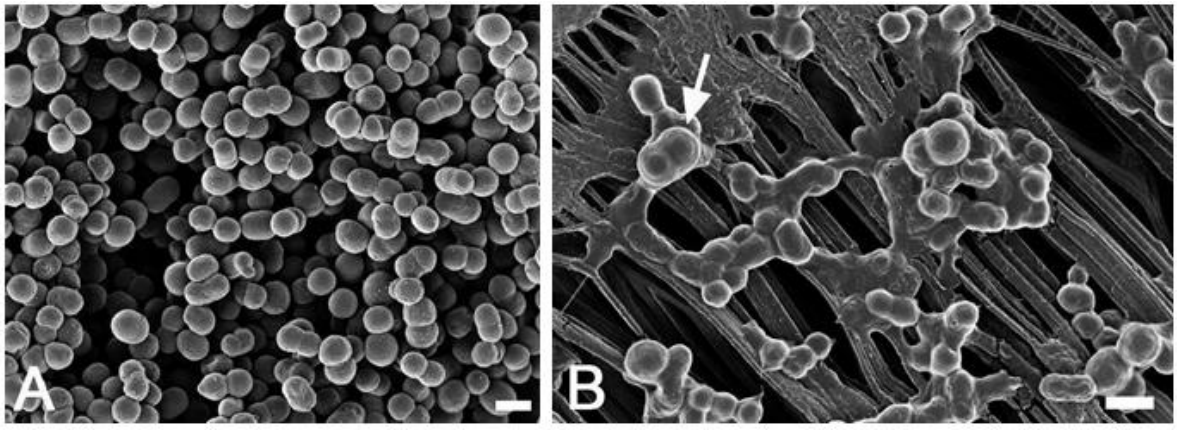
Slika 12. Preživljavanje *A. baumannii* izolata kroz 5 mjeseci praćenja u anaerobnim uvjetima (zasićenost kisikom 0 %). SW – komercijalno dostupna izvorska voda; DNB – razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom (1:100).

Da bi se provjerila čistoća kulture i razlika u morfologiji stanica, prilikom svakog uzorkovanja bakterijske kulture bojane su po Gramu i promatrane optičkim mikroskopom. Nakon 14 dana izlaganja anaerobnim uvjetima uz normalne stanice uočene su i napuhnute nepravilne stanice *A. baumannnii*, koje nisu primile boju (Slika 13).

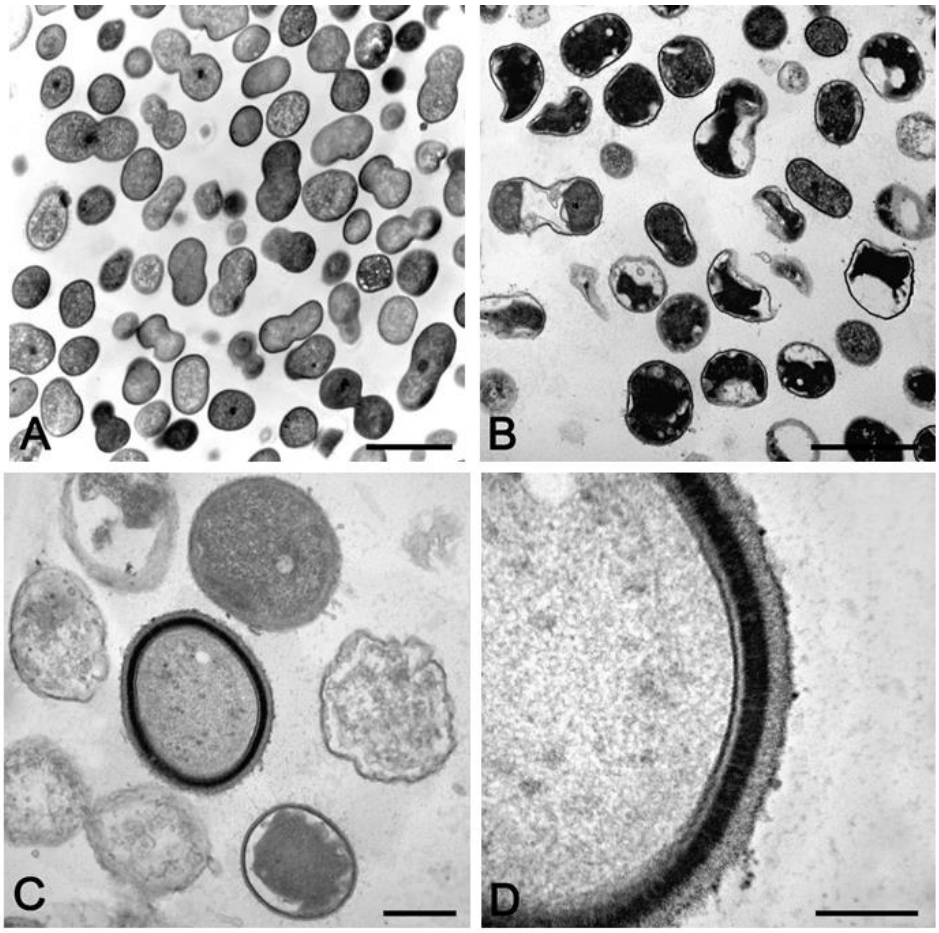


Slika 13. Normalne stanice *A. baumannii* zajedno s deformiranim stanicama koje se nisu obojale po Gramu u anaerobnim uvjetima.

SEM analiza *A. baumannii* nakon izlaganja anaerobnim uvjetima nije pokazala oštećenu površinu stanice u usporedbi sa stanicama s početka eksperimenta. Stanice su bile grupirane i međusobno povezane izvanstaničnim tvarima (Slika 14). TEM analiza pokazala je normalnu strukturu *A. baumannii* stanica nakon izlaganja aerobnim uvjetima (Slika 15 A). Nakon izlaganja anaerobnim uvjetima stanice su bile oštećene, te se u nekim slučajevima nazirao samo sferoplast (Slika 15 B). Manji broj stanica zadržao je tamni protoplast s netaknutom membranom. U manjem broju među oštećenim i neoštećenim stanicama, bile su prepoznatljive stanice s debelom ovojnicom (Slika 15 C, D). Spomenute stanice imale su oblik kokobacila te su zadržale osmotsku stabilnost. Pretpostavka je da je riječ o dormantnim stanicama. Dormantne stanice nisu bile značajno veće (1317 x 1029 nm) od normalnih stanica (1181 x 996 nm), no postojala je očita razlika u debljini vanjske ovojnice. Prosječna debljina vanjske ovojnice kontrolnih stanica iz aerobnih uvjeta bila je 30 ± 4 nm (od 22 do 41 nm, n = 93), dok je vanjska ovojnica dormantnih stanica iz anaerobnih uvjeta bila 3,3 puta deblja, u prosjeku 98 ± 11 nm (od 83 do 111 nm, n = 17). TEM analiza (Slika 15 D) pokazala je da je uzrok veće debljine vanjske ovojnice najvjerojatnije rezultat zadebljanja peptidoglikanskog sloja u staničnoj stijenci.

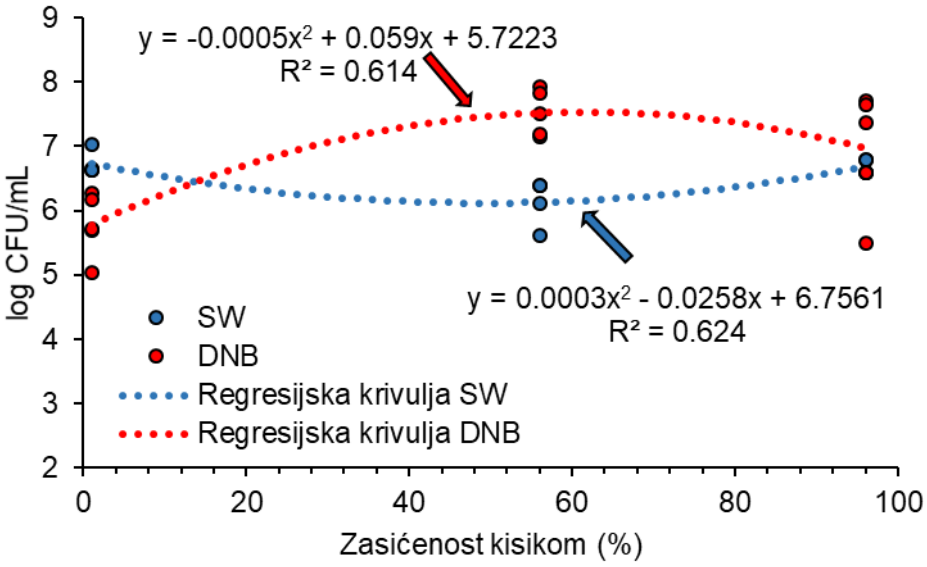


Slika 14. SEM analiza *A. baumannii* stanica (izolat EF7, DNB). A = stanice bez površinskog oštećenja na početku eksperimenta; B = grupirane stanice s izvanstaničnim tvarima na kraju eksperimenta u anaerobnim uvjetima (50 dana). Skala: 1 μm.



Slika 15. TEM analiza *A. baumannii* stanica (izolat EF7, DNB). A = stanice s normalnom strukturom na kraju eksperimenta u aerobnim uvjetima; B = oštećene stanice na kraju eksperimenta u anaerobnim uvjetima (50 dana); C = dormantne stanice iz anaerobnih uvjeta; D = uvećana vanjska ovojnica dormantne stanice. Skala: A, B – 2 μm; C – 500 nm; D – 200 nm.

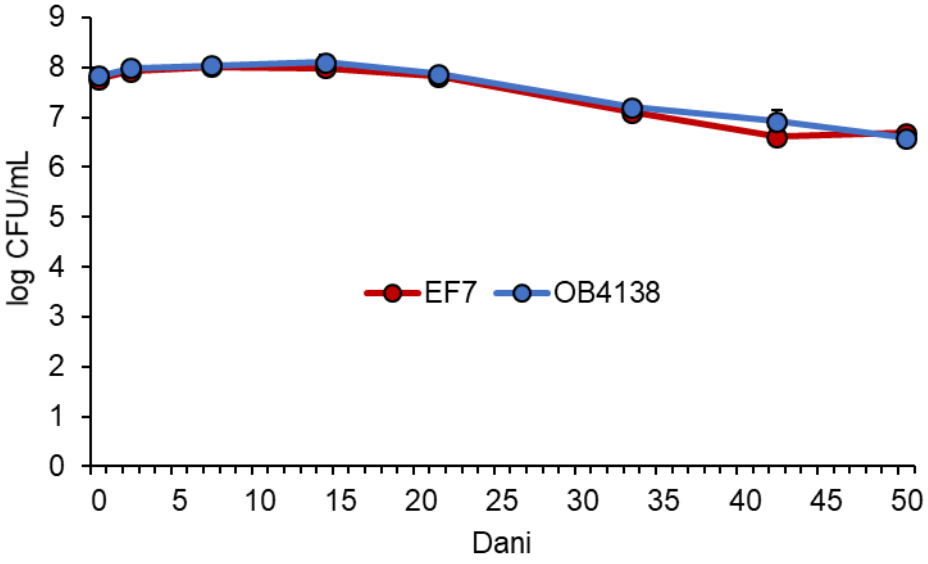
Model preživljavanja *A. baumannii* pri istraživanim koncentracijama kisika nakon 50 dana u dva različita medija izražen je pomoću modela nelinearne polinomne regresije drugog stupnja prikazane na Slici 16. Oba modela imaju podjednaku R^2 vrijednost (SW 61,4 %; DNB 62,4 %). Optimum preživljavanja *A. baumannii* je oko 60 %-tne zasićenosti kisikom u DNB, dok u SW preživljavanje pokazuje malu varijaciju pri svim istraživanim koncentracijama.



Slika 16. Model preživljavanja *A. baumannii* nakon 50 dana u SW (komercijalno dostupna izvorska voda) i DNB (razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom) pri različitim koncentracijama otopljenog kisika. Model je izrađen koristeći nelinearnu polinomnu regresiju drugog stupnja na finalnim brojevima bakterija (nakon 50 dana izlaganja). Zbog bolje aproksimacije, podaci za izolat EF11 izostavljeni su zbog velikog odstupanja od ostalih izolata. R^2 – koeficijent determinacije određuje podobnost modela. Početni broj bakterija bio je 6,9 ± 0,2 log CFU/mL.

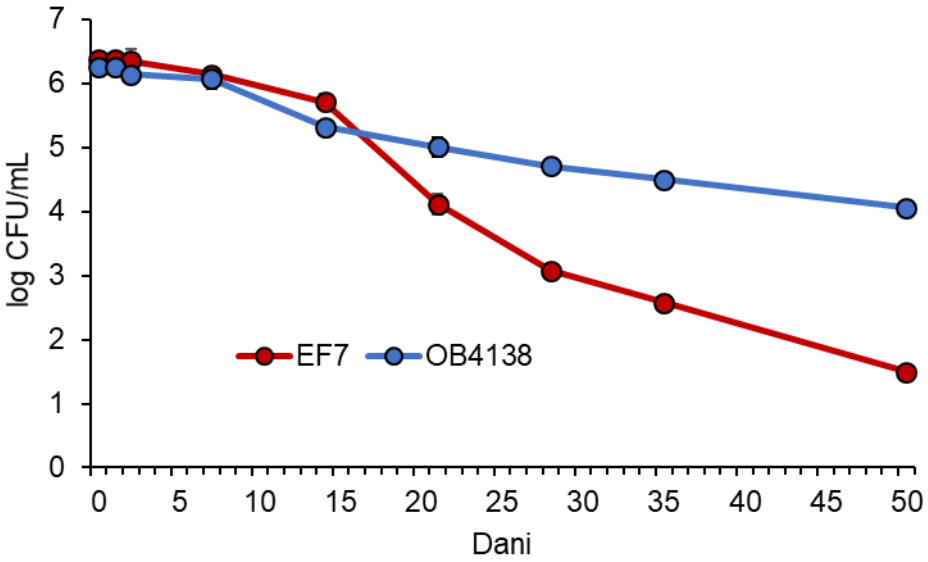
5.1.1.4 Preživljavanje u riječnoj i morskoj vodi

Bakterija *A. baumannii* uspješno preživljava u riječnoj vodi kroz 50 dana praćenja (Slika 17). Između dva testirana izolata ne postoji statistički značajna razlika. Zabilježeno je umnažanje oba izolata za 0,2 ± 0,0 log CFU/mL. Nakon 15 dana praćenja, brojnost *A. baumannii* lagano počinje padati. U odnosu na početak eksperimenta brojnost bakterija značajno (p=0,002) se smanjila za 1,2 ± 0,1 log CFU/mL nakon 50 dana praćenja, no i dalje je ostao visok broj *A. baumannii* u sustavu (6,6 ± 0,1 log CFU/mL).



Slika 17. Preživljavanje *A. baumannii* u riječnoj vodi kroz 50 dana praćenja. Početni broj bakterija bio je 7,8 log ± 0,0 CFU/mL.

U morskoj vodi *A. baumannii* također uspješno preživljava kroz 50 dana praćenja, bez umnažanja (Slika 18). Brojnost oba izolata statistički se značajno smanjila u odnosu na početak eksperimenta (OB4138 redukcija 2,2 ± 0,1 log CFU/mL; EF7 redukcija 4,3 ± 0,1 log CFU/mL). Izolat OB4138 nakon 15 dana praćenja pokazuje statistički bolje preživljavanje od izolata EF7 (p<0,001).

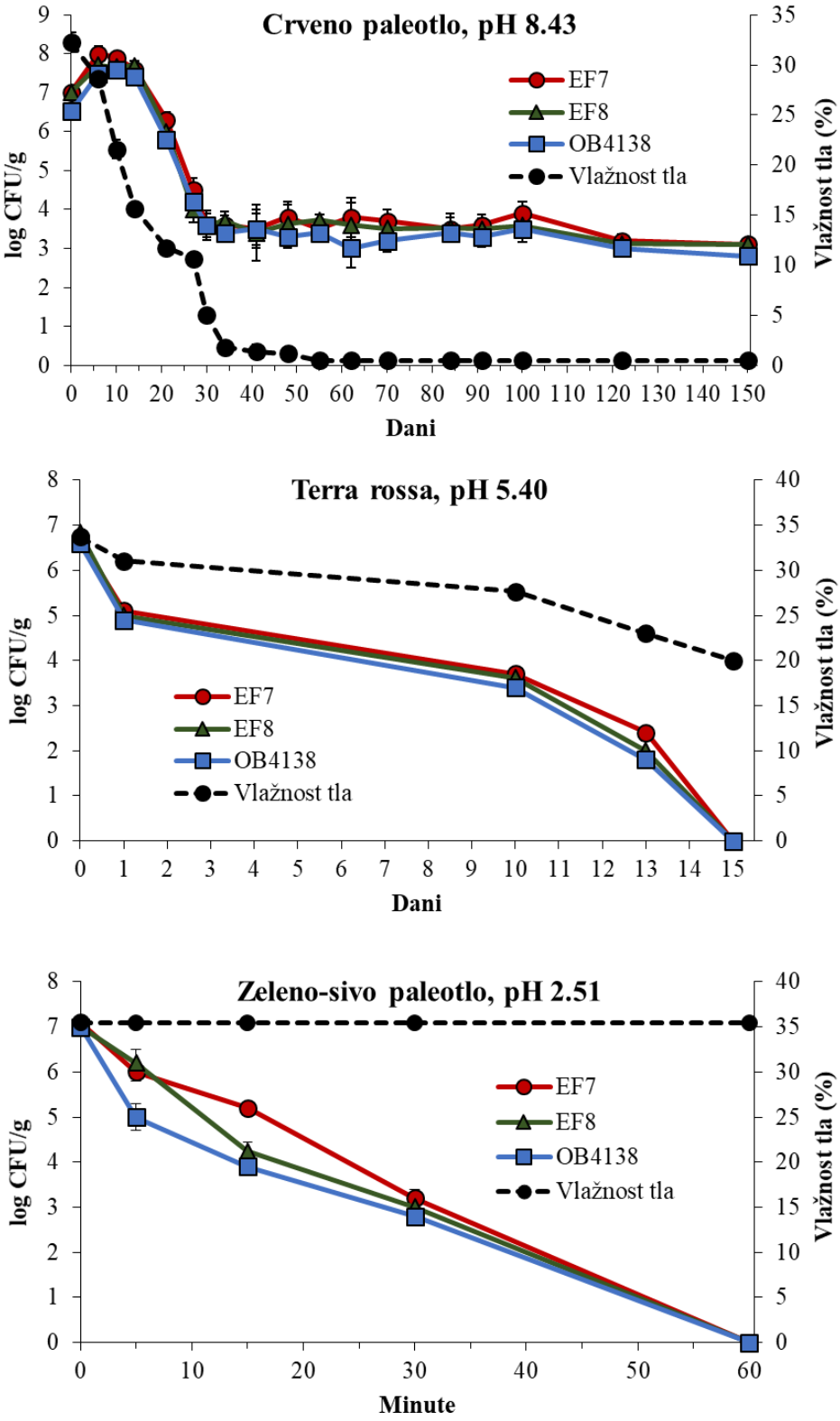


Slika 18. Preživljavanje *A. baumannii* u morskoj vodi kroz 50 dana praćenja. Početni broj bakterija bio je 6,4 log ± 0,1 CFU/mL.

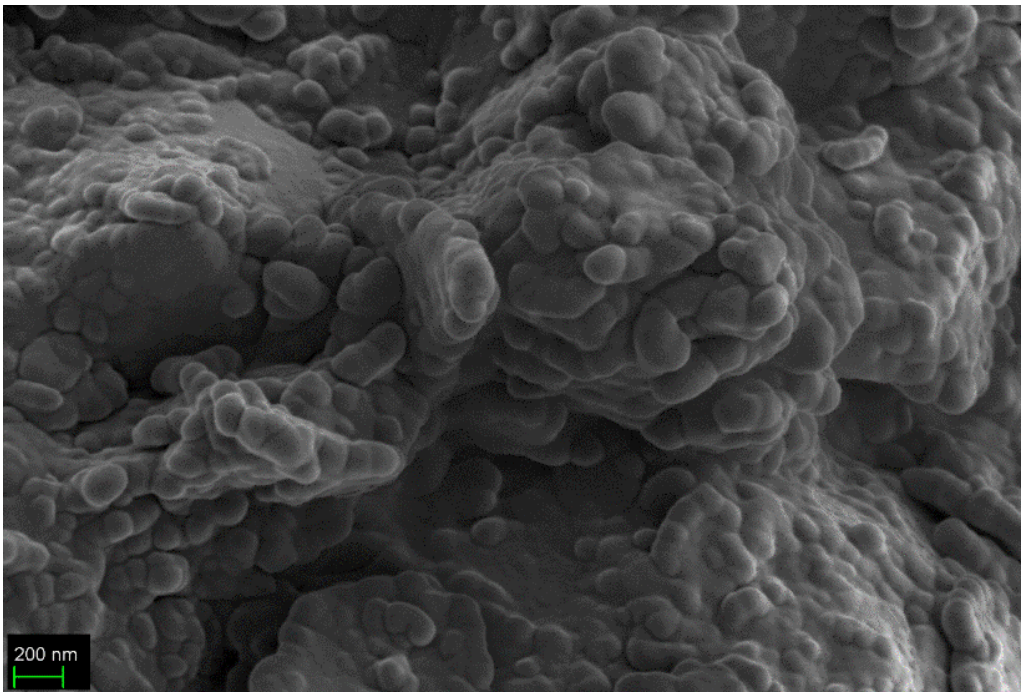
5.1.1.5 Preživljavanje u tlu

Preživljavanje tri *A. baumannii* izolata (EF7, EF8, OB4138) u tri tipa steriliziranih tala prikazano je na Slici 19. Vlažnost tala na početku eksperimenta namještena je do maksimalnog kapaciteta zadržavanje vode, te je prikazana kao maseni udio vode (%). Tijekom eksperimenta tlo se sušilo na zraku, te je zabilježeno postepeno smanjenje vlažnosti. U crvenom paleotlu (pH 8,43) bakterije su se umnažale, dok u Terra Rossi i zeleno-sivom paleotlu nije bilo umnažanja. U crvenom paleotlu dogodio se nagli pad brojnosti *A. baumannii* nakon 14. do 30. dana kontakta (za 4,0 log CFU/g) što je statistički značajno korelirano ($R=0,978$; $p<0,001$) s padom vlažnosti tla od 16 do 5 %. Održavanje vlažnosti tla na minimumu (< 1 %) nije rezultiralo daljnjim padom brojnosti *A. baumannii* (održavanje populacije na 3,4 ± 0,3 log CFU/g). U tom periodu pojavljuju se, kod sva tri testirana izolata, spomenute male prozirne kolonija uz normalne velike kolonije.

