

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivan Vidinić

UTJECAJ AMEBA NA BROJ BAKTERIJA U JEZERSKOJ 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 ima 64 stranice, 15 slika, 2 tablice, 37 literaturnih navoda

Zahvala

Izrazitu zahvalnost dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marini Šantić koja mi je pomogla svojim savjetima i omogućila pristup svim potrebnim materijalima za izradu ovog diplomskog rada. Hvala za ideju, vrijeme i strpljenje.

Zahvaljujem se dr. sc. Valentini Marečić, doc. dr. sc. Mateji Ožanič te čitavom osoblju Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju na Medicinskom fakultetu u Rijeci na pomoći u izvršavanju laboratorijskog dijela diplomskog rada.

Također se zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i usmjeravanju ka pravom putu, kako u obrazovanju, tako i u životu.

Sažetak

Rod *Francisella* predstavlja skupinu gram negativnih bakterija od kojih je *F. tularensis* najvirulentnija i najpatogenija vrsta te uzrokuje tularemiju, bolest koja se s glodavaca vektorima člankonošcima može prenijeti na čovjeka. Klinička manifestacija je povezana s mjestom ulaska patogena, pa se sukladno tome mogu razviti ulceracije i upale limfnih čvorova na području očiju, kože, dišnog i probavnog sustava koje u najtežim slučajevima prelaze u sustavnu infekciju. Rod *Acanthamoeba* predstavlja skupinu ameba koje se zbog sposobnosti encistacije mogu pronaći u svim staništima, odnosno u vodi, zraku i tlu. Etiološki čimbenik koji najčešće uzrokuje granulomatozni amebni encefalitis i amebni keratitis jest *Acanthamoeba* spp. T4. Amebni encefalitis je karakteriziran halucinacijama, letargijom i epileptičkim napadima što su posljedice invazije središnjeg živčanog sustava. Simptomi amebnog keratitisa uključuju edeme konjunktive i kapaka uz jaku bol u očima zbog prodiranja amebe u epitel rožnice oka preko kontaminirane vode. Cilj ovog istraživanja je bio usporediti razmnožavanje bakterijskog soja *Francisella novicida* U112 i amebnog soja *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30234 u nesterilnim uzorcima vode iz Lokvarskog jezera zajedno s bakterijama stalne mikroflore spomenutog vodenog ekosustava. Lokvarsko jezero je umjetno jezero nastalo izgradnjom brane u svrhu iskorištavanja energije vodotoka za potrebe hidroelektrane Vinodol. Nalazi se u blizini naselja Lokve u Gorskom kotru na 767 m nadmorske visine. U praktičnom je radu za kultivaciju *F. novicida* U112 korišten BCYE agar, dok je za uzgoj *A. castellanii* ATCC 30234 upotrijebljen PYG medij. Laboratorijski rad je uključivao i korištenje drugih hranjivih podloga ovisno o proučavanoj bakteriji stalne mikroflore jezera. Pri obradi uzoraka je korištena metoda membranske filtracije te metoda nasađivanja na hranjivu podlogu. Od tri pripremljena uzorka, u prvi je inokulirana *F. novicida*, u drugi *A. castellanii* te u treći *F. novicida* i *A. castellanii*. Praćena je promjena broja *F. novicida*, *A. castellanii* i bakterija stalne mikroflore jezera u sva

tri uzorka kroz vremensko razdoblje od 10 dana. Grafičkom obradom rezultata je utvrđeno da *F. novicida* sprječava rast i razmnožavanje *A. castellanii* i bakterija stalne mikroflore jezera uzimajući im hranjive tvari. Također je potvrđeno da *A. castellanii* služi *F. novicida* i bakterijama stalne mikroflore jezera kao domaćin iz kojeg crpe hranjive komponente potrebne za preživljavanje.

Ključne riječi: *Francisella*, tularemija, *Acanthamoeba*, granulomatozni amebni encefalitis, amebni keratitis, Lokvarsko jezero

Summary

The genus *Francisella* represents a group of gram-negative bacteria of which *F. tularensis* is the most virulent and pathogenic species and causes tularemia, a disease that can be transmitted from rodents to arthropod vectors. The clinical manifestation is associated with the site of entry of the pathogen, and accordingly may develop ulcerations and inflammation of the lymph nodes in the eyes, skin, respiratory and digestive systems, which in the most severe cases turn into a systemic infection. The genus *Acanthamoeba* is a group of amoebae that can be found in all habitats, in water, air and soil, due to their ability to survive. The etiological factor most commonly causing granulomatous amoebic encephalitis and amoebic keratitis is *Acanthamoeba spp.* T4. Amoebic encephalitis is characterized by hallucinations, lethargy, and epileptic seizures resulting from invasion of the central nervous system. Symptoms of amoebic keratitis include edema of the conjunctiva and eyelids with severe pain in the eyes due to the penetration of the amoeba into the epithelium of the cornea of the eye through contaminated water. The aim of this study was to compare the reproduction of the bacterial strain *Francisella novicida* U112 and the amoebic strain *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30234 in non-sterile water samples from Lokve lake together with the bacteria of the permanent microflora of the mentioned aquatic ecosystem. Lokve lake is an artificial lake created by the construction of a dam for the purpose of using the energy of watercourses for the needs of the Vinodol hydroelectric power plant. It is located near the village of Lokve in Gorski kotar at 767 m above sea level. In practical work, BCYE agar was used for the cultivation of *F. novicida* U112, while PYG medium was used for the cultivation of *A. castellanii* ATCC 30234. Laboratory work also included the use of other nutrient media depending on the studied bacterium of the permanent microflora of the lake. Membrane filtration method and the method of planting on a nutrient medium were used in the processing of samples. Of the three prepared samples, *F. novicida*

was inoculated in the first, *A. castellanii* in the second, and *F. novicida* and *A. castellanii* in the third. The change in the number of *F. novicida*, *A. castellanii* and bacteria of the permanent microflora of the lake in all three samples was monitored over a period of 10 days. Graphical processing of the results showed that *F. novicida* prevents the growth and reproduction of *A. castellanii* and bacteria of the permanent microflora of the lake by taking their nutrients. It has also been confirmed that *A. castellanii* serves *F. novicida* and the bacteria of the permanent microflora of the lake as a host from which they draw the nutrients necessary for survival.

Key words: *Francisella*, tularemia, *Acanthamoeba*, granulomatous amoebic encephalitis, amoebic keratitis, Lokve lake

Sadržaj

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. <i>Francisella</i> spp.	1
1.1.1. Taksonomska podjela.....	1
1.1.2. <i>Francisella novicida</i>	2
1.2. Tularemija.....	3
1.2.1. Geografska rasprostranjenost i epidemiologija.....	3
1.2.2. Rezervoari i putevi prijenosa.....	5
1.2.3. Činitelji patogenosti.....	6
1.2.4. Unutarstanični život i virulencija.....	7
1.2.5. Klinička slika.....	9
1.2.6. Dijagnoza.....	10
1.2.7. Liječenje i prevencija.....	11
1.2.8. Cjepivo.....	11
1.3. <i>Acanthamoeba</i> spp.....	12
1.3.1. Taksonomska podjela.....	12
1.3.2. Morfologija.....	12
1.3.3. Putevi prijenosa.....	14
1.3.4. Patogenost.....	15
1.4. <i>Acanthamoeba</i> infekcije.....	15
1.4.1. Granulomatozni amebni encefalitis.....	16
1.4.2. Amebni keratitis.....	17
1.4.3. Ostale <i>Acanthamoeba</i> infekcije.....	18
1.5. Voda.....	19
1.5.1. Lokvarsko jezero.....	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	22
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. Uzimanje uzoraka vode.....	23
3.2. Metoda membranske filtracije.....	23
3.3. Metoda nasađivanja na hranjivu podlogu.....	24
3.4. <i>Francisella novicida</i>	25
3.4.1. Bakterijski soj.....	25
3.4.2. Hranjiva podloga.....	25
3.4.3. Priprema i inokulacija <i>F. novicida</i>	26

3.5.	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	27
3.5.1.	Amebni soj	27
3.5.2.	Hranjiva podloga	28
3.5.3.	Priprema i inokulacija <i>A. castellanii</i>	28
3.6.	Bakterije stalne mikroflore Lokvarskog jezera	30
3.7.	Određivanje broja bakterija i ameba.....	32
3.8.	Statistička obrada podataka	33
4.	REZULTATI.....	34
4.1.	Kinetika rasta ukupnog broja bakterija na 22 °C u vodi iz Lokvarskog jezera	34
4.2.	Kinetika rasta ukupnog broja bakterija na 37 °C u vodi iz Lokvarskog jezera	36
4.3.	Kinetika rasta enterokoka u vodi iz Lokvarskog jezera.....	37
4.4.	Kinetika rasta ukupnih koliforma u vodi iz Lokvarskog jezera	39
4.5.	Kinetika rasta <i>C. perfringens</i> u vodi iz Lokvarskog jezera	40
4.6.	Kinetika rasta <i>E. coli</i> u vodi iz Lokvarskog jezera.....	41
4.7.	Kinetika rasta fekalnih koliforma u vodi iz Lokvarskog jezera	42
4.8.	Kinetika rasta <i>A. castellanii</i> u vodi iz Lokvarskog jezera	44
4.9.	Kinetika rasta <i>F. novicida</i> u vodi iz Lokvarskog jezera	45
5.	RASPRAVA	47
6.	ZAKLJUČAK	50
7.	LITERATURA.....	52

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. *Francisella* spp.

Bakterije unutar roda *Francisella* su mali gram negativni kokobacili koji posjeduju genom od 1,89 Mb [1,2]. Rod bakterije *Francisella* dobio je naziv prema Edwardu Francisu, koji je ustanovio prve kliničke sindrome tularemije nakon izolacije bakterije koja je 1912. godine bolešću sličnoj kugi poharala okrug Tulare u Kaliforniji [5].

1.1.1. Taksonomska podjela

Francisella tularensis se grana u tri podvrste, od kojih *F. tularensis* (tip A) uzrokuje zoonozu tularemiju, teže oboljenje od *F. holarctica* (tip B), dok je *F. mediasiatica* slabije proučavana [1]. Primarni ljudski patogen je *F. tularensis*. *F. novicida* i *F. philomiragia* su sojevi koji se nalaze u okolišu i netipični ljudski patogeni, dok je *F. noatunensis* uzročnik bolesti kod riba [2]. Podvrste *tularensis* i *novicida* obitavaju na području Sjeverne Amerike, *holarctica* na teritoriju Euroazije, dok *mediasiatica* većinski u središnjem dijelu Azije (slika 1.) [6]. Navedene se podvrste razlikuju virulencijom i zemljopisnim podrijetlom, no sve uzrokuju bolest koja je u težem ili blažem obliku nalik tularemiji [3]. Među ostalim otkrivenim vrstama roda *Francisella* ističu se *F. hispaniensis*, *F. piscidida*, *F. guangzhouensis*, *F. opportunistica*, *F. salina*, *F. uliginis*, *F. frigiturris* i *F. adeliensis* [21]. Isprva je *Francisella* bila uključena kao vrsta među rodovima bakterija *Pasteurella* i *Brucella* da bi na posljetku bila svrstana kao zaseban rod. Znanstvenici još uvijek raspravljaju treba li *F. novicida* biti podvrsta *F. tularensis* ili posebna vrsta obzirom na izrazitu genetsku sličnost ovih dvaju bakterija [6].

Tablica 1. Sadašnja i bivša terminologija najpoznatijih vrsta roda *Francisella*.

Trenutna terminologija	Prethodna imena	Geografski položaj
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	<i>Francisella tularensis</i> A; <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>nearartica</i>	Sjeverna Amerika
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	<i>Francisella tularensis</i> B; <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>palaeartica</i>	Europa, Sibir, Daleki Istok, Kazahstan i Sjeverna Amerika
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i>		Središnja Azija i dijelovi bivšeg SSSR-a
<i>Francisella novicida</i>	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i>	Sjeverna Amerika

1.1.2. *Francisella novicida*

Smatra se da je *Francisella novicida* nastala evolucijom iz prethodnih oblika roda *Francisella*. Poznata je kao oportunistički ljudski patogen koji uzrokuje virulentnu bolest nalik tularemiji kod miševa [1]. Iako je rijetko patogena kod ljudi, njezin genom ima izrazito sličnu nukleotidnu sekvencu kao i *F. tularensis* pa se iz tog razloga učestalo koristi kao model za proučavanje visoko infektivnih podvrsta [3]. Nakon opsežne karakterizacije pronađene bakterije u uzorku slane vode u Utahu, koja je bila nalik *F. tularensis*, utvrđeno je da se radi o zasebnoj vrsti roda *Francisella*. Istraživanja su pokazala da bakterija morfološki slični *F. tularensis*, međutim nakon utvrđenih fenotipskih razlika, ovaj izolat je dobio jedinstveno ime *F. novicida* te je zbog izrazite genetske sličnosti s *F. tularensis* svrstan u njenu podvrstu [5].

