

Utjecaj ameba na broj bakterija u riječnoj vodi

Žagar, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:150757>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET RIJEKA
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivan Žagar

Utjecaj ameba na broj bakterija
u riječnoj vodi

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET RIJEKA
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivan Žagar

Utjecaj ameba na broj bakterija
u riječnoj vodi

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marina Šantić

Diplomski rad obranjen je dana

u/na _____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad sadrži 87 stranica, 9 tablica, 45 slika, 85 literaturnih navoda.

ZAHVALA

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

Također, zahvaljujem se osoblju Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada, a osobito komentorici dr. sc. Valentini Marečić.

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

SAŽETAK

Ameba *Acanthamoeba castellanii* protozoa je koja pripada rodu *Amoebae*. Živi slobodno u prirodi; na tlu i u vodi. Većina vrsta su tzv. oportunistički patogeni, međutim neke vrste ipak mogu izazvati infekcije, posebice kod životinja i imunokomprimiranih osoba. *Acanthamoeba* vrste opasne su zbog toga što mogu uzrokovati bolesti poput encefalitisa i amebnog keratitisa. Vrste *Acanthamoeba* domaćini su mnogobrojnim unutarstaničnim patogenima poput bakterija iz roda *Legionella*, *Mycobacterium*, *Chlamydia* i *Francisella*. Brojna istraživanja su pokazala da se *Francisella* razmnožava unutar ameba poput *A. castellanii*, te se stoga ova protozoa smatra važnom u prijenosu tularemije, posebice putem izvorskih i površinskih voda. Evolucijskim mehanizmima mnoge vrste bakterija su razvile sposobnosti da prežive unutar ameba. Mogućnost bakterije *F. novicida* da preživi i razmnožava se unutar ameba veoma je važna za njezin opstanak u vodenom okolišu. Cilj rada bio je ispitati utjecaj ameba *A. castellanii* na broj bakterija u riječnoj vodi Gorskog kotara – rijeci Čabranki. U uzorke su inokulirane određene koncentracije amebe *A. castellanii* te bakterije *F. novicida*. U jedan od uzoraka inokulirana je samo ameba *A. castellanii*, u drugi uzorak inokulirana je samo bakterija *F. novicida*, a u treći uzorak inokulirane su istovremeno i *F. novicida* i ameba *A. castellanii*. Broj bakterija između tri različite vrste uzoraka praćen je u periodu od 10 dana. Broj ameba *A. castellanii* utvrđen je pomoću Neubauer komorice pod invertnim mikroskopom, a broj ostalih bakterija utvrđen je metodom membranske filtracije te metodom nasađivanja na hranjive podloge. Nakon dobivenih rezultata za svaki od pojedine vrste uzoraka, rezultati su statistički obrađeni, a zatim međusobno uspoređeni. Zaključeno je da *A. castellanii* nema utjecaj na broj ostalih prethodno prisutnih bakterija u uzorcima. Rezultati istraživanja pokazuju da je amebama je pogodnije kada se nalaze samostalno u uzorku rijeke Čabranke, nego kada se nalaze zajedno s *F. novicida*, dok *F. novicida* bolje preživljava kada se u uzorku nalazi zajedno s amebama. Utvrđeno je i da bakterija najslabije preživljavaju u uzorku vode iz rijeke Čabranke u koji je dodana samo *F. novicida*. Prema *Uredbi o kakvoći voda za kupanje* rijeka Čabranka nije pokazala zadovoljavajući kriterij zbog prevelikog broja crijevnih enterokoka, međutim u rijeka Čabranka nije pogodan medij za rast *C. perfringens*, *E. coli* te fekalnih koliforma. Četvrtog dana nakon inokulacije (dan 4.) nije zabilježena prisutnost *A. castellanii* u nijednome od uzoraka.

Ključne riječi: *Acanthamoeba castellanii*, *Francisella novicida*, rijeka Čabranka, vodeni okoliš, tularemija, unutarstanični život

SUMMARY

The amoeba *Acanthamoeba castellanii* is a protozoan belonging to the genus *Amoebae*. This amoeba lives freely in nature; on land and in water. Most species are so-called opportunistic pathogens, however, some species can still cause infections, especially in animals and immunocompromised individuals. *Acanthamoeba* species are dangerous because they can cause diseases such as encephalitis and amoebic keratitis. *Acanthamoeba* species host numerous intracellular pathogens such as bacteria of the genera *Legionella*, *Mycobacterium*, *Chlamydia*, and *Francisella*. Numerous studies have shown that *Francisella* reproduces within amoebae such as *A. castellanii*, and therefore this protozoa is considered important in the transmission of tularemia, especially through spring and surface waters. Through evolutionary mechanisms, many species of bacteria have developed the ability to survive within amoebae. The ability of *F. novicida* to survive and multiply within amoebae is very important for its survival in the aquatic environment. The aim of this study was to examine the influence of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* on the number of bacteria in water from river of Gorski kotar - the river Čabranka. Certain concentrations of amoeba *A. castellanii* and bacteria *F. novicida* were added to the samples. To one of the samples was inoculated only amoeba *A. castellanii*, to the second sample was inoculated only the bacterium *F. novicida*, and to the third sample were inoculated both amoeba *A. castellanii* and bacteria *F. novicida*. The number of bacteria between the three different types of samples was monitored over a period of 10 days. The number of amoebae *A. castellanii* was determined using a Neubauer chamber and invert microscope, and the number of other bacteria was determined by membrane filtration and by planting on nutrient media. After the obtained results for each of the individual types of samples, the results were statistically processed and then compared with each other. It was concluded that the amoeba *A. castellanii* had no effect on the number of other previously present bacteria in the samples. The results of the research show that for amoebae is more suitable environment when they are found alone in a sample of the river Čabranka, than when they are found together with the bacterium *F. novicida*, while *F. novicida* survives better when is in the sample along with amoebae. It was also found that the bacteria the least survives in a sample of water to which only *F. novicida* was previously added. According to the document „Uredbi o kakvoći voda za kupanje“, the river Čabranka did not show a satisfactory criterion due to the excessive number of intestinal enterococci. The river Čabranka is not a suitable medium for the growth of bacteria such as *C. perfringens*,

E. coli and fecal coliforms. On the fourth day after inoculation (day 4), the presence of *A. castellanii* was not recorded in any of the samples.

Key words: *Acanthamoeba castellanii*, *Francisella novicida*, the river Čabranka, aquatic environment, tularemia, intracellular life

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Rod <i>Francisella</i>	1
1.1.1. <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	2
1.1.2. <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	3
1.1.3. <i>Francisella novicida</i>	3
1.2. Tularemija.....	4
1.2.1. Epidemiologija tularemije s naglaskom na vodene ekosustave	4
1.2.2. Tularemija u ljudi	5
1.2.3. Tularemija u životinja	7
1.2.4. Prevencija i liječenje tularemije	8
1.3. Patogeneza i virulencija vrsta <i>Francisella</i>	9
1.3.1. Činitelji patogenosti.....	9
1.3.2. Unutarstanični život i virulencija	10
1.4. Laboratorijska sigurnost i dijagnostika <i>Francisella</i>	12
1.5. Proučavana ameba <i>Acanthamoeba castellanii</i>	13
1.5.1. Vrsta <i>Acanthamoeba</i>	13
1.5.2. Podvrste <i>Acanthamoeba</i>	14
1.5.2.1. <i>Acanthamoeba castellanii</i>	14
1.5.2.2. Unutarstanični život <i>Francisella</i> unutar ameba	15
1.6. Proučavana voda iz rijeka.....	17
1.6.1. Rijeka Čabranka	17
1.6.1.1. Rijeka Čabranka i javna vodoopskrba na području grada Čabra	18
2. CILJ RADA	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Uzgoj ameba <i>Acanthamoeba castellanii</i>	21
3.1.1. PYG medij.....	22
3.2. Postupak brojenja ameba pomoću Neubauer komorice	22
3.3. Bakterijski soj	24
3.4. Hranjive podloge.....	24
3.5. Ispitivana voda	26
3.6. Uzimanje uzoraka	26

3.7. Vrste uzoraka	27
3.8. Metoda membranske filtracije	27
3.9. Metoda nasađivanja na hranjive podloge	31
3.10. Inokulacija <i>Francisella novicida</i>	31
3.11. Inokulacija <i>Acanthamoeba castellanii</i>	32
3.12. Postupak određivanja broja bakterija	33
3.13. Statistička obrada podataka	34
4. REZULTATI.....	35
4.1. Broj bakterija i ameba u <i>Uzorku 1., 2. i 3.</i>	35
4.1.1. Mikrobiologija rijeke Čabranke nakon dodatka ameba <i>Acanthamoeba castellanii</i> 35	
4.1.1.1. Ukupni broj bakterija na 22 °C u Uzorku 1.	36
4.1.1.2. Ukupni broj bakterija na 37 °C u Uzorku 1.	37
4.1.1.3. Broj enterokoka u Uzorku 1.....	38
4.1.1.4. Broj ukupnih koliforma u Uzorku 1.	39
4.1.1.5. Broj <i>Clostridium perfringens</i> u Uzorku 1.....	40
4.1.1.6. Broj <i>Escherichia coli</i> u Uzorku 1.....	41
4.1.1.7. Broj fekalnih koliforma u Uzorku 1.	42
4.1.2. Broj ameba <i>Acanthamoeba castellanii</i> u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba <i>Acanthamoeba castellanii</i>	43
4.1.3. Mikrobiologija rijeke Čabranke nakon dodatka <i>Francisella novicida</i>	44
4.1.3.1. Ukupni broj bakterija na 22 °C u Uzorku 2.	45
4.1.3.2. Ukupni broj bakterija na 37 °C u Uzorku 2.	46
4.1.3.3. Broj enterokoka u Uzorku 2.....	47
4.1.3.4. Broj ukupnih koliforma u Uzorku 2.	48
4.1.3.5. Broj <i>Clostridium perfringens</i> u Uzorku 2.....	49
4.1.3.6. Broj <i>Escherichia coli</i> u Uzorku 2.....	50
4.1.3.7. Broj fekalnih koliforma u Uzorku 2.	51
4.1.4. Broj <i>Francisella novicida</i> u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka <i>F. novicida</i> ...52	
4.1.5. Mikrobiologija uzorka rijeke Čabranke nakon dodatka <i>Francisella novicida</i> i <i>Acanthamoeba castellanii</i>	53
4.1.5.1. Ukupni broj bakterija na 22 °C u Uzorku 3.	54
4.1.5.2. Ukupni broj bakterija na 37 °C u Uzorku 3.	55
4.1.5.3. Broj enterokoka u Uzorku 3.....	56
4.1.5.4. Broj ukupnih koliforma u Uzorku 3.	57

4.1.5.5. Broj <i>Clostridium perfringens</i> u Uzorku 3.....	58
4.1.5.6. Broj <i>Escherichia coli</i> u Uzorku 3.....	59
4.1.5.7. Broj fekalnih koliforma u Uzorku 3.....	60
4.1.6. Broj ameba (<i>Acanthamoeba castellanii</i>) u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka <i>Francisella novicida</i> i <i>Acanthamoeba castellanii</i>	61
4.1.7. Broj <i>F. novicida</i> u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka <i>Francisella novicida</i> i <i>Acanthamoeba castellanii</i>	63
4.2. Usporedba broja bakterija i ameba između tri različite vrste uzorka.....	65
4.2.1. Ukupni broj bakterija na 22 °C.....	65
4.2.2. Ukupni broj bakterija na 37 °C.....	66
4.2.3. Broj enterokoka	66
4.2.4. Broj ukupnih koliforma.....	67
4.2.5. Broj <i>Clostridium perfringens</i>	69
4.2.6. Broj <i>Escherichia coli</i>	69
4.2.7. Broj fekalnih koliforma.....	70
4.2.8. Broj <i>Francisella novicida</i>	71
4.2.9. Broj ameba <i>Acanthamoeba castellanii</i>	72
5. RASPRAVA	74
6. ZAKLJUČAK	79
7. LITERATURA.....	80
8. KRATKI ŽIVOTOPIS.....	87

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Rod *Francisella*

Rod *Francisella* pripada porodici *Francisellaceae*. Rod *Francisella* spp. obuhvaća vrste *tularensis*, *novicida*, *hispaniensis*, *philomiragia* te *noatunensis*. Nedavno su rodu *Francisella* dodane nove vrste: *F. guangzhouensis*, *F. salina*, *F. frigiditurris*, *F. piscidida*, *F. opportunistica*, *F. uliginis* i *F. adeliensis* (Tablica 1.). Bakterije ovog roda su zapravo gram negativni kokobacili.

Istraživanje roda *Francisella* započelo je davne 1912. godine kada je prvi put izolirana *F. tularensis* (grad Tulara, Kalifornija, SAD). Tada je *F. tularensis* definirana kao uzročnik „bolesti sličnoj kugi“, koja se inače javlja u vjeverica (1). Najznačajniji znanstvenik u području istraživanja francizele odnosno tularemije bio je Edward Francis, te je po njemu rod i dobio ime (2).

Tablica 1. Taksonomija unutar roda *Francisella*

Rod	Vrsta	Podvrsta
<i>Francisella</i>	<i>tularensis</i>	<i>noatunensis</i>
		<i>holarctica</i>
		<i>mediasiatica</i>
	<i>novicida</i>	
	<i>hispaniensis</i>	
	<i>philomiragia</i>	
	<i>noatunensis</i>	<i>noatunensis</i>
		<i>orientalis</i>
	<i>guangzhouensis</i>	
	<i>salina</i>	
	<i>frigiditurris</i>	
	<i>piscidida</i>	
	<i>opportunistica</i>	
	<i>uliginis</i>	
<i>adeliensis</i>		

Današnja istraživanja pokazuju kako je rod *Francisella* puno veći i rasprostranjeniji nego što se mislilo. *Francisella* je prisutna svugdje u okolišu; vodi, zemlji, prašini i slami (3). Za čovjeka su najznačajnije, ali i najopasnije vrste *F. tularensis* i *F. philomiragia*. Kako bi francizela moga rasti na hranjivim podlogama potreban je dodatak raznih nutritivnih tvari poput L-cisteina, alfa-ketoglutarata i željezova pirofosfata (4). Inkubacija francizele provodi se na 37 °C, 24-48 sati, a ponekad i duže (2-4 dana). Pozitivan porast francizela na čokoladnom agaru uočavamo u obliku sivkastih glatkih kolonija, veličine 2 do 4 mm, pravilnog okruglog oblika. Također, koriste se i podloge koje sadrže krv, te na njima francizela stvori usku zonu alfa hemolize (djelomična hemoliza crvenih krvnih stanica). Koristeći moderne metode taksonomije, znanstvenici su francizelu smjestili u tzv. gama podskupinu proteobakterija (5).

1.1.1. *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*

Francisella tularensis sastoji se od tri podvrste: *mediastatica*, *holartica* i *tularensis* (Tablica 1.). Prije se u tu grupu svrstavala i *F. novicida*, međutim zbog novijih istraživanja, svrstana je u zasebnu vrstu (6). Dvije od tri nabrojane podvrste su važne za zdravlje čovjeka: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) te *F. tularensis* subsp. *holartica* (tip B). Naime, ove dvije podvrste (tip A i tip B) uzrok su tularemije u čovjeka. Međusobno se razlikuju po virulenciji, geografskoj rasprostranjenosti te ishodu bolesti. Duž cijele sjeverne polutke pojavljuje se tip B (subsp. *holartica*), te uzrokuje blaži oblik bolesti. Tip A (subsp. *tularensis*) javlja se uglavnom na području Sjeverne Amerike, te se radi o težem obliku bolesti s visokom stopom smrtnosti u čovjeka (7).

Genotipizacija podvrsta *F. tularensis* provodi se raznim suvremenim molekularnim metodama, primjerice, pulsirajućom gel elektroforezom. Naime, za podvrstu *tularensis* određena su tri tipa: A1a, A1b i A2. Međusobno se razlikuju prema kliničkom tijeku bolesti. Najvirulentnijom smatra se tip A1b (8). Soj *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) izoliran je iz kožne ulceracije čovjeka, 1941. godine. Nazvan je Schu S4 (9).

U današnje se vrijeme *Francisella* i patogeneza tularemije sve više istražuju. Nažalost, u svijetu su sve više aktualne teme poput terorizma i biološkog oružja, te također postoji mogućnost i zlouporabe francizele u te svrhe. Najopasniji faktor je taj da je potrebno samo 15 bakterija tipa A (subsp. *tularensis*) nakon respiratornog unosa da bi došlo do infekcije u

čovjeka. Putevi prijenosa su različiti, poput: kapljičnim putem, oralnim putem, člankonošcima, te kroz kožu i konjuktivu. Zbog ovako visoke virulentnosti, *F. tularensis* subsp. *tularensis* zahtjeva rad u tzv. BSL-3 laboratorijima – laboratoriji visokog stupnja zaštite (10).

1.1.2. *Francisella tularensis* subsp. *holartica*

Francisella tularensis subsp. *holartica* (tip B) javlja se na području Azije i Europe. Tip B nije virulentan kao tip A te dovodi do klinički blažih oblika tularemije, a time i nižih stopa smrtnosti. Subsp. *holartica* specifična je po tome što se povezuje sa slatkovodnim staništima te glodavcima koji borave u vodi i uz vodu, poput dabrova (11). Zanimljiva činjenica je ta da ova podvrsta francizele (tip B) preživljava u okolišu na način da egzistira u protozoama. Vektor prijenosa bakterije je komarac ili krpelj, te se tako bolest može prenjeti s čovjeka na čovjeka (12).

Početkom 20. st. znanstvenici su iz podvrste subsp. *holartica* (tip B) konstruirali tzv. LVS – soj (engl. *live vaccine strain*) (13). LVS – soj ili soj živuće vakcine nastao je subkultivacijom bakterije *F. tularensis* subsp. *holartica* uzastopnom intraperitonealnom infekcijom miševa. Na kraju je soj izoliran iz samog tkiva miševa (14). Mehanizmom nastanka LVS – soja smatra se slučajna mutacija genoma (15). Međutim, ne postoji certificirano cjepivo protiv tularemije. Naime, LVS – soj još uvijek nije u potpunosti opisan, a zabilježeno je da i dovodi do bolesti u imunokomprimitiranih osoba. Cjepivo se pokazalo učinkovito primjerice za zaštitu zdravstvenih djelatnika, koji se smatraju rizičnom skupinom (16).

1.1.3. *Francisella novicida*

Kao što je već spomenuto, *Francisella novicida* uvrštena je u posebnu vrstu zbog određenih fenotipskih razlika izolata (17). Prvi puta izolirana je 1950. godine iz slane vode u zaljevu Ogden Bay (u američkoj saveznoj državi Utah). U početku se smatralo da je bakterija morfološki vrlo slična *F. tularensis*, ali kasnije se uspostavilo da je *F. novicida* značajno manje virulentna, te da fermentira saharozu. *F. novicida* geografski je zastupljena u Australiji (18).

F. novicida vrlo rijetko može uzrokovati bolest, najčešće kod imunokomprimitiranih bolesnika (opisano nekoliko primjera u SAD-u) (19,20). Najviše zabilježenih slučajeva zaraze *F. novicida* povezano je s vodenim ekosustavima (bočata i slana voda), ledom te tlom (21).

Iako *F. novicida* nije toliko opasna za zdravog čovjeka, opasna je za životinje. Naime, može uzrokovati bolest u više od 200 životinjskih vrsta poput ovaca, zečeva, majmuna, vjeverica, psa, mačaka i miševa (11). Istraživanja tularemije na laboratorijskim miševima veoma su praktična jer u miševa se javlja bolest vrlo slična tularemiji u čovjeka.

Pozitivni porast *F. novicida* na hranjivim podlogama vidimo u obliku prozirno bijelih pravilno okruglih kolonija. Za ovu gram negativnu bakteriju tipičan je unutarstanični rast i razmnožavanje. Treba naglasiti da je *F. novicida* manje zahtjevnja za uzgoj na hranjivim podlogama nego primjerice vrsta *F. tularensis*. Također, i praktičnija je za uzgoj. Naime, *F. novicida* će na tzv. CGBA agaru (engl. *cysteine-glucose-blood agar*) narasti već nakon 24 sata, dok će primjerice *F. tularensis* narasti tek za 3 do 7 dana (22).

Genom *F. novicida* sastoji se od čak 84 gena (soj U112). Ti geni zaslužni su za stvaranje energije, prijenos i modifikaciju DNA, metabolizam ugljikohidrata te biosintezu aminokiselina (23). Međutim, kod *F. tularensis* subsp. *holartica* LVS i *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4, ti geni su inaktivirani (24).

Kao što je već rečeno, *F. novicida* nije opasna za zdravu osobu, te je to jedan od razloga zašto je upravo ona odabrana kao bakterijski model za izradu ovog diplomskog rada. *F. novicida* pogodna je za laboratorijska istraživanja, te ne zahtjeva rad u posebnim BSL-3 laboratorijima (laboratoriji visokog stupnja zaštite). Danas se *F. novicida* sve više koristi u eksperimentalnim istraživanjima tularemije, posebice zbog visoke genetske sličnosti s *F. tularensis* (21).

1.2. Tularemija

1.2.1. Epidemiologija tularemije s naglaskom na vodene ekosustave

Postoje različiti putevi prijenosa tularemije: direktnim kontaktom sa zaraženom životinjom, putem hrane kontaminirane životinjskim izlučevinama, konzumacijom vode, te putem vektora (komarci, krpelji, muhe) (25).

Najznačajniji člankonošci koji omogućuju preživljavanje *F. tularensis* na području Europe su krpelji (vrste *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus* i *Dermacentor reticulans*). Nadalje, što se tiče prijenosa putem izravnog kontakta sa životinjama, najčešće se radi o kontaktu sa zečevima tijekom lova (tipično za srednju Europu). Na području sjeverne Europe infekcija se najčešće širi ubodom komaraca (25).

U vodenim ekosustavima najčešće je izolirana podvrsta *F. tularensis* subsp. *holarctica*, dok se subsp. *tularensis* ne povezuje s vodenim staništima (25). S obzirom da su vodena staništa tipična za komarce, tijekom razvoja u vodi, može doći do infekcije larvi komaraca. Osim komaraca, životinje tipične za vodena staništa su i dabrovi. Dabrovi su karakteristični za područje Sjeverne Amerike i Skandinavije. Oni također imaju funkciju u održavanju *F. tularensis* u vodenom okolišu.

Ljudi koji najčešće oboljevaju od tularemije su šumari, lovci, poljoprivrednici, mesari, veterinari, rekreativci, a u rizičnu skupinu spadaju i laboratorijski djelatnici (26). Do infekcije najčešće dolazi udisanjem infektivnog aerosola.

Mnogobrojne studije pokazale su da *F. tularensis* u vodenim ekosustavima može preživjeti i do nekoliko mjeseci. Kao što je već spomenuto, smatra se da francizela preživljava u zajednici s protozoama. Nekoliko slučajeva pokazalo je da je moguća zaraza putem kontaminirane vode ili leda (25,26).

1.2.2. Tularemija u ljudi

Kao što je već spomenuto, tularemiju u ljudi uzrokuju podvrste *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) i subsp. *holarctica* (tip B). Tip B javlja se na području cijele sjeverne hemisfere, dok se tip A javlja samo na području Sjeverne Amerike. Međutim, tip A mnogo je opasniji i infektivniji, te ishod bolesti može biti smrtonosan (7). Naime, studije su pokazale kako je dovoljno samo 15-20 bakterije podvrste subsp. *tularensis* da bi došlo do infekcije. Respiratorni put je najčešći put unosa ove bakterije. Vrijeme inkubacije je 3-5 dana. Potencijalni rezervoari infekcije mogu biti različiti, poput glodavaca ili lagomorfa (dvojezupci) (Slika 1.) (27).

Što se tiče kliničke slike, *Francisella* može uzrokovati različite oblike bolesti ovisno o mjestu ulaska bakterije u organizam. Oblici bolesti su: glandularni, ulceroglandularni,

okuloglandularni i angiozni oblik te plućni, tifoidni i abdominalni oblik (28). Ulceloglandularni oblik je najčešći tip tularemije, a nastaje ugriom zaraženog vektora ili izravnim kontaktom sa zaraženom životinjom (29). Naime, na početku infekcije nastaje lezija, koja se kasnije razvija u čir. Čir nastaje u razdoblju od 7 dana, okružen je zonom upale, međutim, gotov je bezbolan. Ako se pak radi o glandularnom obliku bolesti, simptomi su povišena temperatura, glavobolja, opća slabost, grlobolja, dolazi do povećanja limfnih čvorova, a izostaje pojava lezija (25). O okuloglandularnom obliku bolesti govorimo ako dođe do inokulacije bakterije u oko. Unutar nekoliko dana dolazi do otoka očnih kapaka, stvaranja gnoja i konjuktivitisa. Nadalje, do angioznog oblika tularemije dolazi konzumacijom kontaminirane hrane ili vode. Simptomi su povećanje limfnih čvorova na vratu te faringitis (upala ždrijela, farinksa) (29).

Plućni oblik bolesti nastaje udisanjem aerosola koji je prethodno kontaminiran izlučevinama zaraženih životinja. Najrizičnijom skupinom smatraju se poljoprivrednici u ruralnim područjima. Ovisno o infektivnoj dozi i virulentnosti soja, plućna tularemija može biti vrlo opasna, a čak i smrtonosna. Kod akutne infekcije, bolest često ostaje nedijagnosticirana, jer se javljaju samo opći simptomi (visoka temperatura, opća slabost itd.). Kod težih oblika bolesti najčešće se radi o upali pluća (30). Nadalje, u gastrointestinalnom obliku mogu se javiti blaži simptomi poput proljeva, međutim može doći i do težih simptoma akutne bolesti popraćene ulceracijama na crijevima (31). Tifoidni oblik (gripozni ili septički oblik) bolesti karakteriziraju opći simptomi, bez upale limfnih čvorova i bez primarnog afekta. Po simptomima podsjeća na trbušni tifus ili sepsu. Karakteristika svih oblika je moguća pojava osipa, a najčešće se javlja kod tifoidnog oblika tularemije. Naime, osip nam ukazuje na to da je došlo do bakterijemije (prodora bakterije u krv). Kod težih oblika tifoidnog oblika javlja se upala pluća (32).



Slika 1. Putevi prijenosa tularemije. Prilagođeno prema izvoru: <https://www.svetmedicine.com/images/Infektivne/tularemija2.jpg> (pristupljeno: 21.5.2021.)

1.2.3. Tularemija u životinja

Klinička slika tularemije u životinja može biti različita ovisno o infektivnoj dozi i putu infekcije, a najčešće se radi o akutnoj febrilnoj bolesti. Slučajevi tularemije opisani su kod više od 200 vrsta životinja (33).

Većina slučajeva zaraženih životinja opisana je kod psa, a utvrđeno je da se može zaraziti na različite načine poput: kupanja u kontaminiranoj vodi, bliskim kontaktom s drugom zaraženom životinjom, jedenjem mesa divljeg zeca (34). Simptomi zaraženog psa su vrućica, pustule na mjestu inokulacije, limfadenopatija (pojava abnormalnosti u limfnim čvorovima), mukozne izlučevine iz oka i nosa, te anoreksija (35,36).

Nadalje, mnogo slučajeva tularemije opisano je i kod mačaka. Klinička slika kod mačaka najčešće se javlja u obliku groznice, jezične ulceracije, dehidracije, anoreksije, splenomegalije (povećana slezena), hepatomegalije (povećana jetra), a ako dođe do komplikacija može doći i do smrti (37). Mačke mogu prenjeti infekciju na druge životinje i čovjeka. Specifično je i to da mačka ne mora imati simptome bolesti, nego je zapravo asimptomatski kliconoša. Laboratorijskim pretragama može se dokazati infekcija (38).

Osim psa i mačaka, zabilježeni su i mnogobrojni drugi slučajevi tularemije i kod drugih životinja poput ovaca, vjeverica, miševa, majmuna i zečeva. U ovaca su simptomi tularemije vrlo slični simptomima zaraze kod psa (visoka temperatura, limfadenopatija, anoreksija), a nažalost u većini slučajeva ishod je fatalan (39,40). Što se tiče tularemije u majmuna, klinička slika najčešće se manifestira u obliku splenomegalije, nekroze slezene ili jetre, te krvarenja sluznice crijeva, krvarenja u području srca, te krvarenja pluća, moždanih ovojnica te nadbubrežnih žlijezda (41). Najčešće se radi o tzv. vjeveričastim vrstama majmuna, te vrstama *tamarini* i *talapoini* (42).

1.2.4. Prevencija i liječenje tularemije

Prevencija tularemije može se sažeti u nekoliko sljedećih smjernica: izbjegavati prostorije gdje postoji mogućnost strujanja kontaminiranog aerosola, izbjegavati izravan kontakt s potencijalno zaraženim životinjama, izbjegavati korištenje vode i konzumaciju hrane za koju se smatra da je potencijalno zagađena, pri boravku u prirodi koristiti različita sredstva koja odbijaju insekte poput komaraca i krpelja, izbjegavati sjedenje na slami ili zemlji, redovita dezinfekcija ruku, itd.

Najčešće, terapija liječenja tularemije je antibioticima aminoglikozidima. Tako se u SAD-u u terapiji plućne tularemije koristi antibiotik gentamicin (31). Nekada su se koristili i antibiotici poput kloramfenikola, streptomicina i doksiciklina, međutim, ustanovljene su mnoge nuspojave tih lijekova poput ototoksičnosti (oštećenje sluha), nefrotoksičnosti (oštećenje bubrega), premećaja razvoja zubiju u djece te negativnog učinka na hematopoezu (stvaranje krvnih stanica i pločica) (10,43). Antibiotici skupine tetraciklina također su se koristili u liječenju tularemije, ali se uspostavilo da nakon njihove primjene ponovno dolazi do povratka bolesti (30). Kod blažih oblika tularemije, uspješnim se pokazao lijek ciprofloksacin, naročito kod djece i trudnica (44).