Stanice *A. baumannii* brzo su se imobilizirale na čestice steriliziranog crvenog paleotla te su formirale biofilm što je potvrđeno SEM analizom nakon 6 dana kontakta (Slika 20). U slabo kiseloj Terra Rossi (pH 5,40) zabilježen je konstantan pad brojnosti svih izolata do 15. dana kontakta kada *A. baumannii* više nije bio detektiran u sustavu (< 1 CFU/g vlažnog tla). Pad brojnosti *A. baumannii* statistički je značajno koreliran s vlažnosti tla ($R=0,982$; $p<0,001$). Međutim, nestanak vijabilnih *A. baumannii* dogodio se pri relativno visokoj vlažnosti tla od 20 %. U kiselom zeleno-sivom paleotlu (pH 2,51) dogodio se oštar pad vijabilnih *A. baumannii* (< 1 CFU/g mokrog tla) unutar 60 minuta kontakta. Pad brojnosti *A. baumannii* nije bio koreliran s vlažnošću tla koja je ostala pri početnoj vrijednosti od 35 % tijekom kratkog trajanja eksperimenta. Nije bilo statistički značajne razlike između preživljavanja tri *A. baumannii* izolata u svim testiranim tlima.



Slika 19. Preživljavanje tri *A. baumannii* izolata kroz 150 dana u steriliziranom tlu oplemenjenom s vodom do maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode. Prikazane su srednje vrijednosti triplikata. Eksperimenti s Terra Rossom i zeleno-sivim paleotlom su prekinuti nakon što je *A. baumannii* nestao iz sustava (< 1 CFU/g vlažnog tla).



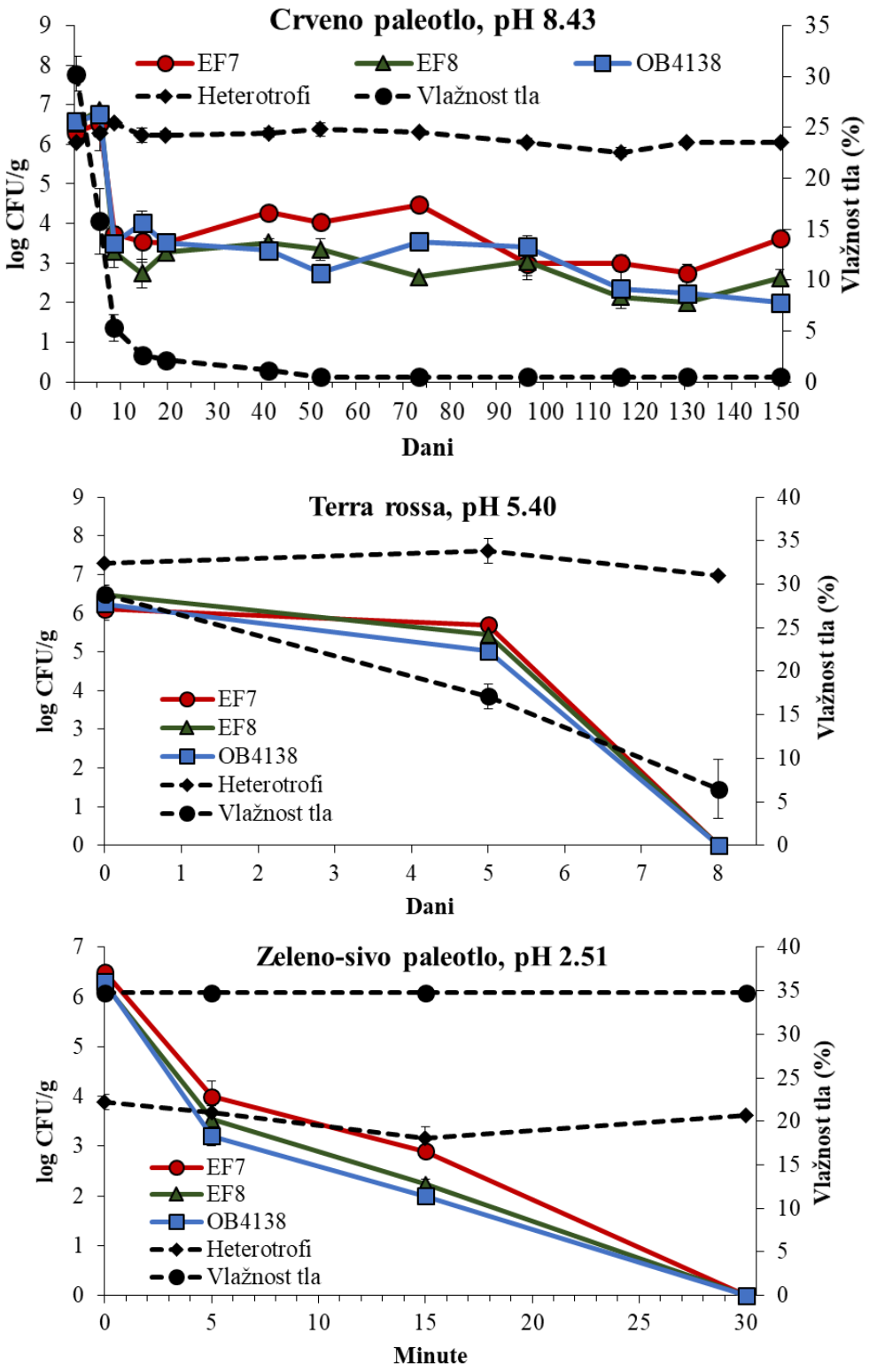
Slika 20. SEM slika čiste *A. baumannii* kulture (izolat EF8) imobilizirane na čestice sterilnog crvenog paleotla nakon 6 dana kontakta.

Rezultati interakcije tri izolata *A. baumannii* u svježem, nativnom tlu s heterotrofnim bakterijama prikazani su na Slici 21. U nativnom crvenom paleotlu identificirane su sljedeće vrste heterotrofnih bakterija: *Arthrobacter* sp. (6 izolata), *Bacillus* sp. (2), *Burkholderia* sp. (1), *Burkholderia caledonica* (1), *Paenibacillus* sp. (2), *Pseudomonas* sp. (1), *Streptomyces* sp. (2). U alkalnom crvenom paleotlu (pH 8,43) *A. baumannii* se umnažao na početku eksperimenta kroz prvih 5 dana praćenja. Povećanje brojnosti dogodilo se pri vlažnosti tla od 30 do 16 %, dok je nagli pad brojnosti *A. baumannii* (redukcija 3,2 ± 0,4 log CFU/g) pozitivno koreliran s padom vlažnosti tla ($R=0,915$; $p<0,001$) od 16 do 5 %. Brojnost *A. baumannii* održavala se na 3,1 ± 0,7 log CFU/g pri manje od 1 % vlažnosti tla do kraja eksperimenta.

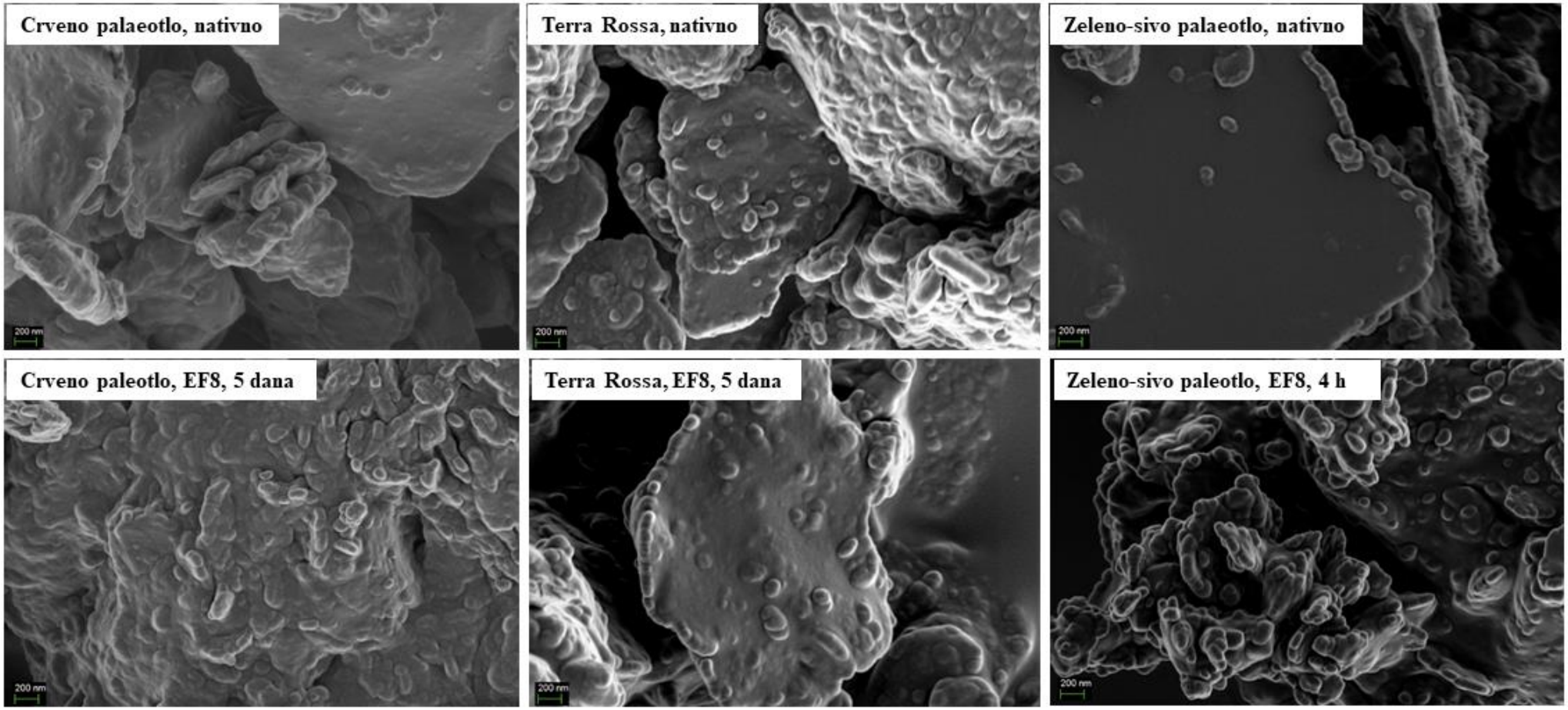
U Terra Rossi (pH 5,40) polagani pad *A. baumannii* kroz prvih 5 dana praćen je s padom vlažnosti tla od 27 do 17 %, te je zabilježena statistički značajna pozitivna korelacija ($R=0,915$; $p<0,001$). Nestanak *A. baumannii* (< 1 CFU/g vlažnog tla) iz sustava zabilježen je nakon 8 dana kontakta pri vlažnosti tla od 6 %. Kontakt sa zeleno-sivim paleotlom (pH 2,51) rezultirao je kontinuiranim padom brojnosti *A. baumannii* i nestankom iz sustava (< 1 CFU/g vlažnog tla) nakon 30 min kontakta unatoč visokoj vlažnosti tla (35 %).

Razlika između preživljavanja tri izolata *A. baumannii* u tri različita tla nije bila statistički značajna. Bez obzira na vlažnost tla, brojnost nativnih heterotrofnih bakterija ostala je konstantana tijekom istraživanog perioda u svim tlima. Između brojnosti *A. baumannii* i heterotrofnih bakterija u sva tri tipa tala nije bio statistički značajne korelacije.

SEM analiza potvrdila je imobilizaciju nativnih stanica na čestice svježih uzoraka tala (Slika 22). Nakon 5 dana kontakta sa crvenim paleotlom, *A. baumannii* je stvorio debeli biofilm na česticama tla. Imobilizirane heterotrofne bakterije bile su prisutne na česticama Terra Rosse (5 dana) i zeleno-sivog paleotla (4 h) unatoč smanjenju brojnosti *A. baumannii*. Nakon dugotrajnog izlaganja niskoj vlažnosti kao i kontakta s tlom niske pH vrijednosti, na pločama se pojavljuju male prozirne kolonije uz velike uobičajene mliječne.

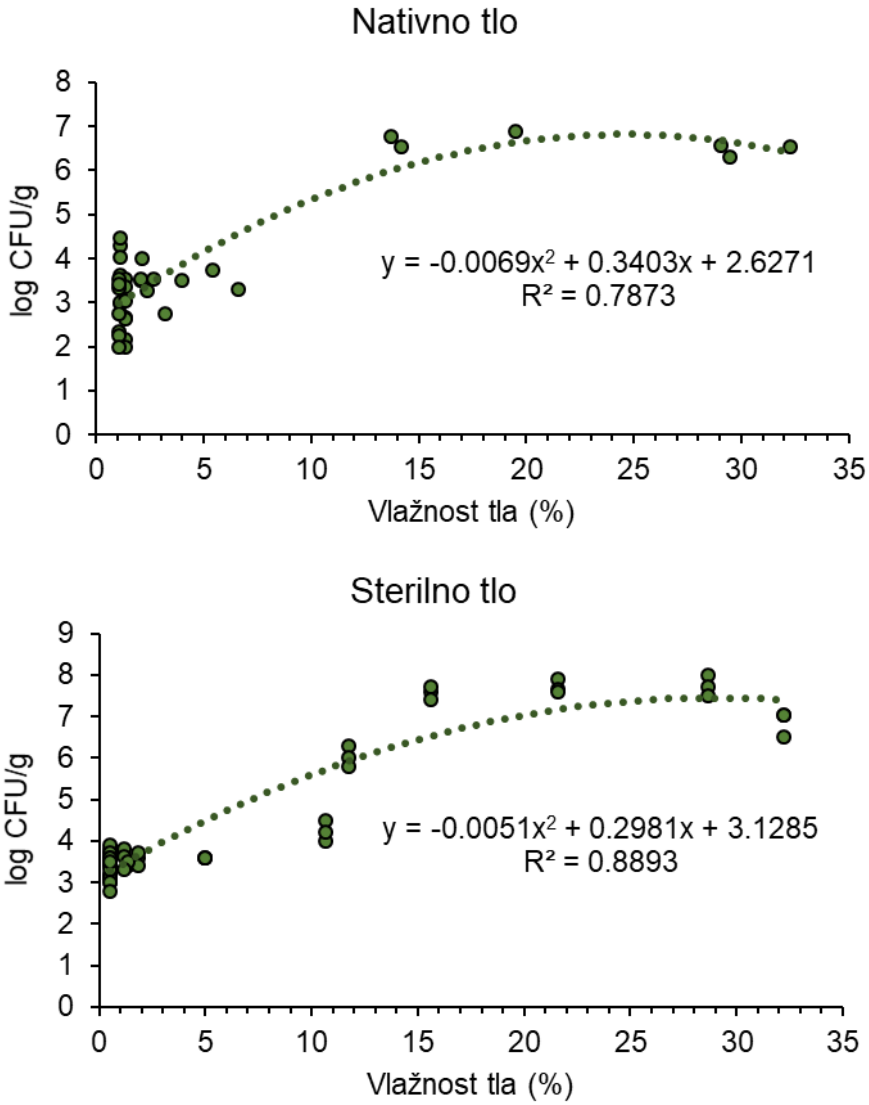


Slika 21. Preživljavanje tri *A. baumannii* izolata kroz 150 dana u svježem tlu s nativnim heterotrofnim bakterijama oplemenjenom s vodom do maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode. Prikazane su srednje vrijednosti triplikata. Eksperimenti s Terra Rossom i zeleno-sivim paleotlom prekinuti su nakon što je *A. baumannii* nestao iz sustava (< 1 CFU/g mokrog tla).



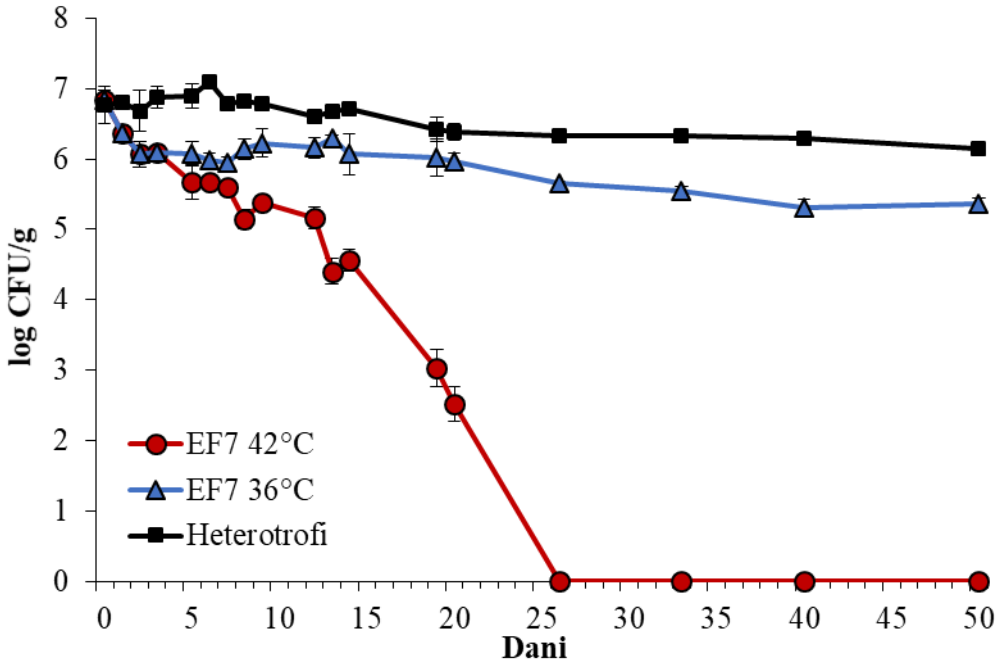
Slika 22. SEM analiza nativnih bakterijskih stanica imobiliziranih na čestice svježih uzoraka tala (prvi red) i imobiliziranih bakterijskih stanica na čestice tala s dodatkom *A. baumannii* (izolat EF8) nakon 5 dana kontakta s crvenim paleotlom i Terra Rossom te 4 h kontakta sa zeleno-sivim paleotlom (drugi red).

Model predviđanja preživljavanja *A. baumannii* u tlu ovisno o postotku vlažnosti tla izrađen je koristeći nelinearnu polinomnu regresiju drugog stupnja (Slika 23). Linearni model regresije bi isto tako bio primjenjiv, no nelinearni model ima za 8 % veći koeficijent determinacije (R^2). Budući da je u alkalnom crvenom paleotlu najmanji učinak pH na preživljavanje *A. baumannii*, korišteni su podaci samo za tu vrstu tla pri izradi modela. Učinak heterotrofnih bakterija u nativnom tlu neznatno utječe na *A. baumannii*, stoga je njihov učinak zanemaren. Model uspješno predviđa preživljavanje *A. baumannii* podjednako u sterilnom (88,9 %) kao i u nativnom (78,7 %) crvenom paleotlu.



Slika 23. Model preživljavanja *A. baumannii* nakon 150 dana u sterilnom i nativnom crvenom paleotlu ovisno o vlažnosti tla. Model je izrađen koristeći nelinearnu polinomnu regresiju drugog stupnja. R^2 – koeficijent determinacije određuje podobnost modela. Početni broj bakterija bio je 6,7 ± 0,3 log CFU/g.

U vlažnom nativnom crvenom paleotlu *A. baumannii* preživljava do 26 dana praćenja na sobnoj temperaturi (Slika 24), što je značajno kraće u usporedbi s preživljavanjem do 150 dana praćenja u istom suhom nativnom tlu (Slika 21). Međutim, primijećena je razlika u brojnosti *A. baumannii* ovisno o temperaturi kultivacije. Pri 36 °C, *A. baumannii* normalno je rastao na selektivnoj podlozi CHROMAgar Acinetobacter s CR102 dodatkom (dodatak sadrži kombinaciju karbapenema što omogućuje selekciju rezistentnih izolata) do 50 dana praćenja. Pri kultivaciji na 42 °C, *A. baumannii* nakon 26 dana više nije detektiran na istoj selektivnoj podlozi. Nakon ponovnog precjepljivanja, bakterije kultivirane na 36 °C su ponovno mogle rasti na podlozi s antibiotikom pri 42 °C. Da bi se otkrilo je li potencijalni uzrok ovakvog ponašanja *A. baumannii* visoka koncentracija željeza u crvenom paleotlu, određena je minimalna inhibitorna (MIK) i baktericidna koncentracija (MBK) Fe u prirodnoj izvorskoj vodi. MIK Fe je 500 mg/L, dok je MBK 1000 mg/L.