Otada je *F. novicida* pronađena u drugim izvorima boćate vode te je za nju poznato da je uzrokovala tek desetak dokumentiranih slučajeva zaraze čovjeka. Svi evidentirani slučajevi su bili povezani s osobama otprije narušenog zdravlja, odnosno to su bile većinski imunokompromitirane osobe te u manjem dijelu oboljele od limfadenopatije koja nije bila popraćena standardnim simptomima tularemije. U usporedbi s *F. tularensis*, *F. novicida* ima snažniji imunološki odgovor što značajno umanjuje replikaciju bakterija u makrofagima pa prevladava obrana domaćina [4]. U slučajevima oboljenja uzrokovanih s *F. novicida* nisu zabilježeni standardni oblici tularemije kao što su ulceroglandularni, respiratorni, okuloglandularni i orofaringealni [5]. Iako nepatogena za čovjeka, *F. novicida* može biti smrtonosna kod miševa.

1.2. Tularemija

Tularemiju („zečju groznicu“) uzrokuju vrste roda *Francisella* [2]. *F. tularensis* slovi za jednog od najzaraznijih do sada poznatih bakterijskih patogena koji je u stanju uzrokovati infekciju sa samo 25 mikroorganizama. Uz podvrstu *tularensis*, i *holarctica* također uzrokuje tularemiju ali sa manjom smrtnošću [5]. Tularemija je zoonotska, vektorska bolest koja se sa sisavaca koji su primarni domaćini prenosi putem ugriza člankonožaca. Sisavci domaćini spomenute bolesti su najčešće zečevi, odnosno glodavci, dok vektori člankonošci većinski uključuju komarce, krpelje i muhe. Ugriz krpelja je najčešći oblik prijenosa zaraze sa životinje na čovjeka. Infekcija s čovjeka na čovjeka nije zabilježena [5].

1.2.1. Geografska rasprostranjenost i epidemiologija

Osim naziva „zečja groznica“, tularemiji se u raznim dijelovima svijeta pripisuju nazivi poput leming groznice ili jelenske groznice [6]. Bakterije roda *Francisella* se pretežno nalaze

na sjevernoj zemljinoj polutki [2]. Od otkrića bakterije u 20. stoljeću poznato je da se ona većinom javlja u Sjevernoj Americi, Skandinaviji, Rusiji i Japanu (slika 2.). Manje je poznato da je bolest proširena na područja Švicarske, Španjolske, Turske i Balkanskog poluotoka što govori da je tularemija rasprostranjenija nego što se prvotno mislilo [6].

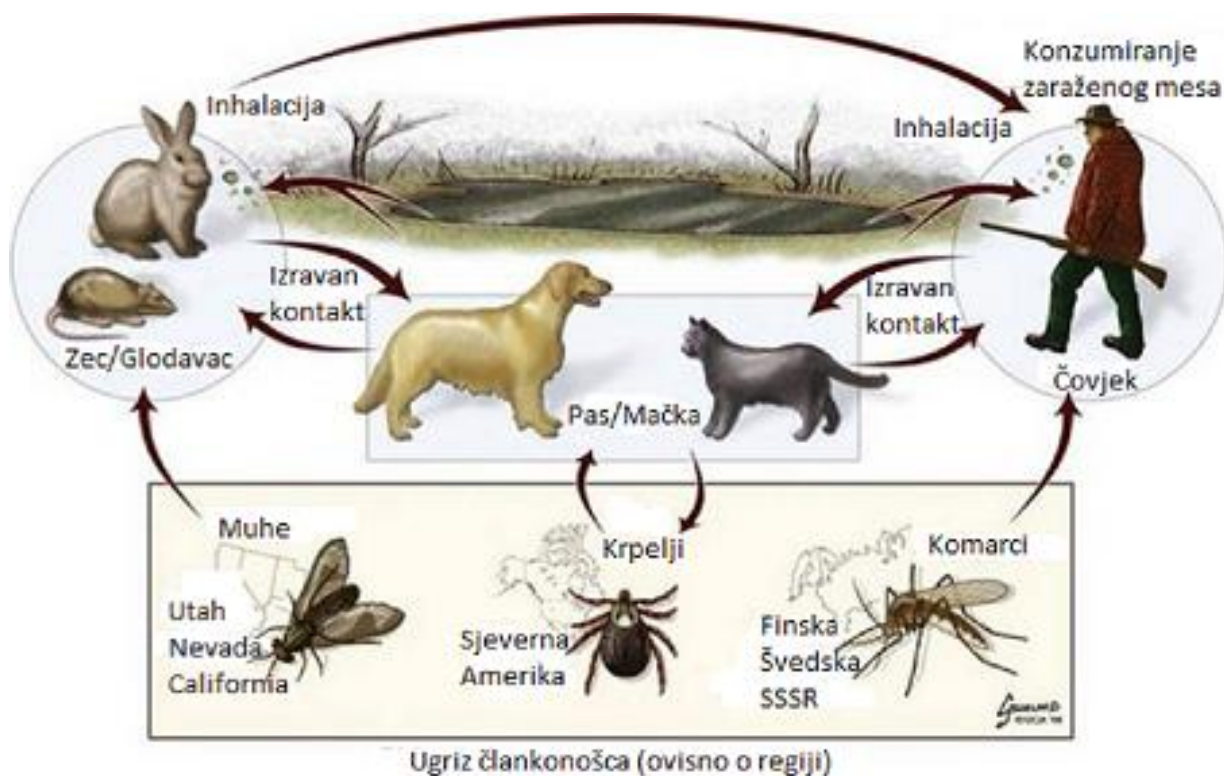


Slika 1. Geografska rasprostranjenost roda *Francisella*. Osjenčana polja predstavljaju područja prisutstva bakterije. Izvor: Ellis J., Oyston P. C. F., Green M., Titball R. W. (2002). *Tularemia*

Izbijanje bolesti kod ljudi je najčešće u korelaciji sa epidemijom kod životinja. U Švedskoj je zabilježeno paralelno oboljenje ljudske populacije i životinja nakon otkrivanja većeg broja slučajeva kod zečeva i voluharica. Također postoji podatak da je u bivšem SSSR-u buknuła epidemija tularemije nakon oboljenja kod kopnenih voluharica, iako nije sa sigurnošću utvrđeno da su glodavci pravi rezervoari bolesti u okolišu [6].

1.2.2. Rezervoari i putevi prijenosa

Organizmi u kojima se najčešće nalazi *Francisella* su vektori poput krpelja i komaraca ali bakterija može preživjeti u amebama, ribama, pticama i postati unutarstanični patogen u sisavcima. Među krpeljima se ističu vrste *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus* koje su pretežno rasprostranjene u srednjoj Europi. Komarci roda *Aedes*, *Culex* i *Anopheles* česti su prenosioci na području Rusije [6]. Životni ciklus spomenute bakterije može uključivati tri elementa, odnosno okoliš, vektor i domaćin. Ljudska vrsta je slučajni domaćin ove zoonotske bakterije, međutim *Francisella* je vrlo zarazna za ljude u slučaju udisanja aerosola, kod kojeg je dovoljno manje od sto mikroorganizama za razvoj infekcije. *Francisella* se, dakle, prenosi ubodom insekata, izravnim kontaktom ili konzumacijom kontaminiranih životinjskih tkiva, unosom onečišćene vode i udisanjem aerosola (Slika 2.). Bakterija je u povijesti korištena i kao biološko oružje [2]. Sjedinjene Američke Države su u drugoj polovici dvadesetog stoljeća procijenile ovaj mikroorganizam kao biološko oružje, da bi potom bivše države SSSR-a uvrstile *Francisella* u skupinu biološkog agensa [6]. *F. tularensis* je primarno zoonotska bakterija koja se, osim u zečevima, može naći u tkivu voluharica, vjeverica i dabrova. S druge strane, identifikacija *F. novicida* nije još zabilježena kod životinja te je dosad njeno jedino stanište vodeno područje u prirodi gdje obitava kao slobodno živući mikroorganizam [5]. Nije rijedak slučaj da *F. tularensis* opstaje u vodotocima, odnosno preživljava u amebama ili dabrovima [6].



Slika 2. Rezervoari i putevi prijenosa roda *Francisella*. Prilagođeno s izvora: Van Hoek M. L., Hoang K. V., Gunn J. S. (2019). *Two-Component Systems in Francisella Species*

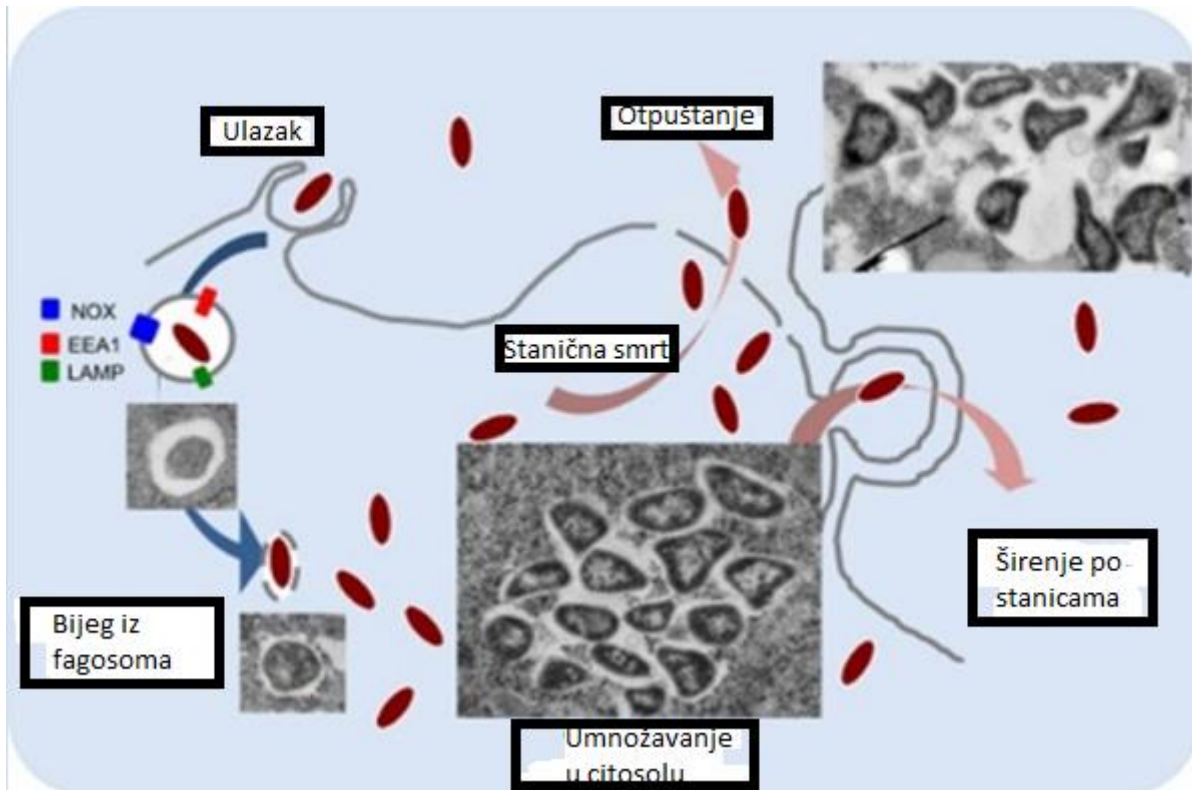
1.2.3. Činitelji patogenosti

Činitelje patogenosti *F. novicida* čine lipopolisaharid, kapsula i pili. Lipopolisaharid se sastoji od lipida A, O-antigena i središnjeg oligosaharidnog dijela. Lipid A je endotoksin i ključan je za virulentnost bakterije, dok je O-antigen zaslužan za virulenciju unutar stanice domaćina te se njegova uloga razlikuje ovisno o vrsti *Francisella* [23][24]. Polisaharidna kapsula pruža zaštitu bakterijskoj stanici od fagocitoze, lize posredovane serumskim komplementom i imunološkog odgovora domaćina. Za vrste roda *Francisella* je karakteristična 0,02-0,04 mikrometra debela struktura nalik kapsuli, za koju je poznato da sudjeluje u virulenciji bakterije [21]. Sustav pila tip IV se sastoji od filamentoznih vlakana smještenih na površini stanice bakterija. Važnost pila kao čimbenika virulencije jest njihova uloga u adherenciji bakterije na površinu stanice, prijenosu DNK i u stvaranju biofilma [22].