Što se tiče prevencije tularemije, postoji cjepivo, međutim ono još uvijek nije ovlašteno. Naime, 1950. izrađeno je cjepivo *live vaccine strain* ili LVS soj živuće vakcine, koji još uvijek nije u potpunosti istražen (opisano u poglavlju *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*). Danas znanstvenici sve više istražuju područje prevencije i liječenja tularemije, pokušava se pronaći odgovarajuće cjepivo, a sve više istraživanja temelji se na proučavanju stanične imunosti (43).

1.3. Patogeneza i virulencija vrsta *Francisella*

1.3.1. Činitelji patogenosti

Francisella nema klasične činitelje virulencije poput egzotoksina, već je virulentna zbog sposobnosti unutarstaničnog razmnožavanja unutar domaćina. Naime, kada se francizela razmnožava unutar domaćina, dolazi do poremećaja funkcioniranja cijelog organizma te do snažne upalne reakcije. Novija istraživanja pokazuju da je činitelj patogenosti nekih sojeva kapsula, ali njena uloga još nije potpuno razjašnjena. Smatra se da kapsula štiti bakterijsku stanicu od fagocitoze, lize posredovane serumskim komplementom te prepoznavanje od strane imunološkog sustava domaćina. Osim kapsule i unutarstaničnog razmnožavanja, na površini bakterije otkriven je i tzv. tip IV sustava pila. Taj sustav pila ima sposobnost adherencije (prijanjanja) bakterije unutar stanica domaćina. Osim adherencije, smatra se da sustav pila ima i važnost u izlučivanju bjelančevina u citosol stanice domaćina, stvaranju biofilma, te u prijenosu DNA. Kod ostalih gram negativnih bakterija veliku važnost kod upalnog odgovora imaju i lipopolisaharidi (LPS), koji su sastavni dio vanjske membrane bakterija. Primjerice, za virulenciju bakterija važan je endotoksin lipid A. Pretpostavlja se da su razlike u virulenciji među vrstama *Francisella* povezane s lipidom A (45).

Važnu ulogu u virulenciji među vrstama roda *Francisella* imaju i različiti sekrecijski sustavi, proteini unutarnje membrane, proteini vanjske membrane, periplazmatski proteini te stvaranje biofilma. Najvažniji proteini koje izlučuju Schu S4 i LVS soj su katalaza – peroksidaza protein KatG, šaperoni GroEL, GroES i DnaK, bakterioferitin Bfr i superoksid dismutaza SodB (85).

Istaživanjima je utvrđeno da mnogi organizmi sadrže TRL skupinu receptora (engl. *Toll-Like Receptors*) čija je uloga da uzrokuju urođeni imunološki odgovor kada prepoznaju

određene komponente *Francisella*. Takvi receptori nalaze se na površini stanica makrofaga i dendritičnih stanica (46). Receptori najčešće prepoznaju bakterijske lipoproteine, što u konačnici dovodi do stimulacije protuupalnih citokina tijekom infekcije. Da bi se organizam obranio nakon infekcije bakterijom *Francisella*, dolazi do mehanizma aktivacije TRL signalnih puteva u fagocitnim stanicama (47).

F. tularensis ulazi u stanicu domaćina fagocitozom, vezanjem na različite receptore (48,49). Francizeli faktor elongacije (EF) omogućuje adherenciju na stanice makrofaga. Faktor elongacije djeluje zajedno s proteinom FsaP (50,51). Ukoliko je bakterija prekrivena protutjelima, za njen ulazak u stanicu domaćina bitni su Fc receptori (50).

Kada *Francisella* ulazi u stanicu domaćina, ona je smještena u fagosomu, te na taj način ulazi kroz membranu u stanicu domaćina. Fagosom je citoplazmatski mjehurić koji se stvara oko bakterije koja se apsorbira fagocitozom. U ovaj proces fagocitoze uključene su i lipidne splavi (engl. *Lipid Rafts*) te membranski protein caveolin-1. Lipidne splavi su stanične opne bogate kolesterolom, te sadrže brojne receptore i signalne molekule koji im omogućuju komunikaciju s patogenom (52).

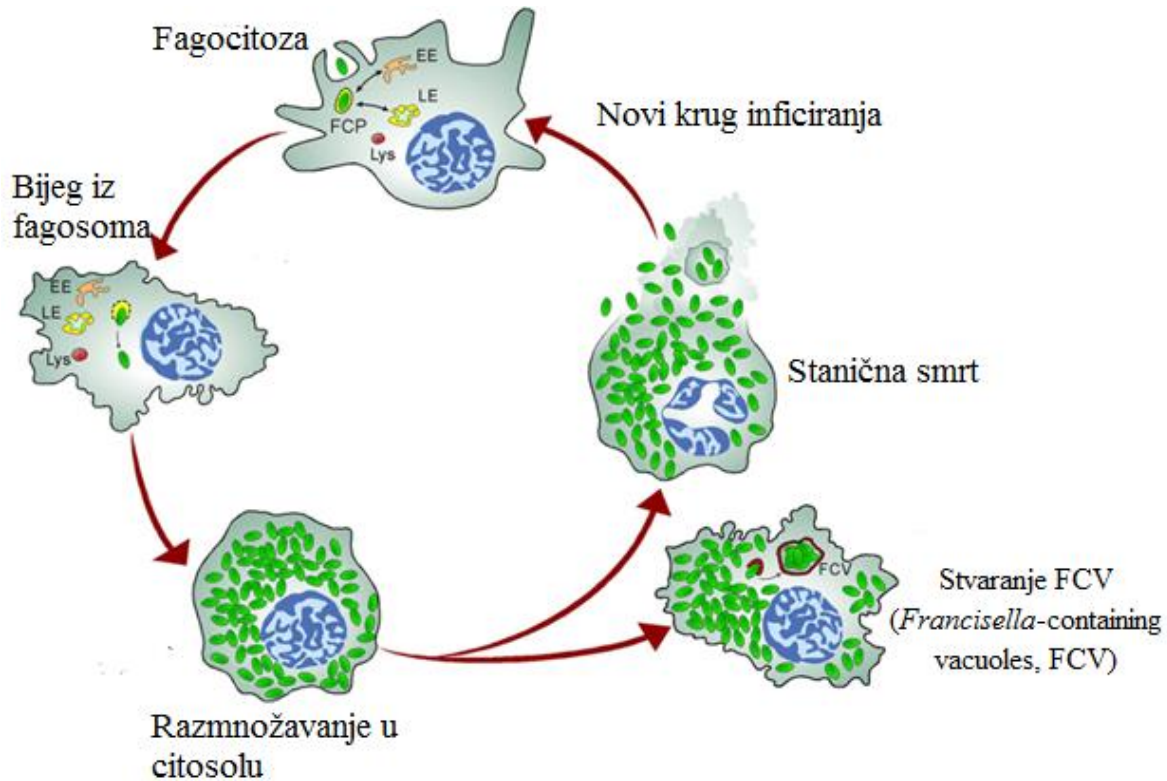
Zaključno, kada sve sumiramo, u činitelje patogenosti francizele spadaju: unutarstanični način razmnožavanja, kapsula, tip IV sustav pila, lipopolisaharid (LPS), različiti sekrecijski sustavi i proteini, stvaranje biofilma te tzv. *Francisella* patogeni otok (FPO), koji je opisan i objašnjen u sljedećem poglavlju.

1.3.2. Unutarstanični život i virulencija

Kao što je već rečeno, *Francisella* ulazi u stanicu domaćina s ciljem da iskoristi sve raspoložive izvore energije iz unutarstaničnog okruženja. Naime, da bi francizela preživjela unutar stanice, mora povećati prinos hranjivih tvari ili pak razgraditi kompleksne strukture poput bjelančevina, glikogena i lipida, s obzirom da je u njima pohranjen najveći udio potencijalnih nutrijenata (53,54,55).

Dakle, *Francisella* ulazi u stanicu procesom fagocitoze (vrsta endocitoze), a nakon ulaska u stanicu egzistira u fagosomu oko 2 sata. Zatim dolazi do tzv. *bijega iz fagosoma*, te se potom bakterija razmnožava u citosolu. Za vrijeme umnožavanja bakterija, istovremeno dolazi do stvaranja vakuola koje sadrže *Francisellu* (engl. *Francisella containing vacuoles*,

FCV). Nakon toga dolazi do uništenja stanica i stanične smrti. Nakon svih prethodno opisanih procesa, dolazi do novog ciklusa inficiranja (56-61) (Slika 2.).



Slika 2. Model unutarstaničnog životnog ciklusa *F. tularensis* prilagođen prema makrofagima. Prilagođeno prema izvoru: Chong, A., Celli, J. *The Francisella intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. Frontiers in Microbiol.* 2010. (1) 138.

Međutim, osim u makrofazima, brojna istraživanja pokazuju da se *Francisella* može razmnožavati i drugim vrstama stanica poput: plućnim epitelnim stanicama, hepatocitima, stanicama artropoda, neutrofilima, te protozoama (7). Jedna od tih protozoa je i *Acanthamoeba castellanii*. Dakle, vrlo često gdje je *Francisella* prisutna negdje u prirodnom vodenom okolišu, tamo su često prisutne razne protozoe poput *A. castellanii*.

Znanstvenici stalno istražuju složeni unutarstanični život francizele, a u posljednje vrijeme poseban je naglasak stavljen na proučavanje pojedinih gena koji imaju važnu ulogu u tom životnom ciklusu. Tako je otkriven i već spomenuti *Francisella* patogeni otok (FPO) ili FPI (engl. *Francisella pathogenicity island*). Naime, FPO sadrži 19 do 26 gena neophodnih za unutarstanično razmnožavanje i sposobnost virulencije francizele. Među tim genima otkriveni

su i geni *iglABCD* i *pdpABCD* (62). Ova dva gena smatraju se izuzetno važnima za virulentnost (stupanj patogenosti) francizele. Između ostalog *Francisella* patogeni otok (FPO ili FPI) izlučuje i FPI proteine (IglC, IglE, PdpA, PdpE, IglI, IglF, IglJ, VgrF) (63). FPI proteini imaju važnu ulogu u bijegu bakterije iz fagosoma, virulenciji francizele u miševima te razmnožavanju u stanicama sisavaca i ameba. Između ostalog, kod infekcije francizelom znatno je povišena ekspresija primjerice IglC proteina (64,65).

Zaključno, mogli bismo reći da se glavnim mehanizmom virulencije francizele smatra njena sposobnost preživljavanja i razmnožavanja unutar stanica domaćina.

1.4. Laboratorijska sigurnost i dijagnostika *Francisella*

Kao što je već spomenuto u prethodnim poglavljima, *F. tularensis* je veoma infektivna bakterija, a time i veoma opasna za rad u laboratoriju. Stoga, kada se provode istraživanja na ovoj vrsti francizele, provode se u već spomenutim BSL-3 laboratorijima (laboratoriji sa stupnjem zaštite III). Naime, u BSL-3 laboratorijima zaposlenici nose posebnu zaštitnu odjeću, a omogućena je i primjena sofisticiranih bioloških kabineta. Zbog svega navedenoga danas se u istraživanjima često koristi vrsta *F. novicida*, jer nije opasna za zdravog čovjeka, a ima visoku genetsku sličnost s vrstom *F. tularensis* (21).

U pogledu dijagnostike, obično se analiziraju uzorci krvi, ulceroznih ogrebotina ili sadržaj iz limfnih čvorova. Za transport uzoraka pretežno se koristi podloga Cary-Blair (25,26). U laboratorijskim uvjetima, bakterija se većinom uzgaja na BCYE agaru (engl. *Buffered Charcoal Yeast Extract*). U podlogu se naknadno dodaju alfa cistein i soli željeza, jer francizela zahtjeva mnoštvo različitih hranjivih tvari. Inkubacija se provodi pri temperaturi od 37 °C, 24 do 48 sati.

Danas se tularemija obično dokazuje serološkim metodama, a glavni razlog je otežana i manje jednostavna metoda kultivacije. Najčešće serološke metode su test aglutinacije u nizu epruveta i mikroaglutinacija. U dijagnostici tularemije sve se više koriste molekularne metode poput lančane reakcije polimerazom (PCR) (26).

1.5. Proučavana ameba *Acanthamoeba castellanii*

1.5.1. Vrsta *Acanthamoeba*

U rod protozoa imena *Amoebae*, između ostalih, pripadaju i vrste *Acanthamoeba*. Veliki dio vrsta živi slobodno u prirodi; na tlu i u vodi. Većina vrsta su tzv. oportunistički patogeni (u zdravih ljudi rijetko ili gotovo nikada ne izazivaju bolest), međutim neke vrste ipak mogu izazvati infekcije, posebice kod životinja i imunokompromitiranih osoba (66).

Tijekom životnog ciklusa amebe se mogu nalaziti u dva različita oblika: u obliku trofozoita ili u obliku ciste. U laboratorijskim istraživanjima *A. castellanii* se uzgaja u formi trofozoita. Trofozoiti tvore karakteristične pseudopodije (akantapodije, lažne nožice) te imaju jezgru s istaknutim središnjim kariosomom (kromatinski materijal unutar stanične jezgre). Trofozoiti su dugi od 14 do 40 µm. Kada se ameba nalazi u nepovoljnim životnim uvjetima, primjerice nedostatku hranjivih tvari, ona prelazi u oblik ciste što joj omogućuje duže preživljavanje. Ciste sadrže stijenku nepravilnog oblika, koja je dvostruka i može sadržavati pore. Promjer cista kreće se od 12 do 16 µm. Vrstama *Acanthamoeba* potreban je kisik za rast, odnosno imaju aerobni metabolizam. Temperatura pogodna za njihov rast kreće se u rasponu od 25 do 37 °C (66).

Vrste *Acanthamoeba* hrane se brojnim mikroorganizmima, a posebno gram negativnim bakterijama, poput *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*. Zanimljiva činjenica je ta da *E.coli* potiče rast ameba, te inače služi kao ko-kultivacijska bakterija u laboratorijskim uvjetima (67).

Nadalje, *Acanthamoeba* vrste opasne su zbog toga što mogu uzrokovati bolesti poput encefalitisa i amebnog keratitisa. Od amebnog keratitisa najčešće oboljevaju osobe koje nose leće, s obzirom da se *Acanthamoeba* može uvući i preživjeti u prostoru između oka i leće. S druge strane, encefalitis ili upala moždanog parenhima nastaje kada ameba uđe kroz oštećeni dio kože u organizam, te nakon toga prodire sve do središnjeg živčanog sustava. Encefalitis se najčešće javlja kod osoba s oslabljenim imunitetom, slabo uhranjenih osoba, alkoholičara te kod dijabetičara (66).

1.5.2. Podvrste *Acanthamoeba*

Podvrste *Acanthamoeba* najčešće možemo razlikovati prema obliku cista. Dijele se u dvije glavne skupine: one koje uzrokuju i one koje ne uzrokuju infekcije (Tablica 2.). Podvrste koje nisu opasne, odnosno ne uzrokuju infekcije su: *A. jacobsi*, *A. comandoni*, *A. griffini* i *A. divionensis*. One su također slobodnoživuće amebe u mnogobrojnim vodenim staništima. S druge strane, potencijalno opasne podvrste *Acanthamoeba* koje uzrokuju infekcije su: *A. quina*, *A. keratitis*, *A. astronyxis*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, i *A. castellanii* (66).

Tablica 2. Podvrste *Acanthamoeba*.

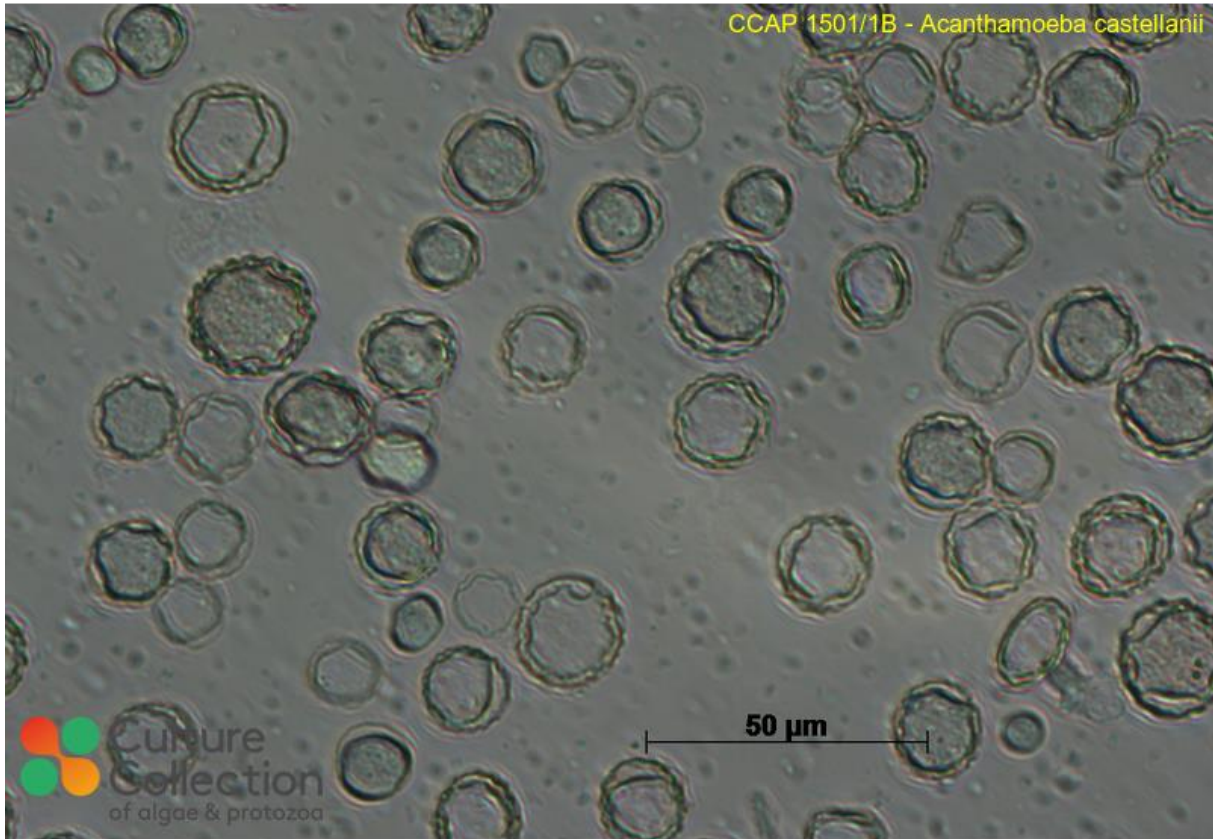
Podvrste <i>Acanthamoeba</i>	
Uzrokuju infekcije	Ne uzrokuju infekcije
<i>A. quina</i>	<i>A. jacobsi</i>
<i>A. keratitis</i>	<i>A. comandoni</i>
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. griffini</i>
<i>A. polyphaga</i>	<i>A. divionensis</i>
<i>A. culbertsoni</i>	
<i>A. hatchetti</i>	
<i>A. lugdunensis</i>	
<i>A. castellanii</i>	

1.5.2.1. *Acanthamoeba castellanii*

Ameba *Acanthamoeba castellanii* prisutna je svugdje u prirodnom vodenom okolišu (kao i vrste bakterija iz roda *Francisella*). Hrani se brojnim bakterijama, gljivama i ostalim protozoama. Mehanizam djelovanja joj je sposobnost da razori staničnu membranu bakterija. Također ima i sposobnost razlaganja organske tvari pomoću brojnih enzima poput celulaze ili hitinaze (67).

Ova ameba često se koristi u laboratorijskom radu kod proučavanja unutarstaničnog života bakterija (Slika 3.). Također, koristi se i u istraživanjima vezanim uz biokemiju,

ekologiju, mikrobiologiju te molekularnu biologiju. U laboratorijskom radu se za *A. castellanii* često koristi kataloški broj: „ATCC 30234“ (67).



Slika 3. *Acanthamoeba castellanii* pod mikroskopom. Izvor: https://www.ccap.ac.uk/catalogue/image/cache/catalog/strainImages/image_4083_7544-800x600.png (pristupljeno: 21.5.2021.)

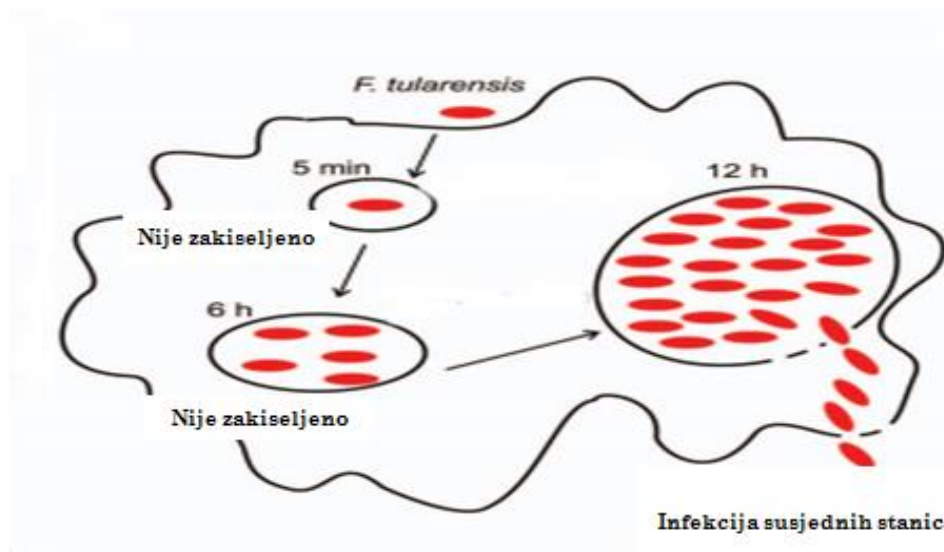
Kao što je već spomenuto, amebe pretežito žive u vodenom okolišu, te su kao dio biofilмова povezane kompleksnim interakcijama s bakterijama. Vrste *Acanthamoeba* domaćini su mnogobrojnim unutarstaničnim patogenima poput bakterija iz roda *Legionella*, *Mycobacterium*, *Chlamydia* i *Francisella*. Mnogobrojna današnja istraživanja pokazala su da je u mediju koji sadrži amebe izraženiji rast bakterija iz roda *Francisella* (68).

1.5.2.2. Unutarstanični život *Francisella* unutar ameba

Naime, brojna istraživanja su pokazala da se *Francisella* razmnožava unutar ameba poput *Hartmannella vermiformis*, *Acanthamoeba castellanii* te *Dictyostelium discoideum*.

Smatra se da su navedene protozoe veoma važne u prijenosu tularemije, posebice putem izvorskih i površinskih voda (69).

Jednom od najvirulentnijih vrsta *Francisella* smatra se *F. tularensis* (više o tome opisano je u poglavlju „Rod *Francisella*“). Mehanizmi ulaska *F. tularensis* u amebu nisu poznati. Što se tiče vrste *Francisella novicida*, za nju je zanimljivo to da joj se životni ciklus razlikuje u stanicama makrofaga u usporedbi sa životnim ciklusom unutar ameba. Naime, u makrofagima bakterija nakon ulaska u stanicu bježi iz fagosoma te se razmnožava u citosolu inficiranog domaćina. S druge strane, unutar ameba (*A. castellanii* i *H. vermiformis*) *F. novicida* razmnožava se u vakuolama, ali pod uvjetom da pH nije u kiselom području, odnosno da vakuola nije zakiseljena. Kada se nakon nekog vremena bakterija namnoži u amebi (najčešće nakon 24 sata), uzrokuje njezinu lizu i oslobađanje bakterija koje inficiraju susjedne stanice (Slika 4.). U samom uzorku vode to može biti vidljivo golim okom kao zamućenje (69).



Slika 4. Unutarstanični život *Francisella tularensis* unutar stanica ameba. Mehanizmi ulaska *F. tularensis* u amebu nisu poznati. Životni ciklus *F. tularensis* razlikuje se unutar stanica ameba u usporedbi sa životnim ciklusom u stanicama makrofaga. U makrofagima bakterija bježi iz fagosoma. S druge strane, unutar ameba (*A. castellanii* i *H. vermiformis*) *Francisella* se razmnožava unutar vakuole, ali pod uvjetom da vakuola nije zakiseljena. Prilagođeno prema izvoru: Ožanić M, Marečić V, Gobin I, Šantić M: Intracellular life of *Francisella* and *Legionella* within amoeba cells. Prilagođeno na hrvatski jezik.

Dosadašnja *in vitro* ispitivanja su pokazala kako *F. tularensis*; *F. tularensis* subsp. *tularensis* i *F. tularensis* subsp. *holartica* preživljavaju i razmnožavaju se unutar ameba *H. vermiformis* i *A. castellanii*. Također, dokazano je da se *F. novicida* više razmnožava unutar

H. vermiformis. S druge strane, pokazano je da *F. tularensis* subsp. *holartica* dugotrajnije preživljava u cistama *A. castellanii* (70,71,72,73).

Mogućnost bakterije *F. novicida* da preživi i razmnožava se unutar ameba veoma je važna za njezin opstanak u vodenom okolišu. Općenito, amebe bakterije vide kao izvor hrane, ali evolucijskim mehanizmima mnoge vrste bakterija su razvile sposobnosti da prežive unutar ameba, pa tako i vrsta *Francisella* (70,71,72,73).

1.6. Proučavana voda iz rijeka

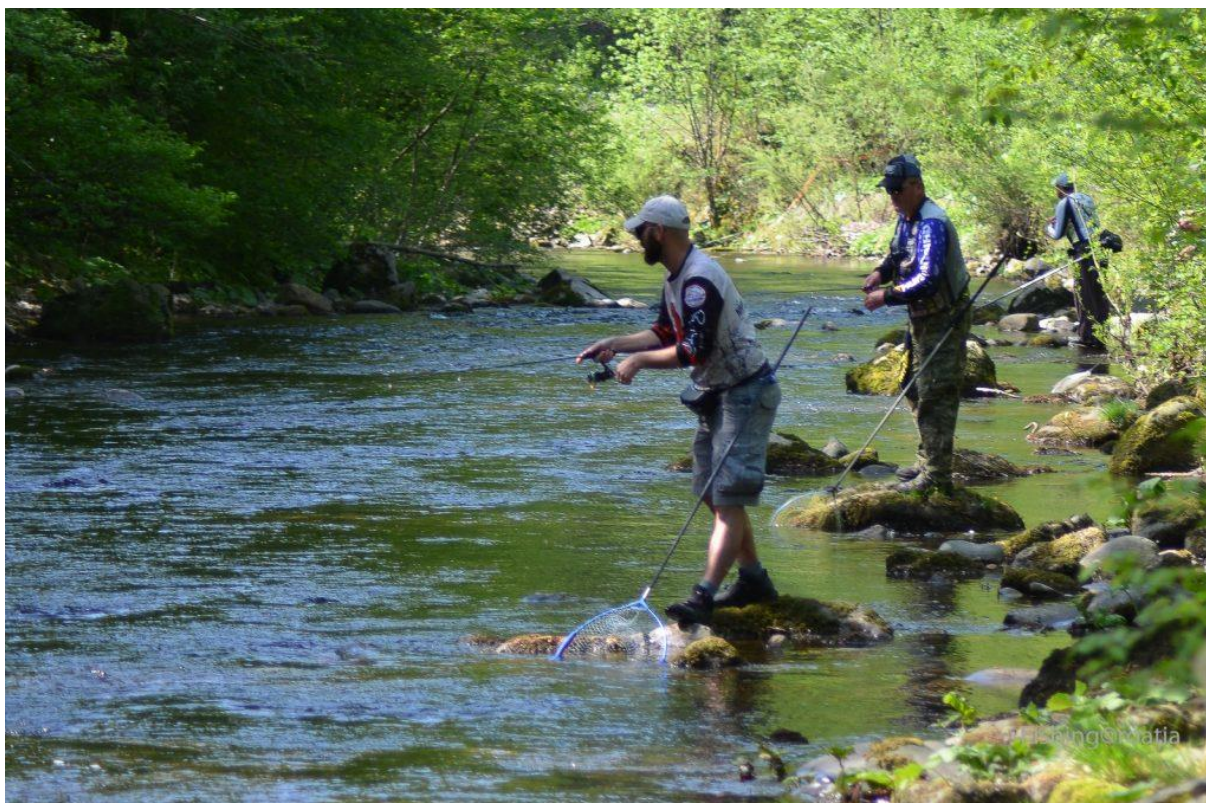
Kratko i sažeto rečeno, u ovome diplomskom radu proučavan je utjecaj ameba *Acanthamoeba castellanii* na broj bakterije u riječnoj vodi Gorskog kotara – rijeci Čabranki.

1.6.1. Rijeka Čabranka

Jedan od pritoka rijeke Kupe je rijeka Čabranka. Čabranka izvire u dva mlaza. Prvi mlaz nalazi se u jezercu Zelenoj koti, i prima potok Sušicu iz Slovenije, a drugi je smješten u dubokoj užoj maloj dolini pod Obrhom iznad Čabra. Baš u gradu Čabru u Čabranku uvire tzv. *Pakleni jarak* ili potok Trščanka, a kod naselja Plešće uvire potok Mandli. Rijeka je duga oko 13 km. Počinje na početku Čabra, a završava kod sela Hrvatsko i Osilnica (ušće u Kupu) (74).

Dolina rijeke Čabranke okružena je bujnom vegetacijom livada, pašnjaka i šuma, što je veoma privlačno za rekreativce, domaće stanovništvo i turiste, a posebno za sportskog ribolovca (Slika 5.). U donjem toku rijeke mogu se pronaći brojne vrste riječnih riba poput klana, peša i lipljana, a u gornjem toku prevladava potočna pastrva (74).

Općenito, Čabranka čini prirodnu granicu između Slovenije i Hrvatske. Sam izvor (sa Hrvatske strane) udaljen je oko 20-ak minuta hoda od samog centra Čabra. Od objekata izgrađenih na rijeci Čabranki mogu se naći uzgajalište pastrva te mala hidroelektrana (75).



Slika 5. Sportski ribolov na rijeci Čabranki. Izvor: http://ribolov-koprivnica.com/wp-content/uploads/2018/05/HM2_6137-1024x678.jpg (pristupljeno: 20.5.2021.)