Slika 24. Preživljavanje *A. baumannii* u vlažnom nativnom nesterilnom crvenom paleotlu kroz 50 dana praćenja na 36 i 42 °C. Vlažnost tla održavana je na 30 % povremenim dodavanjem sterilne prirodne izvorske vode. Početni broj bakterija bio je 6,8 ± 0,1 log CFU/g.

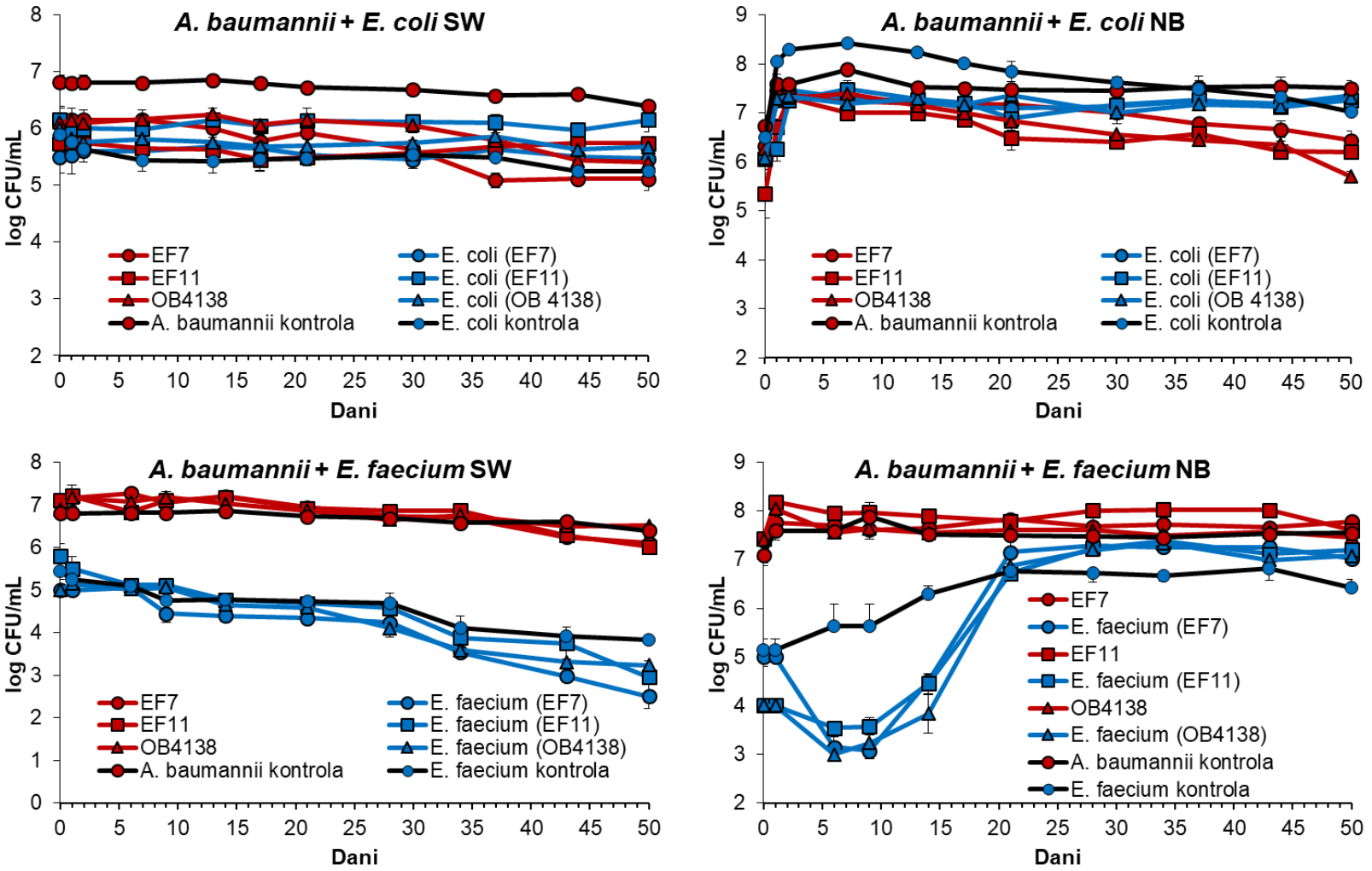
5.1.2 Utjecaj biotičkih ekoloških čimbenika

5.1.2.1 Među-bakterijska interakcija

Rezultati interakcije *A. baumannii* s *E. coli* i *E. faecium* prikazani su na Slici 25. U SW nije bilo umnažanja bakterija. U DNB je do umnažanja došlo u kombinacijama s *E. coli* i *E. faecium*. Sva tri *A. baumannii* izolata (EF7, EF11, OB4138) ponašala su se slično, bez statistički značajne razlike u svim sustavima, bez obzira na medij.

Nakon 50 dana kontakta nije bilo statistički značajne razlike u SW između *A. baumannii* u kontroli i *A. baumannii* u sustavu s *E. coli* (p=0,443), dok je u DNB ta razlika bila statistički značajna (p=0,040). No, redukcija brojnosti *A. baumannii* u sustavu s *E. coli* u DNB u praksi je zanemariva zbog redukcije od samo 1,0 ± 0,5 log CFU/mL. U SW nije bilo statistički značajne korelacije brojnosti *A. baumannii* s *E. coli* (R= -0,135; p=0,732). U DNB postoji pozitivna korelacija, no statistički beznačajna (R= 0,409; p= 0,072).

Nadalje, između *A. baumannii* u kontroli i *A. baumannii* u sustavu s *E. faecium* u SW (p=0,135) i DNB (p=0,082) nije bilo statistički značajne razlike. Brojnost *A. baumannii* bila je statistički pozitivno korelirana s brojnosti *E. faecium* u SW (R= 0,808; p<0,001). U DNB se bakterija *E. faecium* drugačije ponašala (Slika 25) stoga nije postojala značajna korelacija s *A. baumannii* (R=0,083; p=0,850). U prvih 5 dana izloženosti, srednja vrijednost *E. faecium*, smanjila se s 4,3 ± 0,5 na 3,2 ± 0,3 log CFU/mL. Nakon 10 dana, brojnost *E. faecium* počela je rasti i rezultirala finalnim brojem od 7,1 ± 0,1 log CFU/mL.



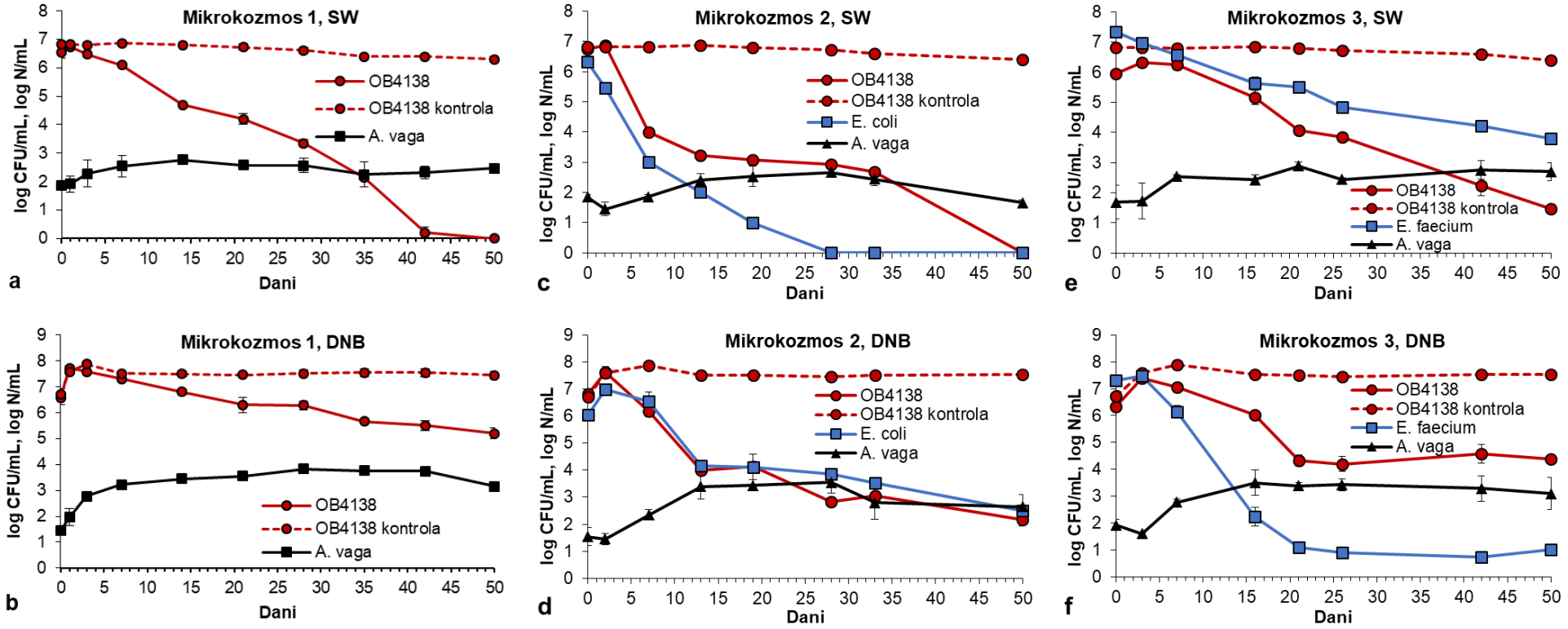
Slika 25. Brojnost *A. baumannii* u interakciji s *E. coli* i *E. faecium* u SW (komercijalno dostupna izvorska voda) i DNB (razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom) kroz 50 dana praćenja. *A. baumannii* kontrola – srednja vrijednost čistih kultura sva 3 testirana izolata *A. baumannii* bez interakcije s drugim bakterijama; *E. coli* kontrola – brojnost čiste kulture *E. coli* bez interakcije s drugim bakterijama; *E. faecium* kontrola – brojnost čiste kulture *E. faecium* bez interakcije. Prikazane su srednje vrijednosti i standardne varijacije. U zagradi je prikazana interakcija *E. coli* i *E. faecium* s određenim izolatom *A. baumannii*.

5.1.2.2 Grazing kolnjaka

Rezultati interakcije *A. baumannii* s kolnjacima prikazani su na Slikama 26 i 27. Statistički značajne korelacije između kolnjaka i bakterija prikazane su u Tablici 13. U oba testirana medija (SW i DNB) brojnost *A. baumannii, E. coli* i *E. faecium* negativno je korelirana s kolnjacima u sva tri mikrokozmosa (Tablica 13). Nadalje, brojnost *A. baumannii* statistički je pozitivno korelirana s *E. coli* u mikrokozmosu 2 i *E. faecium* u mikrokozmosu 3 u oba medija.

Uklanjanje *A. baumannii* pomoću kolnjaka u SW iznosilo je 6,6; 6,7 i 4,5 log CFU/mL, dok su u DNB vrijednosti bile 1,4; 4,7 i 2 log CFU/mL u mikrokozmosima 1-3 (Slika 27). U usporedbi s kontrolom, kolnjaci su prosječno uklonili 5,5 ± 1,3 log CFU/mL *A. baumannii* u SW i 3,5 ± 1,7 log CFU/mL u DNB.

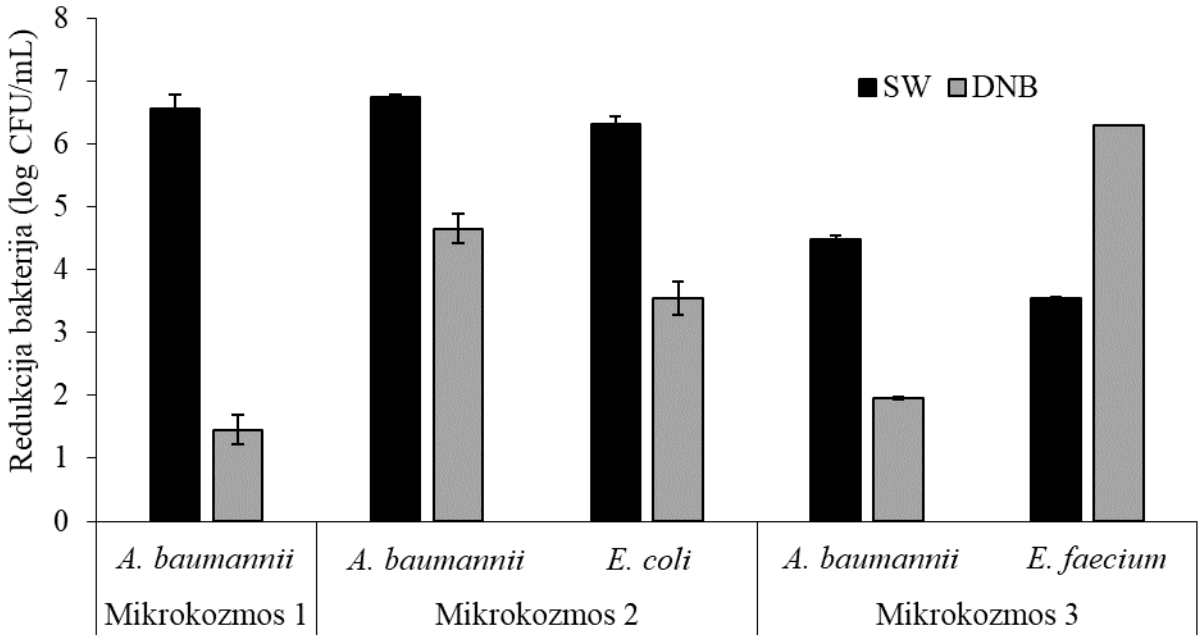
Bakterija *A. baumannii* efikasnije je uklonjena iz SW ($p<0,001$) nego iz DNB. *E. coli* je slijedila isti trend. Međutim, *E. coli* je nestala iz mikrokozmosa nakon 28 dana izlaganja, dok je *A. baumannii* opstala do 50 dana (Slika 26). U DNB bakterije *A. baumannii* i *E. coli* uspješno preživljavaju 50 dana. U mikrokozmosu 3, bakterija *E. faecium* ponašala se drugačije. Uklanjanje *E. faecium* bilo je veće u DNB ($p<0,001$) (6,3 log CFU/mL) nego u SW (3,6 log CFU/mL).



Slika 26. Brojnost (srednja vrijednost i standardne devijacije) bakterija i kolnjaka u sljedećim mikrokozmosima: mikrokozmos 1 (*A. baumannii* i *A. vaga* a, b); mikrokozmos 2 (*A. baumannii*, *E. coli* i *A. vaga* c, d); mikrokozmos 3 (A. *baumannii*, *E. faecium* i *A. vaga* e, f) u SW (komercijalno dostupna izvorska voda) i DNB (razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom). U eksperimentu s kolnjacima korišten je jedan *A. baumannii* izolat (OB4138). OB4138 kontrola – brojnost (srednja vrijednost i standardna devijacija) čiste kulture *A. baumannii* OB4138 izolata bez interakcija.

Tablica 13. Vrijednost Spearman R korelacija u sljedećim mikrokozmosima: mikrokozmos 1 (*A. baumannii* i *A. vaga*); mikrokozmos 2 (*A. baumannii*, *E. coli* i *A. vaga*); mikrokozmos 3 (*A. baumannii*, *E. faecium* i *A. vaga*) u SW (komercijalno dostupna izvorska voda) i DNB (razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom). Statistička značajnost označena je zvjezdicom ($p<0,05$).

Mikrokozmos	Vodeni medij	Parametar	Spearman R vrijednost	p vrijednost
1	SW	*A. baumannii* + *A. vaga*	-0,279	0,135
	DNB	*A. baumannii* + *A. vaga*	-0,552	0,002*
2	SW	*A. baumannii* + *A. vaga*	-0,427	0,100
		E. coli + *A. vaga*	-0,536	0,000*
		A. baumannii + *E. coli*	0,949	0,032*
	DNB	*A. baumannii* + *A. vaga*	-0,645	0,007*
		E. coli + *A. vaga*	-0,574	0,000*
		A. baumannii + *E. coli*	0,923	0,020*
3	SW	*A. baumannii* + *A. vaga*	-0,580	0,012*
		E. faecium + *A. vaga*	-0,704	0,000*
		A. baumannii + *E. faecium*	0,914	0,002*
	DNB	*A. baumannii* + *A. vaga*	-0,634	0,007*
		E. faecium + *A. vaga*	-0,653	0,000*
		A. baumannii + *E. faecium*	0,900	0,006*



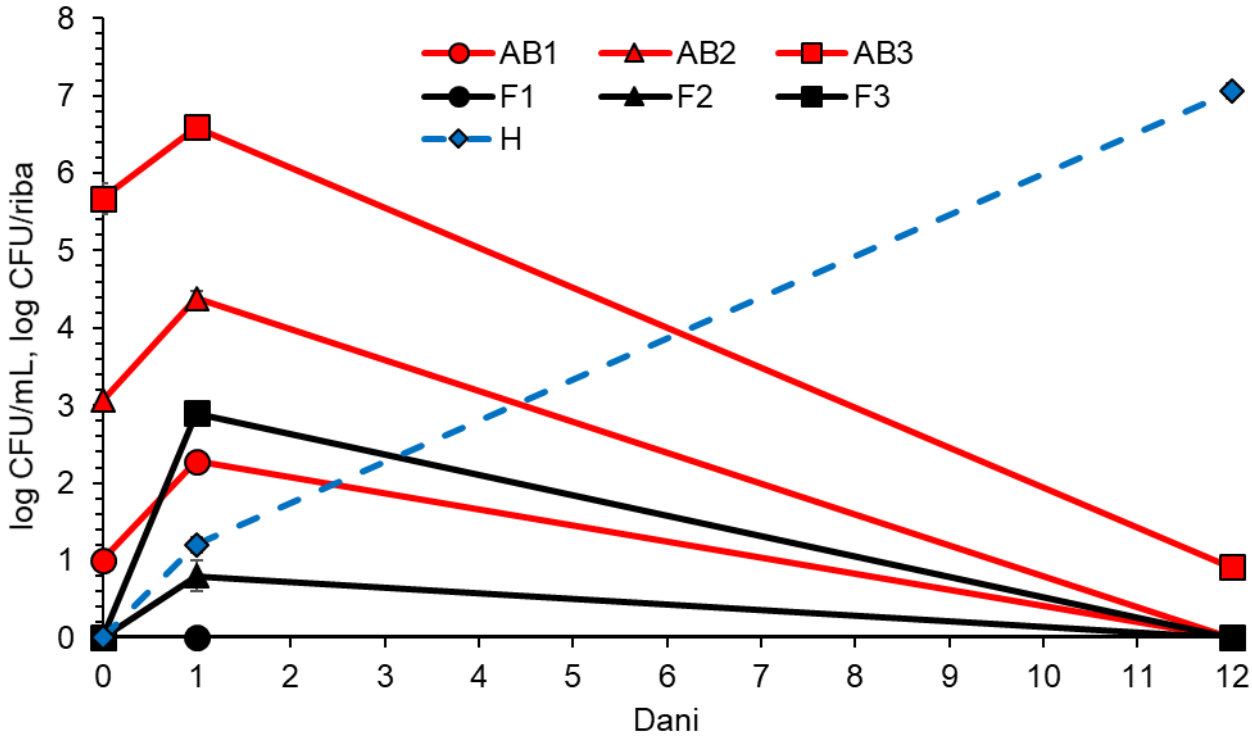
Slika 27. Uklanjanje bakterija pomoću kolnjaka izraženo kao redukcija log CFU/mL (log $CFU_{početni\ broj\ bakterija}$ – log $CFU_{finalni\ broj\ bakterija}$) u sljedećim mikrokozmosima: mikrokozmos 1 (*A. baumannii* i *A. vaga*); mikrokozmos 2 (*A. baumannii*, *E. coli* i *A. vaga*); mikrokozmos 3 (A. *baumannii*, *E. faecium* i *A. vaga*) u SW (komercijalno dostupna izvorska voda) i DNB (razrijeđen hranjivi bujon s destiliranom vodom). Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

5.1.2.3 Kolonizacijski potencijal *A. baumannii*

Rezultati interakcije *A. baumannii* s ribama vrste *P. reticulata* prikazani su na Slici 28. Nakon jednog dana kontakta, početna koncentracija *A. baumannii* u vodi (1,0; 3,1; 5,7 log CFU/mL) povećala se u sva tri istraživana sustava (2,3; 4,4; 6,6 log CFU/mL). U ribama sustava 1 nije zabilježena prisutnost *A. baumannii*, dok je 0,8 log CFU/mL *A. baumannii* zabilježeno u ribama u sustavu 2 i 2,9 log CFU/mL u sustavu 3. Brojnost *A. baumannii* u vodi statistički značajno korelira s brojnosti *A. baumannii* u ribama u svim sustavima (R=0,894; p=0,040).

Nakon 12 dana izloženosti, brojnost *A. baumannii* u vodi sva tri sustava bila je značajno niža u odnosu na prvi dan (p= 0,005). *A. baumannii* nije pronađen u ribama nakon 12 dana u nijednom sustavu.