1.2.4. Unutarstanični život i virulencija

Bakterije iz roda *Francisella* moraju modificirati ekspresiju gena da bi preživjele u neprijateljskim okruženjima te je dokazano da *Francisella* regulira ekspresiju četiri proteina (20, 23, 55 i 70 kDa) tijekom rasta u makrofagu [6]. *F. tularensis* slovi kao fakultativni unutarstanični patogen koji može inficirati velik broj stanica, prvenstveno stanice sisavaca i člankonožaca. Nakon ulaska u makrofage, bakterije prvo obitavaju u fagosomu, iz kojeg ubrzo bježe u citoplazmu inficiranog domaćina. *Francisella* unutar fagosoma mora izbjeći antimikrobnu obranu domaćina, poput reaktivnih kisikovih čestica (ROS) koje proizvodi NADPH oksidaza. Stoga, da bi nadjačala imunosti odgovor domaćina, bakterija mora posjedovati enzime od kojih se ističu superoksid dismutaza, katalaza i kisele fosfataze [3]. Bakterija se razmnožava u citosolu što rezultira apoptozom stanice domaćina. *Francisella* pripada obitelji bakterija koje se razmnožavaju jedino u citosolnom odjeljku zaraženih stanica domaćina. Uz *Francisellu*, spomenuta obitelj uključuje listerije, šigele i rikecije te sve imaju izravan pristup citosolnim elementima koji im služe za rast u takvom okruženju. *F. tularensis* je evolucijski prilagođena opstanku u unutarstaničnom životu gubitkom gena za mnoštvo metaboličkih puteva te je razvila mehanizme za stjecanje hranjivih tvari unutar različitih tipova stanica. Suprotno tome, ostali unutarstanični mikroorganizmi obitavaju u vakuolama te zbog toga moraju uvesti hranjive tvari domaćina prije nego ih iskoriste. Nakon nekoliko ciklusa razmnožavanja u citoplazmi, *Francisella* migrira u susjedna tkiva većinski nakon oslobađanja iz liziranih stanica [3]. U svrhu modeliranja infekcije kod životinja najčešće se koriste miševi kod kojih je otkriveno da fagocitne stanice bivaju prve zaražene, te se potom zaraza širi prema drugim tkivima u tijelu. Smatra se da *F. tularensis* razvija strategije izbjegavanja imunosti odgovora domaćina i sposobna je umnožiti se u visokoj mjeri u plućima, jetri i slezeni prije nego imunosti sustav biva potaknut da odgovori djelovanjem citokina [1]. Odlučujući faktor virulencije ovog mikroorganizma su geni koje koriste za unutarstaničnu replikaciju. Stoga neki

geni kod bakterije mogu biti usmjereni na infekciju kod domaćina, dok se drugi odnose na širenje u vektorima i okolišu [2].



Slika 3. Unutarstanični životni ciklus *F. tularensis*. Prikaz unutarstanične *Francisella* elektronskom mikroskopijom. Prilagođeno prema izvoru: Ellis J., Oyston P. C. F., Green M., Titball R. W. (2002). *Tularemia*

Francisella je pri ulazu u stanicu velikim pseudopodijama ugrađena u makrofage. Potom bakterije privremeno borave u fagosomnom odjeljku iz kojeg stižu u citoplazmu gdje uzimaju hranjive tvari za rast. Naposljetku sele u susjedna tkiva oslobađanjem iz mrtvih stanica nakon apoptoze [3].

Tablica 2. Smrtonosne doze najpoznatijih vrsta roda *Francisella*

Podvrsta	50 % smrtonosna doza, CFU			
	Ljudi	Miševi	Zamorci	Zečevi
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	10	10	10	1-10
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	10 ³	1	10	10 ⁶
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i>	Bez rezultata	Bez rezultata	Bez rezultata	Bez rezultata
<i>Francisella novicida</i>	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³

1.2.5. Klinička slika

Klinički izraz bolesti u ljudi primarno ovisi o putu prijenosa. Prijenos putem člankonožaca je najčešći i uzrokuje ulceroglandularni oblik tularemije, te je prvi znak čir na mjestu ugriza koji se može zadržati do nekoliko mjeseci. Fizički kontakt sa zaraženom životinjom također dovodi do ulceroglandularne tularemije. Bolest sa sličnim simptomima ali bez pojave čira se naziva žljezdana tularemija. Infekcija se iz čira širi limfnim sustavom u regionalne limfne čvorove gdje uzrokuje upalu te zbog oteknuća djeluje na manifestaciju kuge s kojom se prvotno povezivala. Bakterija se može proširiti na središnji živčani sustav i skeletne mišiće. Ulceroglandularni i žljezdani oblik mogu dugo potrajati ali nisu smrtonosni kao tifusni kod kojeg je smrtnost velika i pacijent može doći do stanja delirija i šoka. Ostali oblici su okuloglandularna tularemija nakon izravne inokulacije u oko, orofaringealna stečena ingestijom kontaminirane hrane i vode te respiratorna uzrokovana udisanjem infektivnih

aerosola tijekom uzgoja ili laboratorijskih aktivnosti. Upravo je respiratorni oblik zaraze i najteži te se smatra da izloženost samo 20 bakterija uzrokuje fatalne posljedice [5,7]. Ljudi oboljeli od tularemije pokazuju simptome povišene temperature, malaksalosti, mijalgije i primarne ili sekundarne upale pluća. Bakterija djeluje patogeno na jetru i slezenu uzrokujući hepatosplenomegaliju te se u stanicama tih organa može pronaći velik broj mikroorganizama u hepatocitima, makrofagima i dendritičnim stanicama [2]. Nakon razdoblja inkubacije od 3 do 6 dana, pacijent doživljava simptome nalik gripi poput hladnoće, vrućice, glavobolje i generaliziranih bolova u tijelu [6]. Svi oblici tularemije mogu preći u sustavnu infekciju i prouzročiti ozbiljnu prostraciju. Stopa smrtnosti za ljude zaražene *F. tularensis* iznosi 5-6 %, dok je kod bolesti uzrokovane *F. holarctica* manja od 0,5 % i ne izaziva infekciju kod glodavaca [6].

1.2.6. Dijagnoza

F. tularensis je zahtjevan mikroorganizam kojem je za rast potreban obogaćen medij, najčešće je to BCYE hranjiva podloga, puferirani agar s ekstraktom kvasnog ugljena. Ponegdje je preporučen i obogaćeni čokoladni agar, CHAB, odnosno cisteinski srčani agar sa zagrijanim ovčjim crvenim krvnim zrnima. Vidljiv porast se može očekivati za 18 sati inkubacije na 37 °C, no nekad je potrebno dva do četiri dana za jasno raspoznavanje kolonija. Izolacija uzorka se postiže struganjem čira, biopsijom limfnih čvorova ili ispljuvkom. Rijetko se organizam uzgaja iz krvi, urina i izmeta. Testovi korišteni za otkrivanje bakterija u kliničkim uzorcima su ELISA, imunokromatografski ručni test, test lateksne aglutinacije te lančana reakcija polimeraze (PCR). PCR test je često korišten i mjerodavan te s ostalim testovima prevladava u dijagnozi ispred uzgoja u kulturi. Većina se slučajeva tularemije dijagnosticira na temelju kliničke slike ili serologije jer postoji opasnost od zaraze za necijepljeno laboratorijsko osoblje pri uzgoju [6].

1.2.7. Liječenje i prevencija

Uobičajena terapija za učinkovito liječenje tularemije jest primjena aminoglikozida (streptomycin i gentamicin), tetraciklina i kloramfenikola. Vrlo dobru djelotvornost pokazuju i ciprofloksacin te fluorokinoloni ali trenutno nisu odobreni od FDA-e (Food and Drug Administration) u svrhu liječenja zečje groznice. Problem u liječenju bolesti predstavlja potencijalna rezistencija *F. tularensis* na antibiotike [5]. Najizloženiji su ljudi iz ruralne populacije, posebno pojedinci poput lovaca, šumskih radnika i poljoprivrednika koji mnogo vremena provode u prirodi gdje obitava mnoštvo vektora člankonožaca [6].

1.2.8. Cjepivo

Kroz drugu polovicu dvadesetog stoljeća znanstvenici su pokušavali pronaći cjepivo koje će biti dovoljno oslabljeno i u isto vrijeme slabo virulentno kako bi bilo učinkovito za sprječavanje infekcije *F. tularensis*. Postupak razvoja sigurnog cjepiva je otežan zbog činjenice da mehanizmi koji omogućuju invaziju bakterije unutar stanica domaćina nisu poznati. LVS cjepivo je jedino do danas učinkovito cjepivo protiv tularemije, međutim nije ušlo u upotrebu diljem svijeta jer nedostaje licenciranje proizvoda. Iskoristivost ovog cjepiva je ograničena jer nije sa sigurnošću utvrđeno da neće u nekih ljudi izazvati bolest te je preveliki rizik upotrebljavati nedovoljno dokazanu tvar koja može dovesti do fatalnih posljedica [6].

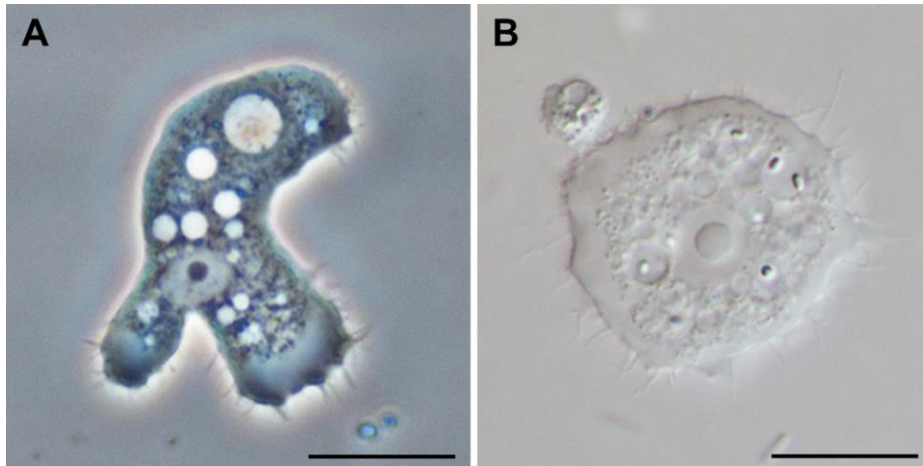
1.3. *Acanthamoeba* spp.

1.3.1. Taksonomska podjela

Rod *Acanthamoeba* je otkriven 1930. godine, međutim kroz povijest se njegova klasifikacija nije odvijala bez promjena. Nedugo nakon je Castellani otkrio amebu pri uzgoju *Cryptococcus pararoseus* te ju svrstao u rod *Hartmanella* [8]. Tek kasnije je *Acanthamoeba* uvedena kao zaseban rod. *Acanthamoeba* spp. su protozoe koje se mogu pronaći kao slobodno živeći organizmi ili u obliku parazita u domaćinu [9]. *Acanthamoeba* spp. roda T2-T6, T10, T11 i T15 su etiološki čimbenici amebnog keratitisa, dok su genotipovi T1, T2, T4, T5, T10 i T12 čimbenici granulomatoznog amebnog encefalitisa. Noviji identificirani genotipovi uključuju *Acanthamoeba micheli*, kao i *Acanthamoeba pyriformis* [9].

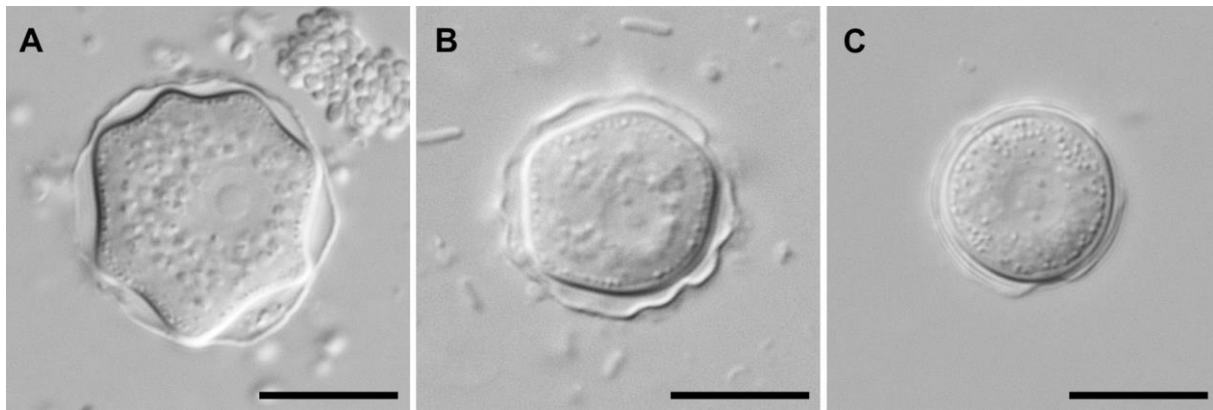
1.3.2. Morfologija

Amebe su u okolini postojane kao trofozoiti i ciste. Trofozoit je veličine 13-40 mikrometara u promjeru. Stanice im sadrže jezgru, pulsirajuću vakuolu te mnoštvo probavnih vakuola. Ameboidno kretanje pospješeno je akantapodijama ili lobopodijama, odnosno bodljikavim strukturama na površini stanice. Trofozoit se može hraniti bakterijama, a množi se binarnom diobom [11].



Slika 4. Trofozoiti vrste *Acanthamoeba* s karakterističnim akantopodijama u faznom kontrastu (A) i u mikroskopiji svijetlih polja (B). Izvor: Lorenzo-Morales J., Khan N. A., Walochnik J. (2015). *An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment*.

Poznato je da nakon razdoblja intenzivnog rasta ili u nepovoljnim uvjetima okoline iz trofozoitnog oblika ulaze u stadij ciste (encistacija) koja je sposobna zadržati svoja patogena svojstva i do deset godina. Ovisno o vrsti, ciste mogu imati okrugli ili poligonalni oblik te su okružene dvostrukom ljuskom, od kojih je vanjska naborana (ektocista) a unutarnja glatka (endocista). Promjer ciste ne prelazi 25 mikrometara. Ciste ameba su otporne na ultraljubičasto zračenje, promjene vlage, promjenjivi osmotski tlak, niske temperature, isušivanje, promjene koncentracije vodikovih iona te organskih i anorganskih spojeva.