1.6.1.1. Rijeka Čabranka i javna vodoopskrba na području grada Čabra

Čabranka je Čabranima veoma bitna i u svrhu javne vodoopskrbe. Za vodoopskrbu se koristi lijevo izvorište Čabranke (gornji tok rijeke). Iz tog se razloga voda ručno klorira. Međutim, voda je vrlo često bakteriološki neispravna, posebno nakon većih oborina. Često dolazi do fekalnog zagađenja, a jedan od razloga tog zagađenja su naselja bez izgrađene kanalizacije (u područjima izravnog utjecaja na podzemne vode) (76).

Naime, na području cijelog grada Čabra (od početka 2020. do svibnja 2021. godine) rezultati ispitivanja zdravstvene ispravnosti vode bili su sljedeći: od ukupno 21 ispitivanih uzoraka, 12 (57%) je bilo identificirano kao neispravno. Uzrok mikrobiološke neispravnosti bili su: ukupne koliformne bakterije, *E. coli*, enterokoki, ukupan broj bakterija na 22 °C i 36 °C; a uzrok kemijske neispravnosti bio je pH te slobodni rezidualni klor (77).

Ukupni broj stanovnika priključenih na vodoopskrbni sustav grada Čabra iznosi 3811 (oko 80% stanovništva), a obuhvaća mjesta: Čabar, Gerovo, Tršće, Prezid, Zamost, Plešće, Mandli i Donji Žagari. Osim samog centralnog vodoopskrbnog sustava (CVS) izvor

Čabranke, u vodoopskrbu su uključeni i izori Podstene, izvor Mandli i izvor Žagari. Komunalno poduzeće koje djeluje na području grada Čabra zove se „Čabranka“ Čabar (78).

Grad Čabar ima velikih problema sa kvalitetom vode za piće. Uzroci česte neispravnosti vode su: cijeli sustav je zastario, primjerice ulazni pročišćivač – javljaju se problemi svaki put kada padne veća količina kiše (zamućenje vode, bakteriološki neispravna voda); razni nedostaci u sanitarno-tehničkom održavanju (direktno ispuštanje nepročišćenih fekalnih otpadnih voda naselja i „crne jame“ glavni su izvor zagađenja podzemnih voda). Najveći problem je diskontinuirana dezinfekcija. U planu je u budućnosti iskoristiti sva moguća sredstva EU za projekte grada Čabra, a jedan od prioriteta je rješavanje problema sa vodoopskrbom. Prioriteti su osigurati vodoopskrbu dovoljnom količinom vode iz sigurnih izvora, osigurati učinkovitu dezinfekciju pitke vode u sustavu cijele vodoopskrbne mreže te izgradnja sustava odvodnje otpadnih voda (77,79).

2. CILJ RADA

Glavni cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj ameba *Acanthamoeba castellanii* na broj bakterija u riječnoj vodi na primjeru rijeke Čabranke u periodu od 10 dana. Također, cilj je bio i ispitati kako će bakterija *Francisella novicida* utjecati na broj bakterija u riječnoj vodi, te međusobni utjecaj francizela i ameba kada se istovremeno nalaze u uzorku vode. Cilj je bio i ispitati mikrobiologiju rijeke Čabranke bez ikakvog dodatka (ili ameba i/ili francizela) te napraviti usporedbu broja bakterija između tri različite vrste uzoraka (uzorak u koji je dodana ameba, uzorak u koji je dodana francizela, te uzorak u koji je dodana istovremeno i ameba i francizela).

Dakle, ovim radom željelo se uvidjeti da li će se *Francisella* razmnožavati unutar amebe *A. castellanii*, ili će ameba te iskoristiti kao izvor vlastitih hranjivih tvari, ili pak u uzorcima neće biti zabilježena prisutnost ameba tijekom praćenog vremena.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzgoj ameba *Acanthamoeba castellanii*

U eksperimentalnom radu korištena je stanična kultura ameba *A. castellanii*. Stanice ameba *A. castellanii* čuvaju se zamrznute na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prije same uporabe potrebno ih je odmrznuti na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u vodenoj kupelji. Međutim, kako bi se omogućilo razmnožavanje i rast ameba *A. castellanii*, potrebno ih je inokulirati u PYG (engl. Peptone Yeast Glucose) medij. Naime, u tom mediju osigurani su povoljni uvjeti koji omogućuju prijelaz ameba iz cističnog u trofozoitni oblik. PYG medij mora se mijenjati svaka tri dana jer tako omogućujemo amebama da stalno imaju dovoljno hranjivih tvari za razmnožavanje i rast. Amebe se uzgajaju na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posudice u kojima se uzgajaju stanične kulture ameba *A. castellanii* nazivaju se flaskovi. U njima se cijelo vrijeme nalazi hranjivi PYG medij. Flaskovi odnosno posudice drže se u paralelnom položaju, polegnuti su na veću površinu jer amebe adheriraju na dno te ih je tada lakše odvojiti. Amebe se odvajaju od dna posude za uzgoj staničnih kultura strugalicom. U jednoj posudi imamo 30 ml hranjivog medija. Upravo zato što su stanične kulture adherirane na dno te ih zbog debljine posude ne bismo mogli vidjeti normalnim mikroskopom, za njihov pregled koristi se invertni mikroskop. U invertnom mikroskopu objektivni su smješteni ispod, a objekt proučavanja iznad objektiva (Slika 6.).

Kako vrijeme prolazi, tako amebe troše hranjivi medij i razmnožavaju se, te se zbog toga hranjivi medij mora stalno mijenjati. Međutim, nije dobro da nam se amebe previše namnože jer ako ih ima previše, one će vrlo brzo potrošiti sav hranjivi PYG medij. S druge strane, ako amebe nemaju dovoljno hranjivih tvari one će najprije prijeći u oblik ciste te neće adherirati na dno posude (zato što samo trofozoiti mogu adherirati). Bitno je naglasiti da se cijeli postupak radi u posebnoj komori kako bi se održala sterilnost.



Slika 6. Invertni mikroskop. Izvor:

https://www.google.com/search?q=Invertni+mikroskop&tbm=isch&ved=2ahUKewihntXIy5bwAhVBk6OKHTH_A94O2-cCegOIABAA&oq=Invertni+mikroskop&gs_lcp=CgNpbWcOAzICCAA6BOgAELEDOggIABCxAXCDAToECAA0HjoECAAQGD0GCAAQChAYUIXEE1j-3xNgveMTaABwAHgAgAHBAogB8RvSAQcwLjguNy4zmAEAoAEBggELZ3dzLXdpei1pbWfAAOE&scient=img&ei=4-eDYOGgF8GmkqWx_o_wDO&bih=625&biw=1366&rlz=1CIAVNG_hrHR708HR708&safe=active (pristupljeno: 24.4.2021.)

3.1.1. PYG medij

Za pripremu 1 L PYG medija odnosno engl. *ATCC Medium:712 PYG* potrebno je: 20 g proteoznog peptona, 1 g ekstrakta kvasca, 20 g agara te 900 ml deionizirane vode.

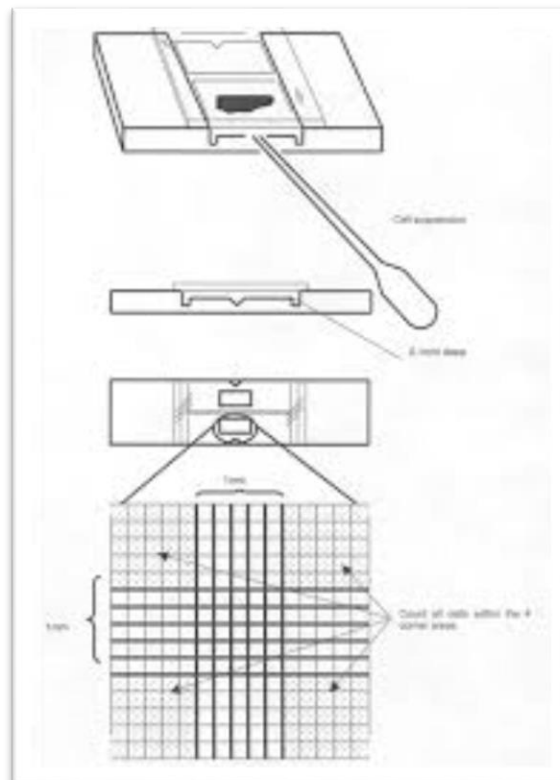
Da bi se izbjegla precipitacija (stvaranje taloga) pripremaju se zasebno matične ili stock otopine (engl. *stock solutions*) te se dodaju u bazalni medij (engl. *basal medium*). Za pripremu stock otopina potrebno nam je: 8 ml 0.05 M CaCl_2 , 10 ml 0.4 M $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 ml 0.25 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 ml 0.25 M KH_2PO_4 , 1 g Na Citrat $\times 2\text{H}_2\text{O}$ i 10 ml 0.005 M $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Autoklav mora biti podešen na 121 °C, a pH treba iznositi 6.5.

3.2. Postupak brojenja ameba pomoću Neubauer komorice

Neubauer komorica čuva se u otopini vodikova peroksida. Na Neubauer komoricu stavlja se pokrovno stakalce, te se zatim pipetom otpipetira 10 μl medija u komoricu koji ulazi ispod stakalca kapilarnim silama. Medij je zapravo PYG medij koji sadrži amebe koje smo prethodno odstrugali s dna flaska jer su amebe bile adherirane na toj površini.

Zatim te amebe promatramo u Neubauer komorici pod mikroskopom. Radi lakšeg brojenja ameba, pod mikroskopom vidimo kako je komorica podijeljena na 4 kvadranta, a svaki od ta 4 kvadranta sastoji se od 16 kvadratića. Dakle, jedan kvadrant ima dimenzije 4 x 4 kvadratića (Slika 7.).

Nakon što smo uočili amebe pod mikroskopom, slijedi postupak brojenja. Naprije prebrojimo koliko ameba ima zasebno u prvome kvadrantu, a zatim prebrojimo koliko ih ima i u ostalim kvadrantima. Zatim sve zbrojimo i podijelimo s 4 kako bismo dobili srednju vrijednost. Primjerice, dobili smo srednju vrijednost 200. Zatim se taj broj množi sa faktorom komorice koji, u ovome slučaju, iznosi 10^4 (svaka vrsta komorice po uputama proizvođača ima svoj faktor komorice). Dakle, broj 200 pomnožimo s 10^4 te dobijemo 200×10^4 odnosno 2×10^6 ameba.



Slika 7. Neubauer komorica. Izvor: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSEuVzp_f9oCIVvsY09dKOWAOXhvcbbeVzG3A&usqp=CAU (pristupljeno: 24.4.2021.)

3.3. Bakterijski soj

Bakterijski soj koji je korišten u ovom eksperimentalnom radu je *Francisella novicida* U112. *F. novicida* U112 drži se pohranjena u zamrzivaču pri temperaturi od -80 °C. Prije samog početka eksperimentalnog rada, bakteriju smo morali dva do tri dana prije nasaditi na BCYE agar (engl. *Buffered Charcoal Yeast Extract Agar*). BCYE agar je kruta hranjiva podloga s aktivnim ugljenom i kvašćevim ekstraktom. Nakon nasadivanja na podloge bakterija se mora inkubirati 24 do 48 sati pri 37 °C, uz 5 % CO₂.

3.4. Hranjive podloge

U ovome poglavlju biti će pobliže opisane sve hranjive podloge koje su korištene u eksperimentalnom dijelu diplomskog rada, a to su: kvašćev agar, SB i KEA (Kanamicin eskulin azid agar) agar, Les endo agar, TSN (Trypton sulfid neomicin) agar, TTC agar, m-FC agar, te BCYE agar.

Agar s kvašćevim ekstraktom korišten je za određivanje ukupnog broja mikroorganizama na 22 °C i 37 °C. Za ukupan broj bakterija otpipetiramo po 1 ml uzorka i nacijepimo na dvije ploče agara s kvašćevim ekstraktom. Jednu ploču inkubiramo na 22 +/- 2 °C tijekom 68 +/- 4 sata, a drugu ploču inkubiramo na 36 +/- 2 °C tijekom 44 +/- 4 sata. Rezultat izražavamo kao broj bakterija u 1 ml.

Slanetz-bartley ili SB agar je selektivna hranjiva podloga koja se koristi za dokazivanje enterokoka. Sastojci SB agara su 2,3,5-trifeniltetrazolium klorid i natrij azid. Svrha 2,3,5-trifeniltetrazolium klorida je da se reducira u crveno obojeni formazan u prisutnosti enterokoka. S druge strane, natrij azid inhibira rast gram negativnih bakterija. Inkubacija se provodi na 37 °C.

U slučaju da na SB agaru nakon inkubacije narastu crveno obojene kolonije, tada se provodi potvrđni test na KEA agaru. Membrana sa SB agara premjesti se na KEA agar. Zatim slijedi inkubacija na 44 °C u periodu od 2 sata. U tom periodu inkubacije enterokoki hidroliziraju eskulin te se krajnji produkt inkubacije (6,7-dihidroksikumarin) veže s ionima željeza (željezo (III) ioni). Kao produkt toga nastaje tamno obojeni kompleks odnosno tamne (crne) kolonije na KEA agaru.

Za dokazivanje ukupnih koliforma služi nam Les endo agar. Les endo agar sadrži peptone kao izvor ugljika, dušika, vitamina i minerala. Podloga sadrži ekstrakt kvasca (izvor vitamina B-kompleksa) koji stimulira rast bakterija. Podloga od ugljikohidrata sadrži laktozu. Fosfati su puferi. Osmotsku ravnotežu medija održava natrij-klorid. Inhibitori su natrij-dezoksikolat i natrij lauril sulfat. Fuksin je pH indikator. U agar se dodaje natrij sulfit zbog dekolorizacije otopine fuksina. Laktoza fermentirajuće bakterije proizvode acetaldehid. Crvenkasto obojene kolonije nastaju kada acetaldehid reagira s natrij-sulfitom i fuksinom. Kako bakterije proizvode acetaldehid, tako dolazi do razvoja metalnog sjaja. Bezbojne kolonije nastaju rastom laktoza nefermentirajućih bakterija. Aldehid veoma brzo fermentira laktozu. Inkubacija se provodi na 37 °C.

TSN agar (ili TSC agar) je selektivna hranjiva podloga koja se koristi za dokazivanje *Clostridium perfringens*. Inkubacija se provodi u anaerobnim uvjetima odnosno stavljanjem u Gas-Pack sustav. Ovaj agar sadrži ekstrakt kvasca, pepton i triptozu. Ti sastojci osiguravaju nužne nutrijente za rast bakterija (dušik, aminokiseline, vitamine i minerale). Pri proizvodnji H₂S dolazi do reakcije redukcije sulfita u sulfid. Tada, uz prisutnost željezo-amonij-citrata, dolazi do formiranja crnih kolonija. Inkubacija se provodi na 37 °C.

TTC agar je selektivna hranjiva podloga koja se koristi za dokazivanje bakterije *Escherichia coli*. Ova hranjiva podloga sadrži natrij-heptadecil sulfat (Tergitol-7). Natrij-heptadecil sulfat inhibira rast gram pozitivnih bakterija. Ovaj agar je osjetljiv dehidrogenaza indikator. Mehanizam djelovanje je u tome što *E. coli* i koliformne bakterije slabo reduciraju TTC. Žuto-narančaste kolonije označavaju pozitivan porast na TTC agaru. Inkubacija se provodi na 37 °C.

Agar m-FC je selektivna hranjiva podloga koja se koristi za dokazivanje fekalnih koliforma. Ovaj agar sadrži pepton i ekstrakt kvasca koji su glavni izvor nutrijenata za rast bakterija. Žučne soli inhibiraju rast gram pozitivnih bakterija (što i je cilj). Inkubacija se provodi na 44 °C jer pri toj temperaturi fekalni koliformi mogu fermentirati laktozu. Pri fermentaciji dolazi do pojave plavo obojenih kolonija, što označuje pozitivan porast. Druge vrste bakterija formiraju sive kolonije (80).

BCYE agar je selektivna hranjiva podloga koja se koristi za dokazivanje bakterija iz roda *Francisella*, a konkretno u ovome diplomskom radu za dokazivanje *Francisella novicida*. Akronim BCYE dolazi od engleskih riječi *Buffered Charcoal Yeast Extract Agar*. Dakle, agar sadrži aktivni ugljen i puferirani kvašćev ekstrakt. S obzirom da je francizela

zahtjevna za uzgoj, u ovaj agar dodaju se sastojci: treonin, serin, L-cistein, željezov pirofosfat i α -ketoglutarat. Francizela kao izvor ugljika i energije upotrebljava aminokiseline treonin, serin i L-cistein. Uloga alfa-ketoglutarata je da pospješuje rast bakterije. Aktivni ugljen i ekstrakt kvasca sprječavaju oksidaciju L-cisteina. Također, djeluju i detoksitativno i apsorpcijski na produkte razgradnje masnih kiselina. Sastav 1 L BCYE agara je slijedeći: 1000 ml destilirane vode, 25 g agara s kvašćevim ekstraktom i aktivnim ugljenom, 10 g ACES pufera 0.4 g L-cistein-HCl, 1 g α -ketoglutarata, 0.25 g Fe-pirofosfata, te 0.4 g L-cisteina. Pozitivan porast na BCYE agaru vidimo u obliku bijelo-prozirnih pravilno okruglih kolonija.

3.5. Ispitivana voda

Gorski kotar poznat je po vrlo lijepim krajolicima, raznolikošću biljnih i životinjskih vrsta te bogatstvom potoka, jezera i rijeka. Rijeke i potoci obiluju mnogobrojnim vrstama riba poput klena, potočne pastrve, potočne mreke, lipljana, mladice, peša, kalifornijske pastrve itd. Rijeke Gorskog kotara veoma su važne i značajne za opstanak i razvoj tog kraja. Prvenstveno, neke rijeke se koriste za javnu vodoopskrbu - poput rijeke Čabranke, koja se koristi za vodoopskrbu mnogobrojnih naselja na području grada Čabra (detaljnije opisano u poglavlju *Rijeka Čabranka*). Osim za vodoopskrbu, rijeke su i sastavni dio prirodnih znamenitosti te se koriste i kao dio sportsko-ribolovnog turizma (aktivni odmor, relaksacija i sl.) (74).

Dakle, u ovome diplomskom radu proučavan je utjecaj ameba na broj bakterija u riječnoj vodi na uzorku rijeke Čabranke koja se nalazi na području Gorskog kotara, odnosno na području općine Čabar.

3.6. Uzimanje uzoraka

Uzorak vode iz rijeke Čabranke prikupljen je na području donjeg toka te rijeke, stoga je ta rijeka promatrana i proučavana kao rekreacijska voda, odnosno kao voda za kupanje jer se u ljetnim mjesecima lokalno stanovništvo često zna kupati na tom dijelu rijeke Čabranke. Uzorkovanje rijeke Čabranke provelo se na temelju međunarodne norme za uzorkovanje (EN)

ISO 5667. Pravilno uzorkovanje veoma nam je bitno kako bismo dobili reprezentativni uzorak, odnosno onaj uzorak koji po svojim osnovnim karakteristikama nalikuje na cjelinu.

Uzorci rijeke Čabranke uzeti su u čiste staklene boce, prethodno isprane najmanje tri do četiri puta samim uzorkom rijeke Čabranke u trenutku uzorkovanja. S obzirom da smo u laboratorijskom radu nakon inokulacije ameba *A. castellanii* i bakterije *F. novidica* imali tri različite vrste uzorka (opisano u poglavlju *Materijali i metode; Vrste uzorka*), uzorkovano je u tri boce po 2 l uzorka, te još dvije dodatne litre u slučaju potrebe. Uzorci su čuvani u hladnjaku u tamnoj prostoriji na temperaturi između 4 i 10 °C. S analizom uzoraka i eksperimentalnim radom započelo se 24 h nakon uzorkovanja (80).

3.7. Vrste uzoraka

Radi lakšeg snalaženja i preglednijeg prikaza rezultata, uzorak rijeke Čabranke podijeljen je na tri različite vrste uzoraka: *Uzorak 1.*, *Uzorak 2.* te *Uzorak 3.*.

Uzorak 1. nazvali smo uzorak u koji su u 2 l vode iz rijeke Čabranke dodane samo amebe *A. castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (dodano 0. dana, ali nakon pregleda mikrobiologije rijeke Čabranke – da vidimo stanje rijeke bez ikakve inokulacije).

Uzorak 2. nazvali smo uzorak u koji je u 2 l vode iz rijeke Čabranke dodana samo bakterija *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (dodano 0. dana, ali nakon pregleda mikrobiologije rijeke Čabranke – da vidimo stanje rijeke bez ikakve inokulacije).

Uzorak 3. nazvali smo uzorak u koji su u 2 l vode iz rijeke Čabranke dodane istovremeno i amebe *A. castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml i bakterija *F. novicida* također u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (dodano 0. dana, ali nakon pregleda mikrobiologije rijeke Čabranke – da vidimo stanje rijeke bez ikakve inokulacije).

3.8. Metoda membranske filtracije

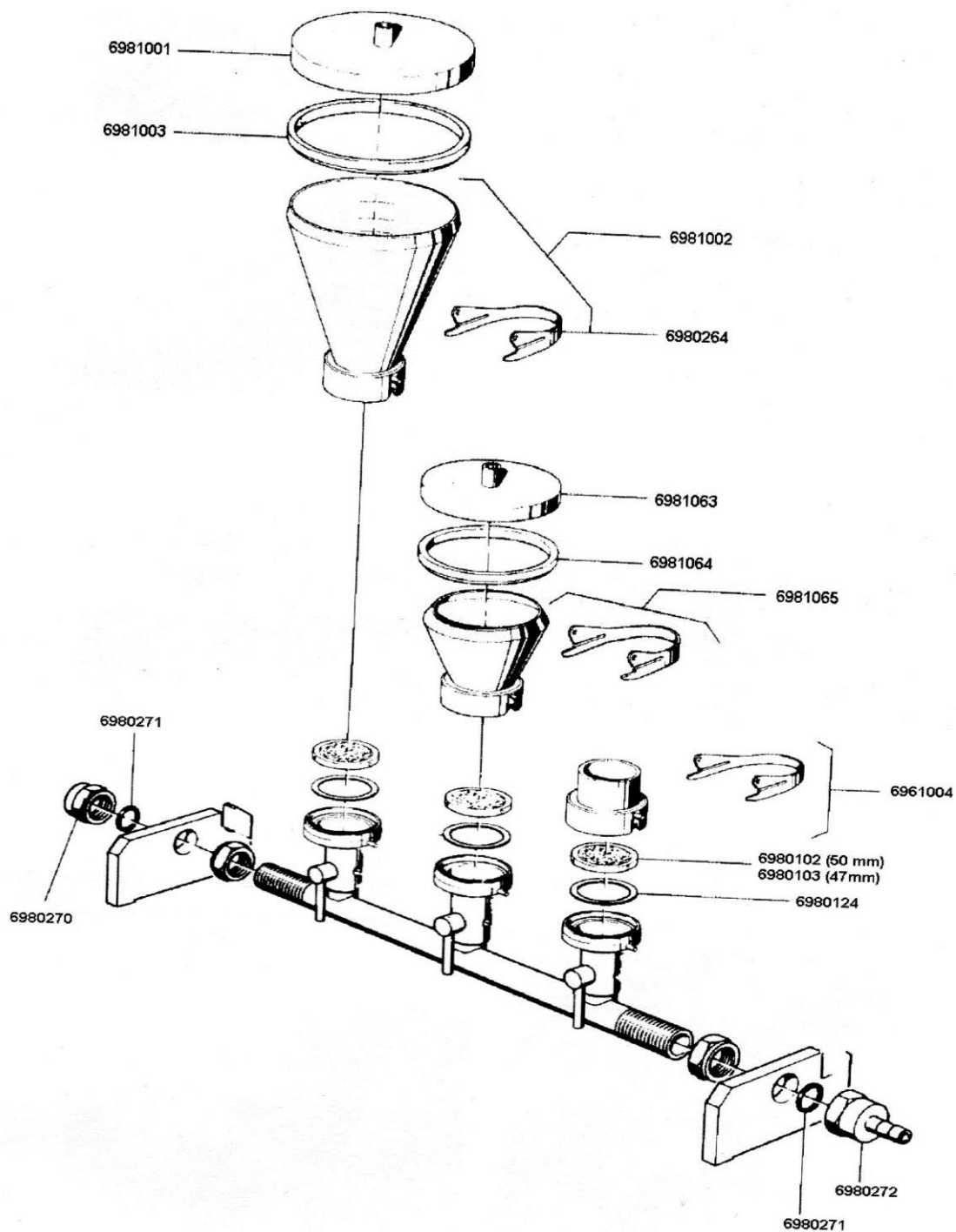
Metodom membranske filtracije određuje se broj bakterija i njihova prisutnost u 100 ml uzorka vode. Stoga je ova metoda i kvantitativna i kvalitativna. Uzorci voda čuvani su u hladnjaku na oko 4 °C. Analiza je započela unutar 24 sata od uzorkovanja.

Uređaj koji se koristi u postupku membranske filtracije naziva se Sartorius uređaj. Sam postupak membranske filtracije sastoji se od nekoliko koraka (Slika 8.). Prvi korak je taj da se dezinficira i očisti radna površina određenim komercijalnim dezinficijensom koji je predviđen za to. Zatim posložimo sav potreban pribor na svoje mjesto; hranjive podloge u jedan red; pakete sa membranskim filterima u područje rukohvata; pripremimo pincetu i staklenu čašu napunjenu alkoholom za dezinfekciju. Bunsenov plamenik smjestimo pokraj višestrukog sustava za filtraciju i upalimo ga (Slika 9a). Zatim uklonimo sva tri lijevaka sa manifolda (cjevovoda), otpustivši klampu (Slika 9b). Lijevaci su izrađeni od nehrđajućeg čelika. Kao dodatna dezinfekcija, potrebno je plamenom prijeći preko držača filtera i metalnog fritra (Slika 9c). Ručkice su u tome procesu cijelo vrijeme u otvorenoj poziciji. Nakon toga ručkice se stave u zatvorenu poziciju, a prije toga se plamenom prijeđe preko donjeg dijela lijevka (Slika 9d). Lijevci se postavljaju na držač filtera. Zatim se plamenom prijeđe cijelim unutrašnjim dijelom lijevka (Slika 9e). Na kraju se plamenom prijeđe i preko poklopca lijevka (Slika 9f). Poklopac se zatim stavlja na lijevak. Držač filtera je sada bio sterilan. Postupak se ponovio i kod ostalih držača filtera.

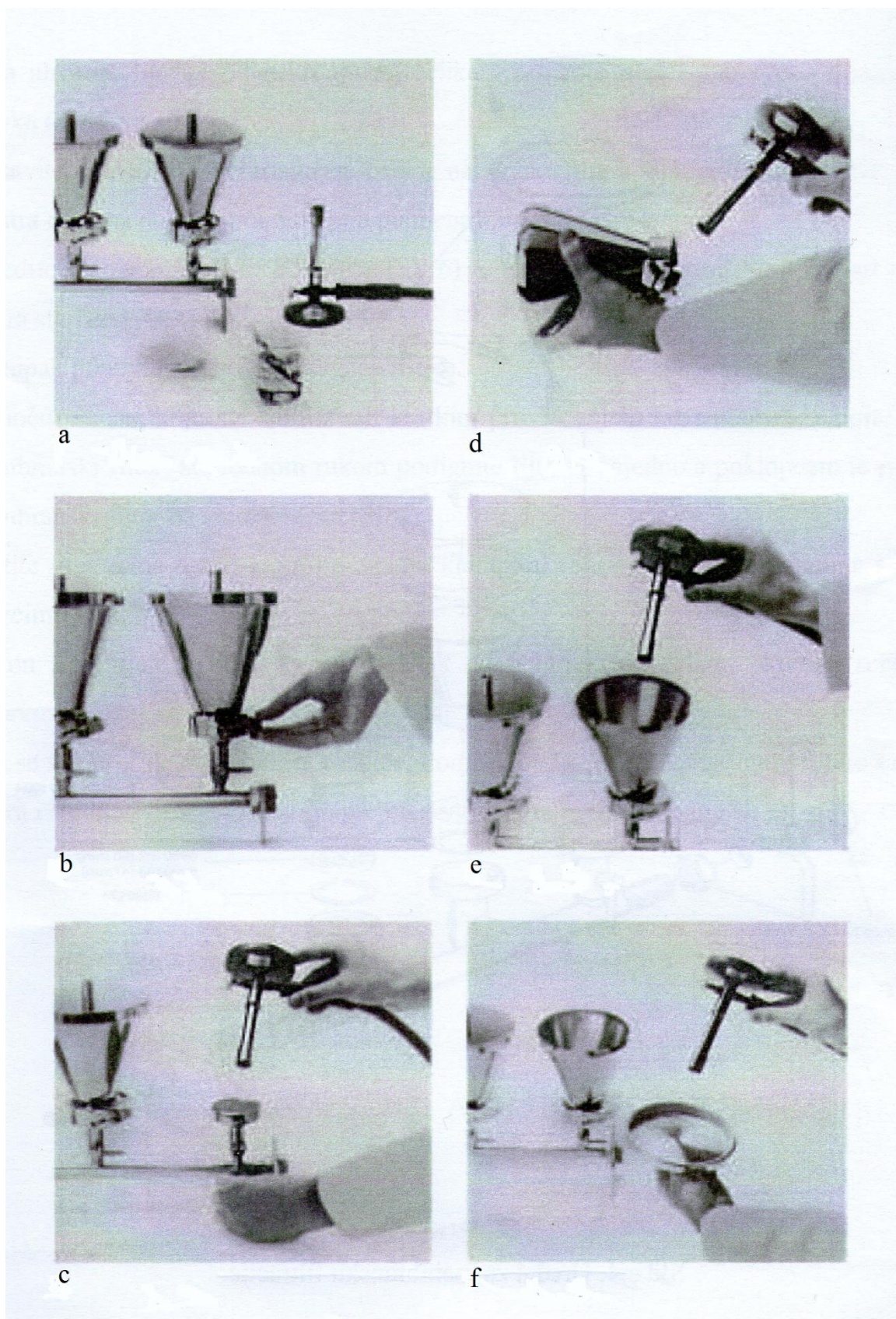
Zatim slijedi postupak stavljanja membranskog filtera. Sterilizirana pinceta kratko se povlači kroz plamen i njome se uzima sterilni membranski filter. Podiže se lijevak s poklopcem, te se membranski filter pažljivo postavlja u središte fritra. Ljevak se zatim vraća na držač filtera i pričvršćuje klampom. Postupak se ponovio i kod ostalih držača filtera.