U vodenom mediju sva tri sustava, početni broj ukupnih heterotrofnih bakterija bio je 0,3 log CFU/mL. Nakon prvog dana broj se povećao na 1,2 log CFU/mL te je nastavio značajno rasti (p<0,001) do 7,1 log CFU/mL na kraju eksperimenta u svim sustavima.



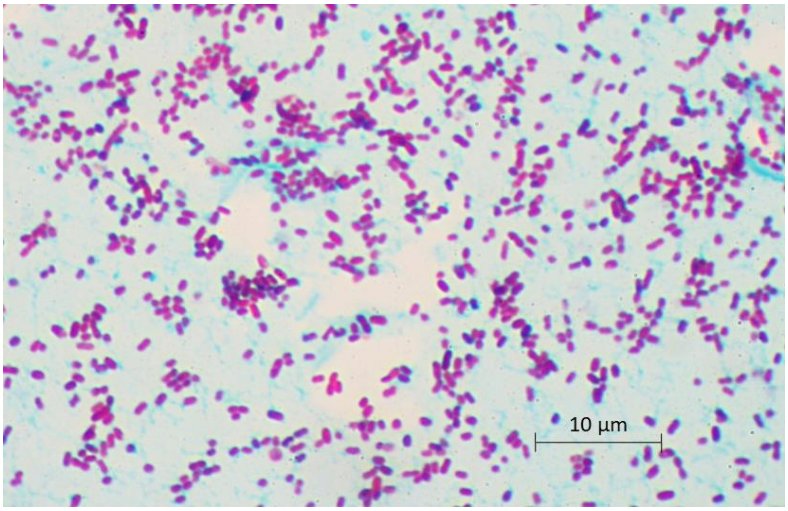
Slika 28. Brojnost *A. baumannii* u vodi (AB1-3) i u ribama (F1-3) u tri istraživana sustava, te brojnost ukupnih heterotrofnih bakterija (H) u vodi tijekom 12 dana praćenja. Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

5.2 Faktori virulencije

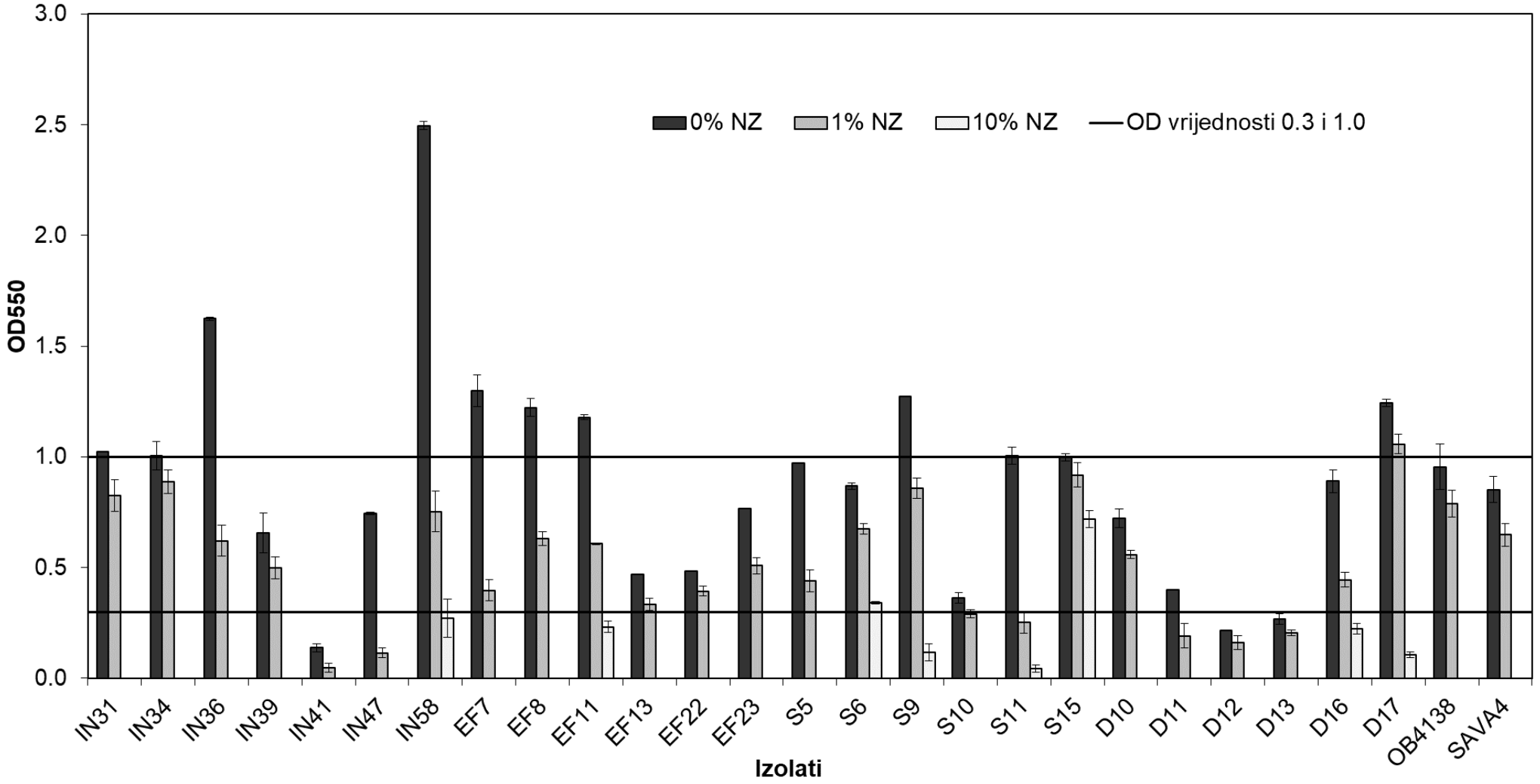
5.2.1 Biofilm i pelikula

Rezultati mjerenja biofilma testiranih izolata prikazani su na Slici 29. Struktura biofilma promatrana pod svjetlosnim mikroskopom prikazana je na Slici 30. Od ukupnog broja izolata 37 % tvori snažan biofilm (OD_{550} > 1). Ističe se izolat IN58 s vrijednosti OD_{550} 2,5. Najviše izolata, 52 % tvori srednji biofilm (0,3 > OD_{550} < 1), te samo 11 % tvori slabi biofilm (OD_{550} < 0,3). Izolati *A. baumannii* osjetljivi na antibiotike statistički značajno bolje tvore biofilm u odnosu na rezistentne izolate (p=0,048). Slabu pelikulu tvori 81 % testiranih izolata, dok je snažna pelikula zabilježena kod 4 izolata (IN58, EF11, S9 i D17). Kod samo jednog izolata IN41 nije zabilježeno stvaranje pelikule (Slika 31, Prilog 1). Od svih 27 testiranih izolata jedino su izolati EF11 i IN58 posjedovali izraženu hrapavost kolonija (Slika 31, Prilog 1).

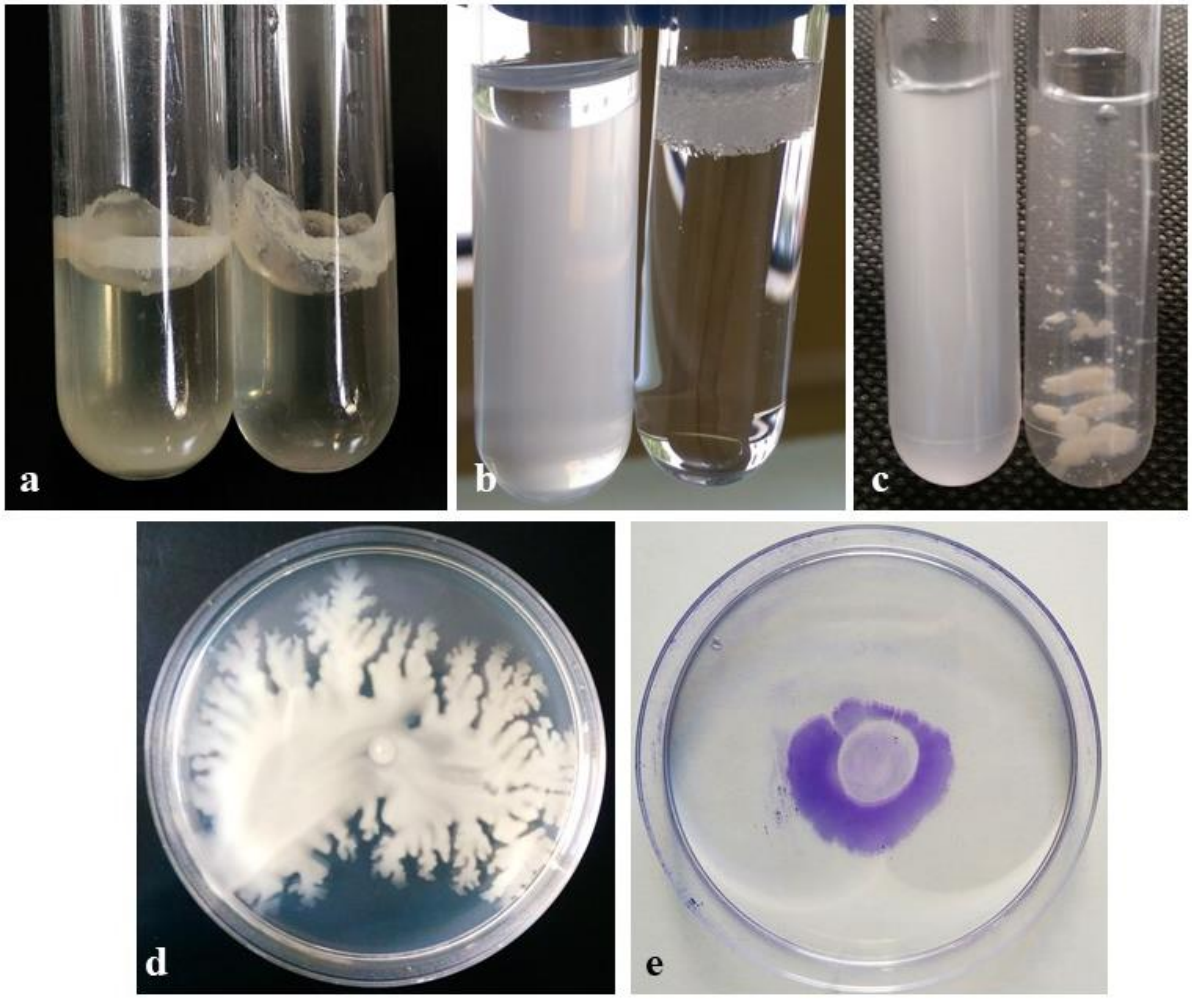
Zabilježena je statistički značajna korelacija između tvorbe biofilma i pelikule (R=0,593; p=0,012). Također, tvorba biofilma na polipropilenskim epruvetama statistički značajno pozitivno korelira s hidrofobnosti izolata (R=0,421; p=0,028) (Prilog 1). Nadalje, oni izolati koji tvore snažnu pelikulu iskazuju veću hidrofobnost (R=0,560; p=0,002). Dodatak 1 % zeolitnog tufa (NZ) u epruvete prilikom inkubacije inhibirao je tvorbu biofilma za 40 ± 22 %, dok je 10 % NZ još više smanjilo biofilm za 76 ± 21 %. Dodatkom 1 % NZ nije zabilježena promjena u stvaranju pelikule, dok je 10 % NZ smanjilo konzistenciju pelikule.



Slika 30. Stanice *A. baumannii* (crveno) okružene izvanstaničnim polimernim tvarima (plavo) obojanih Alcian blue bojom.



Slika 29. Tvorba biofilma (OD_{550}) *A. baumannii* izolata bez prirodnog zeolitnog tufa (0 % NZ) s 1 % i za odabrane izolate s 10 % NZ. Linije predstavljaju granice: $OD_{550} < 0,3$ slaba; OD_{550} 0,3-1= srednja; $OD_{550} > 1$= snažna tvorba biofilma.

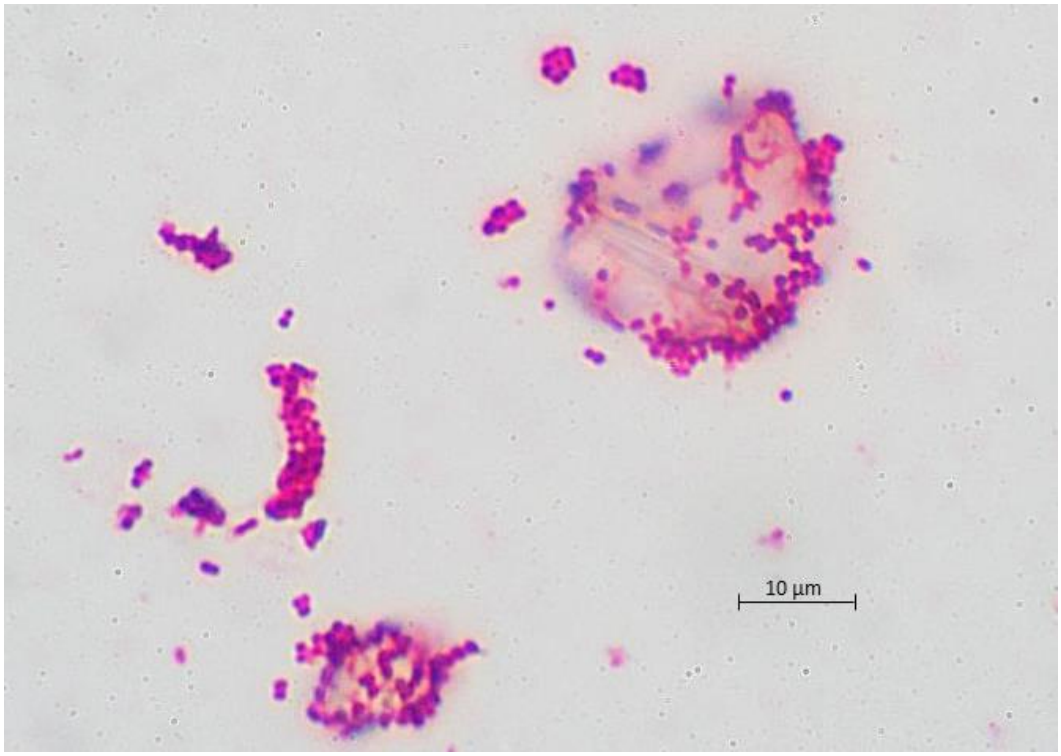


Slika 31. Svojstva klinički značajnih *A. baumannii* izolata a) tvorba biofilma na granici voda-zrak (pelikula) b) hidrofobnost (lijevo hidrofilan izolat, desno hidrofoban izolat koji migrira u netopivi sloj n-heksadekana na površini) c) hrapavost izolata nakon suspendiranja u destiliranoj vodi (lijevo izolat koji tvori glatke kolonije, desno izolat koji tvori hrapave kolonije) d) površinska pokretljivost rojenjem na polukrutom agaru e) površinska pokretljivost trzanjem na krutoj površini petrijeve zdjelice.

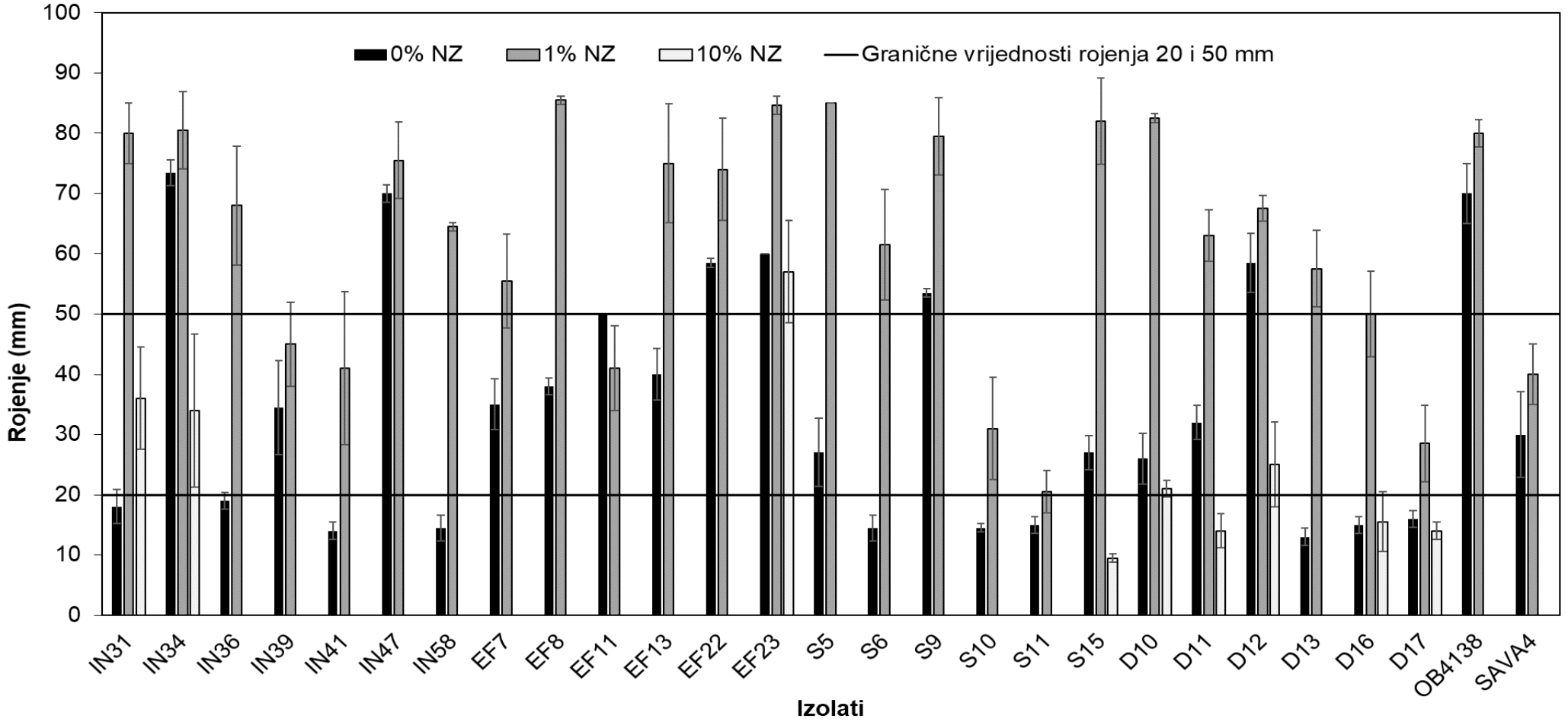
5.2.2 Površinska pokretljivost rojenjem i trzanjem

Rezultati mjerenja pokretljivosti izolata rojenjem i trzanjem prikazani su na Slikama 32 i 33. Svi izolati pokazuju površinsku pokretljivost. Visoku pokreljivost rojenjem (> 50 mm) pokazalo je 26 % izolata, dok je srednju (20 – 50 mm) i slabu pokretljivost (< 20 mm) pokazalo 37 % izolata. Dodatak 1 % NZ pospješilo je pokretljivost rojenjem za 47 ± 27 % ($p<0,001$), dok je 10 % NZ inhibiralo rojenje za 18 ± 51 %.