Slika 5. *Acanthamoeba* ciste u interferencijskoj kontrastnoj mikroskopiji. Različiti morfološki oblici obzirom na strukturu ektociste i endociste. Izvor: Lorenzo-Morales J., Khan N. A., Walochnik J. (2015). *An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment*.

Svi su razvojni oblici ameba invazivni za ljudsku populaciju [9]. Trofozoit pokazuje morfološke promjene u uzgoju s bakterijama pa tako u tom slučaju ameba postaje veća i biva prekrivena bakterijama. U prisustvu pojedinih vrsta bakterija u kulturi bujona, trofozoiti se grupiraju u skupine od 10 do 30 stanica. Smatra se da u cističnom obliku ameba može opstati i u zraku [8,12].

1.3.3. Putevi prijenosa

Amebe *Acanthamoeba* su izolirane iz mnoštva različitih staništa kao što su slatke vode, morske vode, zubni uređaji, kućišta kontaktnih leća i klorirana bazenska voda. Mogu se naći u tlu, zraku te u prirodnim i umjetnim rezervoarima za vodu. Poznato je da su amebe postojane i u hrani te biološkim materijalima poput bakterijskih kultura, cerebrospinalne tekućine te određenih organa [9]. Veći broj pronađenih sojeva nije patogen te je poznato da *A. castellanii* ne uzrokuje infekciju u svakom slučaju kontakta [8].

1.3.4. Patogenost

Patogena svojstva ameba su podijeljena na izravne i neizravne čimbenike. Izravni podrazumijevaju sposobnost prijanjanja, fagocitozu, izlučivanje specifičnih enzima i akantoporina koji je toksičan za živčani sustav čovjeka te antibakterijsko djelovanje protiv raznih bakterijskih sojeva u obliku povećanja propusnosti njihovih membrana. Neizravni uključuju sposobnost encistacije, morfologiju, prilagodbu na promjenjive uvjete okoline, sveprisutnost, biofilmove, kemotaksiju i rezistenciju na lijekove. Broj akantapodija može biti važan agens jer patogene amebe imaju oko 100 akantapodija na svojoj površini, dok nepatogene nemaju više od 20. Patogeni sojevi *Acanthamoeba* spp. pokazuju veću toplinsku toleranciju od nepatogenih pa im to omogućuje razmnožavanje pri ekstremnim uvjetima visoke temperature. Amebe su vektori niza patogenih bakterija te im olakšavaju rast i pružaju zaštitu od nepovoljnih uvjeta. Utvrđeno je da četvrtina ameba izoliranih iz okoline pripada upravo bakterijskim vektorima. Uz bakterije, amebe mogu prenijeti i protozoe, gljive i viruse [9].

1.4. Infekcije uzrokovane vrstama *Acanthamoeba*

Citopatski učinak ameba na ljude je otkriven 1957. godine kada je zabilježen slučaj amebne infekcije oka preko kontaminirane vode iz slavine riječnog izvora [8]. Iako je učestalost amebnih zaraza niska, smrtnost je relativno visoka te *Acanthamoeba* spp. mogu razviti cerebralnu i ekstracerebralnu infekciju rožnice, pluća, bubrega i kože. Oboljenja se mogu pojaviti kod imunokompromitiranih i imunokompetentnih pojedinaca [9]. Glavna prepreka u svladavanju problema liječenja amebnih infekcija je njihova sposobnost encistacije zbog koje je ameba rezistentna na fizička i kemijska oštećenja [8].

1.4.1. Granulomatozni amebni encefalitis

Amebni encefalitis je oportunistička bolest sa izrazito visokom smrtnošću. Najčešće obolijevaju osobe s imunološkim poremećajima uzrokovanim nekom drugom infekcijom te osobe s transplahiranim organima ili kroničnim bolestima poput dijabetesa. Najčešći put prijenosa je njušni epitel u nosnoj šupljini te se zaraza događa udisanjem zraka ili aspiracijom kontaminirane vode u kojoj su invazivni oblici praživotinja. Trofozoitni oblici ameba migriraju u središnji živčani sustav putem nosne sluznice i duž endotela kapilara mozga. Područje infekcije može obuhvatiti i oralnu sluznicu, ulcerativnu kožu, očnu rožnicu i crijevnu sluznicu. Patogeneza nije precizno proučena, ali je poznato da nekrotične lezije rezultiraju smrću nakon 8 dana do nekoliko mjeseci od pojave prvih znakova bolesti.

Klinička slika obuhvaća zbunjenost, halucinacije i letargiju. Može se pojaviti glavobolja, ukočenost vrata, epileptički napadi, promjena tjelesne temperature, povraćanje i mučnina. Simptomi amebnog encefalitisa nisu karakteristični samo za tu bolest pa se često dijagnosticira kao virusni ili bakterijski encefalitis.

Dijagnoza bolesti se utvrđuje korištenjem cerebrospinalnog likvora te nerijetko opažanjem povišene razine proteina i smanjenje glukoze. Ameba se može izolirati iz tkiva bolesnika te uzgajati na posebnim podlogama presvučenim inaktiviranim bakterijama i inkubiranim na 37 °C. Od ostalih se metoda ističe PCR test.

Liječenje zaraze uzrokovane *Acanthamoeba spp.* je otežano zbog nespecifičnih simptoma i nedovoljno preciznih metoda dijagnoze. Dosad su pri liječenju korišteni antibiotici poput flukonazola, ketokonazola, amfotericina B, rifampicina i drugih [9].

1.4.2. Amebni keratitis

Fiziologija ljudskog oka te njegova izravna izloženost okolini ga čini osjetljivim na određene infekcije, među kojima je i amebni keratitis. Osobe koje koriste kontaktne leće imaju najveću vjerojatnost zaraze, ali je bolest moguća i kod pojedinaca koji ih ne koriste. Drugi agens koji dovodi do infekcije je prethodna mehanička ozljeda rožnice u kombinaciji s izlaganjem kontaminiranoj vodi ili tlu. Etiološki čimbenici amebnog keratitisa uključuju *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhodes*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. dunja* i *A. griffini*.

U slučaju nepravilne higijene prilikom korištenja leća, amebe mogu kontaminirati kućište leća putem slavine ili iz zraka te u kratkom periodu mogu biti namnožene do velikih koncentracija [10]. Infekcija započinje prijanjanjem amebe na epitelne stanice rožnice domaćina pomoću akantopodija. Prodiranjem u epitel rožnice amebe uzrokuju fagocitozu i izlučuju toksine koji induciraju apoptozu. Protozoe luče neuraminidazu koja je zaslužna za kolonizaciju parazita te proteaze koje degradiraju bazalne membrane. Prvi znakovi zaraze su upalne reakcije, edemi i nekroze u predjelu oka koje mogu dovesti do upale živca rožnice.

Manifestacija bolesti podrazumijeva jaku bol u očima, fotofobiju, crvenilo, zamagljen vid, osjećaj stranog tijela uz edeme konjunktive i kapaka. Može se javiti upala suzne žlijezde te upala ekstraokularnih mišića. Simptomi koji su karakteristični samo za amebni keratitis su pojedinačni ili višestruki prstenasti infiltrati u središnjem dijelu rožnice zajedno s nestankom keratocita. Spomenute se promjene uglavnom događaju na jednom oku, ali i slučajevi bilateralne invazije nisu nezabilježeni. Ukoliko izostane pravovremeno liječenje, može doći do gubitka vida kod pacijenta.

Dijagnostika keratitisa se temelji na analizi struganja rožnice ili materijala uzetog pri biopsiji rožnice korištenjem konfokalne mikroskopije i imunofluorescentnim metodama. Bris očne jabučice se izbjegava zbog mogućnosti prodora ameba u sljedeće slojeve rožnice. Uz

navedeno, koriste se i tehnike uzgoja te molekularne metode. Metode dokazivanja infekcije i dalje nisu u potpunosti razjašnjene te spomenute tehnike nisu u potpunosti učinkovite u svim slučajevima zaraze [10].

Postupak liječenja je težak i dugotrajan. Najčešće se koriste propidijum (0,1 %), heksamidin, klorheksidin (0,02 %), neomicin i drugi. Steroidi se upotrebljavaju za ublažavanje boli i smanjenje upala. Otkriveno je da ulje čajevca može djelovati na suzbijanje trofozoita i cista *Acanthamoeba* spp. i da pritom ne oštećuje rožnicu [9,12].

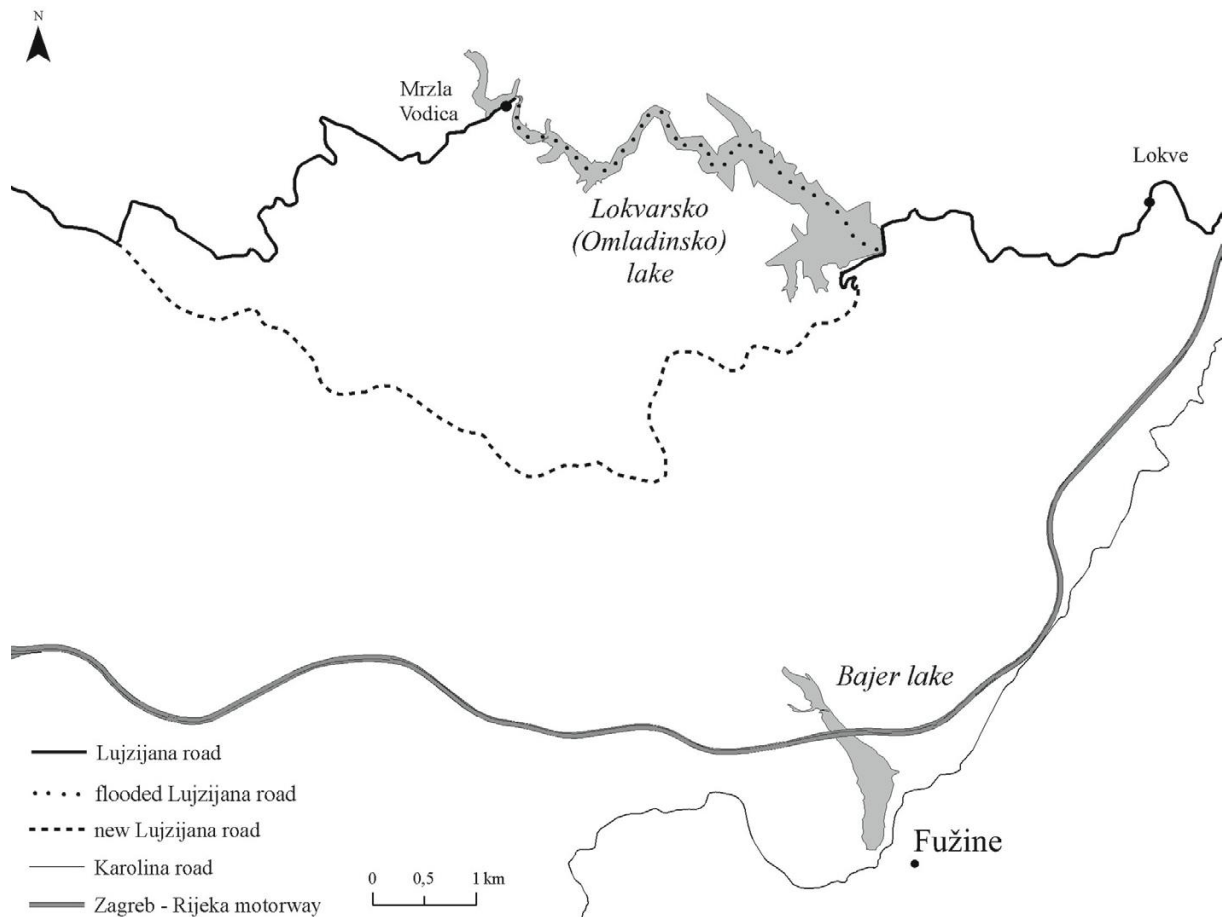
1.4.3. Ostale infekcije uzrokovane vrstama *Acanthamoeba*

Imunosupresivni bolesnici nakon transplantacije mogu biti inficirani na organima poput pluća, jetre, bubrega, nadbubrežnih žlijezda, srca, kože i kostiju. Kožnu infekciju karakteriziraju mrlje koje se povećanjem mogu ulcerirati te lezije koje pogađaju lice, udove i trup. Zaraza na plućima se manifestira gubitkom tjelesne težine i smanjenom respiratornom učinkovitošću te se mogu javiti intersticijske lezije s plućnim edemom. Promjene na jetri uključuju nekrozu, polimorfizam jezgri hepatocita i petehiju. Nekrotične promjene tubula i glomerula uz petehije su uobičajeni simptomi pri infekciji bubrega [9].