Zatim se uzorak rijeke Čabranke ulio u svaki od tri lijevaka (po 100 ml). Nakon ulijevanja uzorka, ručkice su stavljene u otvorenu poziciju i upaljena je vakuum pumpa. Zatim se uzorak filtrirao nekoliko sekundi. Nakon što se sve profiltriralo, ugašena je vakuum pumpa te su ručkice stavljene u zatvoreni položaj.

Nakon toga membranski filteri se pažljivo uklanjaju sterilnom pincetom s držača filtera te se stavljaju na hranjivu podlogu. Filter se stavlja na hranjivu podlogu s mrežicom prema gore. Postupak se ponovio i kod ostalih držača filtera (80).



Slika 8. Satorius uređaj za membransku filtraciju. Slika prikazuje trostruki sustav za filtraciju s 500 ml lijevcima (lijevo), sa 100 ml lijevcima (sredina) i sa 40 ml lijevcima (desno). *Izvor: Šantić M., Gobin I., Ožanić M., Marečić V., MIKROBIOLOGIJA HRANE I VODE za studente preddiplomskog studija sanitarnog inženjerstva.*



Slika 9. Priprema uređaja za rad. Izvor: Šantić M., Gobin I., Ožanić M., Marečić V., *MIKROBIOLOGIJA HRANE I VODE* za studente preddiplomskog studija sanitarnog inženjerstva, Rijeka, Medicinski fakultet sveučilišta u Rijeci, Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, 2014.

Međutim, zbog toga što smo očekivali da će se bakterije u uzorku namnožiti te su u pojedine uzorke dodane i amebe, membranska filtracija provedena je samo 0. dana. Broj bakterija je nakon 2, 4, 8 i 10 dana određen nasađivanjem na hranjive podloge, a broj ameba brojenjem koristeći mikroskop.

3.9. Metoda nasađivanja na hranjive podloge

Dakle, kao što je već spomenuto, voda je direktno nasađivana na hranjive podloge. S obzirom na veliki porast broj bakterija, na Les endo i BCYE agar nasađivano je po 10 µl uzoraka. Za ukupni broj bakterija na 22 i 37 °C uzimano je po 1 ml uzorka. Za sve ostale hranjive podloge nasađivano je po 100 µl uzoraka.

U konačnici su rezultati izraženi kao CFU u 100 ml za: enterokoke, ukupne koliforme, *C. perfringens*, *E. coli* te fekalne koliforme. Drugi dio rezultata izražen je kao CFU u 1 ml za: ukupni broj bakterija na 22°C, ukupni broj bakterija na 37°C, prisutnost ameba *A. castellanii*, te porast bakterija *F. novicida*. Na kraju su svi rezultati grafički prikazani kao log od baze 10.

3.10. Inokulacija *Francisella novicida*

U tzv. *Uzorak 2.* i *Uzorak 3.* (opisano u poglavlju *Vrste uzoraka*) inokulirana je bakterija *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (dodano 0. dana, ali nakon pregleda mikrobiologije rijeke Čabranke – da vidimo stanje rijeke bez ikakve inokulacije).

Volumen uzoraka *Uzorak 2.* i *Uzorak 3.* iznosio je 2 l. Kako bismo dobili bakterijsku suspenziju koncentracije $1,0 \times 10^5$ CFU/ml, morali smo pripremiti otopinu kojoj će optička gustoća tj. turbiditet biti jednak 1. Turbiditet otopine određen je pri valnoj duljini od 600 nm, pomoću uređaja koji se naziva spektrofotometar. Prethodno nasađenu *F. novicida* na BCYE agaru prikupimo štapićem. Zatim štapić uronimo u fiziološku otopinu. Nakon toga se suspenzija homogenizira na tresilici. Suspenziju prelijemo u kivetu. Na spektrofotometru najprije mjerimo apsorbanciju za slijepu probu, a slijepa proba nam je fiziološka otopina (ili obična voda u kojoj se ne nalazi francizela). Zatim ponovimo isti postupak za našu pripremljenu otopinu, a cilj nam je dobiti apsorbanciju koja je približno jednaka 1. Naime, na

temelju višegodišnje laboratorijske prakse utvrđeno je da ako nam apsorbancija iznosi 1, to znači da je koncentracija bakterija jednaka $1,0 \times 10^9$ CFU/ml.

Međutim, nama je cilj bio pripremiti bakterijsku suspenziju koncentracije $1,0 \times 10^5$ CFU/ml. Da bismo dobili tu koncentraciju, proveden je izračun koji prikazuje Slika 10.. Rezultati izračuna bili su slijedeći: u uzorak od 2 l potrebno je dodati 200 μ l suspenzije, da bi nam u konačnici koncentracija francizele u boci od 2 l iznosila $1,0 \times 10^5$ CFU/ml. Dakle, francizela je inokulirana u *Uzorak 2.* i *Uzorak 3.*

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

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

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

$$V_2 = 2 \text{ L} = 2\,000 \text{ mL}$$

$$1 \times 10^9 \text{ CFU/mL} \times V_1 = 1 \times 10^5 \text{ CFU/mL} \times 2\,000 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{1 \times 10^5 \text{ CFU/mL} \times 2\,000 \text{ mL}}{1 \times 10^9 \text{ CFU/mL}}$$

$$V_1 = 1 \times 10^5 \times 2\,000 \text{ mL} \times 1 \times 10^{-9}$$

$$\underline{\underline{V_1(2\,000 \text{ mL}) = 0.2 \text{ mL} = 200 \mu\text{l}}} \rightarrow \text{Količina suspenzije koja se dodaje u 2 L uzorka.}$$

Slika 10. Izračun dobivanja bakterijske suspenzije koncentracije 1×10^5 CFU/ml.

3.11. Inokulacija *Acanthamoeba castellanii*

U tzv. *Uzorak 1.* i *Uzorak 3.* (opisano u poglavlju *Vrste uzoraka*) inokulirana je ameba *Acanthamoeba castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (dodano 0. dana, ali nakon pregleda mikrobiologije rijeke Čabranke – da vidimo stanje rijeke bez ikakve inokulacije).

Dakle, broj ameba smo odredili u Neubauer komorici (opisano u poglavlju *Postupak brojenja ameba pomoću Neubauer komorice*), i izračunali smo volumen koji nam je potreban da bi u našim uzorcima dobili $1,0 \times 10^5$ CFU/ml ameba.

Najprije smo 10 µl medija koji sadrži amebe (PYG medij) stavili Neubauer komoricu i izbrojili smo da u njemu imamo oko 1000 ameba, odnosno kada to preračunamo prema pravilima dobiveno je da u mediju imamo $1,0 \times 10^5$ CFU/ml ameba (opisano u poglavlju *Postupak brojenja ameba pomoću Neubauer komorice*).

Međutim, nama je cilj bio pripremiti suspenziju koja sadrži $1,0 \times 10^5$ CFU/ml ameba. Da bismo dobili tu koncentraciju, proveden je izračun koji prikazuje Slika 11. Rezultati izračuna bili su slijedeći: u uzorak od 2 l potrebno je dodati 20 ml suspenzije, da bi nam u konačnici suspenzija sadržavala $1,0 \times 10^5$ CFU/ml ameba. Dakle, amebu *Acanthamoeba castellanii* inokulirali smo u *Uzorak 1.* i *Uzorak 3.*

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

$$c_1 = 1 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$$

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

$$V_2 = 2 \text{ L} = 2\,000 \text{ mL}$$

$$1 \times 10^7 \text{ CFU/mL} \times V_1 = 1 \times 10^5 \text{ CFU/mL} \times 2\,000 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1 \times 10^5 \text{ CFU/mL} \times 2\,000 \text{ mL} / 1 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$$

$$V_1 = 1 \times 10^5 \times 2\,000 \text{ mL} \times 1 \times 10^{-7}$$

$$\underline{\underline{V_1(2\,000 \text{ mL}) = 20 \text{ mL}}} \rightarrow \text{Količina suspenzije koja se dodaje u 2 L uzorka.}$$

Slika 11. Izračun dobivanja suspenzije koja sadrži 1×10^5 CFU/ml ameba.

3.12. Postupak određivanja broja bakterija

Broj bakterija u tri različita tipa uzoraka (*Uzorak 1.*, *Uzorak 2.*, *Uzorak 3.*) određivan je 0. dana, 2. dana, 4. dana, 8. dana i 10. dana. Kao što je već rečeno, 0. dana određivana je mikrobiologija rijeke Čabranke bez ikakve inokulacije ameba ili francizela – da vidimo stanje

rijeke prije ikakve laboratorijske inokulacije. Nadalje, 2., 4., 8. i 10. dana pratilo se stanje u uzorcima nakon inokulacije ameba i/ili francizela. Nakon inkubacije, propisane za pojedinu vrstu hranjive podloge, brojale su se porasle kolonije (engl. *Colony Forming Units*, CFU).

3.13. Statistička obrada podataka

Rezultati su obrađeni pomoću programa Microsoft® Office Excel i Microsoft® Office Word. U tim programima izrađene su tablice te grafovi. Svi rezultati prikazani su u obliku logaritma s bazom 10 (\log_{10} CFU/ml). Izračunata je i standardna devijacija te srednja vrijednost rezultata. Rezultati su prikazani tablično i grafički. Za statističku usporedbu između uzorak korišten je i program GraphPad Prism 6.0. Normalnost distribucije svih parametara je utvrđena. Uzorci kod kojih je utvrđena normalna distribucija analizirani su parametrijskim Student t – testom.

4. REZULTATI

Prikaz rezultata ovog diplomskog rada podijeljen je u dva dijela. U prvom dijelu prikazan je broj bakterija i ameba pojedinačno za svaki od tri vrste uzoraka, a u drugome dijelu napravljena je istovremena usporedba rezultata između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.*

4.1. Broj bakterija i ameba u *Uzorku 1.*, *2.* i *3.*

U prvom dijelu rezultata prikazan je broj bakterija i ameba pojedinačno za svaki od tri vrste uzoraka (*Uzorak 1.*, *Uzorak 2.* i *Uzorak 3.*) u obliku tablica i grafova.

Rezultati su izražavani kao CFU/ml za: ukupni broj bakterija na 22 °C, ukupni broj bakterija na 37 °C, prisutnost ameba *A. castellanii* te porast bakterija *F. novicida*. Ostali rezultati izražavani su kao CFU/100 ml (enterokoki, ukupni koliformi, *C. perfringens*, *E. coli* te fekalni koliformi). Svi rezultati su grafički prikazani i izraženi kao log od baze 10.

4.1.1. Mikrobiologija rijeke Čabranke nakon dodatka ameba *Acanthamoeba castellanii*

Kao što je prethodno opisano u poglavlju „*Materijali i metode; Hranjive podloge*“, u eksperimentalnom radu su korištene mnoge hranjive podloge. Cilj korištenja svih hranjivih podloga bio je ispitati mikrobiologiju vode iz rijeke Čabranke, prije i nakon dodatka ameba *A. castellanii*, u razdoblju od 10 dana (*Uzorak 1.*).

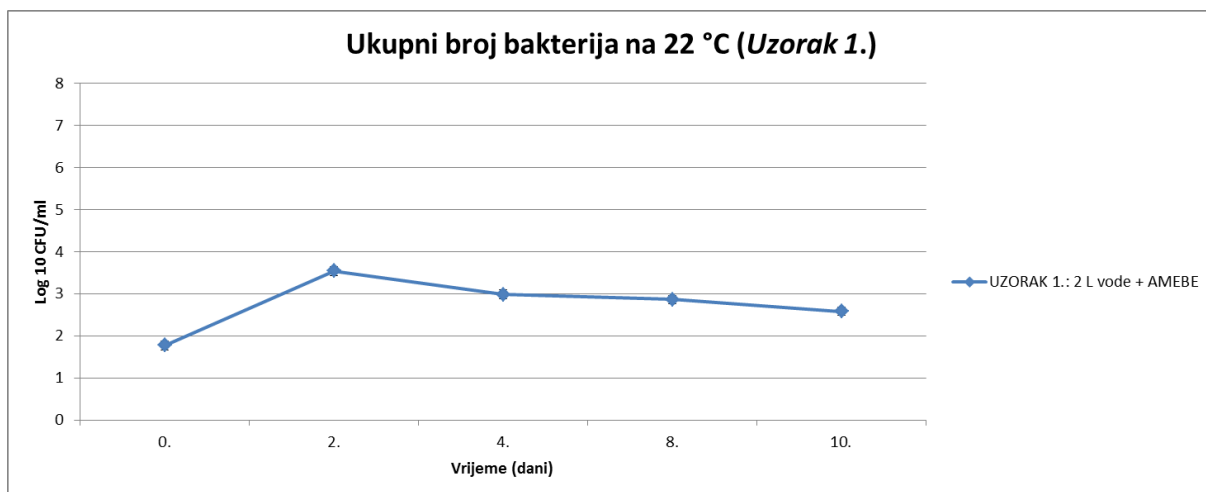
Kao što je već opisano, *Uzorak 1.* nazvali smo uzorak u koji su u 2 l vode iz rijeke Čabranke dodane samo amebe *A. castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (opisano u poglavlju „*Materijali i metode; Vrste uzoraka*“). U *Uzorku 1.* praćen je broj: ukupnih bakterija na 22 °C, ukupnih bakterija na 37 °C, enterokoka, ukupnih koliforma, *C. perfringens*, *E. coli*, fekalnih koliforma te ameba *A. castellanii* u razdoblju od 10 dana (Tablica 3.).

Tablica 3. Mikrobiologija uzorka rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) u razdoblju od 10 dana (*Uzorak 1.*).

Uzorak 1.: 2 l uzorka vode + amebe (<i>Acanthamoeba castellanii</i>)					
HRANJIVA PODLOGA / DAN	DAN 0.	DAN 2.	DAN 4.	DAN 8.	DAN 10.
UBB na 22°C	56 CFU/ml	3 424 CFU/ml	960 CFU/ml	720 CFU/ml	376 CFU/ml
UBB na 37°C	40 CFU/ml	712 CFU/ml	128 CFU/ml	456 CFU/ml	160 CFU/ml
SB → KEA	$1,440 \times 10^3$ CFU/100 ml	$1,212 \times 10^6$ CFU/100 ml	$4,32 \times 10^5$ CFU/100 ml	$6,56 \times 10^5$ CFU/100 ml	$2,24 \times 10^5$ CFU/100 ml
LesEndo	$1,040 \times 10^3$ CFU/100 ml	$3,0 \times 10^6$ CFU/100 ml	$1,6 \times 10^7$ CFU/100 ml	$1,3 \times 10^7$ CFU/100 ml	$1,6 \times 10^7$ CFU/100 ml
TSN	42 CFU/100 ml	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta
TTC	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta
m-FC	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta

4.1.1.1. Ukupni broj bakterija na 22 °C u *Uzorku 1.*

Ukupni broj bakterija na 22 °C u *Uzorku 1.* nultog dana (0. dan) iznosio je 56 CFU/mL (neposredno prije inokulacije *A. castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Drugoga dana broj se povećao na 3 424 CFU/ml (dan 2.). Nadalje, broj je počeo opadati na 960 CFU/ml (dan 4.), zatim je pao na 720 CFU/ml (dan 8.), te je u konačnici (10. dan) broj pao na 376 CFU/ml (Tablica 3., Slika 12.).

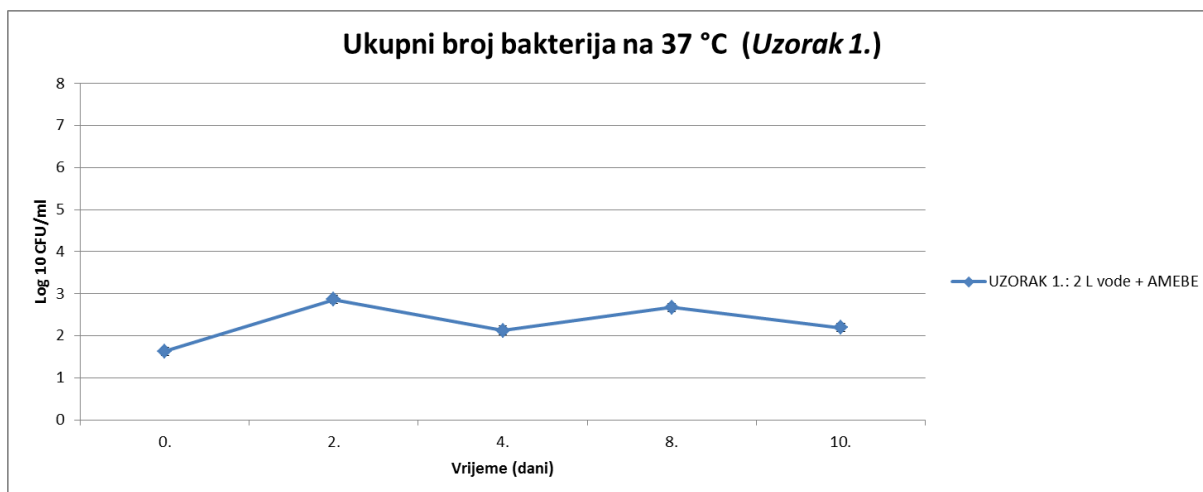


Slika 12. Ukupni broj bakterija na 22 °C u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) u razdoblju od 10 dana (Uzorak 1.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 22 °C na kvaščevom agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je desetog dana nakon inokulacije ukupni broj bakterija na 22 °C ipak bio nešto veći nego na samom početku pokusa (0. dana), ali možemo zaključiti da ima tendenciju prema padu, odnosno kako vrijeme prolazi, tako je ukupni broj bakterija na 22 °C sve manji. Iznimka je jedino period između 0. i 2. dana kada je došlo do porasta broja bakterija (Slika 12.).

4.1.1.2. Ukupni broj bakterija na 37 °C u Uzorku 1.

Ukupni broj bakterija na 37 °C u *Uzorku 1.* nultog dana (0. dan) iznosio je 40 CFU/mL (neposredno prije inokulacije *A. castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Drugoga dana broj se povećao na 712 CFU/ml (dan 2.). Nadalje, broj je počeo opadati na 128 CFU/ml (dan 4.). Osmog dana došlo je ponovno do laganog porasta broja bakterija na 456 CFU/ml (dan 8.), te je u konačnici (10. dan) broj pao na 160 CFU/ml (Tablica 3., Slika 13.).

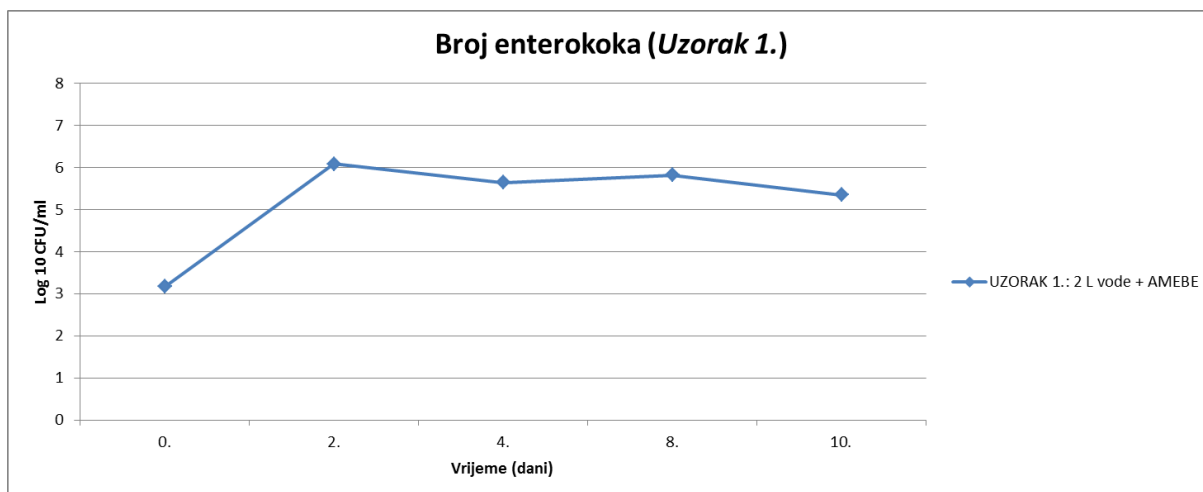


Slika 13. Ukupni broj bakterija na 37 °C u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) u razdoblju od 10 dana (Uzorak 1.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na kvašćevom agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se ponovno vidjeti kako je desetog dana nakon inokulacije ukupni broj bakterija na 37 °C ipak bio nešto veći nego na samom početku pokusa (0. dana), ali možemo zaključiti da ima tendenciju prema padu kako vrijeme prolazi. Iznimka je period između 0. i 2. dana kada je došlo do naglog porasta broja bakterija, te je također i u prijelazu s 4. na 8. dan zabilježen lagani porast broja bakterija, ali 10. dana ponovno dolazi do pada broja bakterija (Slika 13.).

4.1.1.3. Broj enterokoka u Uzorku 1.

Broj enterokoka u *Uzorku 1.* nultog dana (0. dan) iznosio je $1,440 \times 10^3$ CFU/100 mL (neposredno prije inokulacije *A. castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Drugoga dana broj se drastično povećao na $1,212 \times 10^6$ CFU/100 ml (dan 2.). Nadalje, broj je počeo lagano opadati na $4,32 \times 10^5$ CFU/100 ml (dan 4.). Osmog dana došlo je ponovno do laganog porasta broja bakterija na $6,56 \times 10^5$ CFU/100 ml (dan 8.), te je u konačnici (10. dan) broj ponovno lagano pao na $2,24 \times 10^5$ CFU/100 ml (Tablica 3., Slika 14.).

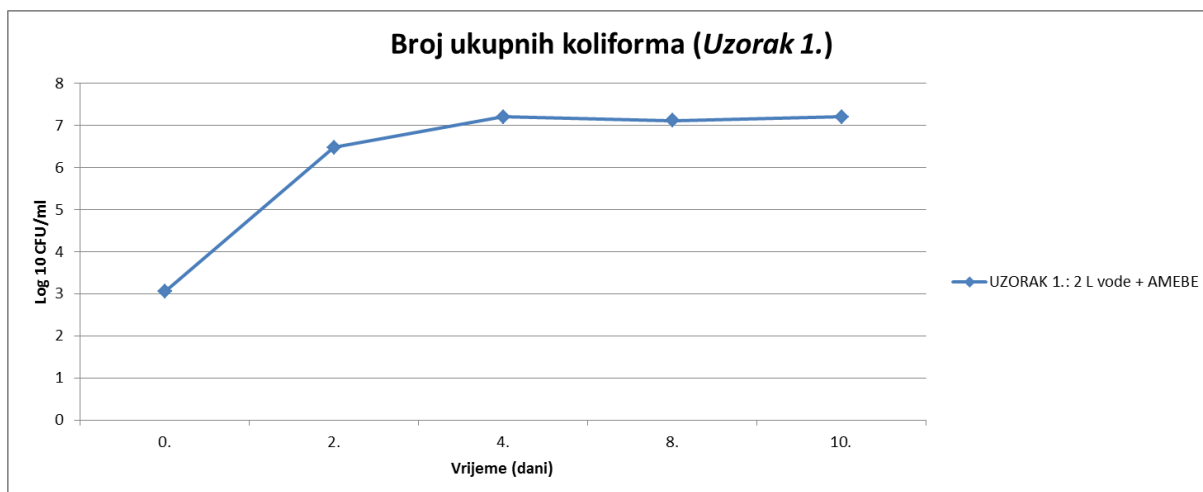


Slika 14. Broj enterokoka u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) u razdoblju od 10 dana (Uzorak 1.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na SB agaru, a nakon toga radi se potvrdni test na KEA agaru koji je prethodno zagrijan na 44 °C. Broj enterokoka praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je desetog dana nakon inokulacije broj enterokoka bio znatno veći nego na samom početku pokusa (0. dana). Na prijelazu iz 0. na 2. dan došlo je do velikog porasta broja bakterija. Zatim je broj bakterija lagano varirao, ali možemo zaključiti kako je i 10. dana broj enterokoka još uvijek bio poprilično visok, iako je lagano počeo opadati (Slika 14.).

4.1.1.4. Broj ukupnih koliforma u Uzorku 1.

Broj ukupnih koliforma u *Uzorku 1.* nultog dana (0. dan) iznosio je $1,040 \times 10^3$ CFU/100 mL (neposredno prije inokulacije *A. castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Drugoga dana broj se drastično povećao na $3,0 \times 10^6$ CFU/100 ml (dan 2.). Nadalje, broj se nastavljao lagano povećavati na $1,6 \times 10^7$ CFU/100 ml (dan 4.), zatim je lagano pao na $1,3 \times 10^7$ CFU/100 ml (dan 8.), te je u konačnici desetog dana nakon inokulacije broj iznosio $1,6 \times 10^7$ CFU/100 ml (Tablica 3., Slika 15.).

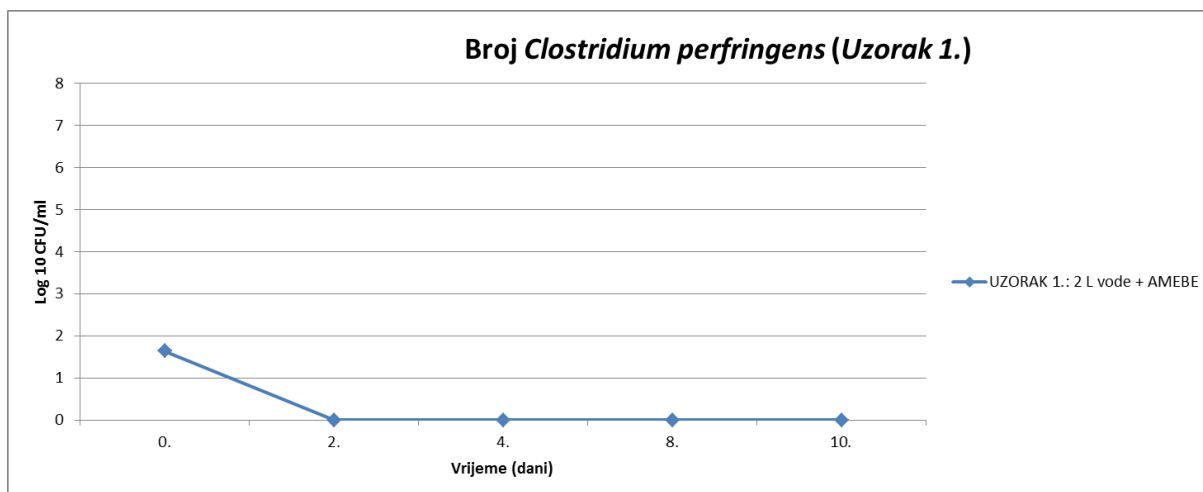


Slika 15. Broj ukupnih koliforma u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) u razdoblju od 10 dana (Uzorak 1.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na Les endo agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je desetog dana nakon inokulacije broj ukupnih koliforma bio poprilično veći nego na samom početku pokusa (0. dana). Na prijelazu iz 0. na 2. dan došlo je do velikog porasta broja bakterija. Broj ukupnih koliforma je u periodu od 2. do 10. dana nastavljao lagano rasti, ali bez drastičnih promjena (Slika 15.).

4.1.1.5. Broj *Clostridium perfringens* u Uzorku 1.

Broj *Clostridium perfringens* u Uzorku 1. nultog dana (0. dan) iznosio je 42 CFU/100 mL (neposredno prije inokulacije *A. castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Sljedećih dana (2., 4., 8. i 10. dan) nije zabilježen porast *C. perfringens* na hranjivim podlogama (Tablica 3., Slika 16.).

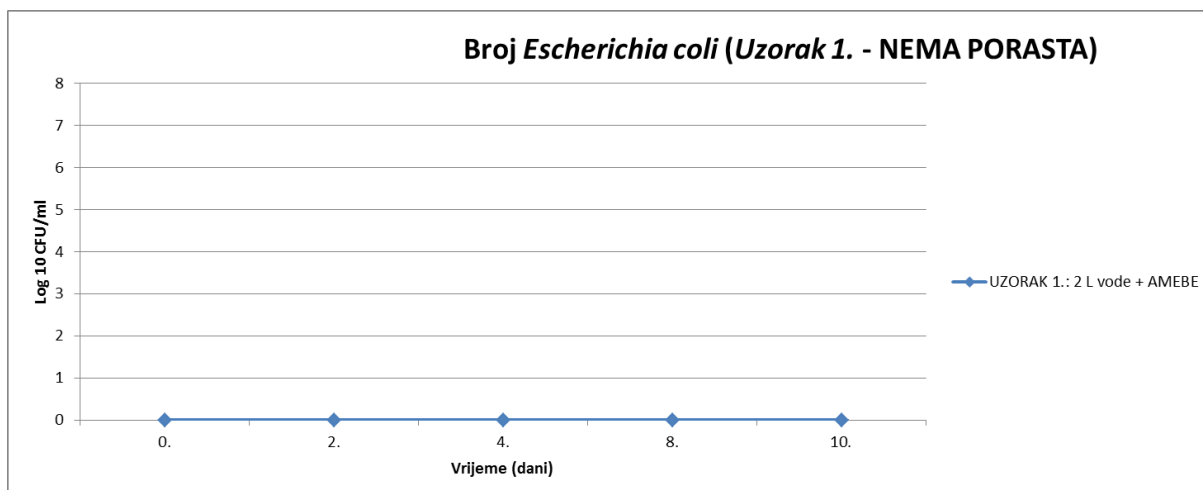


Slika 16. Broj *Clostridium perfringens* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) u razdoblju od 10 dana (Uzorak 1.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na TSN agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je nakon dodatka ameba *Acanthamoeba castellanii* broj *C. perfringens* već drugog dana pao na nulu. Desetog dana nakon inokulacije je broj *C. perfringens* bio jednak nuli, odnosno nije zabilježen porast na hranjivim podlogama (Slika 16.).