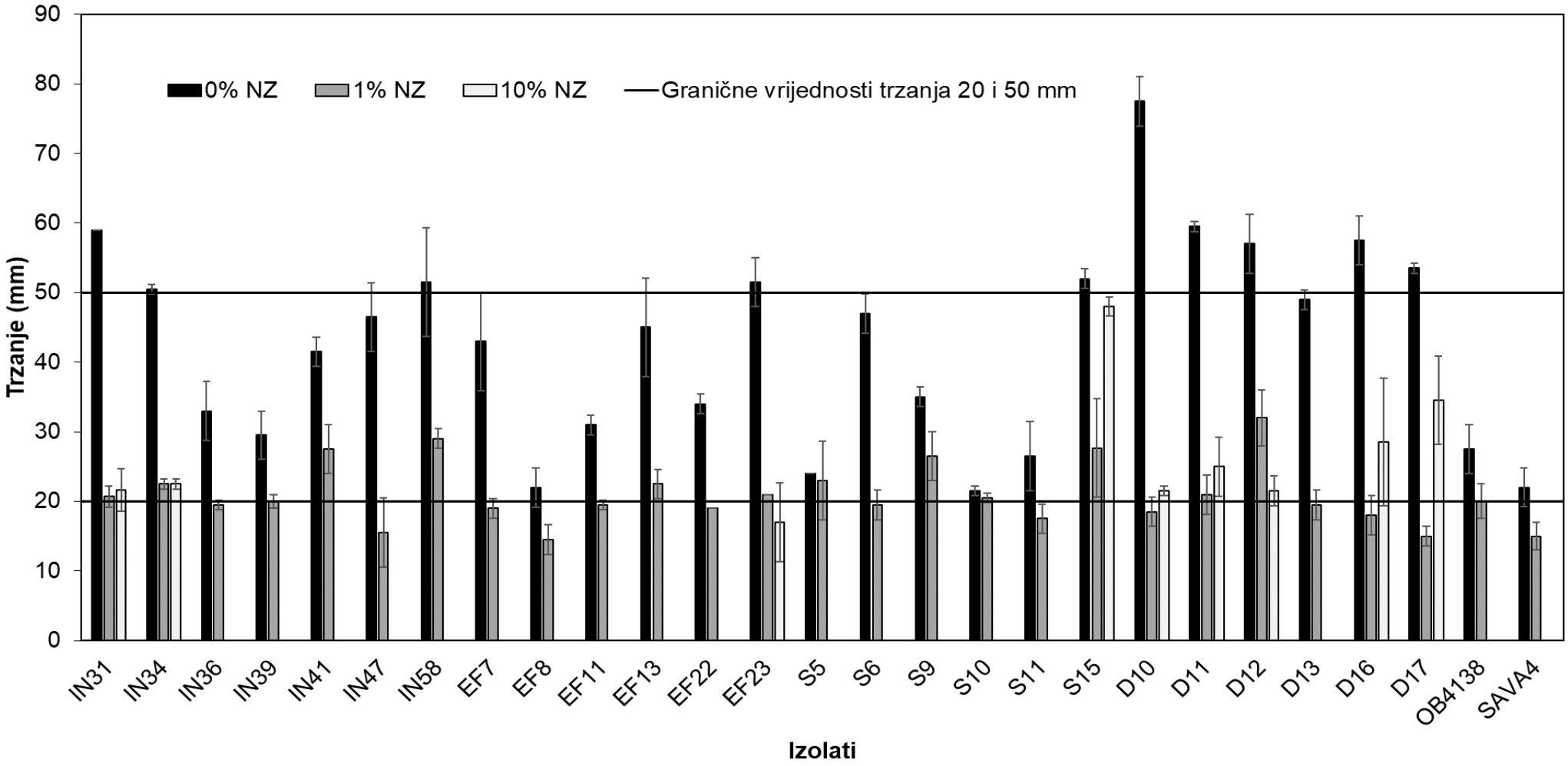
Visoku pokretljivost trzanjem pokazalo je 37 % izolata, srednju pokretljivost 63 %, dok niti jedan izolat nije pokazao slabu pokretljivost trzanjem. Dodatak 1 % NZ značajno je inhibirao pokretljivost trzanjem za 48 ± 19 % ($p<0,001$), dok je 10 % NZ dodatno inhibiralo trzanje za 52 ± 20 %. Između izolata osjetljivih i rezistentnih na antibiotike nije pokazana statistički značajna razlika u pokretljivosti trzanjem i rojenjem. Također, nije bilo statistički značajne korelacije između tvorbe biofilma, pelikule, hidrofobnosti s površinskom pokretljivosti. Nakon završetka eksperimenta, čestice NZ su pregledane pod svjetlosnim mikroskopom te je uočena imobilizacija bakterija na čestice NZ (Slika 34).



Slika 34. Imobilizirane stanice *A. baumannii* na čestice prirodnog zeolitnog tufa.



Slika 32. Površinska pokretljivost rojenjem *A. baumannii* izolata bez prirodnog zeolitnog tufa (0 % NZ) s 1 % i za odabrane izolate s 10 % NZ. Linije predstavljaju granične vrijednosti: < 20 mm slaba, 20-50 mm srednja, > 50 mm visoka pokretljivost rojenjem. Maksimalan promjer = 85 mm, minimalan promjer = 10 mm.



Slika 33. Površinska pokretljivost trzanjem *A. baumannii* izolata bez prirodnog zeolitnog tufa (0 % NZ) s 1 % i za odabrane izolate s 10 % NZ. Linije predstavljaju granične vrijednosti: < 20 mm slaba, 20-50 mm srednja, > 50 mm visoka pokretljivost rojenjem. Maksimalan promjer = 85 mm, minimalan promjer = 10 mm.

RASPRAVA

6 Rasprava

6.1 Utjecaj abiotičkih čimbenika na preživljavanje *A. baumannii*

6.1.1 Temperatura i pH

Prema literaturi *A. baumannii* raste na temperaturama od 15 do 44 °C (Garrity i sur., 2005.) s optimumom pri 37 °C (Antunes i sur., 2011.), što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Pri 35 °C metabolizam bakterija je brži, što znači brži rast. Međutim, optimalna temperatura za dugoročno preživljavanje je 4 i 22 °C. Nadalje, pri 22 °C bakterije su se umnažale, dok pri 4 °C umnažanja nije bilo. Rezultati upućuju na to da *A. baumannii* ima velike šanse za preživljavanje na sobnoj temperaturi i u hladnjacima, što je značajno za opstanak u bolničkoj sredini gdje se događaju povremene epidemije. Na skoro svim temperaturama *A. baumannii* bolje preživljava u DNB nego u SW, no s protokom vremena ta razlika nije toliko značajna, što pokazuje da za dugoročno preživljavanje nije bitan tip medija odnosno dostupnost nutrijenata. Prisutnost nutrijenata u DNB, osobito fosfora koji je limitirajući faktor u prirodnim vodama, omogućilo je umnažanje bakterija u povoljnim uvjetima (22 i 35 °C). Pri niskim temperaturama bakterije imaju usporen metabolizam, stoga nije bilo velikih odstupanja u krivulji rasta. S druge strane, pri 44 °C krivulja rasta bila je nepravilna s velikim odstupanjima. Nepravilna krivulja rasta rezultat je strategije preživljavanja u literaturi poznate pod nazivom „bust and boom“ u kojoj otporne stanice preživljavaju na račun slabijih pogotovo u uvjetima gladovanja (Bravo i sur., 2016.). Još jedna poznata strategija preživljavanja je ulazak bakterija u vijabilno ali nekulturabilno stanje (VBNC) kao npr. *P. aeruginosa* (Khan i sur., 2010.). Slijedeći ovu strategiju bakterije se ne mogu kultivirati na uobičajenim medijima za kultivaciju, no one zadržavaju svoju metaboličnu aktivnost i mogu se potencijalno ponašati kao patogeni. Bravo i sur. (2016.) nisu zabilježili ulazak *A. baumannii* u spomenuto nekulturabilno stanje.

Bakterija *A. baumannii* sposobna je preživjeti klasičnu metodu pasterizacije: 63 °C/30 min i 72 °C/15 s (Pearce i sur., 2001.), te nakratko izdržati 80 °C, što je neočekivano za mezofilnu nesporogenu bakteriju. SEM analiza potvrdila je osmotski nestabilne stanice pri temperaturama iznad i ispod optimuma, no to nije imalo učinka na dugoročno preživljavanje, osobito pri niskim temperaturama. Izolat senzitivan na sve antibiotike EF11 i MDR izolat IN39 slabije su preživljavali u SW za razliku od ostalih XDR i PDR izolata. Ovakvi rezultati upućuju na potencijalno bolje preživljavanje izolata sa širim spektrom rezistencije na antibiotike u vodi siromašnoj nutrijentima. Bazyleu i Kumar (2014.) otkrili su da *A.*

baumannii ATCC 19606T soj ima smanjenu rezistenciju na imipenem, ciprofloksacin, gentamicin i ceftriakson pri 30 °C kao rezultat smanjene ekspresije efluks pumpi. Rezistencija je bila veća pri 37 °C, no između 37 i 42 °C nije bilo razlike u osjetljivosti.

Prema Garrity i sur. (2005.) Bakterije roda *Acinetobacter* optimalno rastu pri pH 5,5 do 6,5, dok su ova istraživanja pokazala optimalan rast *A. baumannii* pri pH 6,9 u DNB. *A. baumannii* također može preživjeti pri pH iznad optimalnog (SW= 8,1). Zbog nedostatka nutrijenata, u SW nije bilo umnažanja bakterija. Nadalje, u prva dva dana izlaganja vrijednosti pH 5 i 10 nije bilo promjene u brojnosti *A. baumannii*, što upućuje na to da *A. baumannii* može preživjeti širok spektar vrijednosti pH. Dezinfekcija vode zagađene s *A. baumannii* najučinkovitija je u kiselim uvjetima što je dokazano najkraćim vremenom preživljavanja pri pH 2 (do 3 h). Slično istraživanje proveli su Obeidat i sur. (2014.) koji su zabilježili preživljavanje kliničkih izolata *A. baumannii* do 23 dana u destiliranoj, vodovodnoj vodi i fiziološkoj otopini pri temperaturi 18 – 24 °C i vrijednosti pH 4,5 – 8. Zabilježili su rast *A. baumannii* pri 37, 42 i 45 °C, dok na 4 i 48 °C nije bilo rasta, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja.

U nepovoljnim okolišnim uvjetima *A. baumannii* ima sposobnost formiranja dva tipa kolonija – uobičajene krupne mliječne kolonije i male prozirne kolonije, što je potvrđeno u literaturi (Tipton i sur., 2015.; Chin i sur., 2018.). Tamo je navedeno da su male prozirne kolonije vidljive samo uz posebno osvjetljenje pri određenom kutu (Tipton i sur., 2015.; Chin i sur., 2018.), dok su u ovom istraživanju kolonije vidljive pri normalnom dnevnom svjetlu bez posebnog osvjetljenja, stoga nije sigurno radi li se o istom tipu kolonijalnog dimorfizma. U spomenutim istraživanjima normalne mliječne kolonije pokazuju veću virulenciju u miševima i *Galleria mellonella* modelu, bolju površinsku pokretljivost, veću otpornost na dezinficijense, isušivanje te tvore deblju kapsulu. Male prozirne kolonije tvore snažniji biofilm, te eksprimiraju gene za iskorištavanje šireg spektra spojeva kao izvora energije. Smatra se da su stanice koje tvore mliječne kolonije odgovorne za infekcije domaćina, dok stanice koje tvore male prozirne imaju više šanse za preživljavanje u okolišnim uvjetima (Chin i sur., 2018.). Velike mliječne kolonije imaju sposobnost prelaska u male prozirne i obrnuto, što je jedna od strategija preživljavanja *A. baumannii* u različitim okolišima (Tipton i sur., 2015.; Chin i sur., 2018.). Osim *A. baumannii*, kolonijalni dimorfizam zabilježen je u *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* (Proctor i sur. 2006.).

6.1.2 Koncentracija otopljenog kisika

Prema literaturi *A. baumannii* je striktna aerobna bakterija s kisikom kao terminalnim akceptorom elektrona u procesu aerobnog staničnog disanja (Garrity i sur., 2005.). Stoga uspješno preživljavanje u aeriranim i intermedijarnim uvjetima nije iznenađujuće. Za stimulaciju rasta bakterija roda *Acinetobacter*, u literaturi se preporuča koristiti aeraciju (Garrity i sur., 2005.), no rezultati ovog istraživanja upućuju na to da *A. baumannii* jednako dobro raste sa i bez aeracije. Zabilježeno je bolje preživljavanje MDR, XDR i PDR izolata u odnosu na izolat osjetljiv na sve testirane antibiotike (EF11) u vodi siromašnoj nutrijentima pri svim koncentracijama otopljenog kisika, što upućuje na potencijalni javnozdravstveni rizik u oligotrofnim vodama.

Higgins i sur. (2018.) pratili su preživljavanje 17 *A. baumannii* izolata iz digestiranog mulja na hranjivom agaru u anaerobnim uvjetima. Dokazali su da *A. baumannii* ne raste, ali uspješno preživljava u anaerobnim uvjetima tijekom 30 dana izlaganja na 36 °C. Nakon ponovnog izlaganja zraku, izolati su normalno porasli na hranjivom agaru. Za razliku od Higgins i sur. (2018.), u ovom istraživanju zabilježen je inicijalni porast broja bakterija u anaerobnim uvjetima u DNB, što je vjerojatno rezultat zaostalog kisika prije nastupanja anaerobije. Krivulja rasta u anaerobnim uvjetima u DNB bila je vrlo nepravilna, te je osim toga zabilježena tvorba malih prozirnih kolonija zajedno uz uobičajene krupne mliječne kolonije nakon jednog dana izlaganja što predstavlja brzi odgovor na nepovoljne uvjete. Na optičkom mikroskopu, te SEM i TEM analizom nakon 14 dana uočena je prisutnost većih stanica sa zadebljalom vanjskom ovojnicom za koje se pretpostavlja da su dormantne stanice. Debela ovojnica dormantnih stanica vjerojatno smanjuje propusnost stanične stijenke te omogućuje održavanje minimalnog metabolizma unutar stanice. Dormancija u nesporogenih bakterija kao stanje u kojem stanice mogu u nepovoljnim životnim uvjetima preživjeti dugo vremena bez umnažanja, poznata je nekoliko desetljeća (Kaprelyants i sur., 1993.) Dormantne stanice zadržavaju nisku metaboličku aktivnost, te se mogu uzgojiti na agaru jedino nakon faze oporavka, odnosno prestanka nepovoljnih uvjeta (Kaprelyants i sur., 1993.). Faza oporavka u ovom istraživanju bila je izlaganje aerobnim uvjetima u postupku kultivacije što je omogućilo normalno formiranje kolonija na agaru. Tvorba dormantnih stanica nije povezana s malim prozirnim kolonijama, jer se ne pojavljuju u isto vrijeme niti su stanice malih kolonija morfološki iste kao dormantne stanice. Tvorba malih kolonija predstavlja brzi odgovor na nepovoljne uvjete, dok je za tvorbu dormantnih stanica ipak potrebno duže vrijeme izlaganja. U literaturi se dormantno stanje spominje kao pasivna obrana od nepovoljnih uvjeta i često se

veže uz stanje gladovanja (Pu i sur., 2017.). Aktivnom obranom smatra se tvorba perzistentnih stanica (engl. *Persister Cells*) stanica koje mogu preživjeti tretman antibioticima i nastaviti rasti nakon što se antibiotik ukloni (Pu i sur., 2017.). Perzistentne stanice aktivno izbacuju antibiotike pomoću efluks pumpi te predstavljaju novi način preživljavanja biocidnog djelovanja antibiotika. Barth i sur. (2013.) otkrili su prisutnost perzistentnih stanica kod *A. baumannii* nakon tretmana osjetljivih kliničkih izolata s visokim koncentracijama tobramicina i polimiksina B.

Nepravilna krivulja rasta u literaturi zabilježena je kao već spomenuta „bust and boom“ strategija (Bravo i sur., 2016.). Međutim, malo je vjerojatno da se *A. baumannii* umnaža u anaerobnim uvjetima te je nepravilna krivulja potencijalni rezultat formacije dormantnih stanica. Sudeći prema relativno velikoj brojnosti stanica u anaerobnom eksperimentu, *A. baumannii* ne ulazi u VBNC stanje, što je potvrđeno u literaturi (Bravo i sur., 2016.).

U literaturi postoje navodi o striktnim aerobima poput *A. baumannii*, koji uspješno preživljavaju anaerobne uvjete. Bakterija *P. aeruginosa* primjer je ubikvitarne bakterije otporne na širok spektar okolišnih čimbenika. Prema literaturi *P. aeruginosa* striktna je aerobna gram negativna bakterija koja vrši aerobno stanično disanje s kisikom kao terminalnim akceptorom elektrona (Garrity i sur., 2005). Međutim, postoje navodi da neki sojevi bakterije *P. aeruginosa* uspješno dugoročno preživljavaju i umnažaju se u anoksičnim uvjetima u kojima su sposobni vršiti anaerobno stanično disanje s nitratima, nitritima ili dušikovim oksidom kao konačnim akceptorom elektrona (Wu i sur., 2005.). Nadalje, otkriveno je da su neki sojevi bakterije *P. aeruginosa* također sposobni vršiti fermentaciju u anoksičnim uvjetima (Eschbach i sur., 2004.; Schreiber i sur, 2006.). Ovakvi podaci upućuju na to da je *P. aeruginosa* visoko prilagodljiva bakterija te da je sposobna živjeti u okolišima različite koncentracije otopljenog kisika, poput *A. baumannii*. No, mehanizam stvaranja energije u anaerobnim uvjetima kod *A. baumannii* još uvijek nije razjašnjen. Prema Garrity i sur. (2005) većina vrsta roda *Acinetobacter* ne može reducirati nitrate u nitrite u ciklusu dušika, ali postoje neke iznimke. Kod sojeva koji to mogu, nije zabilježeno umnažanje u anoksičnim uvjetima na način da koriste nitrat kao akceptor elektrona u anaerobnom staničnom disanju, kao što je to slučaj kod *P. aeruginosa*. Stoga jedan od mogućih načina dugoročnog preživljavanja je stvaranje fiziološki različitih stanica kao što su dormantne stanice.

6.1.3 Preživljavanje u riječnoj i morskoj vodi

Potvrđen je prijenos klinički značajnih izolata *A. baumannii* iz bolničke sredine u prirodni okoliš preko otpadne vode (Kovačić i sur., 2017.; Šeruga Musić i sur., 2017.). Klinički značajni izolati *A. baumannii* pronađeni su u rijeci Seni (Girlich i sur., 2010.), Savi (Šeruga Musić i sur., 2017.), Dunavu (Kittinger i sur., 2018.) i Krapini (Hrenović i sur., 2019.). Nadalje, u gradovima na obali, otpadne vode ispuštaju se direktno u more.

Nakon što se nađu u riječnom i morskom okolišu, bakterija *A. baumannii* sposobna je preživjeti preko 50 dana. Preživljavanje u prirodnom okolišu uvjetovano je brojnim abiotičkim ekološkim čimbenicima poput svjetlosti, temperature, vrijednost pH, koncentracije otopljenog kisika, nutrijenata i saliniteta. Svjetlost i temperatura utječu na gibanje vodenih masa, primarnu produkciju te time dostupnost nutrijenata, vrijednost pH i koncentraciju otopljenog kisika u vodi. Utok kanalizacijske vode bogate nutrijentima također mijenja sastav zajednica. *A. baumannii* vrlo je prilagodljiva bakterija, koja može podnijeti širok rang temperaturnih i pH vrijednosti te koncentracije otopljenog kisika, što je dokazano u eksperimentima provedenih u sklopu ove doktorske disertacije.

Koncentracija otopljene soli u morskoj vodi je oko 3,5 %, dok je u slatkoj vodi oko 0,05 % (Nester i sur., 2004). Bakterije koriste dvije strategije za izjednačavanje osmotskog tlaka i sprječavanja gubitka tekućine iz citoplazme (Rozen i Belkin, 2005.). Halofilne bakterije akumuliraju soli (KCl) što zahtijeva posebno prilagođen metabolizam. Druge bakterije akumuliraju male organske molekule iz okoliša ili ih sintetiziraju da bi izjednačile osmotski tlak. Spomenute male organske molekule ne ometaju normalne stanične funkcije, te osim osmoregulacije stabiliziraju proteine i membrane (Zeidler i Müller, 2019.). Većina tih molekula pripada skupini šećera (npr. trehaloza), alkoholnih šećera (npr. manitol), aminokiselina (npr. glutamat) i njihovih derivata te spojeva trimetil amonija (npr. glicin betain) (Zeidler i Müller, 2019.). Bakterija *A. baumannii* uslijed osmotskog stresa akumulira glutamat i manitol, te u manjoj mjeri trehalozu (Zeidler i sur. 2017.). Nadalje, *A. baumannii* pripada skupini halotolerantnih organizama (Zeidler i Müller, 2019.).

Morska voda smatra se oligotrofnom sredinom (Nester i sur., 2004), te je nedostatak nutrijenata uz osmotski šok jedan od važnih čimbenika preživljavanja u morskoj vodi. Hrenović i Ivanković (2009.) dokazali su uspješno umnažanje *E. coli* (do 5 % NaCl) i *A. junii* (do 3,5 % NaCl) u vodi bogatoj nutrijentima s visokim koncentracijama soli, dok se u vodi siromašnoj nutrijentima umnažanje događa pri vrlo niskim koncentracijama soli (*E. coli* 0,4 %

NaCl) ili u potpunosti izostaje (*A. junii*). Rezultati prethodnog istraživanja upućuju na to da u blizini kanalizacijskih ispusta u more postoji mogućnost boljeg preživljavanja patogena zbog prisutnosti nutrijenata. Štimac i sur., (2010.) istraživali su preživljavanje fekalne bakterije *K. pneumoniae* u sterilnoj morskoj, prirodnoj izvorskoj, destiliranoj vodi i vodi iz slavine. *K. pneumoniae* uspješno je preživjela izlaganje različitim tipovima voda kroz 6 mjeseci praćenja s oko 10^4 CFU/mL bakterija na kraju eksperimenta. Najbolje preživljavanje bilo je u destiliranoj vodi, dok je najslabije preživljavanje bilo u izvorskoj vodi. Umnažanja bakterija nije bilo u izvorskoj kao ni u morskoj vodi, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Iznenađujuće, prema Štimac i sur., (2010.), *K. pneumoniae* se nakon perioda prilagodbe umnažala u destiliranoj vodi i vodi iz slavine.

Hrenović i sur. (2016.) pratili su preživljavanje *A. baumannii* u sterilnoj izlaznoj vodi Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu. Dokazali su da se 6 izolata *A. baumannii* izdvojenih iz izlazne vode može uspješno umnažati i preživjeti u istoj vodi kroz 50 dana praćenja. Izlazna voda se nakon tretmana ispušta u prirodni recipijent (rijeka Sava), gdje *A. baumannii* može nastaviti živjeti te se uslijed veće koncentracije nutrijenata može čak i umnažati.