1.5. Voda

1.5.1. Lokvarsko jezero

Lokvarsko jezero je umjetno stvoreno jezero koje se nalazi u šumovitom području crnogorice u Gorskom kotru. Duboko je najviše 40 m, površine 2,1 km² te se nalazi na 767 m nadmorske visine. Jezero je prvotno nosilo naziv Omladinsko jezero zbog utjecaja 27 tisuća mladih pripadnika Omladinske radne akcije koji su u Jugoslaviji sudjelovali u gradnji 48 metara visoke brane u svrhu stvaranja umjetnog jezera. Izgradnja brane za potrebe hidroelektrane Vinodol trajala je od 1952. do 1955. godine. Umjetno jezero je stvoreno na mjestu nekadašnjih naselja Srednji jarak i Homer (dio je ostao nepotopljen), te su stanovnici tih zaseoka morali iseliti. Podizanjem brane na rijeci Lokvarki, potopljeno je područje doline kroz koje je prolazio 8 km dug dio ceste Lujzijana s trima pilanama, dva mosta, pekarom, gostionicom, kapelicom te šezdesetak kuća. Zbog posljedica izgradnje brane, južno od jezera je izgrađena zaobilazna cesta koju se ponekad naziva i Nova Lujzijana, također od strane Omladinske radne akcije. Stvaranje jezera je prouzročilo nekoliko mikroklimatskih promjena koje uključuju niže temperature i maglu tijekom većeg dijela godine. Važnost brane se očituje u podatku da se proizvodnja električne energije u Hrvatskoj nakon njene izgradnje udvostručila u odnosu na prethodno petogodišnje razdoblje.



Slika 6. Prikaz položaja jezera i okolnih naselja uz poplavlvenu i novu dionicu ceste Lujzijana. Izvor: Jarec M. (2019). *Love of the road and memories in the water: Affects in infrastructural spaces in Gorski kotar.*

Danas je Lokvarsko jezero jedna od najvažnijih izletničkih i turističkih destinacija u Gorskom kotru na kojoj se sastaju brojni sportaši i rekreativci. Organizirane su i veslačke regate kao i susreti pod nazivima POJ (pješice oko jezera) i BOJ (biciklom oko jezera). Na jezeru je dostupno iznajmljivanje kajaka i dopušteno je baviti se ribolovom.

Voda Lokvarskog jezera je prepuna šaranom, klenom i pastrvama. Postoji priča iz 1968. godine kada je u jezeru pronađena najveća potočna pastra na svijetu koja je bila dulja od metra te težila 25 kg.

Oko jezera kruži pješačka staza dužine oko 18 km koja je pogodna za šetnju i biciklizam. Područje uz jezero je mirno i pristupačno što privlači kupaće tijekom ljetnih mjeseci te

modrozeleni boja vode ne odaje da se ustvari radi o umjetnom jezeru. Spuštanjem razine vodostaja, na određenom dijelu jezera postaje vidljiv stari kameni Carev most koji je služio kao prijelaz preko rijeke Lokvarke prije izgradnje brane. Jezero se prazni svakih nekoliko godina zbog remonta hidroopreme i održavanja nadzora i zaštite postrojenja te taj čin predstavlja priliku da se vidi potopljeno dno jezera na kojem se još mogu razaznati ostaci kamenih kuća. Nedaleko od jezera se nalazi špilja Lokvarka koja je slučajno otkrivena prošlog stoljeća te je kao jedna od najljepših špilja hrvatskog krša dobila titulu spomenika prirode [13,14].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati i usporediti preživljavanje bakterije *F. novicida*, amebe *A. castellanii* te bakterija stalne mikroflore u uzorcima nesterilne vode iz Lokvarskog jezera, pri čemu se proučavala kinetika rasta bakterija u vodi s dodanom *F. novicida*, kinetika rasta bakterija i ameba s dodanom *A. castellanii* te kinetika rasta bakterija i ameba s dodanim *F. novicida* i *A. castellanii* zajedno. Praćena je promjena ukupnog broja bakterija, enterokoka, ukupnih koliforma, *C. perfringens*, *E. coli*, fekalnih koliforma, *A. castellanii* i *F. novicida* u različitim uzorcima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzimanje uzoraka vode

Pri uzorkovanju vode prirodnih i umjetnih jezera koristi se norma HRN ISO 5667-4, dok oznaka (EN) ISO 5667 označava međunarodne norme za postupak uzorkovanja voda. Uzorci vode uzeti su u sterilne boce u količini koja je zadovoljavajuća za potrebe izvršavanja laboratorijske analize uz obraćanje pažnje na pravilno rukovanje kako bi u konačnici ispitani pokazatelji kvalitete bili što reprezentativniji. Za potrebe praktičnog dijela ovog diplomskog rada uzorci vode su uzeti iz aseptičkog izvora Lokvarskog jezera na obalnom području do dubine od jednog metra. Uzorkovanje je izvršeno sakupljanjem vode u tri prethodno isprane boce volumena dvije litre. Boce su do početka analize čuvane na tamnom i hladnom mjestu te su kasnije korištene za ubacivanje bakterija i ameba u svrhu usporedbe, odnosno ispitivanja mikrobioloških parametara. Tijekom odvijanja pokusa uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi.

3.2. Metoda membranske filtracije

Membranska filtracija je kvantitativna i kvalitativna metoda kojom se dokazuje prisutnost i određuje broj mikroorganizama filtriranjem 100 mililitara uzorka. Prije početka analize ovom metodom sterilne hranjive podloge je potrebno postaviti nadohvat ruke uz pakovanje sa sterilnim membranskim filterima. Prvi čin podrazumijeva ručnu sterilizaciju uređaja pomoću plamenika koji se odvija kružnim spaljivanjem unutrašnjosti lijevka, od vrha prema dnu, što uključuje sterilizaciju poklopca lijevka, stjenke lijevka te podloge lijevka. Zatim se uklanja lijevak s aparature te steriliziranom pincetom stavljamo filter papir (mrežasta strana okrenuta prema gore) na metalni frit lijevka. Lijevak se potom vraća na prethodno mjesto te pričvrsti držačem. Isti se postupak ponavlja kod svih lijevaka te je tada uređaj spreman za

filtraciju uzoraka vode. U trenutku kada su filteri i lijevci postavljeni, ulijevamo po 100 mililitara uzorka vode u svaki lijevak, okrećemo ručkice na otvoreni položaj i uključujemo uređaj za membransku filtraciju. Po završetku filtriranja, ručkice se zatvaraju, lijevci se sklanjaju s podloge za filter papir, ponovno se plamenikom sterilizira pinceta kojom prenosimo filter papir (mrežica okrenuta prema gore) na odgovarajuću selektivnu podlogu u Petrijevoj zdjelici pripremljenoj sa strane. U slučaju pojave mjehurića između filtra i podloge, potrebno je nježnim pokretom podići filter i ponovno položiti na agar.

3.3. Metoda nasađivanja na hranjivu podlogu

Hranjiva podloga je medij koji u svojem sastavu posjeduje tvari koje omogućuju rast bakterija. Upotreba hranjivih podloga olakšava identifikaciju pojedine bakterije ili skupine bakterija što doprinosi točnoj analizi prisutnosti nekog mikroorganizma u ispitivanoj sredini ili pravilnom dijagnosticiranju uzročnika bolesti kod ljudi. Pri određivanju prisutnosti enterokoka, ukupnih koliforma, fekalnih koliforma, *E. coli*, *C. perfringens* te *F. novicida* korištene su čvrste selektivne hranjive podloge (agari). Metoda kultivacije na hranjivu podlogu napravljena je nasađivanjem 100 mikrolitara određenog uzorka vode na agar korištenjem automatske pipete. Potom je staklenim štapićem uzorak ravnomjerno razmazan po površini hranjive podloge. Iznimka je prethodno zagrijani kvašćev agar kod kojeg je za određivanje ukupnog broja bakterija unesen 1 mililitar uzorka, također automatskom pipetom.

Početno mikrobiološko stanje uzoraka vode je određeno membranskom filtracijom 100 ml uzorka umjesto nasađivanja na hranjivu podlogu kako bi se dobili točniji rezultati zbog veće količine vode koja je time reprezentativnija.

3.4. *Francisella novicida*

3.4.1. Bakterijski soj

U laboratorijskom radu je korišten bakterijski soj *Francisella novicida* U112 koji u obliku bijelo-sivih kolonija raste na BCYE agaru. Navedeni bakterijski soj je izabran za analizu iz razloga što je genetski najbliži *F. tularensis* te je kod njega zabilježen veći broj oboljenja preko kontaminirane vode kod ljudi nego u slučaju drugih sojeva roda *Francisella*.

3.4.2. Hranjiva podloga

Hranjiva podloga korištena u eksperimentalnom radu za uzgoj bakterije *F. novicida* jest BCYE agar.

Sastav BCYE agara u litri destilirane vode:

- 10 g ACES [N-(2-acetamido)-2-aminoetansulfonska kiselina] pufera
- 10 g kvašćevog ekstrakta
- 2,2 g KOH (kalijev hidroksid)
- 1 g α -ketoglutarata
- 1.5 g aktivnog ugljena
- 15 g agara
- 0,4 g L-cisteina otopljenog u 10 ml destilirane vode
- 0,25 g željezovog pirofosfata otopljenog u 10 ml destilirane vode

Bakteriji *F. novicida* su za kultivaciju potrebni posebni uvjeti. ACES pufer se dodaje u formulaciju zbog postizanja stalne pH vrijednosti, koja za optimalan rast iznosi 6,8-6,9. Kvašćev ekstrakt pruža izvor ugljika, dušika i vitamina, dok α -ketoglutarat pospješuje porast mikroorganizama. Agar se koristi kao sredstvo za stvrdnjavanje, a suplementi u obliku L-cisteina i željezo pirofosfata služe kao izvori energije, odnosno željeza.

3.4.3. Priprema i inokulacija *F. novicida*

Željeni ishod istraživanja podrazumijeva usporedbu porasta *F. novicida*, *A. castellanii*, te svih ostalih bakterija stalne mikroflore Lokvarskog jezera u nesterilnim uzorcima u koje su dodane *F. novicida* te *A. castellanii*. Količina bakterije *F. novicida* u suspenziji određena je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 580 nanometara. U ovom slučaju apsorbancija odgovara zamućenju (OD, optical density) što znači da viša vrijednost apsorbancije znači i veće zamućenje, odnosno veći broj bakterija. Postupak počinje mjerenjem apsorbancije slijepe probe, odnosno u kivetu je stavljena sterilna voda te potom umetnuta u spektrofotometar. Potom su sa BCYE agara sterilnim brisnim štapićem odvojene bakterije *F. novicida* te uz stijenku umućene u epruvetu sa sterilnom vodom. Nakon toga je izmjerena apsorbancija uzorka, odnosno suspenzija s umućenom *F. novicida* je umetnuta u spektrofotometar. Ukoliko je dobivena apsorbancija koja je manja od 1, štapićem se dodaje *F. novicida* dok se ne postigne $A=1$ te je tada broj bakterija *F. novicida* u suspenziji jednak $1 \cdot 10^9$ CFU/ml. Poveznica među navedenim vrijednostima apsorbancije i broja bakterija je standard za bakteriju *F. novicida* koji je dobiven laboratorijskom praksom te ne vrijedi za ostale vrste bakterija. U prvom i trećem uzorku vode iz Lokvarskog jezera želimo koncentraciju *F. novicida* od $1 \cdot 10^5$ CFU/ml. Oba uzorka vode su volumena 2 l te je stoga preračunavanjem dobiven volumen 0,2 ml suspenzije koncentracije $1 \cdot 10^9$ CFU/ml kojeg treba unijeti u uzorke kako bi u njima koncentracija *F. novicida* bila $1 \cdot 10^5$ zbog razrjeđenja.

$$C1=1*10^9 \text{ CFU/ml}$$

$$C2=1*10^5 \text{ CFU/ml}$$

$$V2=2000 \text{ ml}$$

$$V1=?$$

$$C1*V1=C2*V2$$

$$V1=C2*V2/C1$$

$$V1=1*10^5 \text{ CFU/ml} * 2000 \text{ ml} / 1*10^9 \text{ CFU/ml}$$

$$V1=0.2 \text{ ml}$$

3.5. *Acanthamoeba castellanii*

3.5.1. Amebni soj

U laboratorijskom radu je korišten amebni soj *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30234 koji raste u PYG mediju. Navedeni soj amebe je korišten u ovom diplomskom radu jer *A. castellanii* učestalo služi kao domaćin bakterijama kada se nađu u istoj okolini te uzrokuje bolesti kod ljudi u obliku amebnog keratitisa i encefalitisa što nije slučaj kod svih ostalih sojeva roda *Amoebae*.

3.5.2. Hranjivi medij

Hranjivi medij korišten u eksperimentalnom radu za uzgoj amebe *A. castellanii* je PYG tekući medij.

Sastav PYG medija u litri destilirane vode:

- 10 g kvašćevog ekstrakta
- 5 g D-glukoze
- 10 g proteaznog peptona
- 5 g NaCl
- 3,57 mg Na₂HPO₄
- 3,45 mg KH₂PO₄
- 0,55 mg penicilina
- 1 mg streptomicina

A. castellanii u nepovoljnim uvjetima stvara cistične oblike, dok u povoljnoj sredini kao što je PYG medij prelazi u stadij trofozoita. Spomenuti medij osigurava amebi potrebnu količinu hranjivih tvari za rast i razmnožavanje. Optimalna pH vrijednost za kultivaciju *A. castellanii* iznosi 6.5.