4.1.1.6. Broj *Escherichia coli* u Uzorku 1.

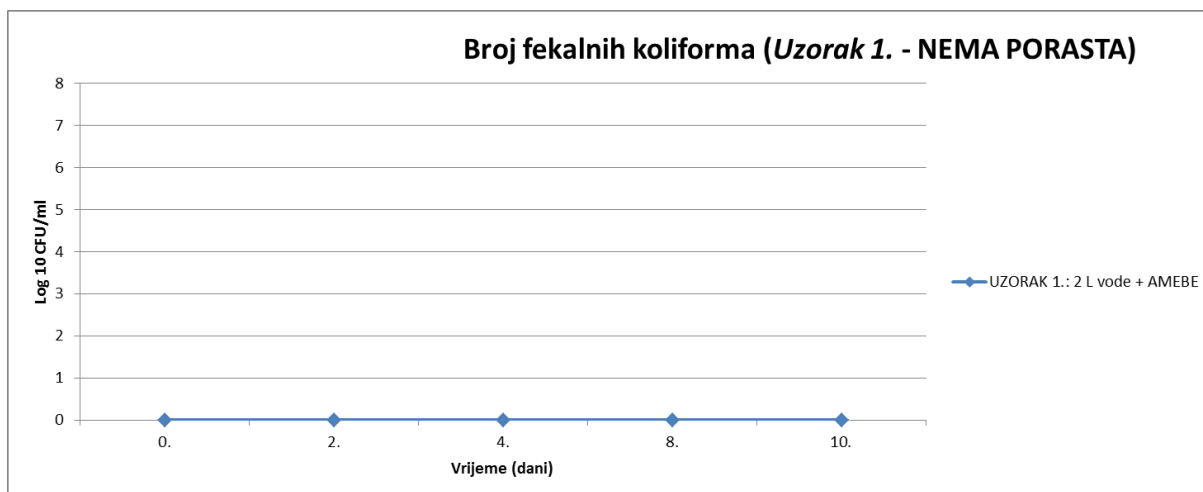
U periodu od 0. do 10. dana nije zabilježen porast *E. coli* u Uzorku 1., ni prije ni nakon inokulacije *A. castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (Tablica 3., Slika 17.)



Slika 17. Broj *Escherichia coli* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) u razdoblju od 10 dana (Uzorak 1.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na TTC agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

4.1.1.7. Broj fekalnih koliforma u Uzorku 1.

U periodu od 0. do 10. dana nije zabilježen porast fekalnih koliforma u *Uzorku 1.*, ni prije ni nakon inokulacije *A. castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (Tablica 3., Slika 18.).



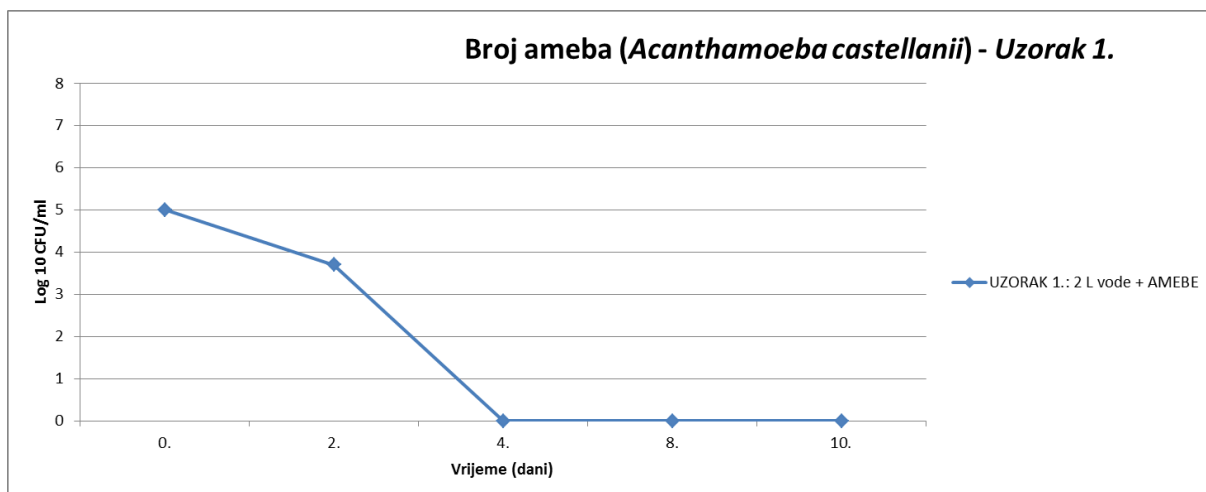
Slika 18. Broj fekalnih koliforma u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) u razdoblju od 10 dana (Uzorak 1.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 44 °C na m-FC agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

4.1.2. Broj ameba *Acanthamoeba castellanii* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba *Acanthamoeba castellanii*

Nultoga dana (0. dan) u *Uzorak 1.* inokulirana je *A. castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml. Drugog dana broj ameba pao je na $5,0 \times 10^3$ CFU/ml. Četvrtog (4.dan), osmog (8.dan) i desetog (10.dan) dana nije zabilježna prisutnost ameba *A. castellanii* u *Uzorku 1.* (Tablica 4., Slika 19.).

Tablica 4. Broj ameba u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) u razdoblju od 10 dana (Uzorak 1.).

Uzorak 1.: 2 l uzorka vode + amebe (<i>Acanthamoeba castellanii</i>)					
HRANJIVA PODLOGA / DAN	DAN 0.	DAN 2.	DAN 4.	DAN 8.	DAN 10.
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	$1,0 \times 10^5$ CFU/ml	$5,0 \times 10^3$ CFU/ml	nisu prisutne	nisu prisutne	nisu prisutne



Slika 19. Broj ameba *Acanthamoeba castellanii* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) u razdoblju od 10 dana (Uzorak 1.). Broj ameba praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je nakon dodatka ameba *A. castellanii* broj već drugog dana počeo opadati. Nakon 4. dana nije zabilježena prisutnost *A. castellanii* u Uzorku 1. (Slika 19.).

4.1.3. Mikrobiologija rijeke Čabranke nakon dodatka *Francisella novicida*

Kao što je prethodno opisano u poglavlju „*Materijali i metode; Hranjive podloge*“, u eksperimentalnom radu su korištene mnoge hranjive podloge. Cilj korištenja svih hranjivih podloga bio je ispitati mikrobiologiju ispitivane vode iz rijeke Čabranke, prije i nakon dodatka bakterije *F. novicida*, u razdoblju od 10 dana (Uzorak 2.).

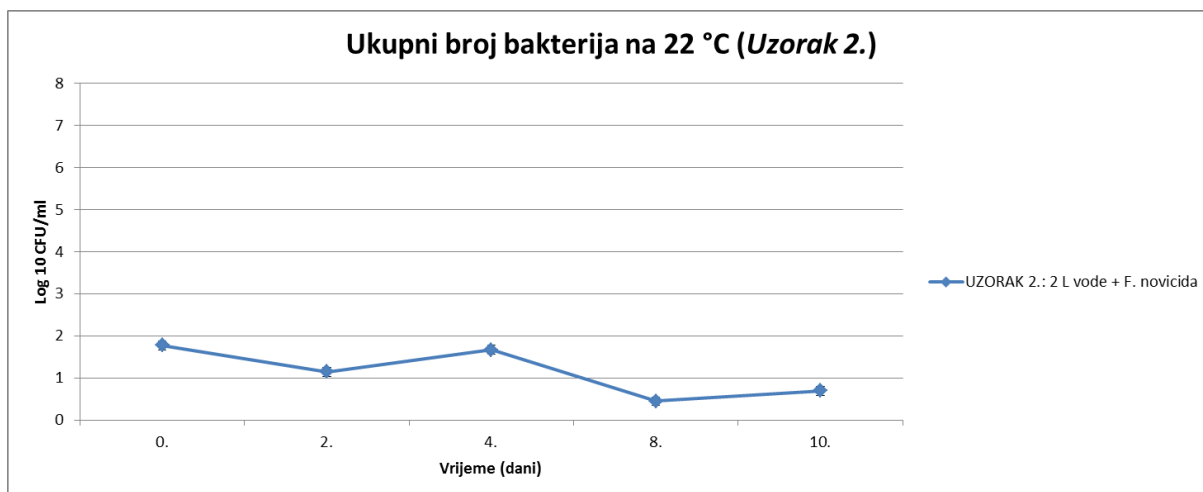
Kao što je već opisano, Uzorak 2. nazvali smo uzorak u koji je u 2 l vode iz rijeke Čabranke dodana samo bakterija *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (opisano u poglavlju „*Materijali i metode; Vrste uzoraka*“. U Uzorku 2. praćen je broj: ukupnih bakterija na 22 °C, ukupnih bakterija na 37 °C, enterokoka, ukupnih koliforma, *C. perfringens*, *E. coli*, fekalnih koliforma te bakterije *F. novicida* u razdoblju od 10 dana (Tablica 5.).

Tablica 5. Mikrobiologija uzorka rijeke Čabranke nakon dodatka *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (*Uzorak 2.*).

<i>Uzorak 2.: 2 l uzorka vode + Francisella novicida</i>					
HRANJIVA PODLOGA / DAN	DAN 0.	DAN 2.	DAN 4.	DAN 8.	DAN 10.
UBB na 22°C	56 CFU/ml	12 CFU/ml	44 CFU/ml	2 CFU/ml	4 CFU/ml
UBB na 37°C	40 CFU/ml	40 CFU/ml	124 CFU/ml	6 CFU/ml	2 CFU/ml
SB → KEA	1,440 x 10 ³ CFU/100 ml	1,6 x 10 ⁴ CFU/100 ml	1,4 x 10 ⁴ CFU/100 ml	nema porasta	nema porasta
LesEndo	1,040 x 10 ³ CFU/100 ml	3,0 x 10 ³ CFU/100 ml	nema porasta	nema porasta	nema porasta
TSN	42 CFU/100 ml	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta
TTC	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta
m-FC	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta

4.1.3.1. Ukupni broj bakterija na 22 °C u *Uzorku 2.*

Ukupni broj bakterija na 22 °C u *Uzorku 2.* nultog dana (0. dan) iznosio je 56 CFU/mL (neposredno prije inokulacije *F. novicida* u koncentraciji od 1,0 x 10⁵ CFU/ml). Drugoga dana broj je pao na 12 CFU/ml (dan 2.). Nadalje, broj je lagano porastao na 44 CFU/ml (dan 4.). Zatim je broj počeo opadati na 2 CFU/ml (dan 8.) te je desetog dana nakon inokulacije iznosio 4 CFU/ml (dan 10.) (Tablica 5., Slika 20.).

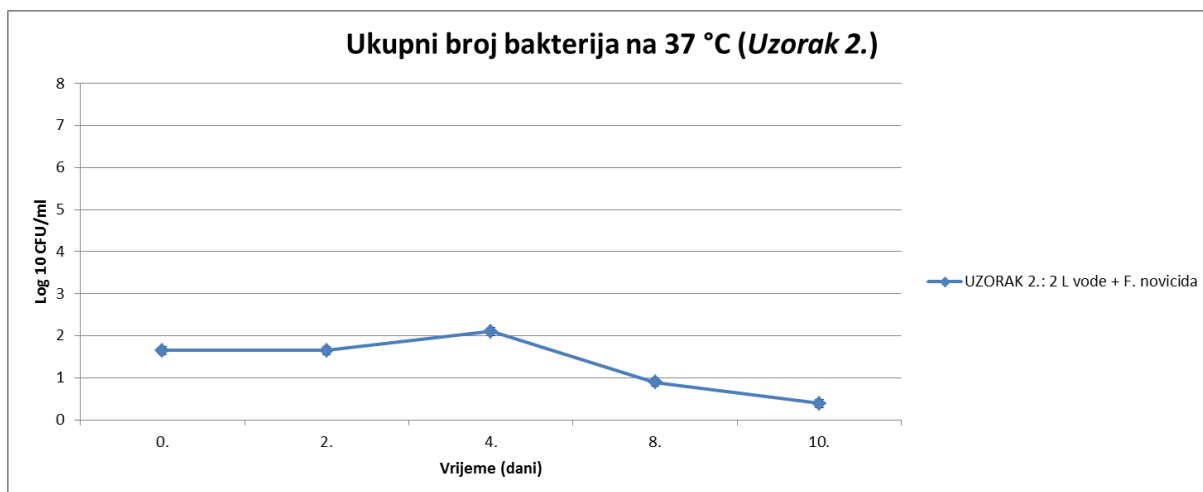


Slika 20. Ukupni broj bakterija na 22 °C u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 2.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 22 °C na kvašćevom agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je desetog dana nakon inokulacije ukupni broj bakterija na 22 °C bio manji nego na samom početku pokusa (0. dana), te gotovo da i nije bilo porasta 10. dana (samo 4 CFU/ml). Iznimka je jedino period između 2. i 4. dana kada je došlo do laganog porasta broja bakterija, ali ipak možemo zaključiti da UBB na 22 °C s vremenom opada (Slika 20.).

4.1.3.2. Ukupni broj bakterija na 37 °C u Uzorku 2.

Ukupni broj bakterija na 37 °C u Uzorku 2. nultog dana (0. dan) iznosio je 40 CFU/mL (neposredno prije inokulacije *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Drugoga dana broj bakterija je također iznosio 40 CFU/ml (dan 2.). Nadalje, broj je porastao na 124 CFU/ml (dan 4.). Osmog dana (dan 8.) broj je pao na 6 CFU/ml, a desetog dana (dan 10.) na 2 CFU/ml (Tablica 5., Slika 21.).

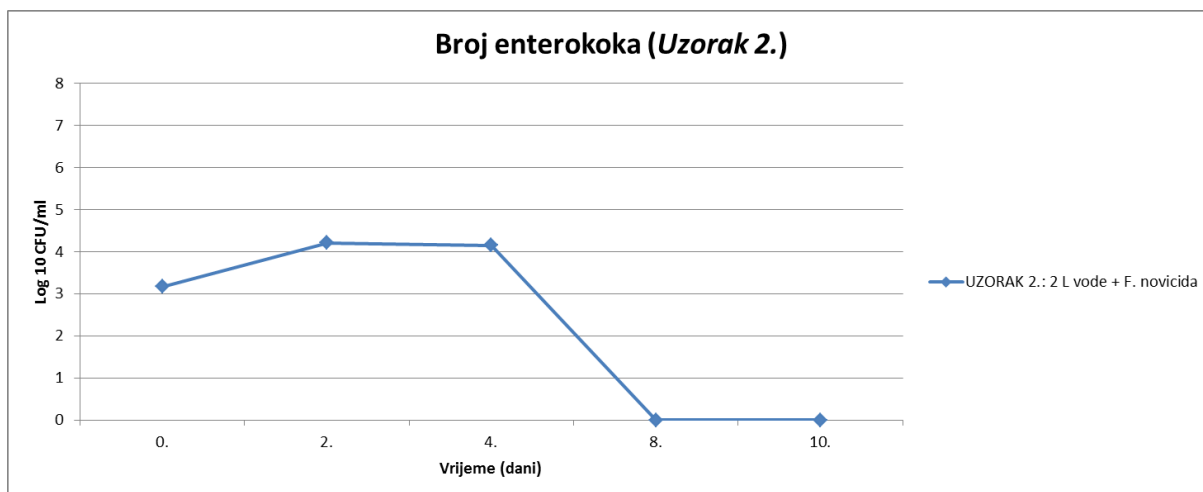


Slika 21. Ukupni broj bakterija na 37 °C u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 2.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na kvašćevom agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je desetog dana nakon inokulacije ukupni broj bakterija na 37 °C bio manji nego na samom početku pokusa (0. dana) te gotovo da i nije bilo porasta nakon 10. dana (samo 2 CFU/ml). Iznimka je jedino period između 2. i 4. dana kada je došlo do laganog porasta broja bakterija, ali ipak možemo zaključiti da UBB na 37 °C s vremenom opada, kao i kod slučaja s UBB na 22 °C (Slika 21.).

4.1.3.3. Broj enterokoka u Uzorku 2.

Broj enterokoka u *Uzorku 2.* nultog dana (0. dan) iznosio je $1,440 \times 10^3$ CFU/100 mL (neposredno prije inokulacije *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Drugoga dana broj se povećao na $1,6 \times 10^4$ CFU/100 ml (dan 2.). Nadalje, broj je počeo lagano opadati na $1,4 \times 10^4$ CFU/100 ml (dan 4.). Osmog dana (dan 8.) i desetog dana (dan 10.) nije zabilježen porast enterokoka na hranjivim podlogama (Tablica 5., Slika 22.).

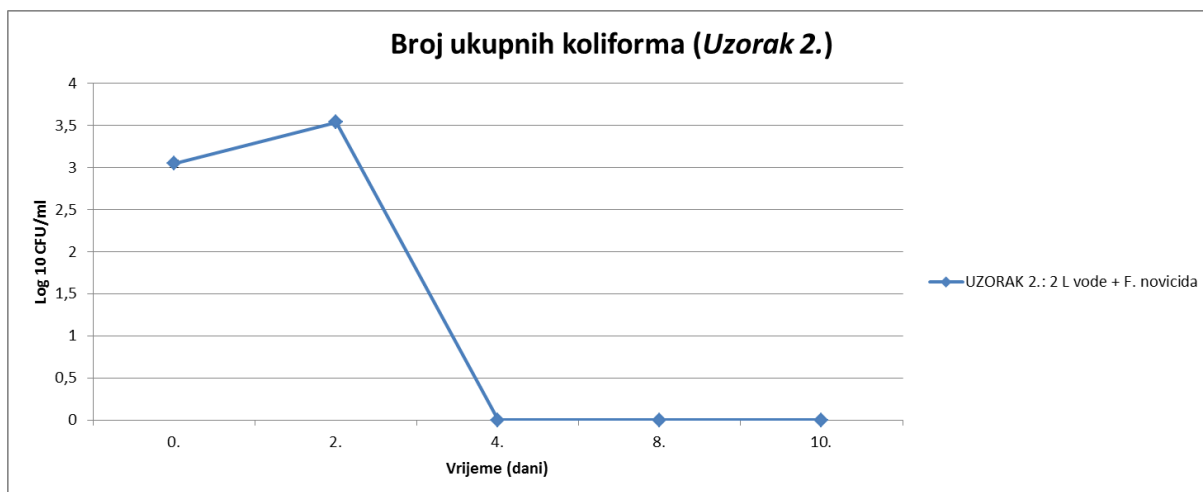


Slika 22. Broj enterokoka u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 2.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na SB agaru, a nakon toga radi se potvrdni test na KEA agaru koji je prethodno zagrijan na 44 °C. Broj enterokoka praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako desetog dana nakon inokulacije broj enterokoka pao na nulu. Na prijelazu iz 0. na 2. dan došlo je do laganog porasta broja enterokoka, ali nakon toga slijedio je pad broja enterokoka u ispitivanom uzorku (Slika 22.).

4.1.3.4. Broj ukupnih koliforma u Uzorku 2.

Broj ukupnih koliforma u *Uzorku 2.* nultog dana (0. dan) iznosio je $1,040 \times 10^3$ CFU/100 mL (neposredno prije inokulacije *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Drugoga dana broj se povećao na $3,0 \times 10^3$ CFU/100 ml (dan 2.). Nadalje, četvrtog (dan 4.), osmog (dan 8.) i desetog dana (dan 10.) nije zabilježen porast ukupnih koliforma na hranjivim podlogama, odnosno bio je jednak nuli (Tablica 5., Slika 23.).

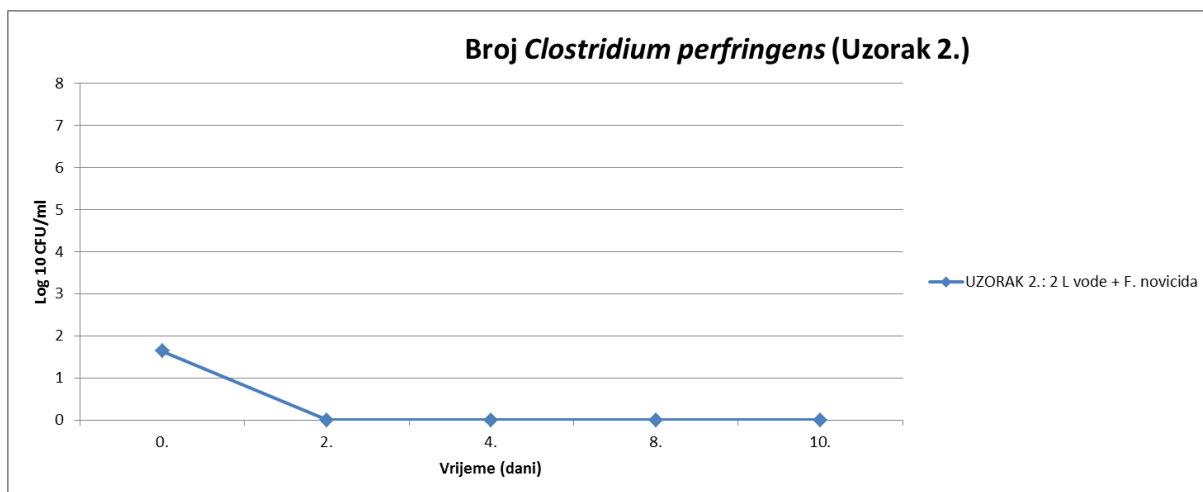


Slika 23. Broj ukupnih koliforma u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 2.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na Les endo agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je već četvrtog dana nakon inokulacije broj ukupnih koliforma pao na nulu. Između 0. i 2. dan došlo je do laganog porasta broja enterokoka, ali nakon toga slijedio je pad broja enterokoka, te od četvrtog dana (dan 4.) nije zabilježen porast ukupnih koliforma na hranjivim podlogama (Slika 23.).

4.1.3.5. Broj *Clostridium perfringens* u Uzorku 2.

Broj *C. perfringens* u Uzorku 2. nultog dana (0. dan) iznosio je 42 CFU/100 mL (neposredno prije inokulacije *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Sljedećih dana (2., 4., 8. i 10. dan) nije zabilježen porast *C. perfringens* na hranjivim podlogama (Tablica 5., Slika 24.).

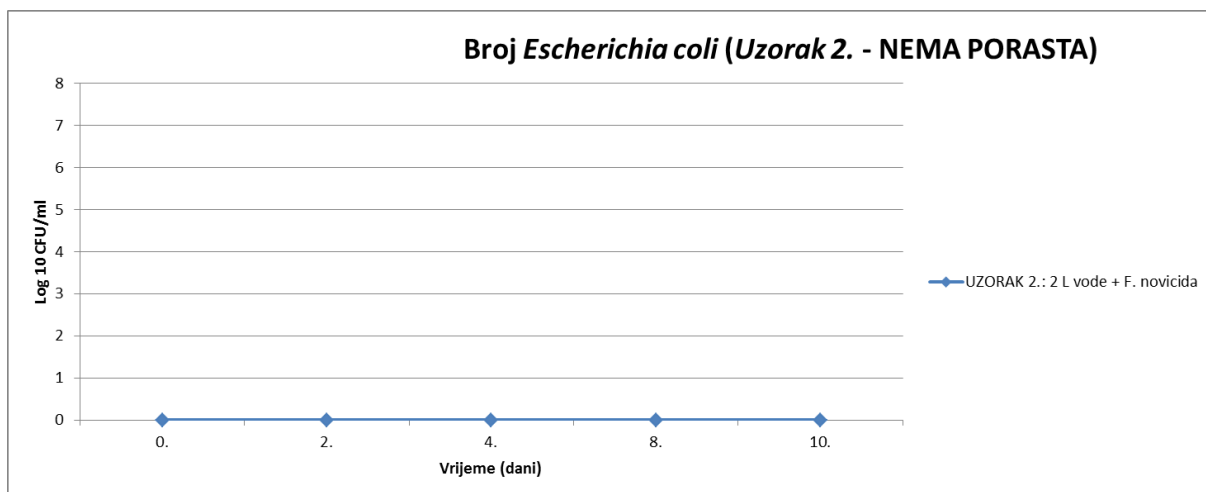


Slika 24. Broj *Clostridium perfringens* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 2.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na TSN agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je nakon dodatka ameba *F. novicida* broj *C. perfringens* već drugog dana pao na nulu. U konačnici (dan 10.) broj *Clostridium perfringens* bio jednak nuli, odnosno nije zabilježen porast na hranjivim podlogama (Slika 24.).

4.1.3.6. Broj *Escherichia coli* u Uzorku 2.

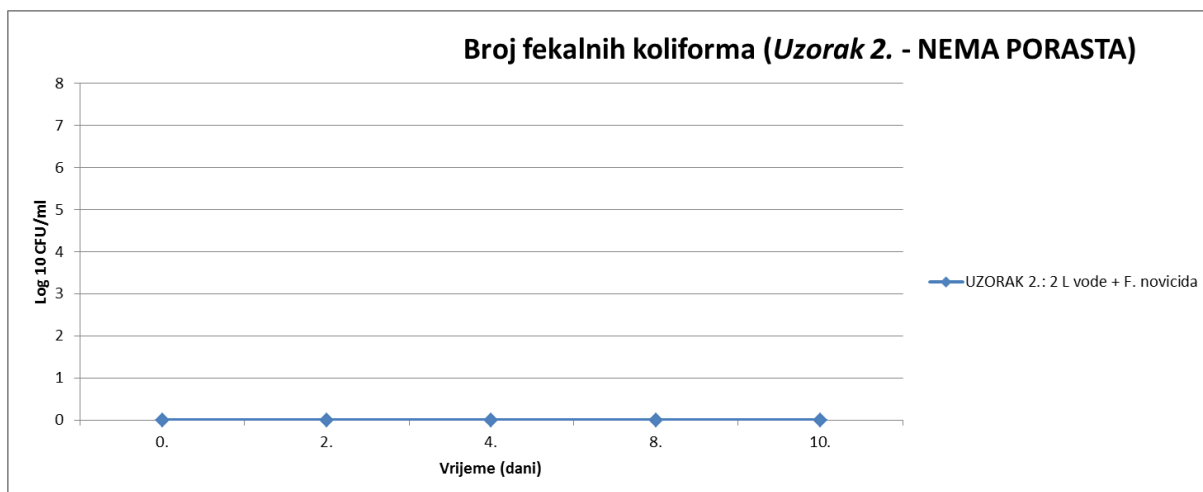
U periodu od 0. do 10. dana nije zabilježen porast *E. coli* u Uzorku 2., ni prije ni nakon inokulacije *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (Tablica 5., Slika 25.)



Slika 25. Broj *Escherichia coli* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 2.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na TTC agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

4.1.3.7. Broj fekalnih koliforma u Uzorku 2.

U periodu od 0. do 10. dana nije zabilježen porast fekalnih koliforma u *Uzorku 2.*, ni prije ni nakon inokulacije *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (Tablica 5., Slika 26.)



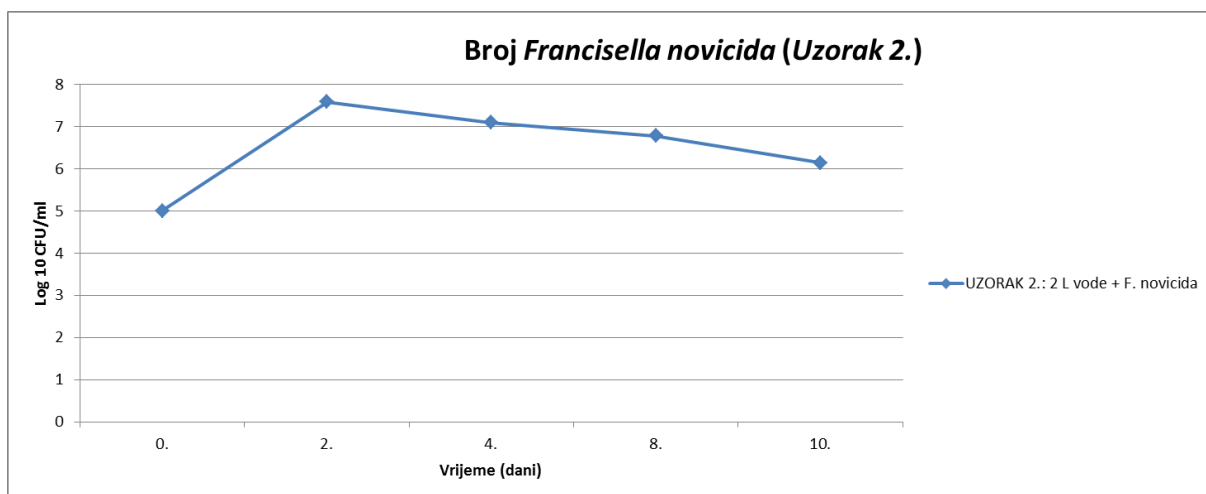
Slika 26. Broj fekalnih koliforma u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 2.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 44 °C na m-FC agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

4.1.4. Broj *Francisella novicida* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka *F. novicida*

Nultoga dana (0. dan) u *Uzorak 2.* inokulirana je *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml. Drugog dana koncentracija bakterija je porasla na $3,88 \times 10^7$ CFU/ml. Četvrtog (4.dan) dana koncentracija je pala na $1,24 \times 10^7$ CFU/ml, zatim osmog dana (8.dan) pala je na $6,0 \times 10^6$ CFU/ml, a desetog dana (dan 10.) broj bakterija u ispitivanom uzorku iznosio je $1,4 \times 10^6$ CFU/ml (Tablica 6., Slika 27.).

Tablica 6. Broj *F. novicida* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka *F. novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 2.).