Zbog kompliciranе kultivacije *A. baumannii*, eksperimenti su rađeni u sterilnoj riječnoj i morskoj vodi, što je eliminiralo kompeticiju i predatorski pritisak drugih organizama. Sličan eksperiment preživljavanja u riječnoj vodi proveden je s bakterijom *E. coli* (Flint, 1987.). Korištena je realna netretirana i autoklavirana riječna voda, te riječna voda filtrirana kroz različite filtre za eliminaciju suspendiranih čestica, praživotinja i bakterija. Preživljavanje *E. coli* bilo je najduže u autoklaviranoj vodi (260 dana), u filtriranoj od 20 do 70 dana, dok je u netretiranoj vodi preživljavanje bilo do 15 dana. Preživljavanje je također bilo ovisno o temperaturi, te je brojnost bakterija bila veća pri 4 °C i 15 °C, nego 37 °C, što odgovara stvarnim uvjetima u okolišu (Flint, 1987.). S druge strane, preživljavanje bakterije *Salmonella* sp. u riječnoj vodi bilo je bolje u netretiranoj nego autoklaviranoj vodi, što autori objašnjavaju malom koncentracijom predatora u vodi, budući da je uzorak vode uzet u kasnu jesen (Santo Domingo i sur., 2002.). Sudeći prema prethodnim eksperimentima (Flint, 1987.; Santo Domingo i sur., 2002.) pretpostavlja se da je preživljavanje *A. baumannii* u realnoj, nesterilnoj vodi kraće, no to ne mora biti slučaj. Predacijski i kompeticijski pritisak nije tijekom cijele sezone isti, što bitno utječe na preživljavanje bakterija. Iz ovih eksperimenata dobiven je značajan podatak da *A. baumannii* može preživjeti izvjesno vrijeme u morskoj i

riječnoj vodi. Dugoročno preživljavanje ovog patogena može biti uzrok sporadičnih izvanbolničkih infekcija, što predstavlja javnozdravstveni rizik.

6.1.4 Preživljavanje u tlu

Bakterija *A. baumannii* u tlo može dospjeti infiltracijom otpadne vode ili procijedim vodama na mjestima ilegalno odbačenog ljudskog otpada (Hrenović i sur., 2014., 2017.). Bakterije se u tlu suočavaju s brojnim izazovima. Najvažniji ekološki čimbenici koji uvjetuju preživljavanje bakterija u tlu su vlažnost, dostupnost kisika, temperatura, pH, nutrijenti, poljoprivredna obrada tla, doba godine i dubina tla na kojoj se bakterije nalaze (Alexander, 1977.). Jedan od ograničavajućih ekoloških čimbenika u tlu za preživljavanje mikroorganizama je dostupnost vode. Gravitacija povlači vodu prema dolje (slobodna ili gravitacijska voda), koja se zadržava u porama tla. Sva voda u tlu nije biološki dostupna. Dio vode zadržava se u porama unatoč gravitaciji, što je rezultat privlačnih sila između čestica tla i vode. Da bi mogle koristiti tu vodu, mikroorganizmi moraju nadvladati spomenute privlačne sile. Vlažnost u tlu direktno je povezana s dostupnosti kisika. U slučaju obilnih oborina, pore u tlu inače ispunjene zrakom, pune se vodom ograničavajući izmjenu plinova. Aerobni organizmi respiracijom potroše sav kisik, što rezultira kratkoročnim povećanjem obligatnih aeroba, te se dalje nastavlja povećanjem fakultativnih i obligatnih anaerobnih bakterija u tlu (Alexander, 1977). U trenucima smanjene koncentracije kisika u tlu zbog prezasićenosti vodom, *A. baumannii* bi mogao uspješno preživjeti što je dokazano prethodnim eksperimentom u sklopu ove doktorske disertacije.

U ovom istraživanju najvažniji ekološki čimbenici koji uvjetuju preživljavanje *A. baumannii* u tlu su vlažnost i pH. Prisutnost nativnih heterotrofnih bakterija prilagođenih na različite uvjete u tlu ne utječe na preživljavanje *A. baumannii* u ovom eksperimentu.

Bakterija *A. baumannii* uspješno je preživjela 150 dana u sterilnom i svježem nesterilnom alkalnom crvenom paleotlu. Umnažanje u alkalnom tlu vjerojatno je rezultat prisutnosti organskog ugljika (0,215 %). *A. baumannii* normalno preživljava pri vlažnosti tla od 32 do 16 %. Prema modelu nelinearne polinomne regresije, optimalna vlažnost za preživljavanje *A. baumannii* u sterilnom i svježem nesterilnom tlu je oko 25 %. Pad vlažnosti od 16 do 5 % uzrokuje smanjenje brojnosti (redukcija 3,6 ± 0,5 log CFU/g). Ispod 5 % vlažnosti, brojnost *A. baumannii* održavala se oko 3,3 ± 0,2 log CFU/g do 150 dana. Male prozirne kolonije pojavile su se kao odgovor na smanjenu vlažnost u tlu. Preživljavanje *A. baumannii* u potpuno suhom tlu (<1 % vlažnosti) vjerojatno je posljedica tvorbe biofilma na

česticama tla. Razlika u preživljavanju *A. baumannii* u svježoj (8 dana) i sterilnoj (15 dana) Terra Rossi vjerojatno je posljedica razlike u vlažnosti tla na kraju monitoringa (6 u sterilnoj i 20 % u nesterilnoj Terra Rossi). Sa smanjenjem vlažnosti tla ispod 16 %, brojnost vijabilnih *A. baumannii* pada.

Prema literaturi, bakterija *A. baumannii* preživjela je na suhim staklenim površinama 36 dana pri relativnoj vlažnosti zraka od 31 % (Espinal i sur., 2012.), te na suhim celuloznim filterima 30 dana pri relativnoj vlažnosti zraka 21-27 % (Bravo i sur., 2016.). U ovom istraživanju, pri sličnom rasponu vlažnosti bakterija *A. baumannii* također je neometano preživljavala u alkalnom tlu, dok se u slabo kiseloj Terra Rossi i snažno kiselom zeleno-sivom paleotlu pri još uvijek visokim vrijednostima vlažnosti dogodio drastičan pad vijabilnih *A. baumannii*. Rezultati ukazuju na to da je vrijednost pH tla najvažniji okolišni faktor koji utječe na preživljavanje *A. baumannii* u tlima. Ti rezultati u skladu su s rezultatim eksperimenata provedenim u sklopu ove doktorske disertacije u kojem se pratilo preživljavanje *A. baumannii* u vodenom mediju različite vrijednosti pH. U vodenim medijima neutralnog do lagano alkalnog pH (6,9 - 8,1), bakterija *A. baumannii* preživjela je 5 mjeseci, dok je pri pH 2 preživjela do 3 sata. U alkalnom tlu (pH=8,43) preživljavanje je također bilo 5 mjeseci, dok je u kiselom tlu preživljavanje bilo do 1 sat.

Prošireno-rezistentni okolišni izolat EF8 i klinički izolat OB4138, kao i sveopće rezistentan izolat EF7, pokazali su slično preživljavanje u tlu. Rezultati upućuju na to da profil antibiotske rezistencije i porijeklo izolata nisi bitni za preživljavanje *A. baumannii* u tlu. *A. baumannii* ne pokazuje značajnu korelaciju s nativnim heterotrofnim bakterijama u svježem tlu što znači da nativne bakterije iz tla neće pridonijeti uklanjanju *A. baumannii* iz sustava. Nasuprot tome, zakiseljavanje tla čini se kao obećavajuća metoda za bioremedijaciju tla kontaminiranog s *A. baumannii*.

U vlažnom nativnom crvenom paleotlu pri istim uvjetima kultivacije (42 °C/24 h, CHROMAgar Acinetobacter, CR102 dodatak), prisutnost *A. baumannii* zabilježena je značajno kraće (26 dana) nego u suhom tlu (150 dana). Naime, nakon što se temperatura kultivacije smanjila na 36 °C, bakterije su zabilježene do 50 dana praćenja na istoj podlozi. Isti postupak kultivacije ponovljen je na podlozi CHROMAgar Acinetobacter s dodatkom 15 mg/L antibiotika cefsulodina umjesto CR102 dodatka, te je zabilježena ista pojava gubitka sposobnosti rasta na podlozi s antibiotikom. Ova pojava mogla bi se okarakterizirati kao gubitak termotolerancije u prisutnosti karbapenema, ali i drugih antibiotika. Visoka koncentracija željeza u crvenom paleotlu (Fe_2O_3 6,16 wt %) vjerojatno je rezultirala dodatnim

stresom na bakterije. Određeni MIK Fe u izvorskoj vodi je 500 mg/L što je puno niže od koncentracije Fe u tlu (43084 mg Fe/kg tla). Uz prisutnost vode, željezo potencijalno može uzrokovati oksidativni stres putem Fentonove reakcije u kojoj Fe reagira s vodikovim peroksidom te se stvaraju velike količine reaktivnog hidroksilnog iona, koji oštećuju stanice (Touati, 2000.). Međutim, radi se o privremenom gubitku termotolerancije i rezistencije na antibiotike jer su bakterije kultivirane na 36 °C nakon precjepljivanja, odnosno faze oporavka, ponovno rasle na podlozi s antibiotikom pri 42 °C. Sličnu pojavu gubitka i ponovnog povratka antibiotske rezistencije zabilježili su Griffiths i sur. (1990.) u bakterije *E. coli* nakon izlaganja uvjetima gladovanja. Da bi se otkrio točan mehanizam posrijedi ove pojave privremenog izostanka rasta na višoj temperaturi i rezistencije na antibiotike potrebno je provesti daljnja istraživanja.

6.2 Utjecaj biotičkih čimbenika na preživljavanje *A. baumannii*

Klinički značajni izolati *A. baumannii* pronađeni su u različitim vodenim okolišima poput otpadnih voda i rijeka gdje uspješno preživljavaju različite abiotičke uvjete. Međutim, utjecaj biotičkih uvjeta na preživljavanja *A. baumannii* u okolišu slabo je istražen. U otpadnim vodama *A. baumannii* dolazi u kontakt s uobičajenim fekalnim bakterijama poput *E. coli* i *E. faecium*, čija prisutnost, prema rezultatima ovog istraživanja, ne ometa preživljavanje *A. baumannii*, što potencijalno predstavlja javnozdravstveni problem. *A. baumannii* i *E. coli* imali su slično ponašanje u eksperimentu u oba testirana medija (SW i DNB), dok se *E. faecium* u DNB drugačije ponašao vjerojatno zbog sporijeg umnažanja u odnosu na *A. baumannii*. Crijevni enterokoki uspješno preživljavaju u slatkovodnim i morskim ekosustavima, no njihovo umnažanje u tim okolišima nije zabilježeno (Gilmore i sur., 2014.). U ovom istraživanju zabilježeno je umnažanje *E. faecium* u vodi bogatoj nutrijentima sa i bez prisutnosti *A. baumannii*. Nije bilo razlike u preživljavanju sveopće-rezistentnog (EF7), proširenо-rezistentnog (OB4138) i osjetljivog (EF11) izolata *A. baumannii*. Svi izolati su pokazali slično ponašanje sugerirajući na to da profil antibiotske osjetljivosti bez prisutnosti antibiotika nije značajan u kompetitivnim interakcijama s drugim bakterijama, te da se klinički izolati *A. baumannii* ponašaju isto kao i okolišni.

U literaturi postoji vrlo malo podataka o interakciji *A. baumannii* s drugim mikroorganizmima. Lastoria i sur. (2014.) analizirali su bakterije uzročnike bolničkih krvožilnih infekcija u Brazilu između 2005. i 2010. godine. Učestalost infekcija uzrokovanih s *A. baumannii* bila je negativno korelirana s učestalosti infekcija uzrokovanih s bakterijom *S. aureus* i *Enterobacter* spp. Autori su zaključili da su interakcije među patogenima važan

čimbenik koji utječe na epidemije u bolnicama, te da mjere za kontrolu infekcija trebaju uzeti te interakcije u obzir. Prema nedavnim istraživanjima (Carruthers i sur., 2013.; Repizo i sur., 2015.) neki sojevi *A. baumannii* koristeći sekrecijski sustav tipa VI mogu nadvladati *E. coli*. Međutim, u ovom istraživanju nijedan izolat *A. baumannii* nije potisnuo *E. coli*.

U slatkovodnim ekosustavima kolnjaci kao ubikvitarni bakterivorni organizmi utječu na brojnost bakterija (Fiałkowska i Pajdak-Stós 2004.; Kocerba-Soroka i sur., 2013.). U vodi siromašnoj nutijentima kolnjaci su u potpunosti uklonili *A. baumannii* i *E. coli*, dok su bakterije u vodi bogatoj nutijentima opstale 50 dana. U vodi siromašnoj nutrijentima, odsutnost organske tvari sprječava umnažanje bakterija te u kombinaciji s grazingom kolnjaka utječe na potpuno nestajanje bakterija iz mikrokozmosa. U vodi bogatoj nutrijentima, bakterije su se umnažale unatoč grazingu kolnjaka, što je rezultiralo generalno nižim stopama uklanjanja. Prema rezultatima ovog istraživanja, kolnjaci nemaju značajnu preferenciju prema pokretnim (*E. coli*) ili nepokretnim (*A. baumannii*, *E. faecium*), kao ni gram pozitivnim (*E. faecium*) niti gram negativnim bakterijama (*A. baumannii*, *E. coli*). Sporije umnažanje bakterija kao što je *E. faecium* rezultira većim stopama uklanjanja. Rezultati upućuju na to da tip vodenog medija zajedno s grazingom kolnjaka utječe na brojnost vijabilnih bakterija u vodi. Kolnjaci su uspjeli ukloniti 5,5 ± 1,3 log CFU/mL *A. baumannii* u vodi siromašnoj nutrijentima te 3,5 ± 1,7 u vodi bogatoj nutrijentima. Grazing kolnjaka mogao bi pružiti novu perspektivu u uklanjanju patogenih bakterija iz nutrijentima siromašne vode kao što je pitka voda, te nutrijentima bogate otpadne vode.

Cateau i sur. (2011.) zabilježili su interakciju *A. baumannii* sa slobodno živućim bakterivornim amebama, koje obitavaju u vodovodnoj vodi i bazenima. *A. baumannii* se uspješno umnažao i preživljavao unutarstanično u amebama *Acanthamoeba castellanii* i *A. culbertsoni*. Slobodno živuće amebe štite unutarstanične bakterije od nepovoljnih okolišnih uvjeta pospješujući njihovo preživljavanje i širenje (Cateau i sur., 2014.). U ovom istraživanju nije zabilježeno preživljavanje *A. baumannii* unutar kolnjaka *A. vaga*. Naime, cijeli sadržaj epruvete iz mikrokozmosa 1 nakon 50 dana kontakta je vorteksiran, filtriran i inokuliran na selektivni medij. Kolonije *A. baumannii* nisu zabilježene, premda su kolnjaci bili prisutni u mikrokozmosu. Kolnjak *A. vaga* je obećavajući agens za uklanjanje *A. baumannii* iz raznih vodenih okoliša.

6.3 Kolonizacijski potencijal *A. baumannii*

U prijašnjim istraživanjima, potencijal *A. baumannii* da inficira ribe istraživan je na način da se bakterijska suspenzija direktno injektira u ribu (Xia i sur., 2008.; Rauta i sur., 2011; Behera i sur., 2017.). Međutim, ovakva istraživanja nisu primjenjiva u okolišnim uvjetima. U ovom eksperimentu okolišni uvjeti su simulirani u laboratoriju u zatvorenom sustavu. Kolonizacija ribe prethodi infekciji, te predstavlja potencijalan način širenja patogena s riba na ljude. Uzrok sporadičnih izvanbolničkih infekcija ljudi (Dexter i sur., 2015.) s *A. baumannii* nije definiran do danas. Ljudi mogu doći u kontakt s inficiranim ili koloniziranim ribama prilikom čišćenja akvarija ili konzumacije, što može biti potencijalan izvor infekcija.

Bakterija *A. baumannii* se ne umnaža u izvorskoj vodi, zbog nedostatka nutrijenata. Međutim, u eksperimentima u sklopu ove doktorske disertacije, dokazano je uspješno preživljavanje *A. baumannii* u izvorskoj vodi tijekom 150 dana praćenja. U ispitivanom zatvorenom sustavu s izvorskom vodom, *A. baumannii* se umnažao tijekom prvog dana praćenja. S vremenom, ribe metaboliziraju hranu i izlučuju metaboličke produkte, koji su izvor nutrijenata za *A. baumannii* i druge heterotrofne bakterije, čiji se broj povećao. Povećanje broja *A. baumannii* tijekom jednog dana može se objasniti odsutnošću kompeticije s drugim bakterijama, koje su bile prisutne u vrlo malom broju u izvorskoj vodi na početku eksperimenta te unosom nutrijenata u sustav zbog ribljih izlučevina. Heterotrofne bakterije su s vremenom prerasle *A. baumannii*. Nakon 24 h izlaganja, *A. baumannii* je uspio kolonizirati ribu *P. reticulata*. Međutim, nakon 12 dana kontakta, intenzitet kolonizacije se smanjio zbog umažanja heterotrofnih bakterija. Kolonizacijski potencijal ovisan je o koncentraciji bakterija u vodi. Što je veća koncentracija *A. baumannii* u vodi, veći je i kolonizacijski potencijal. Tijekom eksperimenta, ribe nisu uginule, niti su primijećeni znakovi infekcije (lezije na koži, promjene na škrgama).

U ranijim istraživanjima izdvojen je jedan okolišni izolat *A. baumannii* iz rijeke Sene nizvodno od Pariza (Girlich i sur., 2010.) i 4 izolata iz rijeke Save nizvodno od Zagreba (Šeruga Musić i sur., 2017.). Koncentracija *A. baumannii* u riječnoj vodi bila je manja od 10 CFU/mL, što odgovara koncentraciji *A. baumannii* iz sustava 1 ovog eksperimenta. Pri spomenutoj najmanjoj testiranoj koncentraciji, nije bilo kolonizacije *P. reticulata* s *A. baumannii*, što upućuje na niski kolonizacijski potencijal. Ribe su kolonizirane nakon jednog dana kontakta s koncentracijom *A. baumannii* u vodi iznad 3,1 log CFU/mL (10^3 CFU/mL), što je ekstremno velika koncentracija za prirodni okoliš. Infektivna doza *A. baumannii* je 10^8 CFU/mL, kada se injektira intraperiotnealno u slatkovodne ribe (Behera i sur., 2017.). Visoke

doze bakterija potrebne za kolonizaciju i infekciju riba upućuju na to da ribe imaju učinkovitu antimikrobnu obranu. Integument i lučenje sluzi su u većini slučajeva dovoljni za zaštitu riba od bakterija prisutnih u vodi. Krvna plazma i gastrointestinalni trakt dodatno sadrže brojne antimikrobne faktore (Ellis, 2001.). Međutim, ako je integument oštećen, bakterije mogu ući u organizam. S obzirom da je *A. baumannii* oportunistički patogen, ribe imaju veću šansu da budu inficirane ako su ozlijeđene ili ako im je kompromitiran imunološki sustav uslijed brojnih stresnih faktora poput naglih promjena temperature i saliniteta, prisutnosti parazita, zagađenja ili prenatrpanosti u spremnicima (Bly i sur., 1997.).

Visoka koncentracija *A. baumannii* u okolišu može se očekivati u zatvorenim vodenim tijelima pod utjecajem ljudskog otpada i kanalizacijske vode. U tim slučajevima postoji veća šansa za kolonizaciju i infekciju riba. Da bi se spriječilo širenje *A. baumannii* na ribljim farmama, one moraju biti na sigurnoj udaljenosti od utoka kanalizacijske vode. Nadalje, veću pažnju treba posvetiti pravilnom rukovanju ribom i čišćenju ribolovnog alata kako bi se spriječilo širenje, ne samo *A. baumannii*, nego i drugih patogena.

6.4 Faktori virulencije

Svi testirani izolati *A. baumannii* pokazali su ekspresiju faktora virulencije što doprinosi patogenezi i preživljavanju u bolničkom i izvanbolničkom okolišu. Sposobnost tvorbe biofilma i pelikule te površinska pokretljivost rojenjem i trzanjem okolišnih izolata *A. baumannii* usporediva je s kliničkim izolatima iz literature (Antunes i sur., 2011.; Eijkelkamp i sur., 2011a.; Espinal i sur., 2012.; Martí i sur., 2011.; Nait Chabane i sur., 2014.).

Hidrofobne bakterije tvore snažniji biofilm i pelikulu kao zaštitu od vodenog medija na što ukazuje pozitivna korelacija hidrofobnosti s tvorbom biofilma i pelikule (Kempf i sur., 2012b.; Nait Chabane i sur., 2014.). Tvorba biofilma na polipropilenu i pelikule dva su međusobno povezana svojstva. Izolati osjetljivi na testirane antibiotike stvarali su snažniji biofilm i pelikulu u odnosu na rezistentne izolate, što je u suglasnosti s podacima iz literature za kliničke izolate *A. baumannii* (Kaliterna i sur., 2015.; Perez, 2015.; Qi i sur., 2016.). Biofilm štiti osjetljive izolate od štetnog učinka antibiotika, dok rezistentni izolati posjeduju druge mehanizme za zaštitu od antibiotika i nemaju potrebu stvarati snažan biofilm. Nadalje, samo dva izolata *A. baumannii* pokazuju izrazitu hrapavost kolonija (EF11 i IN58). Oba izolata su senzitivna na sve testirane antibiotike te tvore snažan biofilm. Hrapavost kolonija potencijalno je svojstvo senzitivnih izolata sa snažnom tvorbom biofilma na polipropilenu, no potrebno je analizirati veći broj uzoraka da bi se ova pretpostavka potvrdila.