3.5.3. Priprema i inokulacija *A. castellanii*

Željeni ishod istraživanja podrazumijeva usporedbu porasta *F. novicida*, *A. castellanii*, te svih ostalih bakterija stalne mikroflore Lokvarskog jezera u nesterilnim uzorcima u koje su dodane *F. novicida* te *A. castellanii*. Uzgoj *A. castellanii* uključuje njihovo zamrzavanje na -70 °C te potom odmrzavanje u vodenoj kupelji pri 37 °C netom prije upotrebe. Zbog

omogućavanja razmnožavanja, amebe su inokulirane u PYG medij gdje vladaju povoljni uvjeti za rast i razmnožavanje *A. castellanii*. Medij je promijenjen svaki treći dan kako bi se osigurala dovoljna količina hranjivih tvari. Postupak inokulacije ameba u uzorak vode podrazumijeva struganje ameba štapićem sa stjenki posude s medijem kako bi se zajedno s njim unijele u pipetu za prebacivanje u bocu s uzorkom nesterilne vode. Količina amebe *A. castellanii* u suspenziji za ubacivanje u uzorak vode je određena brojanjem u Neubauer komorici pomoću invertnog mikroskopa. Brojanjem ameba je dobiven broj od $1 \cdot 10^7$ ameba po mililitru PYG medija. U drugom i trećem uzorku vode iz Lokvarskog jezera želimo broj *A. castellanii* od $1 \cdot 10^5$ po mililitru. Oba uzorka vode su volumena 2 l te je stoga preračunavanjem dobiven volumen 20 ml suspenzije koncentracije $1 \cdot 10^7$ kojeg treba unijeti u uzorke kako bi u njima broj *A. castellanii* bila $1 \cdot 10^5$ zbog razrjeđenja.

$$C1 = 1 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

$$C2 = 1 \cdot 10^5 / \text{ml}$$

$$V2 = 2000 \text{ ml}$$

$$V1 = ?$$

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

$$V1 = C2 \cdot V2 / C1$$

$$V1 = 1 \cdot 10^5 / \text{ml} \cdot 2000 \text{ ml} / 1 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

$$V1 = 20 \text{ ml}$$

3.6. Bakterije stalne mikroflore Lokvarskog jezera

Isključujući BCYE i PYG agar, u praktičnom su radu korištene i ostale hranjive podloge s ciljem mikrobiološkog ispitivanja nesterilne vode iz Lokvarskog jezera nakon *inokulacije F. novicida* i *A. castellanii*.

Ostale korištene hranjive podloge su:

- SB (Slanetz-Bartley) agar
- KEA (Kanamicin eskulin azid) agar
- LE (Les Endo) agar
- TSN (Trypton-sulfit-neomicin) agar
- TTC (2,3,5-trifeniltetrazoliumklorid) agar
- mFC (Membrane Fecal Coliform) agar

Određivanje početnog mikrobiološkog stanja u nesterilnim uzorcima voda iz Lokvarskog jezera provedeno je metodom membranske filtracije. Nakon inokulacije *F. novicida* i *A. castellanii* u uzorke promjena porasta bakterija i ameba praćena je korištenjem metode nasađivanja na hranjivu podlogu.

Slanetz-Bartley (SB) agar je korišten za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja enterokoka. Navedena hranjiva podloga sadrži natrij azid koji inhibira rast gram negativnih bakterija i 2,3,5-trifeniltetrazolium koji se reducira u crveno obojeni formazan u prisutnosti enterokoka. Nakon postupka membranske filtracije, odnosno nasađivanja na hranjivi agar, podloga je inkubirana na 37 °C tijekom 48 sati. Zbog razvoja tipičnih crveno obojenih kolonija, membrana je premještena na kanamicin eskulin azid (KEA) agar i inkubirana 2 sata na 44 °C.

Izbrojane su sve kolonije s tamnim prstenom i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 mililitara. Kao potvrdni test koristio se pozitivan porast na KEA agaru.

Les Endo (LE) agar je korišten za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja ukupnih koliforma. Navedena hranjiva podloga sadrži ekstrakt kvasca, peptone, dušik, vitamine i minerale. Ekstrakt kvasca služi kao izvor vitamina B-kompleksa koji potiče rast bakterija, a peptoni su izvor ugljika. Podloga od ugljikohidrata sadržava laktozu. Bakterije koje fermentiraju laktozu tvore kolonije crvene boje, a razvoj metalnog sjaja dolazi kada bakterije proizvode aldehid koji vrlo brzo fermentira laktozu. Bakterije koje ne fermentiraju laktozu tvore čiste, bezbojne kolonije. Nakon postupka membranske filtracije, odnosno nasadivanja na hranjivi agar, podloga je inkubirana na 37 °C tijekom 24 sata. Izbrojane su sve crveno obojane kolonije sa karakterističnim metalnim sjajem i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 mililitara. Potvrdni test je oksidaza test.

Tripton-sulfit-neomicin (TSN) agar je korišten za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Clostridium perfringens*. Navedena hranjiva podloga sadržava triptozu, ekstrakt kvasca i pepton koji čine osnovu za rast bakterija (dušik, vitamine, minerale i aminokiseline). U prisutnosti željezo amonij citrata formiraju se crne kolonije kao posljedica redukcije sulfita u sulfid zbog prisutnosti bakterija koje proizvode sumporovodik. Neomicin u podlozi ima ulogu inhibicije rasta konkurentne mikrobne flore. Nakon postupka membranske filtracije, odnosno nasadivanja na hranjivi agar, podloga je stavljena u Gas-Pack sustav i prije zatvaranja je ubačen reagens za stvaranje plina (anaerobnih uvjeta). Zatvoren sustav je inkubiran na 37 °C tijekom 20 sati. Izbrojane su sve crne kolonije i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 mililitara. Potvrdni test je bojanje po Gramu.

2,3,5-trifeniltetrazoliumklorid (TTC) agar je korišten za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *E. Coli*. Navedena hranjiva podloga sadrži natrij-heptadecil sulfat (inhibira rast gram pozitivnih bakterija). Laktoza pozitivna *Escherichia coli* i koliformne bakterije daju

žuto-narančastu boju kolonija na agaru reducirajući TTC. Nakon postupka membranske filtracije, odnosno nasađivanja na hranjivi agar, podloga je inkubirana na 37 °C tijekom 24 sata. Izbrojane su sve kolonije žuto-narančaste boje i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 mililitara. Potvrdni testovi su oksidaza test i indol.

Membrane Fecal Coliform (mFC) agar je korišten za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja fekalnih koliforma. Navedena hranjiva podloga sadrži pepton i ekstrakt kvasca koji tvore izvor nutrijenata za rast bakterija, te žučne soli (inhibiraju rast gram pozitivnih bakterija). Na temperaturi od 44 celzijeva stupnja fekalni koliformi fermentiraju laktozu i pritom formiraju kolonije plave boje dok ostale bakterije tvore sive kolonije. Nakon postupka membranske filtracije, odnosno nasađivanja na hranjivi agar, podloga je inkubirana na 44 °C tijekom 24 sata. Izbrojane su sve kolonije plave boje i rezultat je izražen kao broj bakterija u 100 mililitara. Potvrdni test je oksidaza test.

3.7. Određivanje broja bakterija i ameba

Broj bakterija je određen prebrojavanjem s hranjive podloge nakon postupanja prema metodama membranske filtracije i nasađivanja na agar. U početku analize je metodom membranske filtracije određeno prvotno mikrobiološko stanje u uzorcima vode iz Lokvarskog jezera bez dodane bakterije *F. novicida* i amebe *A. castellanii* te je potom metodom nasađivanja na hranjivu podlogu određen porast, odnosno pad broja bakterija i ameba u uzorcima nakon unošenja istih. Praćen je brojčani rast bakterija i ameba kroz vremensko razdoblje od deset dana uz očitavanje mikrobiološkog stanja svaki drugi dan od prvotnog ispitivanja mikrobiološkog stanja u uzorcima vode. Na posljertku su kod prebrojavanja poraslih bakterija rezultati preračunati na 100 mililitara te su te preračunate vrijednosti korištene pri izradi grafova.

Iznimno su kod ukupnog broja bakterija rezultati izraženi brojem kolonija po mililitru, odnosno bez kasnijeg preračunavanja.

3.8. Statistička obrada podataka

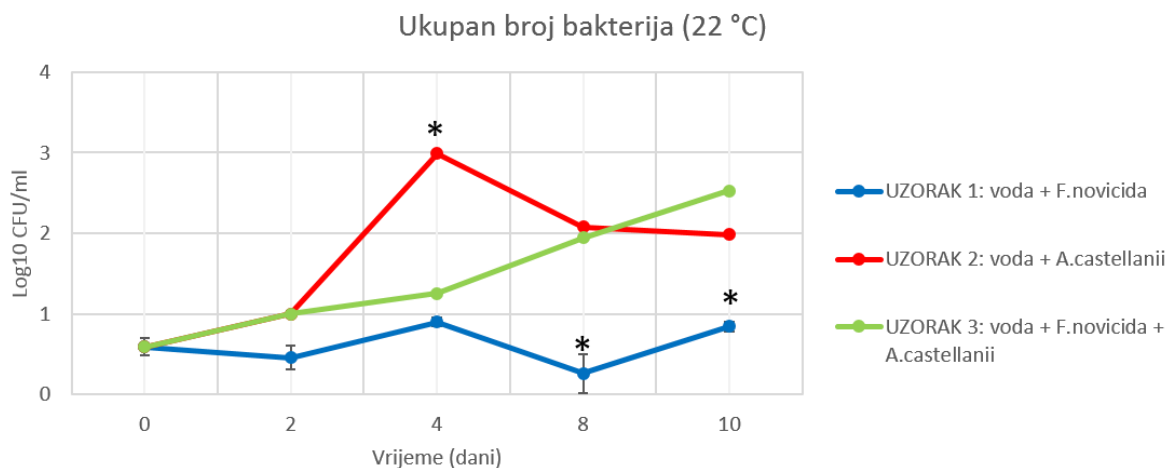
Dobiveni rezultati prebrojavanja bakterija i ameba uneseni su u program Microsoft Office Excel te potom preračunati funkcijom logaritmiranja u obliku logaritma po bazi 10 kako bi se mogli grafički jasnije prikazati. Grafički prikaz uključuje vrijednosti \log_{10} CFU/ml na y osi te vremenski raspon promatranja u trajanju od 10 dana na x osi. Statistička obrada dobivenih podataka provedena je programom Statistica 12 (StatSoft Inc., SAD) ili programom GraphPad Prism 6.0. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Kinetika rasta ukupnog broja bakterija na 22 °C u vodi iz Lokvarskog jezera

U trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii* u uzorke vode iz Lokvarskog jezera ukupan broj svih prisutnih bakterija (22 °C) iznosio je 4 CFU/ml. Preživljavanje svih prisutnih bakterija pri 22 °C u sva tri uzorka nesterilne vode praćeno je kroz vremenski period od 10 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon dva dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 3 CFU/ml, u drugom uzorku 10 CFU/ml te u trećem uzorku 10 CFU/ml. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 8 CFU/ml, u drugom uzorku 976 CFU/ml te u trećem uzorku 18 CFU/ml. Nakon osam dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 2 CFU/ml, u drugom uzorku 120 CFU/ml te u trećem uzorku 88 CFU/ml. Nakon deset dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 7 CFU/ml, u drugom uzorku 96 CFU/ml te u trećem uzorku 336 CFU/ml.



Slika 7. Kinetika rasta ukupnog broja bakterija na 22 °C u vodi iz Lokvarskog jezera. Nakon inkubacije na temperaturi od 22 °C na kvašćevom agaru, praćeno je preživljavanje svih prisutnih bakterija u nesterilnim uzorcima vode iz Lokvarskog jezera u kojima su prethodno dodane bakterija *F. novicida* i ameba *A. castellanii*. Promjena ukupnog broja bakterija prikazana je kroz vremensko razdoblje od 10 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani na sobnoj temperaturi. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Rezultati označeni zvjezdicom (*) pokazuju statistički značajnu razliku.

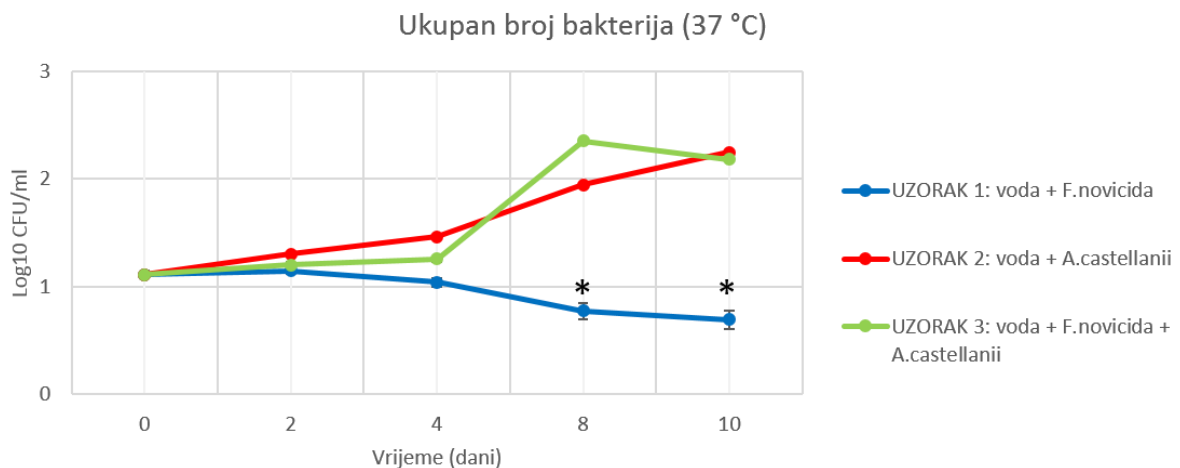
Iz priloženog grafičkog prikaza (Slika 7.) može se uočiti da je ukupan broj bakterija u sva tri uzorka nakon desetog dana rasta veći nego u trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii*. Prvi uzorak je imao oscilacije u rastu kroz period od deset dana, drugi uzorak bilježi nagli porast nakon drugog dana rasta, dok treći uzorak ima konstantan rast kroz cijeli period ispitivanja. Ukupan broj bakterija kultiviranih na 22 °C bilježi najbolji porast u trećem uzorku vode gdje je prisutan najveći broj bakterija nakon desetog dana analize.