<i>Uzorak 2.: 2 l uzorka vode + Francisella novicida</i>					
HRANJIVA PODLOGA / DAN	DAN 0.	DAN 2.	DAN 4.	DAN 8.	DAN 10.
<i>Francisella novicida</i>	$1,0 \times 10^5$ CFU/ml	$3,88 \times 10^7$ CFU/ml	$1,24 \times 10^7$ CFU/ml	$6,0 \times 10^6$ CFU/ml	$1,4 \times 10^6$ CFU/ml



Slika 27. Broj *Francisella novicida* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 2.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na BCYE agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je nakon dodatka bakterije *F. novicida*, broj drugog dana naglo porastao, a nakon četvrtog dana zabilježen je blagi pad broja bakterija koji se nastavio i osmog (dan 8.) i desetog dana (dan 10.), ali možemo vidjeti da kako vrijeme prolazi, tako broj *F. novicida* lagano opada (Slika 27.).

4.1.5. Mikrobiologija uzorka rijeke Čabranke nakon dodatka *Francisella novicida* i *Acanthamoeba castellanii*

Kao što je prethodno opisano u poglavlju „*Materijali i metode; Hranjive podloge*“, u eksperimentalnom radu su korištene mnoge hranjive podloge. Cilj korištenja svih hranjivih podloga bio je ispitati mikrobiologiju ispitivane vode iz rijeke Čabranke, prije i nakon istovremenog dodatka ameba *A. castellanii* i bakterije *F. novicida*, u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3.).

Kao što je već opisano, *Uzorak 3.* nazvali smo uzorak u koji su u 2 l vode iz rijeke Čabranke dodane istovremeno i amebe *A. castellanii* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml i bakterija *F. novicida* također u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (opisano u poglavlju

„Materijali i metode; Vrste uzoraka“). U Uzorku 3. praćen je broj: ukupnih bakterija na 22 °C, ukupnih bakterija na 37 °C, enterokoka, ukupnih koliforma, *C. perfringens*, *E. coli*, fekalnih koliforma, ameba *A. castellanii*, te bakterije *F. novicida* u razdoblju od 10 dana (Tablica 7.).

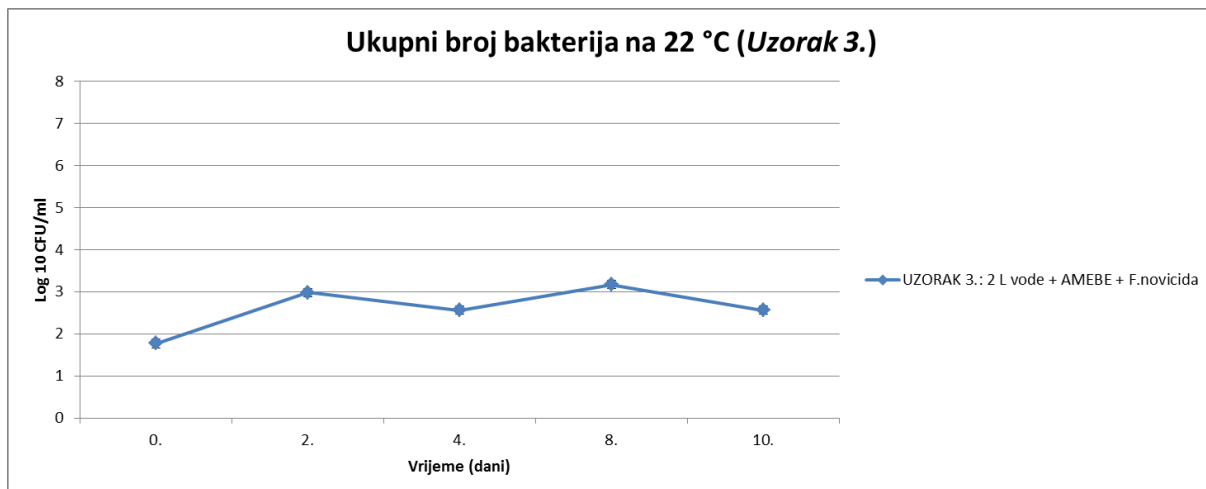
Tablica 7. Mikrobiologija uzorka rijeke Čabranke nakon dodatka *Francisella novicida* i *Acanthamoeba castellanii* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3).

Uzorak 3.: 2 l uzorka vode + <i>Francisella novicida</i> + <i>Acanthamoeba castellanii</i>					
HRANJIVA PODLOGA / DAN	DAN 0.	DAN 2.	DAN 4.	DAN 8.	DAN 10.
UBB na 22°C	56 CFU/ml	944 CFU/ml	352 CFU/ml	1480 CFU/ml	360 CFU/ml
UBB na 37°C	40 CFU/ml	712 CFU/ml	436 CFU/ml	344 CFU/ml	296 CFU/ml
SB → KEA	1,440 x 10 ³ CFU/100 ml	1,544 x 10 ⁶ CFU/100 ml	5,6 x 10 ⁵ CFU/100 ml	5,68 x 10 ⁵ CFU/100 ml	2,60 x 10 ⁵ CFU/100 ml
LesEndo	1,040 x 10 ³ CFU/100 ml	1,0 x 10 ⁴ CFU/100 ml	1,6 x 10 ⁷ CFU/100 ml	1,6 x 10 ⁷ CFU/100 ml	1,5 x 10 ⁷ CFU/100 ml
TSN	42 CFU/100 ml	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta
TTC	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta
m-FC	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta	nema porasta

4.1.5.1. Ukupni broj bakterija na 22 °C u Uzorku 3.

Ukupni broj bakterija na 22 °C u Uzorku 3. nultog dana (0. dan) iznosio je 56 CFU/mL (neposredno prije inokulacije *A. castellanii* i *F. novicida* u koncentraciji od 1,0 x 10⁵ CFU/ml). Drugoga dana broj se povećao na 944 CFU/ml (dan 2.). Nadalje, broj je počeo opadati na 352 CFU/ml (dan 4.), a zatim je ponovno porastao na 1480 CFU/ml (dan 8.).

Desetog dana nakon inokulacije broj ukupnih koliforma na 22 °C pao je na 360 CFU/ml (Tablica 7., Slika 28.).

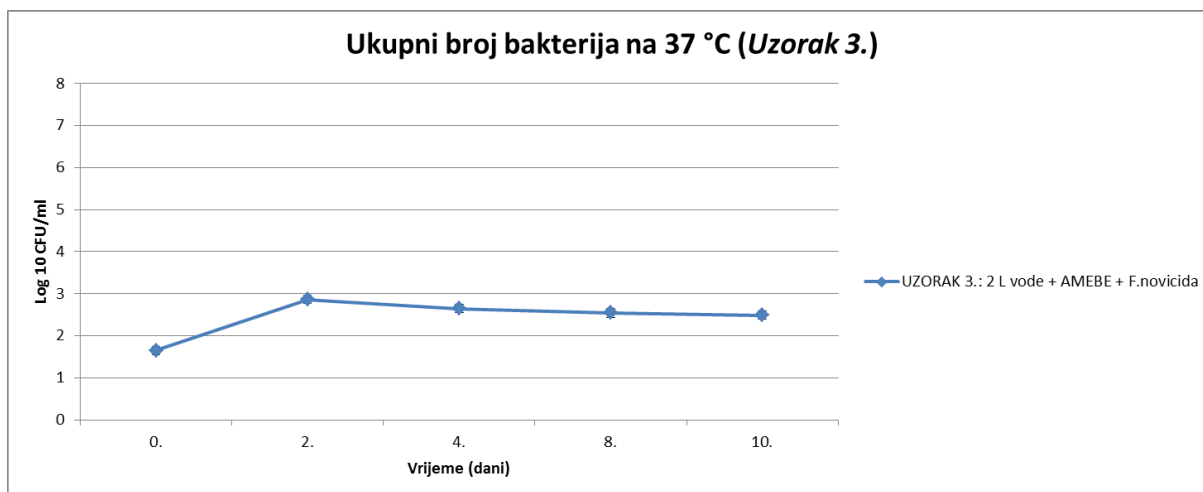


Slika 28. Ukupni broj bakterija na 22 °C u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) i bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 22 °C na kvašćevom agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je desetog dana nakon inokulacije ukupni broj bakterija na 22 °C ipak bio nešto veći nego na samom početku pokusa (0. dana). Ukupni broj bakterija na 22 °C mijenjao se u praćenom vremenskom razdoblju (porast na prijelazu iz 0. u 2. dan te iz 4. na 8. dan), ali je desetog dana nakon inokulacije broj bakterija iznosio 360 CFU/ml (Tablica 7., Slika 28.).

4.1.5.2. Ukupni broj bakterija na 37 °C u Uzorku 3.

Ukupni broj bakterija na 37 °C u Uzorku 3. nultog dana (0. dan) iznosio je 40 CFU/mL (neposredno prije inokulacije *A. castellanii* i *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Drugoga dana broj se povećao na 712 CFU/ml (dan 2.). Nadalje, broj je počeo lagano opadati na 436 CFU/ml (dan 4.). Osmog dana broj je pao na 344 CFU/ml (dan 8.), te je u konačnici (10. dan) broj pao na 296 CFU/ml (Tablica 7., Slika 29.).

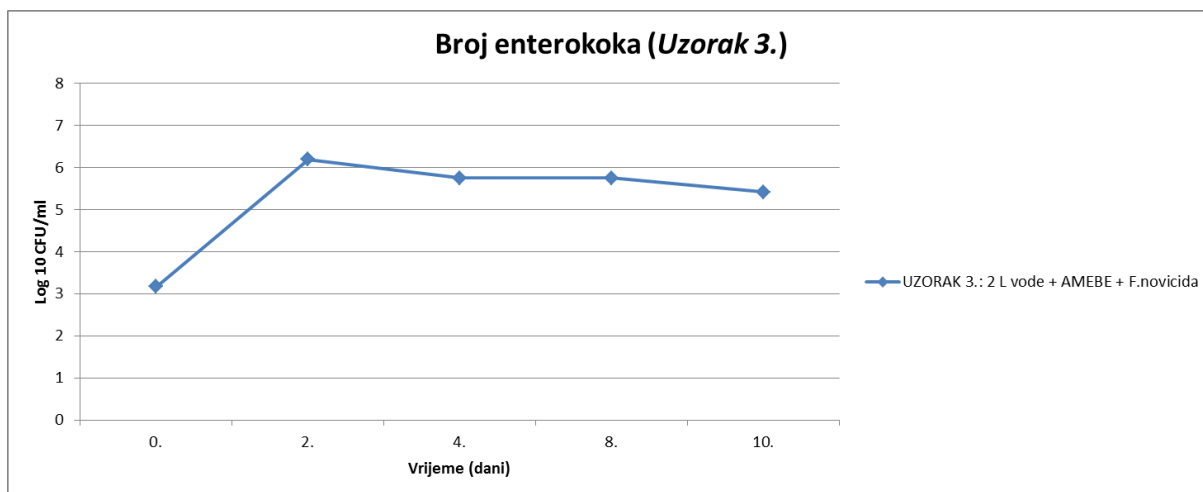


Slika 29. Ukupni broj bakterija na 22 °C u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) i bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 22 °C na kvašćevom agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se ponovno vidjeti kako je desetog dana nakon inokulacije ukupni broj bakterija na 37 °C ipak bio nešto veći nego na samom početku pokusa (0. dana), ali možemo zaključiti da ima tendenciju prema padu kako vrijeme prolazi. Iznimka je period između 0. i 2. dana kada je došlo do porasta broja bakterija, ali nakon četvrtog dana ponovno dolazi do pada broja bakterija (Slika 29.).

4.1.5.3. Broj enterokoka u Uzorku 3.

Broj enterokoka u *Uzorku 3.* nultog dana (0. dan) iznosio je $1,440 \times 10^3$ CFU/100 mL (neposredno prije inokulacije *A. castellanii* i *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Drugoga dana broj se naglo povećao na $1,544 \times 10^6$ CFU/100 ml (dan 2.). Nadalje, broj je počeo lagano opadati na $5,6 \times 10^5$ CFU/100 ml (dan 4.). Osmog dana došlo je ponovno do laganog porasta broja bakterija na $5,68 \times 10^5$ CFU/100 ml (dan 8.), te je u konačnici (dan 10.) broj ponovno lagano pao na $2,6 \times 10^5$ CFU/100 ml (Tablica 7., Slika 30.).

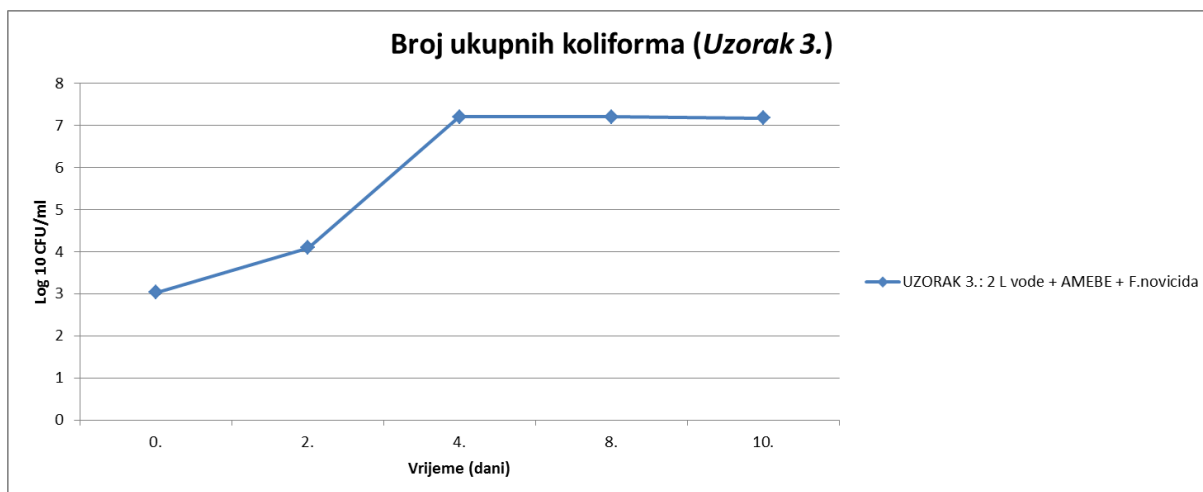


Slika 30. Broj enterokoka u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) i bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na SB agaru, a nakon toga radi se potvrdni test na KEA agaru koji je prethodno zagrijan na 44 °C. Broj enterokoka praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je desetog dana nakon inokulacije broj enterokoka bio poprilično veći nego na samom početku pokusa (0. dana). Na prijelazu iz 0. na 2. dan došlo je do velikog porasta broja bakterija. Zatim je broj bakterija lagano počeo opadati, ali možemo zaključiti kako je i 10. dana broj enterokoka još uvijek bio poprilično visok (Slika 30.).

4.1.5.4. Broj ukupnih koliforma u Uzorku 3.

Broj ukupnih koliforma u *Uzorku 3.* nultog dana (0. dan) iznosio je $1,040 \times 10^3$ CFU/100 mL (neposredno prije inokulacije *A. castellanii* i *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Drugoga dana broj se povećao na $1,0 \times 10^4$ CFU/100 ml (dan 2.). Nadalje, četvrtog dana broj se nastavljao povećavati na $1,6 \times 10^7$ CFU/100 ml (dan 4.). Osmog dana (dan 8.) broj je ostao isti odnosno $1,6 \times 10^7$ CFU/100 ml, te je u konačnici (10. dan) broj pao na $1,5 \times 10^7$ CFU/100 ml (Tablica 7., Slika 31.).

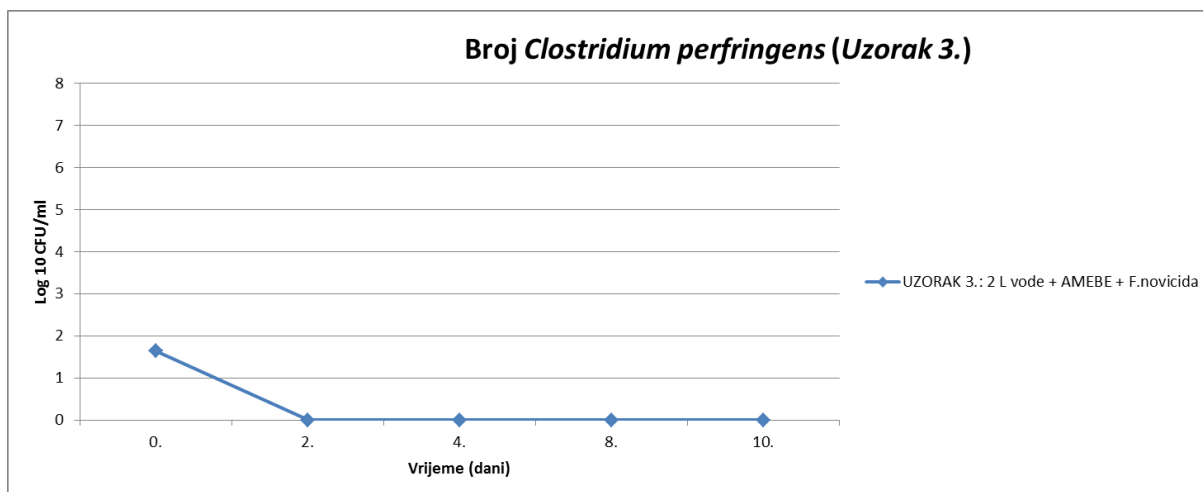


Slika 31. Broj ukupnih koliforma u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) i bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na Les endo agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je desetog dana nakon inokulacije (dan 10.) broj ukupnih koliforma bio veći nego na samom početku pokusa (0. dana). Između 0. i 2. dana, te 2. i 4. dana došlo je do značajnog porasta broja bakterija. Nakon toga broj bakterija je lagano počeo opadati (nakon 4. dana), ali je još uvijek bio poprilično visok (Slika 31.).

4.1.5.5. Broj *Clostridium perfringens* u Uzorku 3.

Broj *C. perfringens* u Uzorku 3. nultog dana (0. dan) iznosio je 42 CFU/100 mL (neposredno prije inokulacije *A. castellanii* i *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml). Sljedećih dana (2., 4., 8. i 10. dan) nije zabilježen porast *C. perfringens* na hranjivim podlogama (Tablica 7., Slika 32.).

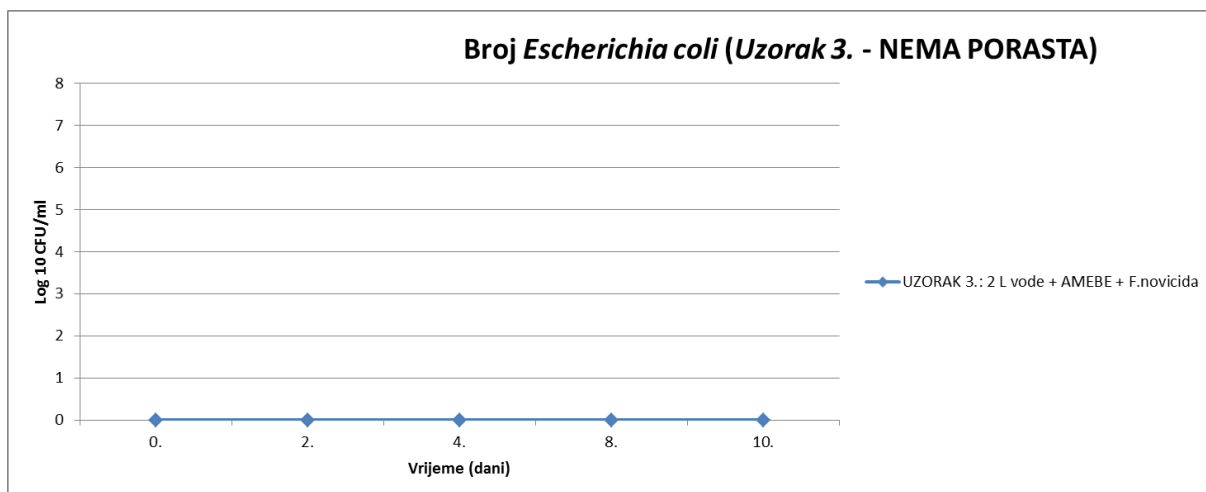


Slika 32. Broj *Clostridium perfringens* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) i bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na TSN agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je nakon istovremenog dodatka ameba *A. castellanii* i bakterije *F. novicida* broj *C. perfringens* već drugog dana pao na nulu. Desetog dana nakon inokulacije (dan 10.) broj *C. perfringens* bio jednak nuli, odnosno nije zabilježen porast na hranjivim podlogama (Slika 32.).

4.1.5.6. Broj *Escherichia coli* u Uzorku 3.

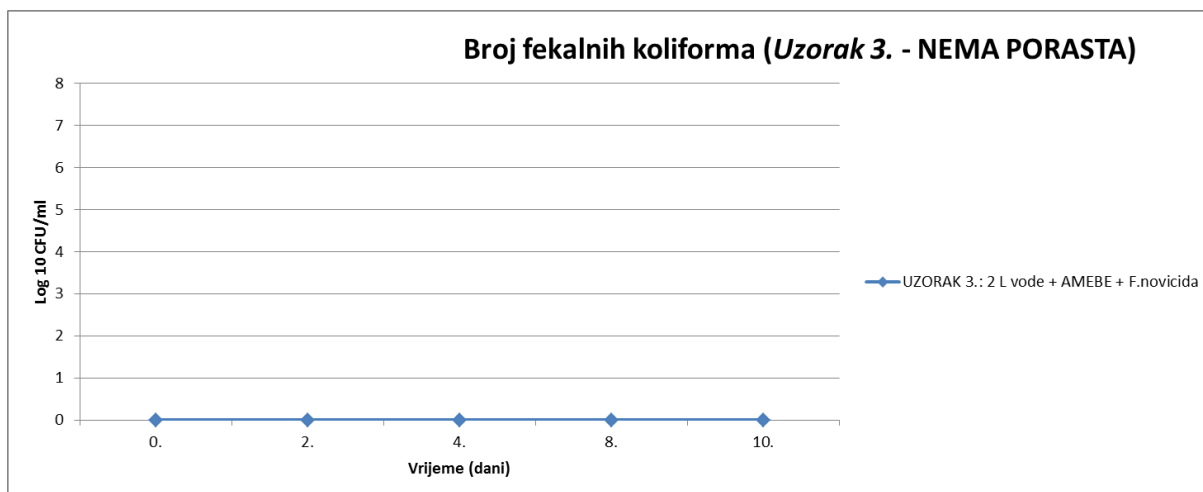
U periodu od 0. do 10. dana nije zabilježen porast *E. coli* u Uzorku 3., ni prije ni nakon inokulacije *A. castellanii* i *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (Tablica 7., Slika 33.).



Slika 33. Broj *Escherichia coli* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) i bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na TTC agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

4.1.5.7. Broj fekalnih koliforma u Uzorku 3.

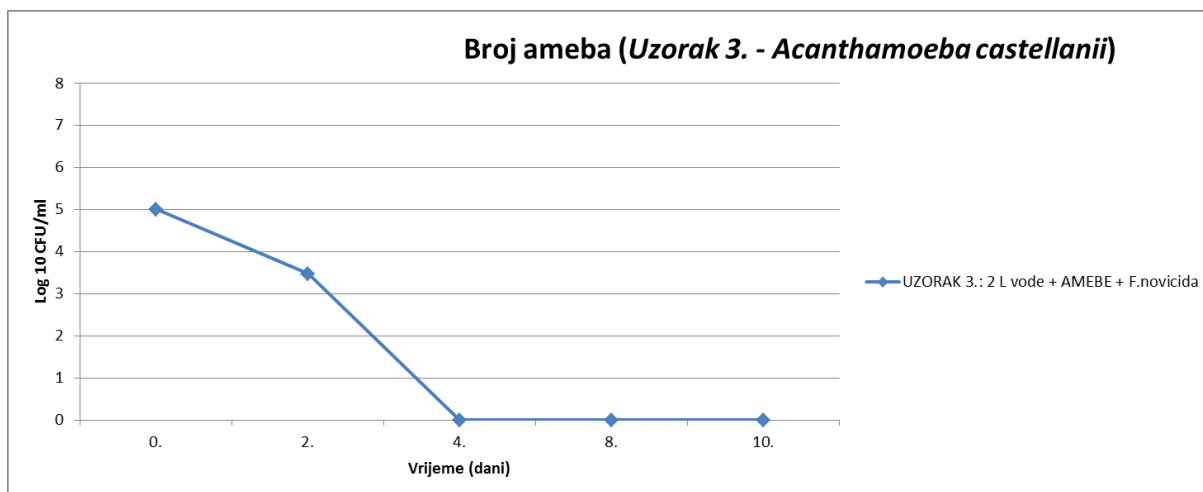
U periodu od 0. do 10. dana nije zabilježen porast fekalnih koliforma u Uzorku 3., ni prije ni nakon inokulacije *A. castellanii* i *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (Tablica 7., Slika 34.).



Slika 34. Broj fekalnih koliforma u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) i bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 44 °C na m-FC agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

4.1.6. Broj ameba (*Acanthamoeba castellanii*) u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka *Francisella novicida* i *Acanthamoeba castellanii*

Nultoga dana (0. dan) u *Uzorak 3.* inokulirana je *A. castellanii* i *F. novicida* u koncentraciji od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml. Drugog dana (dan 2.) broj ameba pao je na $3,0 \times 10^3$ CFU/ml. Četvrtog (dan 4.), osmog (dan 8.) i desetog dana (dan 10.) nije zabilježna prisutnost ameba *A. castellanii* u *Uzorku 3.* (Tablica 8., Slika 35.).



Slika 35. Broj ameba *Acanthamoeba castellanii* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) i bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3.). Broj ameba praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

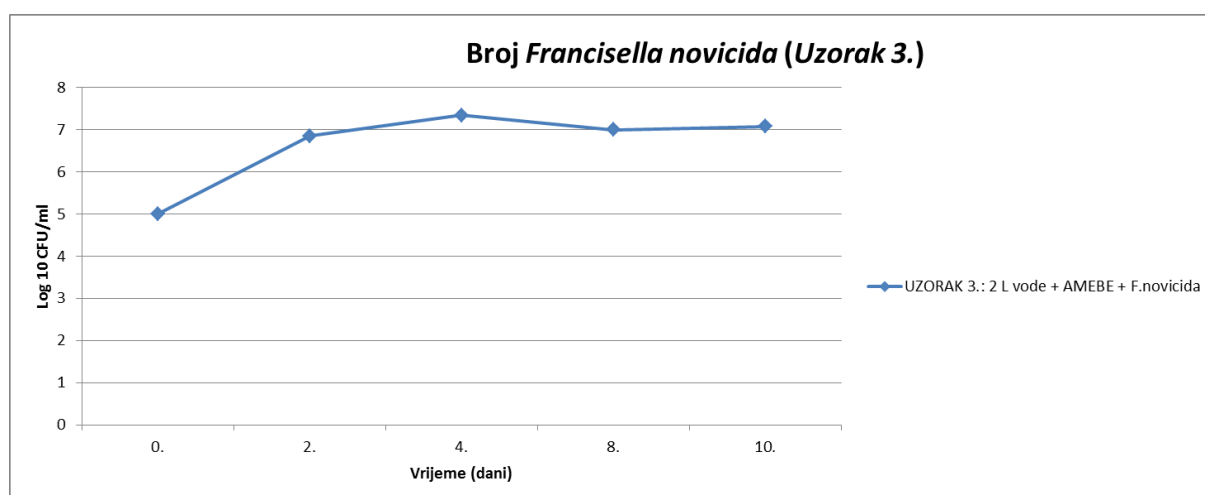
Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je nakon dodatka ameba *A. castellanii* i bakterije *F. novicida*, broj ameba već drugog dana počeo opadati. Nakon 4. dana nije zabilježena prisutnost *A. castellanii* u Uzorku 3. (Slika 35.).

Tablica 8. Broj ameba (*Acanthamoeba castellanii*) u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka *Francisella novicida* i *Acanthamoeba castellanii* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3.).

Uzorak 3.: 2 l uzorka vode + <i>Francisella novicida</i> + <i>Acanthamoeba castellanii</i>					
HRANJIVA PODLOGA / DAN	DAN 0.	DAN 2.	DAN 4.	DAN 8.	DAN 10.
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	1,0 x 10 ⁵ CFU/ml	3,0 x 10 ³ CFU/ml	nisu prisutne	nisu prisutne	nisu prisutne

4.1.7. Broj *F. novicida* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka *Francisella novicida* i *Acanthamoeba castellanii*

Nultoga dana (dan 0.) u *Uzorak 3.* inokulirana je *A. castellanii* i *F. novicida* u koncentraciji od 1.0×10^5 CFU/ml. Drugog dana broj bakterija je porastao na $7,0 \times 10^6$ CFU/ml. Četvrtog (dan 4.) dana broj bakterija u ispitivanom uzorku iznosio je $2,2 \times 10^7$ CFU/ml, zatim je osmog dana (dan 8.) broj bakterija iznosio $1,0 \times 10^7$ CFU/ml, a desetog dana $1,2 \times 10^7$ CFU/ml (Tablica 9., Slika 36.).



Slika 36. Broj *Francisella novicida* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka ameba (*Acanthamoeba castellanii*) i bakterije *Francisella novicida* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3.). Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na BCYE agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako je nakon dodatka amebe *A. castellanii* i bakterije *F. novicida*, broj *F. novicida* drugog dana naglo porastao, a nakon četvrtog dana zabilježen je lagani pad broja bakterija. U periodu između osmog (dan 8.) i desetog dana (dan 10.) zabilježen je ponovno lagani porast broja *F. novicida* (Slika 36.).

Tablica 9. Broj *F. novicida* u uzorku rijeke Čabranke nakon dodatka *Francisella novicida* i *Acanthamoeba castellanii* u razdoblju od 10 dana (Uzorak 3.).