Većina ispitanih izolata pokazala je dobru sposobnost površinske pokretljivosti rojenjem i trzanjem. Rojenje i trzanje su dva neovisna fenotipska svojstva koja se međusobno isključuju (Eijkelkamp i sur., 2011.a). U literaturi je površinska pokretljivost trzanjem povezana s kliničkim izolatima *A. baumannii* koji tvore snažan biofilm (Eijkelkamp i sur., 2011a.). Međutim, u ovom istraživanju nije bilo značajne korelacije između tvorbe biofilma i pokretljivosti trzanjem. Sposobnost izolata da tvori biofilm ovisna je i o njegovu porijeklu. Izolati *A. baumannii* iz sputuma tvore snažniji biofilm, dok su izolati iz krvi pokretniji (Vijayakumar i sur., 2016.). Kaliterna i sur. (2015.) dokazali su snažniju tvorbu biofilma u izolata izdvojenih iz respiratornog sustava i rana nego izolata iz krvi i urina. Površinska pokretljivost ne korelira s nijednim drugim ispitivanim parametrom, te se kod okolišnih izolata *A. baumannii* smatra da je ovisna o soju.

Dodatak 1 % NZ u hranjivi medij značajno je smanjio tvorbu biofilma i pokretljivost trzanjem. Dodatak 10 % NZ dodatno je inhibirao spomenute faktore virulencije. Utjecaj NZ najočitiji je u eksperimentima s tvorbom biofilma i pokretljivosti trzanjem jer su bakterije u direktnom kontaktu s česticama NZ na koje su se imobilizirale. U eksperimentima s tvorbom pelikule i pokretljivosti rojenjem, čestice NZ su se istaložile na dno epruvete ili petrijeve zdjelice, te nisu bile u direktnom kontaktu s bakterijama, što objašnjava zanemarujući utjecaj NZ na redukciju tvorbe pelikule i pokretljivosti rojenjem. Udio klinoptilolita u NZ bio je relativno nizak (50-55%). No, udio klinoptilolita u NZ nije glavni faktor koji utječe na imobilizaciju bakterija (Hrenović i sur., 2009.). Druga vrsta roda *Acinetobacter*, *A. junii*, uspješno se imobilizirala na isti NZ veličine čestica 0,122 – 0,263 mm u velikom broju (1,27 $\times 10^{10}$ CFU/g (Hrenović i sur., 2011.). Imobilizacija na manje čestice (<0,122 mm) vjerojatno je veća jer se broj imobiliziranih bakterija povećava sa smanjenjem veličine čestica (Hrenović i sur., 2005.). Imobilizacija *A. baumannii* u eksperimentima s tvorbom biofilma i pokretljivosti trzanjem na čestice NZ potvrđena je mikroskopski, no nije kvantificirana. Stanice *A. baumannii* će se radije pričvrstiti na nepravilnu i grubu površinu čestice NZ, nego li na glatku površinu epruvete i petrijeve zdjelice koje su građene od polipropilena i polistirena. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je NZ obećavajući materijal za inhibiciju faktora virulencije klinički značajne bakterije *A. baumannii*. Potencijalna primjena NZ mogla bi biti u proizvodima za čišćenje u kojima bi se stanice *A. baumannii* imobilizirale na čestice NZ i na taj način lako uklonile iz kontaminiranog okoliša.

ZAKLJUČAK

7 Zaključak

1. Bakterija *A. baumannii* ima sposobnost preživljavanja pri različitim temperaturama i vrijednostima pH u vodenom mediju. Optimalni uvjeti za dugoročno preživljavanje *A. baumannii* su temperature između 4 i 22 °C te neutralan pH što je preduvjet za opstanak u okolišu. Dugoročno preživljavanje (150 dana) pri sobnoj temperaturi i rashladnim jedinicama značajno je u bolnicama gdje se događaju povremene epidemije ove bakterije.
2. Bakterija *A. baumannii* preferira vodeni medij bogat nutrijentima u kojem se umnaža. Međutim, dostupnost nutrijenata u vodi ne utječe značajno na dugoročno preživljavanje.
3. Bakterija *A. baumannii* uspješno je preživjela izlaganje različitim koncentracijama otopljenog kisika kroz 50 dana praćenja (aerirani, intermedijarni, anaerobni uvjeti). U anaerobnim uvjetima zabilježene su dormantne stanice kao potencijalni odgovor *A. baumannii* na nepovoljne uvjete.
4. U uvjetima ekstremnih temperatura, vrijednosti pH, nedostatka kisika i isušivanja, *A. baumannii* stvara male prozirne kolonije uz uobičajene krupne mliječne kolonije kao potencijalni mehanizam preživljavanja nepovoljnih okolišnih uvjeta.
5. Multiplo-rezistentni, prošireno-rezistentni i sveopće-rezistentni izolati *A. baumannii* bolje preživljavaju u uvjetima gladovanja od izolata osjetljivih na sve testirane antibiotike.
6. Rijeke i more u koje se ispušta otpadna voda mogu biti potencijalan rezervoar klinički značajnih *A. baumannii*, na što upućuje uspješno preživljavanje *A. baumannii* u autoklaviranoj riječnoj i morskoj vodi.
7. Preživljavanje *A. baumannii* u tlu ovisno je o vrijednosti pH i vlažnosti tla. U pH neutralnim i blago alkalnim tlima, pad vlažnosti tla ispod 16 % uzrokuje smanjenje brojnosti *A. baumannii* za 4 log CFU. Međutim, u sušnim uvjetima kada je vlažnost tla ispod 1 %, brojnost *A. baumannii* će i dalje biti visoka (3 log CFU/g). U kiselim tlima najkraće je preživljavanje *A. baumannii* (do 1h), dok je u suhom alkalnom tlu znatno duže (150 dana). Nativne heterotrofne bakterije ne utječu na preživljavanje *A. baumannii* u tlu.

8. U vlažnom nesterilnom crvenom paleotlu *A. baumannii* privremeno gubi sposobnost termotolerancije uz simultani gubitak rezistencije na antibiotike. Potencijalni uzrok ove pojave je oksidativni stres uzrokovan visokom koncentracijom željeza u tlu.
9. Uobičajene fekalne bakterije *E. coli* i *E. faecium* ne utječu značajno na preživljavanje *A. baumannii* u vodenom mediju. Profil antibiotske rezistencije i porijeklo izolata *A. baumannii* također ne utječe na biotičke interakcije s drugim mikroorganizmima.
10. Kolnjaci su uspješno uklonili 5,5 ± 1,3 log CFU/mL *A. baumannii* iz vode siromašne nutrijentima te 3,5 ± 1,7 log CFU/mL iz vode bogate nutrijentima. U postrojenjima za obradu otpadnih voda i pitke vode, predacijom kolnjaka moguće je uklanjanje patogena poput *A. baumannii* iz vode.
11. Kolonizacija riba s *A. baumannii* ovisna je o koncentraciji *A. baumannii* u vodi. Niska koncentracija (< 10 CFU/mL) *A. baumannii* u prirodnim vodama zajedno s ribljim imunitetom rezultira niskim potencijalom *A. baumannii* da kolonizira ribe. Rezultati upućuju na to da su slatkovodne ribe u prirodnom okolišu vjerojatno slabi vektori za širenje bolničkih patogena. S druge strane, u zatvorenim sustavima gdje postoji konstantan dotok kontaminirane vode, ako koncentracija *A. baumannii* dostiže visoke vrijednosti (iznad 3 log CFU/mL), može doći do kolonizacije riba i javnozdravstvene opasnosti.
12. Okolišni izolati *A. baumannii* posjeduju iste faktore virulencije kao klinički izolati, što potvrđuje pretpostavku da su okolišni izolati ustvari kliničkog porijektla. Izolati osjetljivi na antibiotike tvore snažniji biofilm i pelikulu od MDR izolata. Hidrofobnost je važno svojstvo stanice koje određuje tvorbu biofilma i pelikule, dok je površinska pokretljivost stanica ovisna o soju bakterije.
13. Dodatak 1 % NZ u hranjivi medij uspješno je inhibirao tvorbu biofilma i površinsku pokretljivost trzanjem zbog imobilizacije bakterijskih stanica na čestice NZ. NZ je obećavajući materijal za kontrolu *A. baumannii*.
14. Uspješno preživljavanje *A. baumannii* u okolišu može se također smatrati faktorom virulencije.

POPIS LITERATURE

8 Popis literature

Alexander M (1977). Introduction to Soil Microbiology - Second Edition. John Wiley & Sons, New York, USA, p. 480.

Antunes L.C.S., Imperi F., Carattoli A., Visca P. (2011). Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS One* **6**: e22674.

Antunes L.C.S., Visca P., Towner K.J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog. Dis.* **71**: 292–301.

APHA, AWWA & WEF (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st edn. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

Armbruster T. (2001). Clinoptilolite-heulandite: applications and basic research. Zeolites and Mesoporous Materials at the Dawn of 21st Century, Proceedings of the 13th International Zeolite Conference, Montpellier, France, Studies in Surface Science and Catalysis, **135**, A. Galerneau, F. Di Renzo, F. Fajula and J. Vendrine eds., Elsevier Science B.V., Amsterdam, 13-27.

Asif M., Alvi I.A., Rehman S.U. (2018). Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infect. Drug Resist.* **11**: 1249–1260.

Barth V.C., Rodrigues B.Á., Bonatto G.D., Gallo S.W., Pagnussatti V.E., Ferreira C.A., de Oliveira S.D. (2013). Heterogeneous persister cells formation in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* **8**: e84361.

Bazyleu A., Kumar A. (2014). Incubation temperature, osmolarity, and salicylate affect the expression of resistance-nodulation-division efflux pumps and outer membrane porins in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 T. *FEMS Microbiol. Lett.* **357**: 136-143.

Behera B.K., Paria P., Das A., Bhowmick S., Sahoo A.K., Das B.K. (2017). Molecular characterization and pathogenicity of a virulent *Acinetobacter baumannii* associated with mortality of farmed Indian Major Carp Labeo rohita (Hamilton 1822). *Aquaculture* **471**: 157–162.

Bly J.E., Quiniou S.M., Clem L.W. (1997). Environmental effects on fish immune mechanisms. *Dev. Biol. Stand.* **90**: 33–43.

Bravo Z., Orruño M., Parada C., Kaberdin V.R., Barcina I., Arana I. (2016). The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state. *Arch. Microbiol.* **198**: 399–407.

Camp C., Tatum O.L. (2010). A Review of *Acinetobacter baumannii* as a Highly Successful Pathogen in Times of War. *Lab. Med.* **41**: 649–657.

CAMS (2017). Antibiotic Resistance in Croatia, 2016. The Croatian Academy of Medical Sciences, Zagreb.

Carruthers M.D., Nicholson P.A., Tracy E.N., Munson R.S. (2013). *Acinetobacter baumannii* Utilizes a Type VI Secretion System for Bacterial Competition. *PLoS One* **8**: e59388.

Cateau E., Verdon J., Fernandez B., Hechard Y., Rodier M.H. (2011). Acanthamoeba sp. promotes the survival and growth of *Acinetobacter baumanii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **319**: 19–25.

Cateau E., Delafont V., Hechard Y., Rodier M.H. (2014). Free-living amoebae: What part do they play in healthcare-associated infections? *J. Hosp. Infect.* **87**: 131–140.

Chapartegui-González I., Lázaro-Díez M., Bravo Z., Navas J., Icardo J.M., Ramos-Vivas J. (2018). *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. *PLoS One* **13**: e0201961.

Chin C.Y., Tipton K.A., Farokhyfar M., Burd E.M., Weiss D..S, Rather P.N. (2018). A high-frequency phenotypic switch links bacterial virulence and environmental survival in *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Microbiol.* **3**: 563–569.

Choi A.H., Slamti L., Avci F.Y., Pier G.B., Maira-Litran T. (2009). The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N- acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J. Bacteriol.* **191**: 5953–5963.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Coombs D.S., Alberti A., Armbruster T., Artioli G., Colella C., Galli E., Grice J.D., Liebau F., Mandarino J.A., Minato H., Nickel E.H., Passaglia E., Peacor D.R., Quartieri S., Rinaldi R., Ross M., Sheppard R.A., Tillmanns E., Vezzalini G. (1997). Recommended

nomenclature for zeolite minerals: report of the subcomittee on new minerals and mineral names. *Can. Mineral.* **35**: 1571–1606.

de Breij A., Gaddy J., van der Meer J., Koning R., Koster A., van den Broek P., Actis L., Nibbering P., Dijkshoorn L. (2009). CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. *Res. Microbiol.* **160**: 213–218.

de Breij A., Dijkshoorn L., Lagendijk E., Van Der Meer J., Koster A., Bloemberg G., Wolterbeek R., van den Broek P., Nibbering P. (2010). Do Biofilm Formation and Interactions with Human Cells Explain the Clinical Success of *Acinetobacter baumannii*? *PLoS One* **5**: e10732.

Dexter C., Murray G.L., Paulsen I.T., Peleg A.Y. (2015). Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **13**: 567–573.

Donlan M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 881–890.

Doughari H.J., Ndakidemi P.A., Susan Human I., Benade S. (2011). Minireview The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes Env.* **26**: 101–112.

Eijkelkamp B.A., Stroeher U.H., Hassan K.A., Papadimitrious M.S., Paulsen I.T., Brown M.H. (2011a). Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* **323**: 106.

Eijkelkamp B.A., Hassan. K.A., Paulsen I.T., Brown M.H. (2011b). Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics* **12**: 126–140.

Ellis A.E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 827–39.

Eschbach M., Schreiber K., Trunk K., Buer J., Jahn D., Schobert M. (2004). Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J. Bacteriol.* **186**: 4596–4604.

Espinal P., Martí S., Vila J. (2012). Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. Hosp. Infect.* **80**: 56–60.

EUCAST intrinsic resistance and exceptional phenotypes, Expert Rules version 3.1 26 September (2016). (http://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/ 12.02.2019.)

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2018). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0.

Eveillard M., Kempf M., Belmonte O., Pailhoriès H., Joly-Guillou M.L. (2013). Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *Int. J. Infect. Dis.* **17**: 802–805.

Ewers C., Klotz P., Leidner U., Stamm I., Prenger-Berninghoff E., Göttig S., Semmler T., Scheufen S. (2017). OXA-23 and ISAba1–OXA-66 class D β-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates from companion animals. *Int. J. Antimicrob. Agents* **49**: 37–44.

Falagas M.E., Karveli E.A., Kelesidis I., Kelesidis T. (2007). Community-acquired *Acinetobacter* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**: 857–868.

Faulde M., Spiesberger M. (2013). Role of the moth fly *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae) as a mechanical vector of bacterial pathogens in German hospitals. *J. Hosp. Infect.* **83**: 51–60.

Ferreira A.E., Marchetti D.P., de Oliveira L.M., Gusatti C.S., Fuentefria D.B., Corção G. (2011). Presence of OXA-23-Producing Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Wastewater from Hospitals in Southern Brazil. *Microb. Drug. Resist.* **17**: 221–227.

Fialkowska E., Pajdak-Stos A. (2008). The role of Lecane rotifers in activated sludge bulking control. *Water Res.* **42**: 2483-2490.

Flint K.P. (1987). The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *J. Appl. Bacteriol.* **63**: 261–270.

Gaddy J.A., Tomaras A.P., Actis L.A. (2009). The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **77**: 3150–3160.

Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria, Springer, New York.

Gevorkyan R., Guyumyan O., Djrbashyan R., Mnackanyan A., Michitaryan R., Petrosov I., Sadoyan A., Sargsyan H. (2001). Deposits of Armenian zeolites, 13th International Zeolite Conference, Recent research reports, Montpellier, France, 01-R-03.

Giles S.K., Stroeher U.H., Eijkelkamp B.A., Brown M.H. (2015). Identification of genes essential for pellicle formation in *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* **15**: 1–14.

Gilmore M.S., Clewell D.B., Ike Y., Shankar N. (2014). Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.

Girlich D., Poirel L., Nordmann P. (2010). First isolation of the blaOXA-23 carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother*. **54**: 578–579.

Goić-Barišić I. (2009). Mehanizmi rezistencije na karbapeneme u *Acinetobacter baumannii*. *Infektološki Glas*. **29**: 185–190.

Goić-Barišić I. (2018). Epidemiologija i rezistencija kliničkih izolata *Acinetobacter baumannii* u Hrvatskoj tijekom desetogodišnjeg razdoblja – što se promijenilo ? *Med. Flum.*. **54**: 268–273.

Gordon N.C., Wareham D.W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**: 219–226.

Griffiths R.P., Moyer C.L., Caldwell B.A., Ye C., Morita R.Y. (1990). Long-term starvation-induced loss of antibiotic resistance in bacteria. *Microb. Ecol.* **19**: 251–257.

Harding C.M, Hennon S.W., Feldman M.F. (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**: 91–102.

Hathroubi S., Mekni M.A., Domenico P., Nguyen D., Jacques M. (2017). Biofilms: Microbial Shelters Against Antibiotics. *Microb. Drug Resist.* **23**: 147–156.

Higgins P.G., Dammhayn C., Hackel M., Seifert H. (2010). Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother*. **65**: 233–238.

Higgins P.G., Hrenović J., Seifert H., Dekić S. (2018). Characterization of *Acinetobacter baumannii* from water and sludge line of secondary wastewater treatment plant. *Water Res* **140**: 261–267.

Hrenović J., Tibljaš D., Orhan Y., Büyükgüngör H. (2005). Immobilisation of *Acinetobacter*

calcoaceticus using natural carriers. *Water SA* **31**: 261–266.

Hrenović J., Ivanković T. (2009). Survival of *Escherichia coli* and *Acinetobacter junii* at various concentrations of sodium chloride. *EurAsia. J. Biosci.* **3**: 144–151.

Hrenović J., Ivanković T., Tibljaš D. (2009). The effect of mineral carrier composition on phosphate-accumulating bacteria immobilization. *J. Hazard Mater.* **166**: 1377–1382.

Hrenović J., Kovačević D., Ivanković T., Tibljaš D. (2011). Selective immobilization of *Acinetobacter junii* on the natural zeolitized tuff in municipal wastewater. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **88**: 208–214.

Hrenović J., Durn G., Goić-Barišić I., Kovačić A. (2014). Occurrence of an environmental *Acinetobacter baumannii* strain similar to a clinical isolate in paleosol from Croatia. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 2860–2866.

Hrenović J., Goić-Barišić I., Kazazić S., Kovačić A., Ganjto M., Tonkić M. (2016). Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. *Euro Surveill.* **21**: 1–10.

Hrenović J., Durn G., Šeruga Musić M., Dekic S., Troskot-Čorbić T., Škorić D. (2017). Extensively and multi drug-resistant *Acinetobacter baumannii* recovered from technosol at a dump site in Croatia. *Sci. Total Environ.* **607**–**608**: 1049–1055.

Hrenović J., Durn G., Kazazić S., Dekić S., Musić M.S. (2019). Untreated wastewater as a source of carbapenem-resistant bacteria to the riverine ecosystem. *Water SA* **45**: 55–62.

Imane M., Hafida H., Samia B., Meriem L., Ibtissem K.T., Ryad D. (2014). Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* isolated from medical devices at the intensive care unit of the University Hospital of Tlemcen (Algeria). *African J. Microbiol. Res.* **8**: 270–276.

ISO 20776-1 Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices -- Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.

Ivanković T., Goić-Barišić I., Hrenović J. (2017). Reduced susceptibility to disinfectants of *Acinetobacter baumannii* biofilms on glass and ceramic. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **68**: 99–108.

Jawad A., Seifert H., Snelling A.M., Heritage J., Hawkey P.M. (1998). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1938–1941.

Kaliterna V., Kaliterna M., Hrenović J., Barišić Z., Tonkić M., Goić-Barišić I. (2015). *Acinetobacter baumannii* in Southern Croatia: clonal lineages, biofilm formation, and resistance patterns. *Infect. Dis.* **47**: 902–907.

Kaprelyants A.S., Gottschal J.C., Kell D.B. (1993). Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 271-286.

Kempf M., Abdissa A., Diatta G., Trape J.F., Angelakis E., Mediannikov O., La Scola B., Raoult D. (2012a). Detection of *Acinetobacter baumannii* in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. *Int. J. Infect. Dis.* **16**: e680–e683.

Kempf M., Eveillard M., Deshayes C., Ghamrawi S., Lefrançois C., Georgeault S., Bastiat G., Seifert H., Joly-Guillou M.L. (2012b). Cell surface properties of two differently virulent strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient. *Can. J. Microbiol.* **58**: 311–317.

Khan N.H., Ahsan M., Taylor W.D., Kogure K. (2010). Culturability and Survival of Marine, Freshwater and Clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Environ.* **25**: 266–274.

Kittinger C., Kirschner A., Lipp M., Baumert R., Mascher F., Farnleitner A., Zarfel G.E. (2018). Antibiotic Resistance of *Acinetobacter* spp. Isolates from the River Danube: Susceptibility Stays High. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15**: 1–8.

Kocerba-Soroka W., Fiałkowska E., Pajdak-Stós A., Klimek B., Kowalska E., Drzewicki A. Salvadó H., Fyda J. (2013). The use of rotifers for limiting filamentous bacteria Type 021N, a bacteria causing activated sludge bulking. *Water Sci Technol* **67**: 1557-1563.

Kovačić A., Šeruga Musić M., Dekić S., Tonkić M., Novak A., Rubić Ž, Hrenovic J., Goić-Barišić I. (2017). Transmission and survival of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outside hospital setting. *Int Microbiol* **20**: 165–169.