Dobiveni rezultati pokazuju kako je drugog dana nakon inokulacije *A. castellanii* u ispitivani uzorak vode ukupan broj bakterija na 22 °C statistički značajno veći u odnosu na ostale uzorke ($p < 0,05$). Međutim, u navedenom uzorku broj bakterija protokom vremena od inokulacije počinje padati. Rezultati pokazuju i da je ukupan broj bakterija na 22 °C u uzorku vode u koji je dodana samo *F. novicida* statistički značajno manji u odnosu na ostale uzorke nakon 8. i 10. dana inkubacije ($p < 0,05$).

4.2. Kinetika rasta ukupnog broja bakterija na 37 °C u vodi iz Lokvarskog jezera

U trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii* u uzorke vode iz Lokvarskog jezera ukupan broj svih prisutnih bakterija (37 °C) iznosio je 13 CFU/ml. Preživljavanje svih prisutnih bakterija pri 37 °C u sva tri uzorka nesterilne vode praćeno je kroz vremenski period od 10 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon dva dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 14 CFU/ml, u drugom uzorku 20 CFU/ml te u trećem uzorku 16 CFU/ml. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 11 CFU/ml, u drugom uzorku 29 CFU/ml te u trećem uzorku 18 CFU/ml. Nakon osam dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 6 CFU/ml, u drugom uzorku 88 CFU/ml te u trećem uzorku 224 CFU/ml. Nakon deset dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 5 CFU/ml, u drugom uzorku 176 CFU/ml te u trećem uzorku 152 CFU/ml.



Slika 8. Kinetika rasta ukupnog broja bakterija na 37 °C u vodi iz Lokvarskog jezera. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C na kvašćevom agaru, praćeno je preživljavanje svih prisutnih bakterija u nesterilnim uzorcima vode iz Lokvarskog jezera u kojima su prethodno dodane bakterija *F. novicida* i ameba *A. castellanii*. Promjena ukupnog broja bakterija prikazana je kroz vremensko razdoblje od 10 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani na sobnoj temperaturi. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Rezultati označeni zvjezdicom (*) pokazuju statistički značajnu razliku.

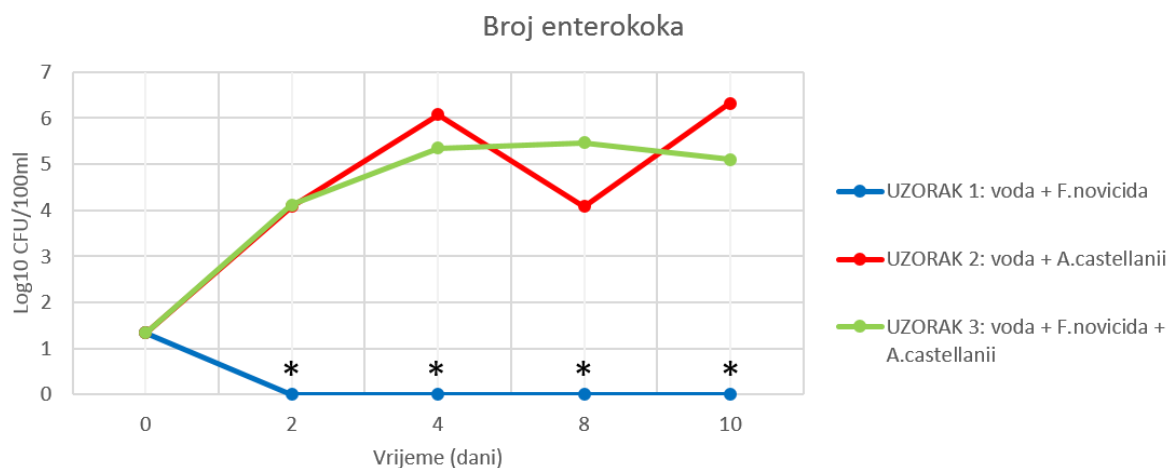
Iz priloženog grafičkog prikaza (Slika 8.) može se uočiti da je ukupan broj bakterija u drugom i trećem uzorku nakon desetog dana rasta veći nego u trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii*, dok je prvi uzorak iznimka gdje je nakon desetog dana prisutan slabiji porast. Prvi uzorak je imao konstantan pad u razmnožavanju kroz period od deset dana, drugi uzorak bilježi blago eksponencijalan porast kroz čitav period, dok treći uzorak ima blage oscilacije uz stalan rast kroz deset dana ispitivanja. Ukupan broj bakterija kultiviranih na 37 °C bilježi najbolji porast u drugom uzorku vode gdje je prisutan najveći broj bakterija nakon desetog dana analize.

Dobiveni rezultati pokazuju da je ukupan broj bakterija na 37 °C u uzorku vode u koji je dodana samo *F. novicida* statistički značajno manji u odnosu na ostale uzorke nakon 8. i 10. dana inkubacije ($p < 0,05$).

4.3. Kinetika rasta enterokoka u vodi iz Lokvarskog jezera

U trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii* u uzorke vode iz Lokvarskog jezera broj enterokoka iznosio je 22 CFU/100 ml. Preživljavanje enterokoka u sva tri uzorka nesterilne vode praćeno je kroz vremenski period od 10 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon dva dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku $1,2 \cdot 10^4$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $1,3 \cdot 10^4$ CFU/100 ml. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku $1,18 \cdot 10^6$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $2,24 \cdot 10^5$ CFU/100 ml. Nakon osam dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku $1,2 \cdot 10^4$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $2,88 \cdot 10^5$ CFU/100 ml. Nakon deset dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku $2,06 \cdot 10^6$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $1,28 \cdot 10^5$ CFU/100 ml.



Slika 9. Kinetika rasta enterokoka u vodi iz Lokvarskog jezera. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C na SB agaru, praćeno je preživljavanje enterokoka u nesterilnim uzorcima vode iz Lokvarskog jezera u kojima su prethodno dodane bakterija *F. novicida* i ameba *A. castellanii*. Promjena broja enterokoka prikazana je kroz vremensko razdoblje od 10 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani na sobnoj temperaturi. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Rezultati označeni zvjezdicom (*) pokazuju statistički značajnu razliku.

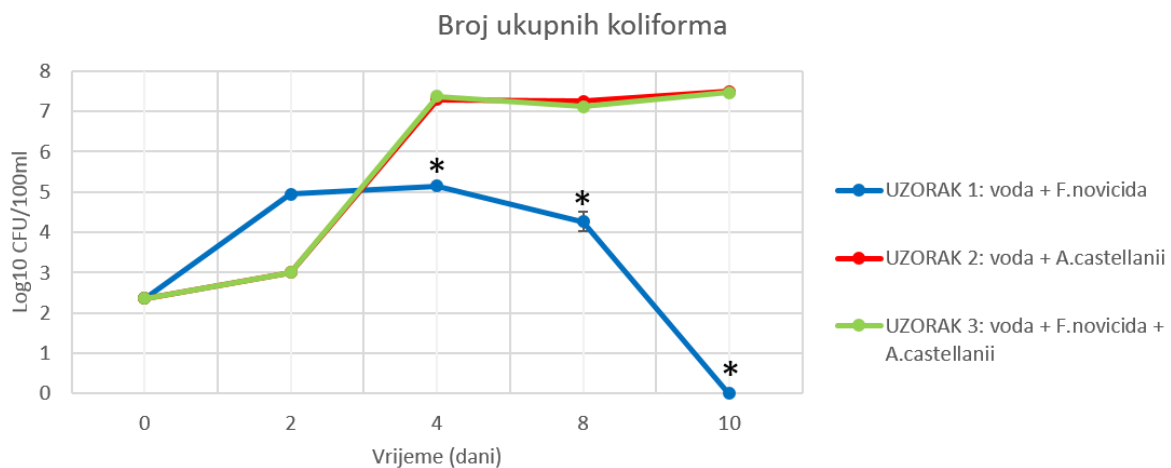
Iz priloženog grafičkog prikaza (Slika 9.) može se uočiti da je broj enterokoka u drugom i trećem uzorku nakon desetog dana rasta veći nego u trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii*, dok je prvi uzorak iznimka gdje nakon drugog dana nije prisutno preživljavanje enterokoka. U prvom uzorku nakon drugog dana ispitivanja nije bilo prisutnih enterokoka, drugi uzorak bilježi porast kroz čitav period osim naglog pada nakon četvrtog dana, dok treći uzorak ima stalan rast kroz deset dana ispitivanja uz blagi pad pri kraju analize. Broj enterokoka bilježi najbolji porast u drugom uzorku vode gdje je prisutan najveći broj bakterija nakon desetog dana analize.

Dobiveni rezultati pokazuju da je broj enterokoka u uzorku vode u koji je dodana samo *F. novicida* statistički značajno manji u odnosu na ostale uzorke nakon 2., 4., 8. i 10. dana inkubacije ($p < 0,05$).

4.4. Kinetika rasta ukupnih koliforma u vodi iz Lokvarskog jezera

U trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii* u uzorke vode iz Lokvarskog jezera broj ukupnih koliforma iznosio je 232 CFU/100 ml. Preživljavanje ukupnih koliforma u sva tri uzorka nesterilne vode praćeno je kroz vremenski period od 10 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon dva dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je $8,8 \cdot 10^4$ CFU/100 ml, u drugom uzorku $1 \cdot 10^3$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $1 \cdot 10^3$ CFU/100 ml. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je $1,4 \cdot 10^5$ CFU/100 ml, u drugom uzorku $1,98 \cdot 10^7$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $2,34 \cdot 10^7$ CFU/100 ml. Nakon osam dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je $2 \cdot 10^4$ CFU/100 ml, u drugom uzorku $1,79 \cdot 10^7$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $1,31 \cdot 10^7$ CFU/100 ml. Nakon deset dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku $3,1 \cdot 10^7$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $2,9 \cdot 10^7$ CFU/100 ml.



Slika 10. Kinetika rasta ukupnih koliforma u vodi iz Lokvarskog jezera. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C na LE agaru, praćeno je preživljavanje ukupnih koliforma u nesterilnim uzorcima vode iz Lokvarskog jezera u kojima su prethodno dodane bakterija *F. novicida* i ameba *A. castellanii*. Promjena broja ukupnih koliforma prikazana je kroz vremensko razdoblje od 10 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani na sobnoj temperaturi. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Rezultati označeni zvjezdicom (*) pokazuju statistički značajnu razliku.

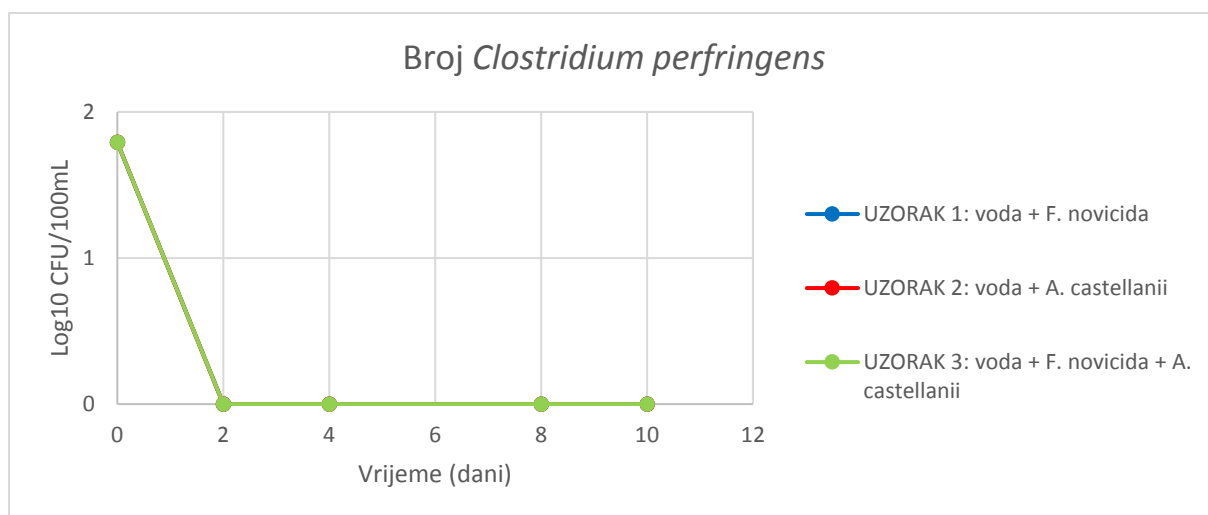
Iz priloženog grafičkog prikaza (Slika 10.) može se uočiti da je broj ukupnih koliforma u drugom i trećem uzorku nakon desetog dana rasta veći nego u trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii*, dok je prvi uzorak iznimka gdje nakon četvrtog dana kreće pad u preživljavanju ukupnih koliforma. U prvom uzorku je prisutan porast do četvrtog dana, nakon čega slijedi pad te na posljertku u desetom danu nije zabilježeno prisustvo ukupnih koliforma. Drugi i treći uzorak bilježe porast kroz čitav period, uz veći skok u preživljavanju nakon drugog dana ispitivanja. Broj ukupnih koliforma bilježi najbolji porast u drugom uzorku vode gdje je prisutan najveći broj bakterija nakon desetog dana analize.