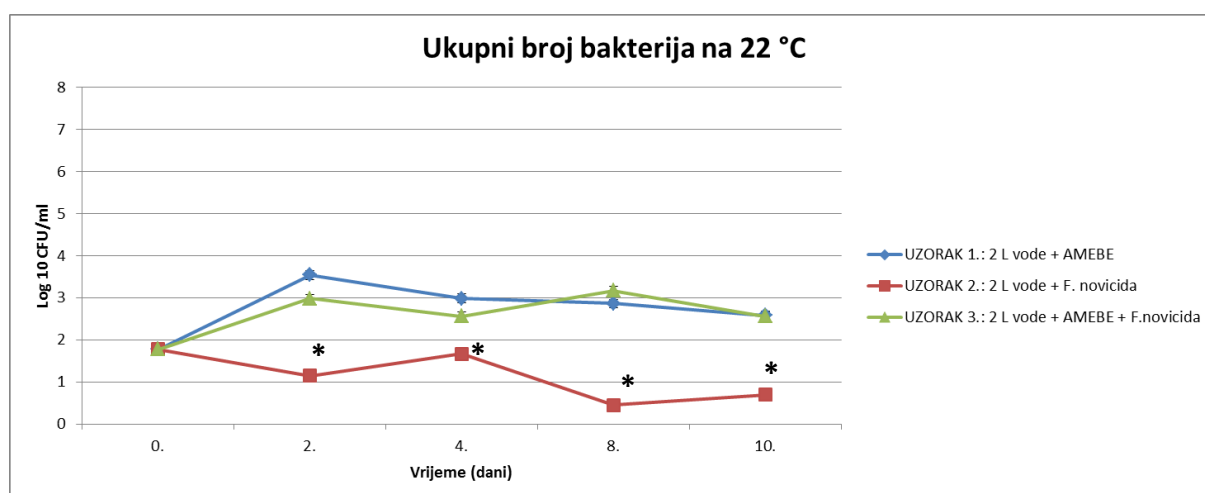
<i>Uzorak 3.: 2 l uzorka vode + Francisella novicida + Acanthamoeba castellanii</i>					
HRANJIVA PODLOGA / DAN	DAN 0.	DAN 2.	DAN 4.	DAN 8.	DAN 10.
<i>Francisella novicida</i>	1,0 x 10 ⁵ CFU/ml	7,0 x 10 ⁶ CFU/ml	2,2 x 10 ⁷ CFU/ml	1,0 x 10 ⁷ CFU/ml	1,2 x 10 ⁷ CFU/ml

4.2. Usporedba broja bakterija i ameba između tri različite vrste uzorka

U drugom dijelu prikaza rezultata prikazana je usporedba broja svih prethodno navedenih vrsta bakterija te ameba *A. castellanii* između *Uzorka 1.*, *Uzorka 2.* i *Uzorka 30.* u obliku grafova.

4.2.1. Ukupni broj bakterija na 22 °C

Ako usporedimo preživljavanje ukupnog broja bakterija na 22 °C između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.*, možemo zaključiti da bakterije najslabije preživljavaju u uzorku u koji je dodana samo *F. novicida* (*Uzorak 2.*). *Uzorak 1.* i *3.* imaju vrlo sličan rast broja bakterija na 22 °C u periodu od 10 dana, iako u konačnici (dan 10.) imamo za nijansu veći porast broja u *Uzorku 1.* (2 l vode + amebe), a malo manji broj u *Uzorku 3.* (2 l vode + amebe + *F. novicida*) (Slika 37.).

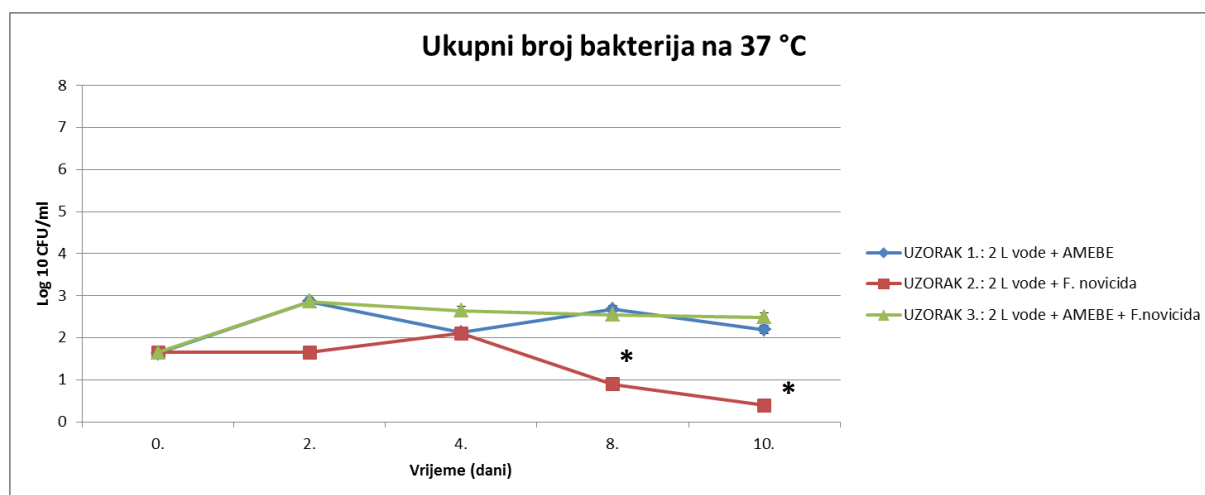


Slika 37. Usporedba između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.* - Ukupni broj bakterija na 22 °C u uzorku rijeke Čabranke u razdoblju od 10 dana. Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 22 °C na kvašćevom agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija. Oznaka „*“ označava statistički značajnu razliku. Razina značajnosti od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

Dobiveni rezultati pokazuju kako je ukupan broj bakterija na 22 °C u uzorku u koji je dodana samo *F. novicida* (*Uzorak 2.*) statistički značajno manji u svim ispitivanim vremenskim razdobljima nakon inokulacije ($p < 0,05$) u odnosu na uzorke vode rijeke Čabranke u koje su inokulirane i *F. novicida* i amebe (*Uzorak 3.*) ili samo amebe (*Uzorak 1.*).

4.2.2. Ukupni broj bakterija na 37 °C

Ako usporedimo preživljavanje ukupnog broja bakterija na 37 °C između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.*, možemo zaključiti da bakterije najslabije preživljavaju u uzorku u koji je dodana samo *F. novicida* (*Uzorak 2.*). Ako usporedimo *Uzorak 1.* i *Uzorak 3.*, u konačnici (dan 10.) je zabilježen veći broj bakterija u *Uzorku 3.* (2 l vode + amebe + *F. novicida*), a malo manji broj u *Uzorku 1.* (2 l vode + amebe) (Slika 38.).



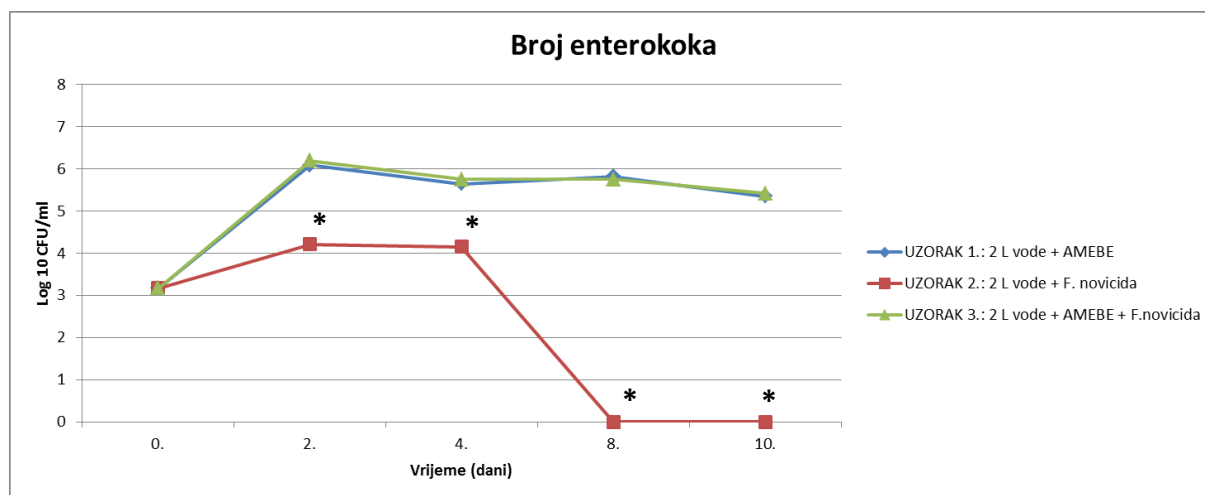
Slika 38. Usporedba između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.* - Ukupni broj bakterija na 37 °C u uzorku rijeke Čabranke u razdoblju od 10 dana. Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na kvašćevom agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka amebe čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija. Oznaka „*“ označava statistički značajnu razliku. Razina značajnosti od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

Dobiveni rezultati pokazuju kako je ukupan broj bakterija na 37 °C u uzorku u koji je dodana samo *F. novicida* (*Uzorak 2.*) statistički značajno manji u određenim vremenskim razdobljima (dan 8. i dan 10.) nakon inokulacije ($p < 0,05$) u odnosu na ostale uzorke (*Uzorak 1.* i *Uzorak 3.*).

4.2.3. Broj enterokoka

Ako usporedimo preživljavanje enterokoka između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.*, možemo ponovno zaključiti da bakterije najslabije preživljavaju u uzorku u koji je dodana samo *F.*

novicida (Uzorak 2.). U Uzorku 2. u konačnici (dan 10.) nije zabilježen porast enterokoka na hranjivim podlogama. Uzorak 1. i 3. imaju vrlo sličan rast broja enterokoka u periodu od 10 dana, iako u konačnici (dan 10.) imamo za nijansu veći porast broja u Uzorku 3. – $2,6 \times 10^5$ CFU/100 ml (2 l vode + amebe + *F. novicida*), a malo manji broj u Uzorku 1. – $2,24 \times 10^5$ CFU/100 ml (2 l vode + amebe) (Slika 39.).



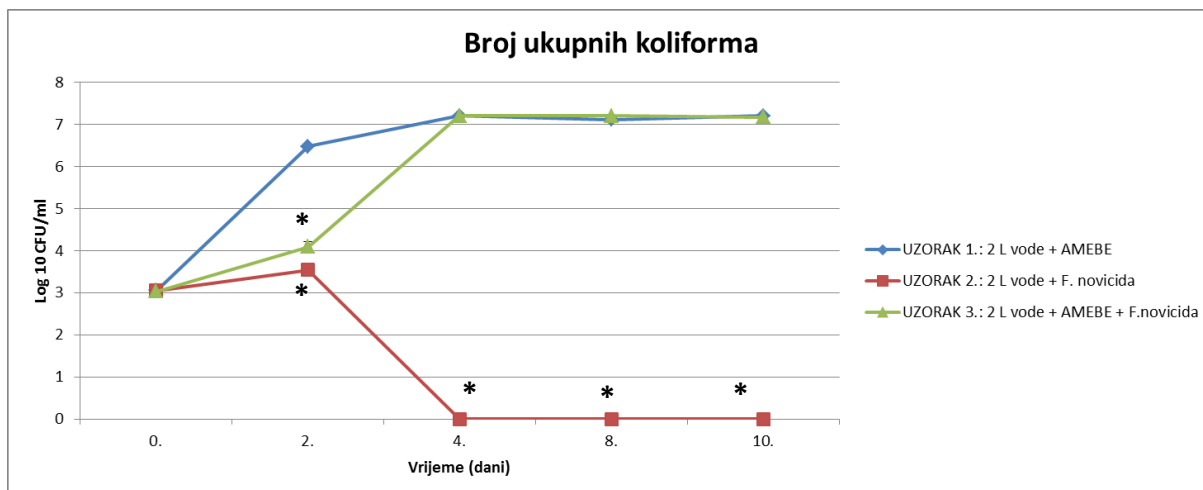
Slika 39. Usporedba između Uzorka 1., 2. i 3. - Broj enterokoka u uzorku rijeke Čabranke u razdoblju od 10 dana. Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na SB agaru, a nakon toga radi se potvrdni test na KEA agaru koji je prethodno zagrijan na 44 °C. Broj enterokoka praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka amebe čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija. Oznaka „*“ označava statistički značajnu razliku. Razina značajnosti od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

Dobiveni rezultati pokazuju kako je broj enterokoka u uzorku u koji je dodana samo *F. novicida* (Uzorak 2.) statistički značajno manji u svim ispitivanim vremenskim razdobljima nakon inokulacije ($p < 0,05$) u odnosu na uzorke vode rijeke Čabranke u koje su inokulirane i *F. novicida* i amebe (Uzorak 3.) ili samo amebe (Uzorak 1.).

4.2.4. Broj ukupnih koliforma

Ako usporedimo preživljavanje ukupnih koliforma između Uzorka 1., 2. i 3., možemo ponovno zaključiti da bakterije ponovno najslabije preživljavaju u uzorku u koji je dodana samo *F. novicida* (Uzorak 2.). U Uzorku 2. u konačnici (dan 10.) nije zabilježen porast ukupnih koliforma na hranjivim podlogama. Uzorak 1. i 3. se 2. dana podosta razlikuju (veći

porast u *Uzorku 1.*), ali od 4. dana imaju vrlo sličan rast broja ukupnih koliforma, iako u konačnici (dan 10.) imamo za nijansu veći porast broja u *Uzorku 1.* – $1,6 \times 10^7$ CFU/100 ml (2 l vode + amebe), a malo manji broj u *Uzorku 3.* – $1,5 \times 10^7$ CFU/100 ml (2 l vode + amebe + *F. novicida*) (Slika 40.).



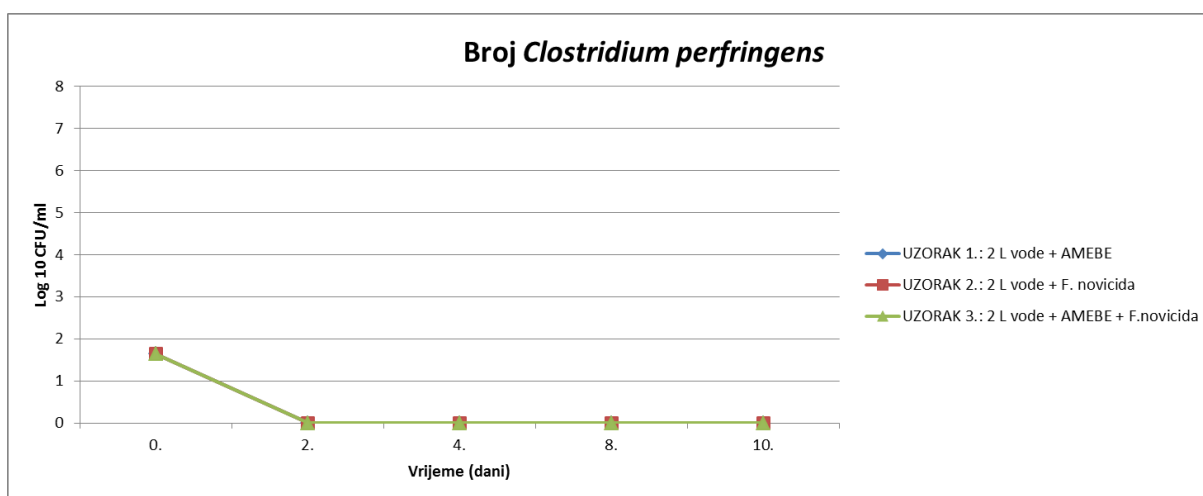
Slika 40. Usporedba između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.* - Slika 12. Broj ukupnih koliforma u uzorku rijeke Čabranke u razdoblju od 10 dana. Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na Les endo agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka amebe čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija. Oznaka „*“ označava statistički značajnu razliku. Razina značajnosti od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

Dobiveni rezultati pokazuju kako je broj ukupnih koliforma u uzorku u koji je dodana samo *F. novicida* (*Uzorak 2.*) statistički značajno manji u određenim vremenskim razdobljima (dan 4., dan 8. i dan 10.) nakon inokulacije ($p < 0,05$) u odnosu na uzorke vode rijeke Čabranke u koje su inokulirane i *F. novicida* i amebe (*Uzorak 3.*) ili samo amebe (*Uzorak 1.*).

Međutim drugog dana nakon inokulacije (dan 2.) broj ukupnih koliforma je i kod uzorka kod kojeg je dodana i *F. novicida* i amebe (*Uzorka 3.*) i kod uzorka kod kojeg je dodana samo *F. novicida* (*Uzorak 2.*) statistički značajno manji ($p < 0,05$) u odnosu na uzorak u koji su dodane sam amebe (*Uzorak 1.*).

4.2.5. Broj *Clostridium perfringens*

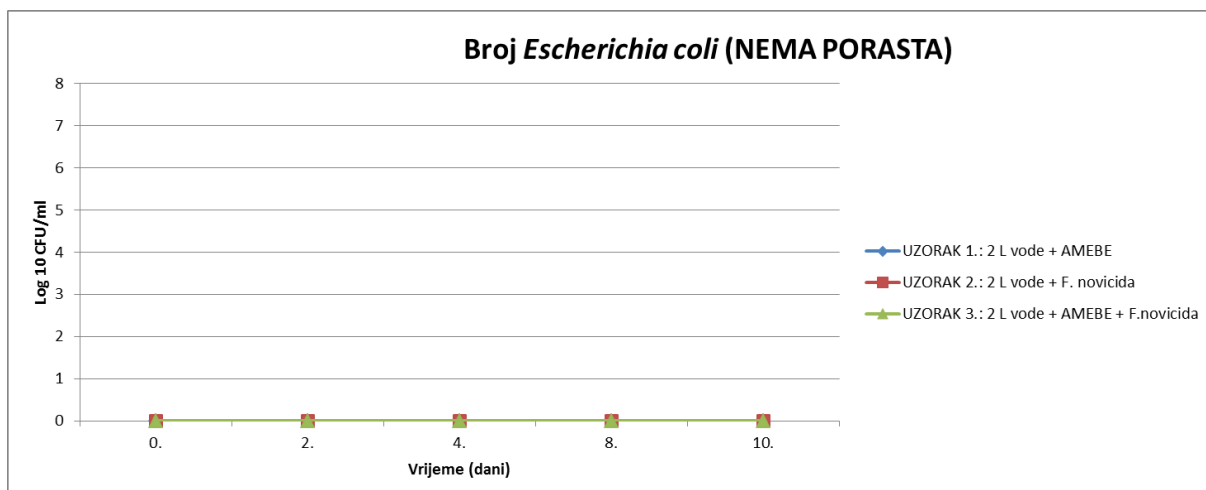
Ako usporedimo preživljavanje bakterije *C. perfringens* između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.*, možemo zaključiti da uzorak rijeke Čabranke nije pogodan medij za rast *C. perfringens*. U sve tri vrste uzoraka 0. dana zabilježen je porast na hranjivim podlogama koji je iznosio 42 CFU/100 mL. Sljedećih dana (2., 4., 8. i 10. dan) nije zabilježen porast *C. perfringens* na hranjivim podlogama, u nijednome od tri vrste uzoraka (Slika 41.).



Slika 41. Usporedba između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.* - Broj *Clostridium perfringens* u uzorku rijeke Čabranke u razdoblju od 10 dana. Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na TSN agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

4.2.6. Broj *Escherichia coli*

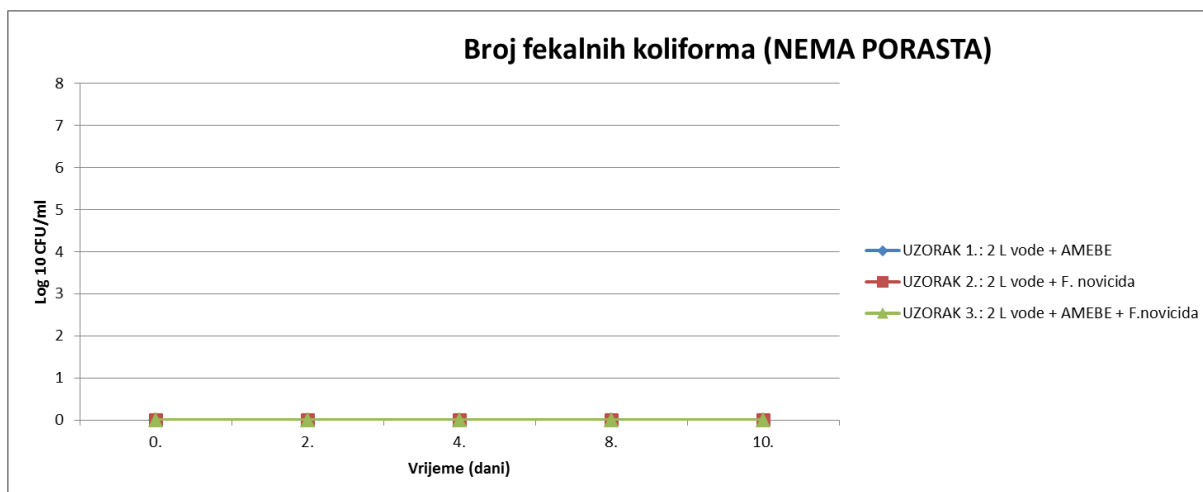
Ako usporedimo preživljavanje bakterije *E. coli* između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.*, možemo zaključiti da uzorak rijeke Čabranke nije pogodan medij za rast *E. coli*. U sve tri vrste uzoraka 0. dana nije zabilježen porast na hranjivim podlogama. Također, ni sljedećih dana (2., 4., 8. i 10. dan) nije zabilježen porast bakterije *E. coli* na hranjivim podlogama, u nijednome od tri vrste uzoraka (Slika 42.).



Slika 42. Usporedba između Uzorka 1., 2. i 3. - Broj *Escherichia coli* u uzorku rijeke Čabranke u razdoblju od 10 dana. Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na TTC agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

4.2.7. Broj fekalnih koliforma

Ako usporedimo preživljavanje fekalnih koliforma između *Uzorka 1., 2. i 3.*, možemo ponovno zaključiti da uzorak rijeke Čabranke nije pogodan medij za rast, u ovome slučaju fekalnih koliforma. U sve tri vrste uzoraka 0. dana nije zabilježen porast na hranjivim podlogama. Također, ni sljedećih dana (2., 4., 8. i 10. dan) nije zabilježen porast fekalnih koliforma na hranjivim podlogama, u nijednome od tri vrste uzoraka (Slika 43.)

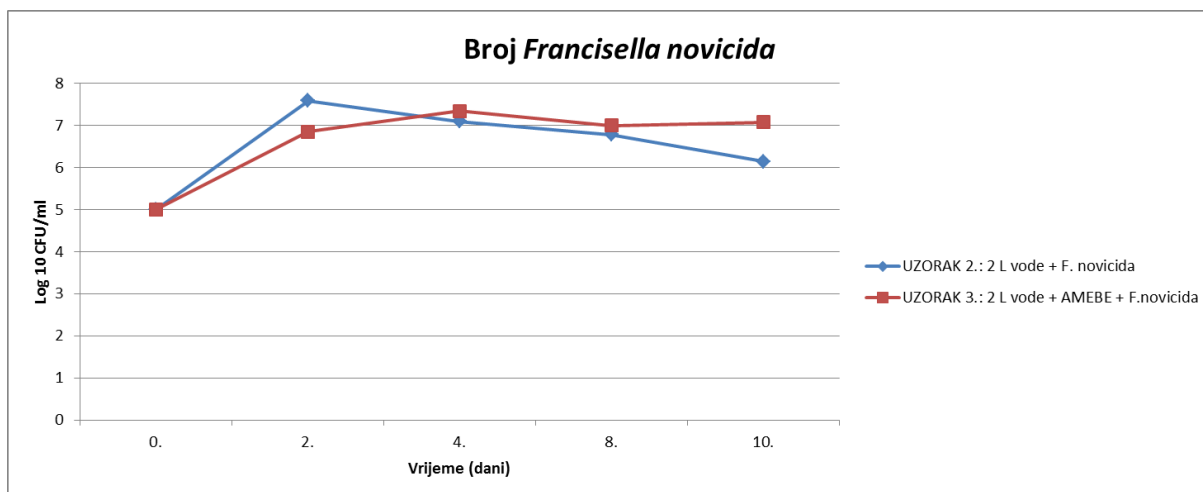


Slika 43. Usporedba između Uzorka 1., 2. i 3. - Broj fekalnih koliforma u uzorku rijeke Čabranke u razdoblju od 10 dana. Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 44 °C na m-FC agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

4.2.8. Broj *Francisella novicida*

Kao što je već spomenuto u poglavlju *Materijali i metode; Vrste uzoraka*, u *Uzorak 2.* je u 2 l uzorka vode ubačena samo *F. novicida*, a u *Uzorak 3.* je istovremeno ubačena i *F. novicida* i ameba *A. castellanii*.

Ako usporedimo preživljavanje *F. novicida* između *Uzorka 2.* i *Uzorka 3.*, možemo zaključiti da u konačnici (dan 10.) *F. novicida* bolje preživljava u *Uzorku 3.* nego u *Uzorku 2.* (Slika 44.). U *Uzorku 2.* je 10. dana zabilježen broj od $1,4 \times 10^6$ CFU/ml, a u *Uzorku 3.* je zabilježen broj od $1,2 \times 10^7$ CFU/ml (Tablica 6., Tablica 9.).

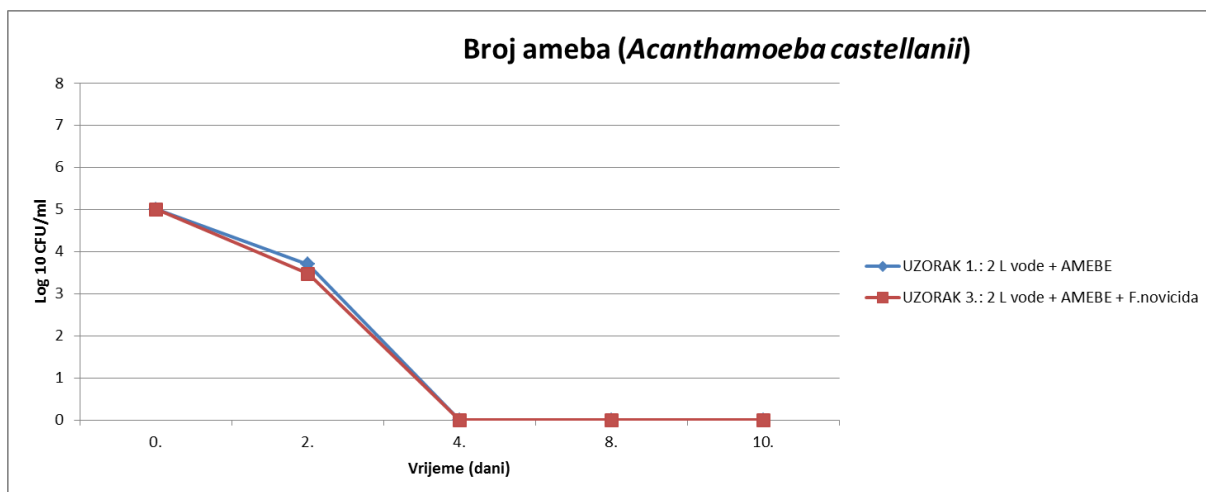


Slika 44. Usporedba između *Uzorka 2.* i *Uzorka 3.* - Broj *Francisella novicida* u uzorku rijeke Čabranke u razdoblju od 10 dana. Bakterije su inkubirane pri temperaturi od 37 °C na BCYE agaru, a njihov je broj praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

4.2.9. Broj ameba *Acanthamoeba castellanii*

Kao što je već spomenuto u poglavlju *Materijali i metode; Vrste uzoraka*, u *Uzorak 1.* je u 2 l vode ubačena samo ameba *A. castellanii*, a u *Uzorak 3.* je istovremeno ubačena i *F. novicida* i ameba *A. castellanii*.

Ako usporedimo preživljavanje *A. castellanii* između *Uzorka 1.* i *Uzorka 3.*, možemo zaključiti da u oba uzorka 2. dana dolazi do pada broja ameba. Drugog dana (dan 2.) je malo veći broj zabilježen u *Uzorku 1.* ($5,0 \times 10^3$ CFU/ml), a malo manji broj u *Uzorku 3.* ($3,0 \times 10^3$ CFU/ml) (Tablica 4., Tablica 8.). Od 4. do 10. dana nije zabilježena prisutnost ameba *A. castellanii*, ni u *Uzorku 1.*, ni u *Uzorku 3.* (Slika 45.).



Slika 45. Usporedba između Uzorka 1. i Uzorka 3. - Broj ameba *Acanthamoeba castellanii* u uzorku rijeke Čabranke u razdoblju od 10 dana. Broj ameba praćen u periodu od 10 dana. Na početku pokusa je uzorak vode čuvan u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, a kasnije je nakon dodatka ameba čuvan na sobnoj temperaturi (22 °C). Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

5. RASPRAVA

Vrste *Acanthamoeba* domaćini su mnogobrojnim unutarstaničnim patogenima poput bakterija iz roda *Francisella*. Ameba *A. castellanii* prisutna je svugdje u prirodnom vodenom okolišu, kao i vrste bakterija iz roda *Francisella* (2). U vodenom okolišu kao dio biofilmova, amebe su povezane s bakterijama. Ova ameba često se koristi u laboratorijskom radu kod proučavanja unutarstaničnog života bakterija. Dosadašnja istraživanja pokazala su da je u mediju koji sadrži amebe izraženiji rast brojnih bakterija (primjerice iz roda *Legionella*, *Mycobacterium*, *Chlamydia*), pa tako i bakterija iz roda *Francisella* (3,68). Iz tog se razloga neke vrste protozoa smatraju opasnim za prijenos tularemije, posebice putem prirodnih površinskih voda (4). Evolucijskim mehanizmima *F. novicida* razvila je sposobnost da preživi i razmnožava se unutar ameba kako bi opstala u vodenom okolišu. Dakle, vrlo često gdje je *Francisella* prisutna negdje u prirodnom vodenom okolišu, tamo su često prisutne razne protozoe poput *A. castellanii* (70,71,72,73).