Krzyściak P., Chmielarczyk A., Pobiega M., Romaniszyn D., Wójkowska-Mach J. (2017). *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired infection: biofilm production and drug susceptibility. *Apmis* **125**: 1017–1026.

La Scola B., Raoult D. (2004). *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg. Infect.*

Dis. **10**: 1671–1673.

Lastoria L.C., Caldeira S.M., Moreira R.G., Akazawa R.T., Maion J.C., Fortaleza C.M. (2014). Ecological competition and the incidence of *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in a teaching hospital in Southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* **47**: 583–588.

Lee C.R., Lee J.H., Park M., Park K.S., Bae I.K., Kim Y.B., Cha C.J., Jeong B.C., Lee S.H. (2017). Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 1-35.

Li J., Rayner C.R., Nation R.L., Owen RJ., Spelman D., Tan K.E., Liolios L. (2006). Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 2946–2950.

Loehfelm T.W., Luke N.R., Campagnari A.A. (2008). Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J. Bacteriol.* **190**: 1036–1044.

Longo F., Vuotto C., Donelli G. (2014). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* **37**: 119–217.

Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**: 268–281.

Martí S., Rodríguez-Baño J., Catel-Ferreira M., Jouenne T., Vila J., Seifert H., Dé E. (2011). Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Res. Notes* **4**: 1-4.

McConnell M.J., Actis L., Pachón J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 130–155.

Meletis G. (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **3**: 15–31.

Milenković J., Hrenović J., Goić-Barišić I., Tomić M., Djonlagić J. (2014). Biofouling : The

Journal of Bioadhesion and Biofilm Synergistic anti-biofouling effect of Ag-exchanged zeolite and D-Tyrosine on PVC composite against the clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Biofouling* **30**: 965–973.

Moffatt J.H., Harper M., Harrison P., Hale J.D., Vinogradov E., Seemann T., Henry R., Crane B., St Michael F., Cox A.D., Adler B., Nation R.L., Li J., Boyce J.D. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 4971–4977.

Moore D.M., Reynolds R.C. (1989). X-ray Diffraction and the Identification and Analysis of Clay Minerals. Oxford University Press, Oxford.

Mussi M.A., Gaddy J.A., Cabruja M., Arivett B.A., Viale A.M., Rasia R., Actis L.A. (2010). The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J. Bacteriol.* **192**: 6336–6345.

Nait Chabane Y., Marti S., Rihouey C., Alexandre S., Hardouin J., Lesouhaitier O., Vila J., Kaplan J.B., Jouenne T., Dé E. (2014). Characterisation of pellicles formed by *Acinetobacter baumannii* at the air-liquid interface. *PLoS One* **9**: e111660.

Nester E.W., Anderson D.G., Evans Roberts C., Pearsall N.N., Nester M.T. (2004). Microbiology A Human Perspective - Fourth Edition. McGraw-Hill, Boston.

Obeidat N.., Jawdat F, Al-Bakri A.G., Shehabi A.A. (2014). Major biologic characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environmental and patients respiratory tract sources. *Am. J. Infect. Control* **42**: 401–404.

Pagano M., Martins A.F., Barth A.L. (2016). Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Brazilian J. Microbiol.* **47**: 758–792.

Pearce L.E., Truong H.T., Crawford R.A., Yates G.F., Cavaignac S., de Lisle G.W. (2001). Effect of Turbulent-Flow Pasteurization on Survival of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* Added to Raw Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3964–3969.

Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**: 538–582.

Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **11**: 297–308.

Perez L.R. (2015). *Acinetobacter baumannii* displays inverse relationship between meropenem resistance and biofilm production. *J. Chemother*. **27**: 13–16.

Proctor R.A., von Eiff C., Kahl B.C., Becker K., McNamara P., Herrmann M., Peters G. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 295–305.

Pu Y., Ke Y., Bai F. (2017). Active efflux in dormant bacterial cells – New insights into antibiotic persistence. *Drug Resist. Updat.* **30**: 7–14.

Qi L., Li H., Zhang C., Liang B., Li J., Wang L., Du X., Liu X., Qiu S., Song H. (2016). Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* **7**: 1–10.

Queenan A.M., Bush K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**: 440–458.

Rauta P.R., Kumar K., Sahoo P.K. (2011). Emerging new multi-drug resistant bacterial pathogen, *Acinetobacter baumannii* associated with snakehead Channa striatus eye infection. *Curr. Sci.* **101**: 548–553.

Repizo G.D., Gagné S., Foucault-Grunenwald M.L., Borges V., Charpentier X., Limansky A.S., Gomes J.P., Viale A.M., Salcedo S.P. (2015). Differential Role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* Virulence. *PLoS One* **10**: e0138265.

Ribeiro F.R., Alvarez F., Henriques C., Lemos F., Lopes J.M., Ribeiro M.F. (1995). Structure-activity relationship in zeolites. *J. Mol. Catal.* **96**: 245-270.

Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cellsurface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**:29-33.

Rozen Y., Belkin S. (2005). Survival of enteric bacteria in seawater: Molecular aspects. *Ocean Heal. Pathog. Mar. Environ.* **25**: 93–107.

Santajit S., Indrawattana N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed. Res. Int.* **2016**: 2475067.

Santo Domingo J.W., Harmon S., Bennett J. (2002). Survival of *Salmonella* Species in River Water. *Curr. Microbiol.* **40**: 409–417.

Schreiber K., Boes N., Eschbach M., Jaensch L., Wehland J., Bjarnsholt T., Givskov M., Hentzer M., Schobert M. (2006). Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. *J. Bacteriol.* **188**: 659–668.

Shamsizadeh Z., Nikaeen M., Esfahani B.N., Mirhoseini S.H., Hatamzadeh M., Hassanzadeh A. (2017). Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: Potential sources for transmission of acinetobacter infections. *Environ. Health Prev. Med.* **22**: 1–7.

Šeruga Musić M., Hrenović J., Goić-Barišić I., Hunjak B., Škorić D., Ivanković T. (2017). Emission of extensively-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* from hospital settings to the natural environment. *J. Hosp. Infect.* **96**: 323–327.

Štimac I., Vasiljev Marchesi V., Tomljenović M., Rukavina T. (2010). Preživljavanje vrste *Klebsiella pneumoniae* u različitim uzorcimna voda. *Hrvat. vode* **18**: 13–18.

Tibljaš D., Šćavničar S. (2007). Nalazišta zeolitnog tufa na području Krapine. U: Filipan T., Tišma S., Farkaš A. (ed.) Prirodni zeolitni tuf iz Hrvatske u zaštiti okoliša. Institut za međunarodne odnose, Zagreb, 13–23.

Tipton K.A., Dimitrova D., Rather P.N. (2015). Phase-Variable Control of Multiple Phenotypes in *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075. *J. Bacteriol.* **197**: 2593–2599.

Tomaras A.P., Dorsey C.W., Edelmann R.E., Actis L.A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* **149**: 3473–3484.

Touati D. (2000). Iron and Oxidative Stress in Bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**: 1–6.

Towner K. (2006). The genus Acinetobacter. U: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (ed.) The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Gamma Subclass. Springer, New York. Volume 6, 746–758.

Towner K.J. (2009). *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J. Hosp. Infect.* **73**: 355–363.

van der Kolk J.H., Endimiani A., Graubner C., Gerber V., Perreten V. (2019). Acinetobacter in veterinary medicine, with an emphasis on Acinetobacter baumannii. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **16**: 59–71.

Vijayakumar S., Rajenderan S., Laishram S., Anandan S., Balaji V., Biswas I. (2016). Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Front. Public. Heal.* **4**: 105.

Wallace R.L., Snell T.W., Ricci C., Nogrady T. (2006). Rotifera. Volume 1: Biology, Ecology and Systematics. Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World, Volume 23, 2nd edn. Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands, p. 299.

Wareth G., Neubauer H., Sprague L.D. (2019). *Acinetobacter baumannii* – a neglected pathogen in veterinary and environmental health in Germany. *Vet. Res. Commun.* **43**: 1-6.

Wendt C., Dietze B., Dietz E., Rüden H. (1997). Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1394–1397.

WHO (World Health Organization) 2017. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1.

Wilharm G., Skiebe E., Higgins P.G., Poppel M.T., Blaschke U., Leser S., Heider C., Heindorf M., Brauner P., Jäckel U., Böhland K., Cuny C., Łopińska A., Kaminski P., Kasprzak M., Bochenski M., Ciebiera O., Tobółka M., Żołnierowicz K.M., Siekiera J., Seifert H., Gagné S., Salcedo S.P., Kaatz M., Layer F., Bender J.K., Fuchs S., Semmler T., Pfeifer Y., Jerzak L. (2017). Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide. *Environ. Microbiol.* **19**: 4349–4364.

Wroblewska M.M., Sawicka-Grzelak A., Marchel H., Luczak M., Sivian A. (2008). Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **53**:140-144 .

Wu M., Guina T., Brittnacher M., Nguyen H., Eng J., Miller S.I. (2005). The *Pseudomonas aeruginosa* proteome during anaerobic growth. *J. Bacteriol.* **187**: 8185–8190.

Xia L., Xiong D., Gu Z., Xu Z., Chen C., Xie J., Xu P. (2008). Recovery of Acinetobacter baumannii from diseased channel catfish (Ictalurus punctatus) in China. *Aquaculture* **284**: 285–288.

Zeidler S., Hubloher J., Schabacker K., Lamosa P., Santos H., Müller V. (2017). Trehalose, a temperature- and salt-induced solute with implications in pathobiology of *Acinetobacter baumannii*. *Environ. Microbiol.* **19**: 5088–5099.

Zeidler S., Müller V. (2019). Coping with low water activities and osmotic stress in *Acinetobacter baumannii*: significance, current status and perspectives. *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/1462-2920.14565.

Zhang C., Qiu S., Wang Y., Qi L., Hao R., Liu X., Shi Y., Hu X., An D., Li Z., Li P., Wang L., Cui J., Wang P., Huang L., Klena J.D., Song H. (2013). Higher Isolation of NDM-1 Producing *Acinetobacter baumannii* from the Sewage of the Hospitals in Beijing. *PLoS One* **8**: e64857.

ŽIVOTOPIS

9 Životopis

Svjetlana Dekić rođena je 08. studenog 1989. godine u Sisku. Na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu završava 2011. godine Preddiplomski sveučilišni studij i 2013. godine Diplomski sveučilišni studij znanosti o okolišu. Poslijediplomski doktorski studij biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2016. godine.

U razdoblju od 2014. do 2015. godine radi kao samostalni inženjer na stručnom osposobljavanju u Glavnom vodnogospodarskom laboratoriju Hrvatskih voda. U studenom 2016. godine zapošljava se kao asistent-doktorand na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Prirodno stanište klinički značajnih *Acinetobacter baumannii*“ (IP-2014-09-5656) voditeljice prof. dr. sc. Jasne Hrenović.

Do sada je objavila 16 znanstvenih radova, od kojih su 7 s glavnim autorstvom, te 21 kongresno priopćenje. Matični broj znanstvenika je 358072 (https://bib.irb.hr/lista-radova?autor=358072). Broj citata prema bazi Web of Science iznosi 17, prema bazi Scopus 21, te prema bazi Google Scholar 38. H indeks prema svim spomenutim bazama iznosi 3. Suvoditeljica je praktikumske nastave iz bakteriologije za studente svih smjerova preddiplomskog studija i neposredna voditeljica jednog diplomskog rada.

Tijekom studiranja dodijeljene su joj brojne nagrade i priznanja poput Rektorove nagrade za studentski rad i Dekanove nagrade za izvrsnost, te Godišnje nagrade Hrvatskih voda za najbolji diplomski rad. Nadalje, 2019. godine dobitnica je Nacionalne stipendije „Za žene u znanosti“ pod pokroviteljstvom L’Oréal ADRIA d.o.o. i Hrvatskog povjerenstva za UNESCO pri Ministarstvu kulture za perspektivne mlade znanstvenice i izvrsnost u znanstvenom radu. Također je dobitnica tri stipendije za pohađanje kongresa.

PRILOZI

10 Prilozi

Prilog 1. Popis korištenih izolata *A. baumannii*. CUPOVZ – Centralni uređaj za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba.

Izolat	Datum izolacije	Porijeklo	Hidrofobnost (%)	Pelikula	Morfologija kolonija
D10	23.9.2015.	Digestirani mulj CUPOVZ	0.0	1	glatko
D11	14.10.2015.		46.4	1	glatko
D12	14.10.2015.		48.6	1	glatko
D13	18.11.2015.		0.0	1	glatko
D16	26.1.2016.		67.4	1	glatko
D17	10.2.2016		0.0	2	glatko
EF7	09.9.2015.	Izlazna, tretirana otpadna voda CUPOVZ	0.0	1	glatko
EF8	23.9.2015.		0.0	1	glatko
EF11	18.11.2015.		73.3	2	hrapavo
EF13	02.12.2015.		0.0	1	glatko
EF22	26.1.2016.		0.0	1	glatko
EF23	26.1.2016.		0.0	1	glatko
IN31	23.9.2015.	Ulazna, netretirana otpadna voda CUPOVZ	97.1	1	glatko
IN34	23.9.2015.		0.7	1	glatko
IN36	23.9.2015.		2.0	1	glatko
IN39	28.10.2015.		30	1	glatko
IN41	04.11.2015.		0.0	0	glatko
IN47	18.11.2015.		0.0	1	glatko
IN58	26.1.2016.		92.8	2	hrapavo
S5	23.9.2015.	Aktivni mulj CUPOVZ	2.5	1	glatko
S6	04.11.2015.		78.0	1	glatko
S9	26.1.2016.		70.3	2	glatko
S10	10.2.2016.		1.7	1	glatko
S11	10.2.2016.		0.0	1	glatko
S15	23.3.2016.		78.8	1	glatko
OB4138	02.10.2015.	Aspirat bronha, Specijalna bolnica za plućne bolesti Zagreb	10.0	1	glatko
SAVA4	11.10.2015.	rijeka Sava nizvodno od Zagreba	2.0	1	glatko

Prilog 2. Određivanje vlažnosti i pH tla

Vlažnost tla

- Izvagati masu prazne petrijeve zdjelice bez poklopca (m_p)
- Izvagati masu petrijeve zdjelice s oko 10 g tla (m_{vt+p})
- Sušenje u suhom sterilizatoru u polu pokrivenoj petrijevoj zdjelici na 105 °C/ 2 h
- Ohladiti u eksikatoru
- Izvagati petrijevu zdjelicu sa suhim tlom (m_{st+p})
- Izračunati masu vlažnog tla (m_{vt}), masu suhog tla (m_{st}) i vlažnost tla (%)

$$m_{vt} = m_{vt+p} - m_p$$

$$m_{st} = m_{st+p} - m_p$$

$$Vlažnost\ tla\ (\%) = \frac{(m_{vt} - m_{st})}{m_{vt}} x\ 100$$

pH tla

- Mjeriti pH elektrodom nakon suspenzije tla u destiliranoj vodi u omjeru 1:2,5. Npr. 1g tla u 2,5 mL ili 4 g tla u 10 mL destilirane vode.

Prilog 3. Bojenje po Gramu

Izrada preparata:

- Označiti brušeni dio predmetnog stakla grafitnom olovkom
- Odmastiti predmetno staklo provlačenjem kroz plamen
- Bakterijskom ušicom nanijeti nekoliko kapi vodovodne vode na sredinu predmetnog stakla
- Razmutiti biomasu u vodi i razmazati po cijeloj površini predmetnog stakla
- Pričekati da se preparat osuši na zraku
- Fiksirati preparat provlačenjem kroz plamen 4 x

Postupak bojenja:

- Kristal violet 3-5 min
- Lugol 1-2 min
- Isprati s 96 %-tnim etanolom
- Isprati s vodom
- Karbol fuksin 0,5-1 min

Korišteni reagensi za metodu bojenja po Gramu

Reagens	Sastav	
Kristal violet	Otopina A	
	Kristal violet	2 g
	Etanol 96 %	20 mL
	Otopina B	
	Amonij-oksalat	0,8 g
	Destilirana voda	80 mL
	Pomiješati otopine A i B	
Lugol	Jod	1 g
	Kalij-jodid	2 g
	Destilirana voda	300 mL
Karbol fuksin	Otopina A	
	Bazični fuksin	0,3 g
	Etanol 96 %	10 mL
	Otopina B	
	Fenol	5 g
	Destilirana voda	95 mL
	Pomiješati otopine A i B	

Prilog 4. Bojenje izvanstaničnih polimernih tvari s Alcian blue

- Izraditi preparat kao u prethodnom bojenju
- Alcian blue 2 min
- Isprati s vodom
- Karbol fuksin 20 s
- Isprati s vodom

Alcian blue priprema:

Rastopiti 0,1 g Alcian blue u 10 mL 96 %-tnog etanola, dodati 90 mL destilirane vode.

Prilog 5. Minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika i profil antibiotske rezistencije za izolate *A. baumannii*.

Izolat	MEM	IMI	CIP	LVX	TOB	GEN	AMK	MIN	SAM	TIM	SXT	CST	Profil rezistencije
D10	0.5 S	< 0.25 S	< 0.25 S	< 0.12 S	< 1 S	< 1 S	< 2 S	< 1 S	< 2 S	< 8 S	<2 0 S	≤ 0.5 S	S
D11	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 4 R	4 R	≤ 1 S	≤ 1 S	32 R	≤ 1 S	16 I	≥ 128 R	≤ 20 S	≤ 0.5 S	MDR
D12	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 4 R	4 R	≤ 1 S	≤ 1 S	16 I	≤ 1 S	16 I	≥ 128 R	≤ 20 S	≤ 0.5 S	MDR
D13	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.12 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 8 S	≤ 20 S	≤ 0.5 S	S
D16	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.12 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 8 S	≤ 20 S	≤ 0.5 S	S
D17	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 4 R	≥ 8 R	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 64 R	8 I	16 I	≥ 128 R	≥ 320 R	≤ 0.5 S	XDR
EF7	> 16 R	> 16 R	> 4 R	> 8 R	> 16 R	> 16 R	> 64 R	8 I	> 32 R	> 128 R	> 320 R	20 R	PDR
EF8	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 4 R	≥ 8 R	≥ 16 R	≥ 16 R	8 S	≥ 16 R	≥ 32 R	≥ 128 R	≤ 20 S	≤ 0.5 S	XDR
EF11	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.12 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 1 S	≤ 2 S	< 8 S	≤ 20 S	≤ 0.5 S	S
EF13	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 4 R	≥ 8 R	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 64 R	≥ 16 R	≥ 32 R	≥ 128 R	≤ 20 S	≤ 0.5 S	XDR
EF22	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 4 R	4 R	8 R	2 S	8 R	2 S	16 I	≥ 128 R	≥ 320 R	≤ 0.5 S	XDR
EF23	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 4 R	≥ 8 R	≥ 16 R	4 S	16 R	4 S	16 I	≥ 128 R	≥ 320 R	≤ 0.5 S	XDR
IN31	< 0.25 S	< 0.25 S	< 0.25 S	< 0.12 S	< 1 S	< 1 S	< 2 S	< 1 S	< 2 S	< 8 S	< 20 S	≤ 0.5 S	S
IN34	> 16 R	> 16 R	> 4 R	> 8 R	> 16 R	> 16 R	> 64 R	> 16 R	> 32 R	> 128 R	< 20 S	≤ 0.5 S	XDR
IN36	< 0.25 S	< 0.25 S	< 0.25 S	< 0.12 S	< 1 S	< 1 S	< 2 S	< 1 S	< 2 S	< 8 S	< 20 S	≤ 0.5 S	S
IN39	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 4 R	4 R	≤ 1 S	4 S	≤ 2 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≥ 128 R	80 I	≤ 0.5 S	MDR
IN41	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 4 R	≥ 8 R	≤ 1 S	≤ 1 S	≥ 64 R	8 I	≥ 32 R	≥ 128 R	≥ 320 R	≤ 0.5 S	XDR
IN47	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 4 R	≥ 8 R	≥ 16 R	8 R	≥ 64 R	8 I	16 I	≥ 128 R	≥ 320 R	≤ 0.5 S	XDR
IN58	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.12 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 8 S	≤ 20 S	≤ 0.5 S	S
S5	> 16 R	> 16 R	> 4 R	> 8 R	> 16 R	> 16 R	> 64 R	> 16 R	> 32 R	> 128 R	< 20 S	≤ 0.5 S	XDR
S6	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.12 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 8 S	≤ 20 S	≤ 0.5 S	S
S9	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.12 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 8 S	≤ 20 S	≤ 0.5 S	S
S10	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 4 R	≥ 8 R	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 64 R	8 I	16 I	≥ 128 R	≥ 320 R	≤ 0.5 S	XDR
S11	≥ 16 R	≥ 16 R	≥ 4 R	≥ 8 R	4 S	≥ 16 R	≥ 64 R	8 I	16 I	≥ 128 R	≥ 320 R	≤ 0.5 S	XDR
S15	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.25 S	≤ 0.12 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 1 S	≤ 2 S	≤ 8 S	≤ 20 S	≤ 0.5 S	S
OB4138	≥ 16 R	≥ 16 R	> 4 R	8 R	> 16 R	> 16 R	> 64 R	> 16 R	16 I	128 R	< 20 S	≤ 0.5 S	XDR
SAVA4	≥ 16 R	≥ 16 R	> 4 R	> 8 R	< 1 S	8 R	16 I	8 I	8 S	> 128 R	> 320 R	≤ 0.5 S	XDR