Primjerice, bakterije iz roda *Legionella* žive u prirodnom ili umjetno napravljenom vodenom okolišu, a mogu se pronaći i na vlažnom tlu. Rast *Legionella* u mediju koji sadrži amebe izraženiji je zato što amebe pružaju zaštitu od nepovoljnih vanjskih čimbenika, poput klorinacije (82). Također provedeno je i jedno istraživanje koje je pokazalo da bakterije *Legionella pneumophila* i *F. novicida* uspješno preživljavaju i razmnožavaju se unutar protozoa, odnosno unutar amebe *Dictyostelium discoideum*. Tim istraživanjem dobiveni su rezultati da broj bakterija *F. novicida* doseže maksimum 48 sati nakon infekcije amebama. U istraživanju se željelo ispitati i kako utječu druge tvari (citokalasin D) na ulazak bakterija u amebu *D. discoideum*. Naime, utvrđeno je da dodatak i koncentracija tvari poput citokalasila D ne utječe na rast bakterija *L. pneumophila* i *F. novicida* u amebi *D. discoideum* (83).

Glavni cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj ameba *A. castellanii* na ukupan broj bakterija u riječnoj vodi na primjeru rijeke Čabranke u periodu od 10 dana. S obzirom da sam u završnom radu istraživao preživaljavanje bakterije *F. novicida* u rijeci Čabranki, motiv za temu ovog diplomskog rada bio je nastavak istraživanja mikrobiologije rijeke Čabranke. U završnome radu donesen je zaključak da *F. novicida* preživljava u rijeci Čabranki, ali joj se broj s vremenom smanjuje (84).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju slijedeće: za početak se željela utvrditi mikrobiologija rijeke Čabranke bez ikakvog dodatka (ili ameba i/ili francizela). Rezultati su

bili slijedeći: ukupni broj bakterija na 22 °C iznosio je 56 CFU/ml, ukupni broj bakterija na 37 °C iznosio je 40 CFU/ml, broj enterokoka iznosio je $1,440 \times 10^3$ CFU/100 ml, broj ukupnih koliforma iznosio je $1,040 \times 10^3$ CFU/100 ml, a broj *Clostridium perfringens* iznosio je 42 CFU/100 ml. U uzorku rijeke Čabranke nije zabilježen porast ni *E. coli* ni fekalnih koliforma. Navedeni rezultati prikazani su u Tablicama 3., 5. i 7. u stupcu „DAN 0.“. S obzirom da je uzorak vode iz rijeke Čabranke prikupljen na području donjeg toka te rijeke, ta je rijeka promatrana i proučavana kao rekreacijska voda odnosno voda za kupanje. Prema *Uredbi o kakvoći voda za kupanje* standardi za ocjenu kakvoće voda su crijevni enterokoki i *Escherichia coli*. Naime, prema ovoj *Uredbi* kriterij za *E. coli* je zadovoljavajuć, ali za crijevne enterokoke nije: maksimalna vrijednost trebala bi iznositi $\leq 400/100$ ml (81).

Jedan od ciljeva rada bio je napraviti usporedbu broja bakterija između tri različite vrste uzoraka. Dakle, kao što je prikazano u rezultatima, u obliku grafova je napravljena usporedba različitih vrsta i kategorija bakterija te ameba *A. castellanii* između *Uzorka 1.*, *Uzorka 2.* i *Uzorka 3.*.

Usporedbom preživljavanja ukupnog broja bakterija na 22 °C između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.*, možemo zaključiti da bakterije najslabije preživljavaju u *Uzorku 2.* (uzorak u koji je dodana samo *F. novicida*). Ukupni broj bakterija na 22 °C vrlo slično raste između *Uzorka 1.* i *Uzorka 3.* (dodana i *F. novicida* i *A. castellanii*), iako je desetog dana nakon inokulacije za nijansu veći porast bio u *Uzorku 1.* (dodana samo *A. castellanii*) (Slika 37.).

Usporedbom preživljavanja ukupnog broja bakterija na 37 °C između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.*, možemo zaključiti da bakterije ponovno najslabije preživljavaju u *Uzorku 2.* (uzorak u koji je dodana samo *F. novicida*). Ukupni broj bakterija na 37 °C vrlo slično raste između *Uzorka 1.* (dodana samo *A. castellanii*) i *Uzorka 3.*, ali desetog dana nakon inokulacije je ipak veći broj zabilježen u *Uzorku 3.* (dodana i *F. novicida* i *A. castellanii*) (Slika 38.).

Usporedbom preživljavanja enterokoka između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.*, možemo zaključiti da enterokoki najslabije preživljavaju u *Uzorku 2.* (dodana samo *F. novicida*), te u tom uzorku 8. i 10. dana nije uopće zabilježen porast enterokoka na hranjivim podlogama (Slika 39.). Prilikom usporedbe broja enterokoka između uzoraka *Uzorkak 1.* (dodana samo *A. castellanii*) i *Uzorak 3.* (dodana i *F. novicida* i *A. castellanii*), rezultati pokazuju da enterokoki vrlo slično rastu u tim uzorcima, ali desetog dana nakon inokulacije je ipak za nijansu veći porast zabilježen u *Uzorku 3* (Slika 39.).

Ako usporedimo preživljavanje ukupnih koliforma između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.*, možemo ponovno zaključiti da bakterije najslabije preživljavaju u *Uzorku 2.* (dodana samo *F. novicida*), te u tom uzorku već 4., a zatim i 8. i 10. dana nije uopće zabilježen porast ukupnih koliforma na hranjivim podlogama (Slika 40.). *Uzorak 1.* i *Uzorak 3.* se 2. dana podosta razlikuju (podosta veći porast u *Uzorku 1.*), zatim imaju vrlo sličnu putanju rasta broja bakterija, a u konačnici (dan 10.) je za nijansu veći porast zabilježen u *Uzorku 1.* (Slika 40.).

Usporedbom preživljavanja bakterije *C. perfringens* između *Uzorka 1.*, *2.* i *3.*, zabilježena je jednaka situacija u sve tri vrste uzoraka, odnosno možemo zaključiti da uzorak rijeke Čabranke nije pogodan medij za rast *C. perfringens*. Naime, 0. dana je u sve tri vrste uzoraka zabilježen porast od 42 CFU/100 mL, a slijedećih dana (2., 4., 8. i 10. dan) nije uopće zabilježen porast *C. perfringens* u nijednome od sve tri vrste uzoraka (Slika 41.).

Praćenjem broja bakterije *E. coli* u različitim uzorcima tijekom deset dana, možemo zaključiti da uzorak rijeke Čabranke nije pogodan medij za rast ove bakterije, odnosno ova bakterija nije bila prisutna u rijeci u trenutku uzorkovanja. Naime, u nijednome od sve tri vrste uzoraka nije zabilježen porast na hranjivim podlogama (uključujući i 0. dan) (Slika 42.).

Jednaki rezultati kao i kod *E. coli*, zabilježeni su i kod fekalnih koliforma. Naime, u nijednome ispitivanom uzorku nije zabilježen porast fekalnih koliforma na hranjivim podlogama (uključujući i 0. dan) (Slika 43.).

Usporedba preživljavanja *F. novicida* nije praćena između sve tri vrste uzoraka, nego između uzoraka *Uzorak 2.* i *Uzorak 3.*, jer u *Uzorku 1.* nije prethodno dodana *F. novicida*. Dakle, usporedbom *Uzorka 2.* i *Uzorka 3.*, možemo zaključiti da *F. novicida* u konačnici bolje preživljava u *Uzorku 3.* (dodana i *F. novicida* i *A. castellanii*), a slabije u *Uzorku 2.* (dodana samo *F. novicida*) (Slika 44.). Veći broj bakterija zabilježen je u *Uzorku 3.* već 4., 8. i 10. dana. Iz grafa (Slika 44.) je vidljivo kako u *Uzorku 2.* s vremenom dolazi do pada broja *F. novicida*, dok u *Uzorku 3.* broj ostaje na istoj razini, odnosno nema tendenciju prema padu.

Usporedba preživljavanja *A. castellanii* nije praćena između sve tri vrste uzoraka, nego između uzoraka *Uzorak 1.* i *Uzorak 3.*, jer u *Uzorku 2.* nije prethodno dodana *A. castellanii*. Dakle, usporedbom *Uzorka 1.* i *Uzorka 3.*, vidljivo je da u obje vrste uzoraka broj *A. castellanii* već 2. dana pada (Slika 45.). Drugog dana je malo veći broj ameba zabilježen u *Uzorku 1.* (dodana samo *A. castellanii*), a malo manji broj u *Uzorku 3.* (dodana i *F. novicida* i

A. castellanii). Četvrtog (dan 4.), osmog (dan 8.) i desetog (dan 10.) dana nije zabilježena prisutnost ameba *A. castellanii*, ni u *Uzorku 1.*, ni u *Uzorku 3.* (Slika 45.).

Iz svega navedenog može se zaključiti slijedeće: gotovo kod svih vrsta bakterija (ukupni broj bakterija na 22 i 37 °C, ukupni koliformi, enterokoki) najslabiji porast zabilježen je u *Uzorku 2.* (dodana samo *F. novicida*), te je utvrđeno da je statistički značajno manji u određenim vremenskim razdobljima nakon inokulacije ($p < 0,05$) u odnosu na ostale uzorke (*Uzorak 1.* i *Uzorak 3.*).

Uzorak 1. (dodana samo *A. castellanii*) i *Uzorak 3.* (dodana i *F. novicida* i *A. castellanii*) imali su vrlo sličan rast bakterija; u nekim slučajevima bakterije su bolje rasle u *Uzorku 1.* (ukupni broj bakterija na 22 °C, ukupni koliformi), a u nekim slučajevima su bolje rasle u *Uzorku 3.* (ukupni broj bakterija na 37 °C, broj enterokoka). Međutim, treba naglasiti da iako je između *Uzorka 1.* i *Uzorka 3.* zabilježen vrlo sličan rast bakterija, znalo je biti slučajeva da su se poneki *time pointovi* podosta razlikovali (primjerice 2. dana kod ukupnih koliforma, Slika 40.). Naime, drugog dana nakon inokulacije (dan 2.) broj ukupnih koliforma je kod *Uzorka 3.* bio statistički značajno manji ($p < 0,05$) u odnosu na *Uzorak 1.* (Slika 40.). To je jedini slučaj kod kojeg je zabilježena statistički značajna razlika u broju bakterija između *Uzorka 1.* i *Uzorka 3.*.

Nadalje, možemo zaključiti da uzorak rijeke Čabranke nije pogodan medij za rast *C. perfringens*, *E. coli* te fekalnih koliforma, odnosno rijeka Čabranka nije kontaminirana tim bakterijama. Naime, u ova tri slučaja kod sve tri vrste uzoraka zabilježena je jednaka situacija: nije uopće zabilježen porast broja odnosno prisutnost bakterija na hranjivim podlogama (Slika 41., 42., 43.). Što se tiče *F. novicida*, ona bolje preživljava u *Uzorku 3.* (dodana i *F. novicida* i *A. castellanii*), nego u *Uzorku 2.* (dodana samo *F. novicida*) (Slika 44.). I na kraju, u slučaju *A. castellanii* drugog dana je zabilježen veći broj ameba u *Uzorku 1.* (dodana samo *A. castellanii*), a malo manji broj u *Uzorku 3.* (dodana i *F. novicida* i *A. castellanii*). Međutim, već četvrtog dana (dan 4.) nije zabilježena prisutnost *A. castellanii* u uzorcima, ni kod *Uzorka 1.*, ni kod *Uzorka 3.* (Slika 45.).

Također, cilj ovog diplomskog rada je bio ispitati utjecaj ameba *Acanthamoeba castellanii* na broj bakterije u riječnoj vodi na primjeru rijeke Čabranke u periodu od 10 dana. Dakle, *A. castellanii* je dodana u *Uzorak 1.* i *Uzorak 3.*. Broj *A. castellanii* u periodu od 10 dana u *Uzorku 1.* prikazan je na Slici 19., a broj *A. castellanii* u *Uzorku 3.* prikazan je na Slici 35.. Usporedba između *Uzorka 1.* i *Uzorka 3.* prikazana je na Slici 45.. Kao što je već rečeno,

drugog dana je zabilježen veći broj ameba u *Uzorku 1.* (dodana samo *A. castellanii*), a malo manji broj u *Uzorku 3.* (dodana i *F. novicida* i *A. castellanii*). Međutim, već četvrtog dana (dan 4.) nije zabilježena prisutnost *A. castellanii* u uzorcima. Na temelju rezultata zabilježenih drugog dana (dan 2.), možemo zaključiti da je u ovome slučaju amebama pogodnije kada se nalaze same u uzorku rijeke Čabranke, nego kada se nalaze zajedno s *F. novicida*, odnosno prisutnost *F. novicida* brže smanjuje broj ameba u uzorku. Dakle ne možemo reći da je ameba bakterije pojela odnosno fagocitirala, nego prije možemo zaključiti da je francisella pojela hranjive sastojke amebama te one zbog toga slabije preživljavaju kada se nalaze zajedno s francizelom u uzorku rijeke Čabranke, nego kada su same (bez francizele). Međutim, ne smijemo zaboraviti da nakon nekog vremena (nakon 4. dana) nije zabilježena prisutnost *A. castellanii* ni u *Uzorku 1.* (dodana samo *A. castellanii*), niti u *Uzorku 3.* (dodana i *F. novicida* i *A. castellanii*). Razlog tomu može biti nedostatak hranjivih tvari nakon 4. dana (bez obzira na to jesu li amebe u uzorku prisutne zajedno s francizelom ili su samostalne).

Također, cilj ovog diplomskog rada bio je pratiti utjecaj *F. novicida* na broj bakterija u riječnoj vodi. Dakle *F. novicida* dodana je u *Uzorak 2.* i *Uzorak 3.*. Broj *F. novicida* u *Uzorku 2.* prikazan je na Slici 27., a broj *F. novicida* u *Uzorku 3.* prikazan je na Slici 36.. Usporedba između *Uzorka 2.* i *Uzorka 3.* prikazana je na Slici 44. Kao što je već rečeno, grafički je odmah vidljivo da *F. novicida* bolje preživljava u *Uzorku 3.* (dodana i *F. novicida* i *A. castellanii*), nego u *Uzorku 2.* (dodana samo *F. novicida*). Dakle iz ovoga možemo zaključiti da *Francisella* bolje preživljava kada se u uzorku nalazi zajedno s *A. castellanii*, nego kada se nalazi samostalno. Ovaj rezultat potkrepljuje teoriju da *Francisella* u prirodi dugotrajnije preživljava u cistama *A. castellanii*, nego u samostalnom obliku (70,71,72,73). Možemo zaključiti da se na primjeru uzorka rijeke Čabranke *Francisella* razmnožava unutar amebe *A. castellanii*, odnosno duže opstaje uz prisutnost protozoe *A. castellanii*.

6. ZAKLJUČAK

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

- Prema *Uredbi o kakvoći voda za kupanje* rijeka Čabranka nije pokazala zadovoljavajući kriterij zbog prevelikog broja crijevnih enterokoka,
- Rijeka Čabranka nije pogodan medij za rast *C. perfringens*, *E. coli* te fekalnih koliforma, odnosno rijeka Čabranka nije pogodna za preživljavanje navedenih bakterija,
- Sve ispitivane vrste bakterija najslabije preživljavaju u uzorku vode iz rijeke Čabranke u koji je dodana samo *F. novicida*,
- Između uzoraka u koji je dodana samo *A. castellanii* i uzoraka u koji je dodana i *A. castellanii* i *F. novicida* zabilježen je vrlo sličan broj bakterija (nije zabilježena statistički značajna razlika), te ne možemo zaključiti da *A. castellanii* ima utjecaj na broj ostalih prethodno prisutnih bakterija u uzorcima,
- Amebama je pogodnije kada se nalaze samostalno u uzorku rijeke Čabranke, nego kada se nalaze zajedno s *F. novicida*,
- Četvrtog dana nakon inokulacije (dan 4.) nije zabilježena prisutnost *A. castellanii* u niti jednome od uzoraka, bez obzira na to jesu li amebe u uzorku prisutne zajedno s francizelom ili su samostalne,
- *F. novicida* bolje preživljava kada se u uzorku nalazi zajedno s *A. castellanii*, nego kada se nalazi samostalno u uzorku rijeke Čabranke.

7. LITERATURA

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

13. Green M, Choules G, Rogers D, Titball RW. (2005) Efficacy of the live attenuated *Francisella tularensis* vaccine (LVS) in a murine model of disease. *Vaccine*. 23(20):2680-6.
14. Eigelsbach HT, Downs CM. (1961) Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig. *J w* 87:415-25.
15. Oyston PC. (2008) *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *Journal of medical microbiology*. (Pt 8):921-30.
16. Wang, X., Ribeiro, A. A., Guan, Z., McGrath, S. C., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. H. (2006). Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. *Biochemistry* 45, 14427–14440.
17. Larson CL, Wicht W, Jellison WL. *Public Health Rep.* (1955); 70(3):253-8
18. Owen CR, Buker EO, Jellison WL, Lackman DB, Bell JF. Comparative studies of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*.
19. Birdsell, Dawn (2009). "*Francisella tularensis* subsp. *novicida* isolated from a human in Arizona." *BMC Research Notes*. 2: 223.
20. "Outbreak of *Francisella novicida* Infections Among Occupants at a Long-Term Residential Facility". (1964) Julie Hand, MSPH; Christine Scott-Waldron, MSPH; Gary Balsamo, DVM MPH & TM *J Bacteriol.*:676-83.
21. Whipp, M. J., Davis, J.M., Lum, G., de Boer, J., Zhou, Y., Bearden, S.W., Petersen, J. M., Chu, M. C. & Hogg, G. Characterization of a *novicida* like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J of Med Microbiol* (2003), 52: 839-842.
22. Rohmer L, Fong C, Abmayr S, et al. (2007). Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. *Genome Biol.* 8(6):R102.
23. Gallagher, L.A., McKeivitt, M., Ramage, E.R., Manoil, C. (2008). Genetic dissection of the *Francisella novicida* restriction barrier. *J Bacteriol.* 190(23):7830-7
24. Transformation and allelic replacement in *Francisella* spp. (1991) Anthony LS, Gu MZ, Cowley SC, Leung WW, Nano FEJ *Gen Microbiol*; 137(12):2697-703
25. Levesque, B., de Serres, G., Higgins, R., D'Halewyn, M. A. Atsorb, H., Grondin, J., Major, M., Garvie, M. & Duval, B. (1995). Seroepidemiologic study of three zoonoses (leptospirosis, Q fever, and tularemia) among trappers in Quebec, Canada. *Clin Diagn Lab Immunol* 2, 496–498.

26. Helvacı, S., Gedikoglu, S., Akalin, H. & Oral, H. B. (2000). Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. *Eur J Epidemiol* 16, 271–276.
27. McCrumb F. R. (1961). Aerosol infection of man with *Pasteurella tularensis*. *Bacteriol. Rev.* 25, 262–267
28. Ohara, Y., Sato, T., Fujita, H., Ueno, T. & Homma, M. (1991). Clinical manifestations of tularemia in Japan - analysis of 1355 cases observed between 1924 and 1987. *Infection* 19, 14–17.
29. Steinemann, T. L., Sheikholeslami, M. R., Brown, H. H. & Bradsher, R. W. (1999). Oculoglandular tularemia. *Arch Ophthalmol* 117, 132–133.
30. Matyas, B. T., Nieder, H. S. & Telford, S. R., III (2007). Pneumonic tularemia on Martha's Vineyard - clinical, epidemiologic, and ecological characteristics. *Ann N Y Acad Sci* 1105, 351–377.
31. Dennis, D. T., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Fine, A. D., Friedlander, A. M., Hauer, J. & other authors (2001). Tularemia as a biological weapon: Medical and Public Health Management. *JAMA* 285, 2763–2773.
32. Ellis, J., Oyston, P. C. F., Green, M., and Titball, R. W. (2002) Tularemia, *Clinical Microbiol. Rev.* 631-646
33. Behr M. Laboratory-acquired lymphadenopathy in a veterinary pathologist. (2000) *Lab Anim (NY)*;29:23–25.
34. Teutsch SM, Martone WJ, Brink EW, et al. (1979) Pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. *N Engl J Med*;301:826–828.
35. Gustafson BW, DeBowes LJ. Tularemia in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* (1996) ;32:339–341
36. Johnson HN. Natural occurrence of tularemia in dogs used as a source of canine distemper virus. (1944) *J Lab Clin Med*;29:906–915
37. Woods JP, Panciera RJ, Morton RJ, et al. Feline tularemia. (1998) *Compend Contin Educ Pract Vet*;20:442–457.
38. Nayar GPS, Crawshaw GJ, Neufeld JL. Tularemia in a group of nonhuman primates. (1979) *J Am Vet Med Assoc*;175:962–963.
39. Waggle K, Day-Lollini P, Murphy-Hackley P, et al. (1997) Diagnostic exercise: illness, cutaneous hemorrhage, and death in two squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Lab Anim Sci*;47:647–649
40. Tarnvik, A. & Chu, M. C. (2007). New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann N Y Acad Sci* 1105, 378–404.

41. Johansson, A., Berglund, L., Sjostedt, A. & Tarnvik, A. (2001). Ciprofloxacin for treatment of tularemia. *Clin Infect Dis* 33, 267–268
42. Titball, R. W. & Petrosino, J. F. (2007). *Francisella tularensis* genomics and proteomics. *Ann N Y Acad Sci* 1105, 98–121.
43. Burke, D. S. (1977). Immunization against tularemia: analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory-acquired tularemia. *J Infect Dis* 135, 55–60.
44. Oyston, P. C. F., Sjostedt, A. & Titball, R. W. (2004). Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol* 2, 967–978.
45. Clemens, D. L., Lee, B. Y. & Horwitz, M. A. (2005). *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun* 73, 5892–5902.
46. Thakran, S., Li, H., Lavine, C. L., Miller, M. A., Bina, J. E., Bina, X. R. & Re, F. (2007). Identification of *Francisella tularensis* lipoproteins that stimulate the Toll-like receptor (TLR) 2/TLR1 heterodimer. *J Biol Chem* 283, 3751–3760.
47. Barel M, Hovanessian AG, Meibom K, Briand JP, Dupuis M, Charbit A. A novel receptor - ligand pathway for entry of *Francisella tularensis* in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu. *BMC microbiology*.2008;8:145.
48. Melillo A, Sledjeski DD, Lipski S, Wooten RM, Basrur V, Lafontaine ER. Identification of a *Francisella tularensis* LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. *FEMS microbiology letters*. 2006 Oct;263(1):102-8.
49. Geier H, Celli J. Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of *Francisella tularensis*. *Infection and immunity*. 2011 Jun;79(6):2204-14.
50. Tamilselvam B, Daefler S. *Francisella* targets cholesterol-rich host cell membrane domains for entry into macrophages. *J Immunol*. 2008 Jun 15;180(12):8262-71. 54. Acid Resistance in *Francisella tularensis* Noreen J Adcock, Brian J Morris and Eugene W Rice- Abstract
51. Shaun, S.; Brunton, J., Ziehr, B., Taft-Benz, S., Moorman, N., Kawula, T.. *F. tularensis* Harvest Nutrients Derived via ATG5-Independed Autophagy to Support Intracellular Growth. *PLOS. Pathogens*. 2013. 9; 8.

52. Meijer, A.J., Codogno, P., (2011). Autophagy: Regulation by energy sensing. *Curr Biol* 21(6): R227-229.
53. Keim, P., Johansson, A., Wagner, D. M. (2007) Molecular epidemiology, evolution and ecology of *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci* 1105: 30-66.
54. Saslaw, S., Eigelsbach, H. T., Prior, J. A., Wilson, H. E., Carhart, S. (1961) Tularemia vaccine study. II respiratory challenge. *Arch Intern Med* 107: 702-714.
55. Gray, C. G., Cowley, S.C., Cheung, K. K. M., Nano, F. E. (2002) . The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol Lett* 215, 53-56.4
56. Chong, A., Celli, J. The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Frontiers in Microbiol.* 2010. (1) 138.
57. Šantić, M., Molmeret, M., Abu Kwaik, J. Modulation of biogenesis of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida*-containing phagosome in quiescent human macrophages and its maturation into a phagolysosome upon activation by IFN-gamma. *Cell Microbiol* (2005) 7(7), 957-967.
58. Baron, G. S., Francis, E. N. *MglA* and *MglB* are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol Microbiol* (1998) 29(1), 247-259.
59. Lauriano, C. M., Barker, J. R., Francis, E. N., Arulanandam, B. P., Hassett, D. J., Klose, K. E. *MglA* regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *PNAS.* (2004)111(12), 4246-4249.
60. Ojeda, S. S., Mares, C. A., Alvarez, J. I., Qun Li, Orihuela, C. J., Teale, J. M. Virulence factors involved in passage of *Francisella tularensis* subsp. *novicida* through an air blood barrier model. *Bioterr Biodef.* 2011, S3.
61. Maggio, S., Takeda, K., Stark, F., Meierovics, A. I., Yabe, I., Cowley, S. C. Control of *Francisella tularensis* intracellular growth by pulmonary epithelial cells. *PLOS ONE* (2015).
62. Šantić, M., Molmeret, M., Barker, J. R., Klose, K. E., Dekanić, A., Dorić, M., Abu Kwaik, Y. (2007). A *Francisella tularensis* pathogenicity island protein essential for bacterial proliferation within the host cell cytosol. *Cell Microbiol* 9, 2391-2403.
63. Bröms, J.E., Meyer, L., Sun, K., Lavander, M., Sjöstedt, A., (2012). Unique substrates secreted by the type VI secretion system of *Francisella tularensis* during intramacrophage infection. *PLoS One.* 7(11):e50473.

64. Lauriano, C. M., et al. (2004). MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:4246–4249.
65. Santic, M., et al. (2005). The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IgIC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell. Microbiol.* 7: 969–979.
66. Sissons, J., Alsam, S., Stins, M., Rivas, A. O., Morales, J. L., Faull, J., and Khan, N. A. (2006) Use of In Vitro Assays To Determine Effects of Human Serum on Biological Characteristic of *Acanthamoeba castellanii*, *J. Clin. Microbiol.* 44: 2595-2600
67. Wang, X., Ahearn, D. G. (1997) Effect of Bacteria on Survival and Growth of *Acanthamoeba castellanii*, *Curr. Microbiol.* 34: 212 – 215
68. Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandström, G., and Forsman, M. (2003) Survival and Growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*, *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 600 – 606
69. Cooper G.M, Hausman R.E. Stanica, molekularni pristup, 5. izdanje
70. Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandstrom G, Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and environmental microbiology*. 2003 Jan;69(1):600-6.
71. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical microbiology reviews*. 2004 Apr;17(2):413-33.
72. Santic M, Ozanic M, Semic V, Pavokovic G, Mrvcic V, Kwaik YA. Intra-Vacuolar Proliferation of *F. Novicida* within *H. Vermiformis*. *Frontiers in microbiology*. 2011;2:78.
73. El-Etr SH, Margolis JJ, Monack D, Robison RA, Cohen M, Moore E, et al. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Applied and environmental microbiology*. 2009 Dec;75(23):7488-500.
74. Tomac Kapelan I., Šafar J., Crnić A., Frković A., Heski T., Janeš J. i sur., GORSKI KOTAR, Delnice, Fond knjige „Gorski kotar“, 1981.
75. LEKSIKOGRAFSKI ZAVOD MIROSLAV KRLEŽA, Čabranka [Internet]; pristupljeno: 18.5.2021. Dostupno na: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=13107>

76. Ćuzela-Bilać D., Piškur V., *Zdravstvena ispravnost vode za piće na području Primorsko-goranske županije u 2005. godini*, Zdravlje u Primorsko-goranskoj županiji, 2007.; Vol 3, broj 9
77. NASTAVNI ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO PGŽ, VODOOPSKEBNI SUSTAVI NA PODRUČJU ČABRA [Internet]; pristupljeno: 18.5.2021. Dostupno na: <https://www.zzjzpgz.hr/vode/index.php?zoom=cabar>
78. NASTAVNI ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO PGŽ, *ZDRAVSTVENA ISPRAVNOST VODE ZA LJUDSKU POTROŠNJU NA PODRUČJU PRIMORSKO-GORANSKE ŽUPANIJE U 2017. GODINI* [Internet]; pristupljeno: 19.5.2021. Dostupno na: <https://www.zzjzpgz.hr/vode/vode2017.pdf>
79. Āir s Davorom Jurkotićem – Āabar [Internet]; pristupljeno: 19.5.2021. Dostupno na: https://www.youtube.com/watch?v=1QzyQW_tjfE (od 25:30 do 26:30)
80. Šantić M., Gobin I., Ožanić M., Marečić V., *MIKROBIOLOGIJA HRANE I VODE za studente preddiplomskog studija sanitarnog inženjerstva*, Rijeka, Medicinski fakultet sveučilišta u Rijeci, Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, 2014.
81. Uredba o kakvoći vode za kupanje, NARODNE NOVINE [Internet]; pristupljeno: 29.5.2021. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2010_04_51_1220.html
82. Kućan M., Utjecaj temperature na porast razliĉitih vrsta *Legionella* na hranjivoj podlozi uz prisutnost amebe *Acanthamoeba castellanii*, CROSB I Hrvatska znanstvena bibliografija [Internet]; pristupljeno: 7.6.2021. Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/429007>
83. Nora V., UTJEC AJ CITOHALASINA D NA ULAZAK BAKTERIJA *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* I *FRANCISELLA NOVICIDA* U AMEBU *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*, CROSB I Hrvatska znanstvena bibliografija [Internet]; pristupljeno: 7.6.2021. Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/836874>
84. Źagar I., Preživljavanje *Francisella novicida* u vodama iz rijeka Āabranka, Kupica i Gerovćica, CROSB I Hrvatska znanstvena bibliografija [Internet]; pristupljeno: 7.6.2021. Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/1027862>
85. Lee BY, Horwitz MA, Clemens DL. Identification, recombinant expression, immunolocalization in macrophages, and T-cell responsiveness of the major extracellular proteins of *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* 2006;74:4002-13.

8. KRATKI ŽIVOTOPIS

OSOBNÉ INFORMACIJE:

IME I PREZIME: Ivan Žagar

DATUM ROĐENJA: 10.9.1997.

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

KONTAKT: +385 99/769 93 59

MAIL: zagarivan03@gmail.com

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE:

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

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

2016. – 2019.: Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

Medicinski fakultet Rijeka (Hrvatska)

2019. – 2021.: Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

Medicinski fakultet Rijeka (Hrvatska)