Dobiveni rezultati pokazuju da je broj ukupnih koliforma u uzorku vode u koji je dodana samo *F. novicida* statistički značajno manji u odnosu na ostale uzorke nakon 4., 8. i 10. dana inkubacije ($p < 0,05$).

4.5. Kinetika rasta *C. perfringens* u vodi iz Lokvarskog jezera

U trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii* u uzorke vode iz Lokvarskog jezera broj *C. perfringens* iznosio je 62 CFU/100 ml. Preživljavanje *C. perfringens* u sva tri uzorka nesterilne vode praćeno je kroz vremenski period od 10 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon dva dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku 0 CFU/100 ml te u trećem uzorku 0 CFU/100 ml. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku 0 CFU/100 ml te u trećem uzorku 0 CFU/100 ml. Nakon osam dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku 0 CFU/100 ml te u trećem uzorku 0 CFU/100 ml. Nakon deset dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku 0 CFU/100 ml te u trećem uzorku 0 CFU/100 ml.



Slika 11. Kinetika rasta *C. perfringens* u vodi iz Lokvarskog jezera. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C na TSN agaru, praćeno je preživljavanje *C. perfringens* u nesterilnim uzorcima vode iz Lokvarskog jezera u kojima su prethodno dodane bakterija *F. novicida* i ameba *A. castellanii*. Promjena broja *C. perfringens* prikazana je kroz vremensko razdoblje od 10 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani na sobnoj temperaturi.

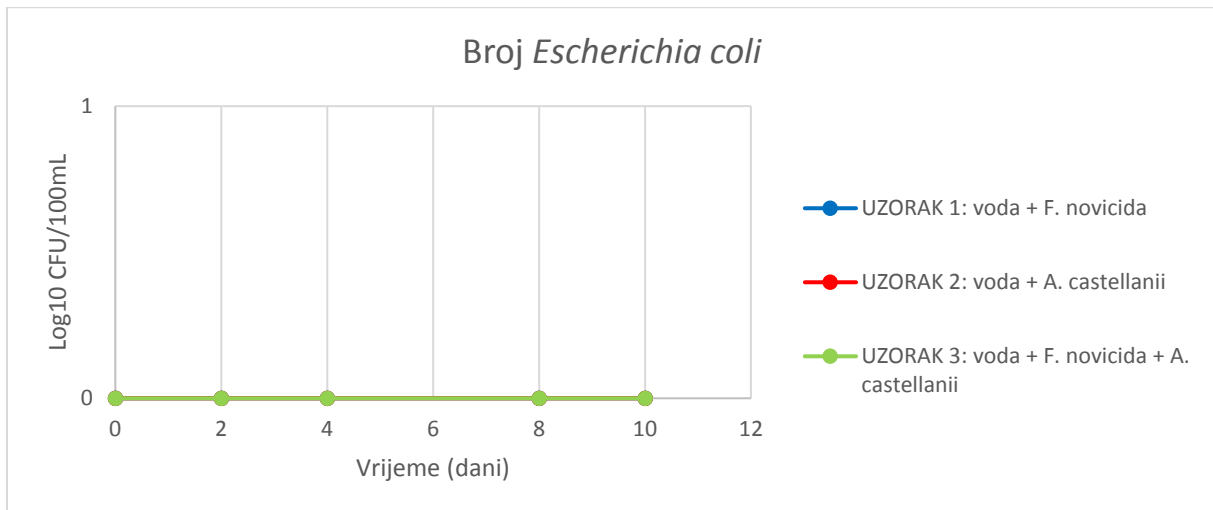
Iz priloženog grafičkog prikaza (Slika 11.) može se uočiti da je u trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii* u uzorke postojala određena količina *C. perfringens*, međutim, od drugog dana pa do kraja analize nije zabilježeno prisutstvo spomenute bakterije.

4.6. Kinetika rasta *E. coli* u vodi iz Lokvarskog jezera

U trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii* u uzorke vode iz Lokvarskog jezera broj *E. coli* iznosio je 0 CFU/100 ml. Preživljavanje *E. coli* u sva tri uzorka nesterilne vode praćeno je kroz vremenski period od 10 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon dva dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku 0 CFU/100 ml te u trećem uzorku 0 CFU/100 ml. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku 0 CFU/100 ml te u trećem uzorku 0 CFU/100 ml. Nakon osam dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml,

u drugom uzorku 0 CFU/100 ml te u trećem uzorku 0 CFU/100 ml. Nakon deset dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku 0 CFU/100 ml te u trećem uzorku 0 CFU/100 ml.



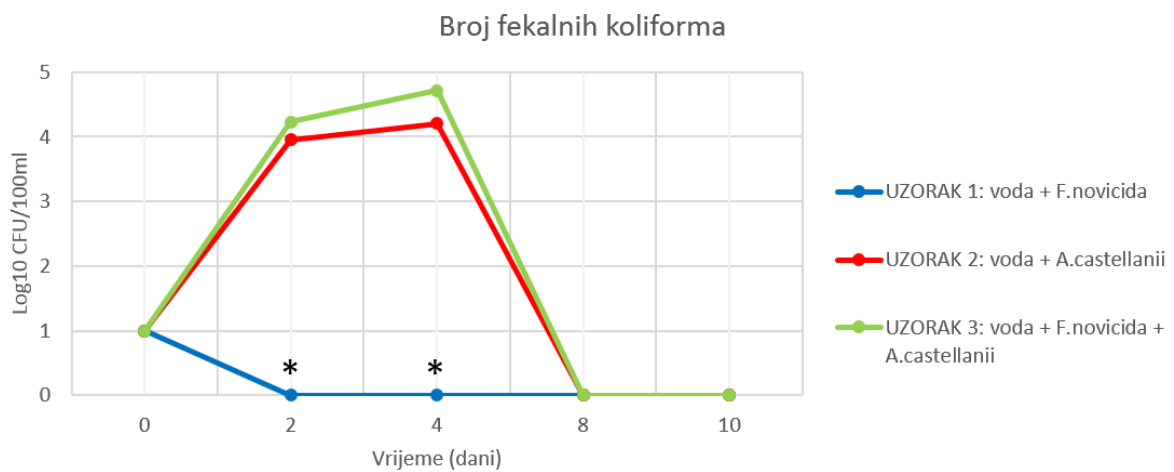
Slika 12. Kinetika rasta *E. coli* u vodi iz Lokvarskog jezera. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C na TTC agaru, praćeno je preživljavanje *E. coli* u nesterilnim uzorcima vode iz Lokvarskog jezera u kojima su prethodno dodane bakterija *F. novicida* i ameba *A. castellanii*. Promjena broja *E. coli* prikazana je kroz vremensko razdoblje od 10 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani na sobnoj temperaturi.

Iz priloženog grafičkog prikaza (Slika 12.) može se uočiti da u trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii* u uzorcima nije postojala niti jedna kolonija *E. coli*. Isti se slučaj zadržao do kraja ispitivanja.

4.7. Kinetika rasta fekalnih koliforma u vodi iz Lokvarskog jezera

U trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii* u uzorke vode iz Lokvarskog jezera broj fekalnih koliforma iznosio je 10 CFU/100 ml. Preživljavanje fekalnih koliforma u sva tri uzorka nesterilne vode praćeno je kroz vremenski period od 10 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon dva dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku $9 \cdot 10^3$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $1,7 \cdot 10^4$ CFU/100 ml. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku $1,6 \cdot 10^4$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $5,2 \cdot 10^4$ CFU/100 ml. Nakon osam dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku 0 CFU/100 ml te u trećem uzorku 0 CFU/100 ml. Nakon deset dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je 0 CFU/100 ml, u drugom uzorku 0 CFU/100 ml te u trećem uzorku 0 CFU/100 ml.



Slika 13. Kinetika rasta fekalnih koliforma u vodi iz Lokvarskog jezera. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C na mFC agaru, praćeno je preživljavanje fekalnih koliforma u nesterilnim uzorcima vode iz Lokvarskog jezera u kojima su prethodno dodane bakterija *F. novicida* i ameba *A. castellanii*. Promjena broja fekalnih koliforma prikazana je kroz vremensko razdoblje od 10 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani na sobnoj temperaturi. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Rezultati označeni zvjezdicom (*) pokazuju statistički značajnu razliku.

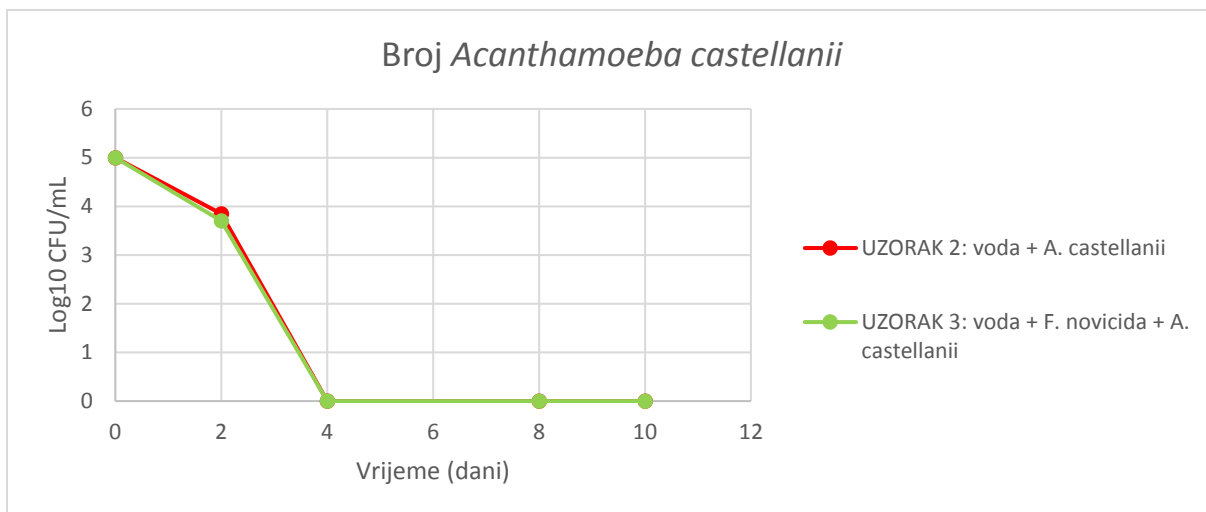
Iz priloženog grafičkog prikaza (Slika 13.) može se uočiti da je broj fekalnih koliforma u svim uzorcima nakon desetog dana rasta manji nego u trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii*. U prvom uzorku nakon drugog dana ispitivanja više nije bilo prisutnih fekalnih koliforma. Drugi i treći uzorak bilježe porast do četvrtog dana, nakon čega u osmom danu te do kraja analize nije preostala niti jedna kolonija fekalnih koliforma. Broj fekalnih koliforma bilježi najbolji porast u trećem uzorku vode gdje je prisutan najveći broj bakterija do četvrtog dana analize.

Dobiveni rezultati pokazuju da je broj fekalnih koliforma u uzorku vode u koji je dodana samo *F. novicida* statistički značajno manji u odnosu na ostale uzorke nakon 2. i 4. dana inkubacije ($p < 0,05$).

4.8. Kinetika rasta *A. castellanii* u vodi iz Lokvarskog jezera

U trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii* u uzorke vode iz Lokvarskog jezera broj *A. castellanii* iznosio je $1 \cdot 10^5$ CFU/ml. Preživljavanje *A. castellanii* u drugom i trećem uzorku nesterilne vode praćeno je kroz vremenski period od 10 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon dva dana rasta broj bakterija u drugom uzorku iznosio je $7 \cdot 10^3$ CFU/ml te u trećem uzorku $5 \cdot 10^3$ CFU/ml. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u drugom uzorku iznosio je 0 CFU/ml te u trećem uzorku 0 CFU/ml. Nakon osam dana rasta broj bakterija u drugom uzorku iznosio je 0 CFU/ml te u trećem uzorku 0 CFU/ml. Nakon deset dana rasta broj bakterija u drugom uzorku iznosio je 0 CFU/ml te u trećem uzorku 0 CFU/ml.



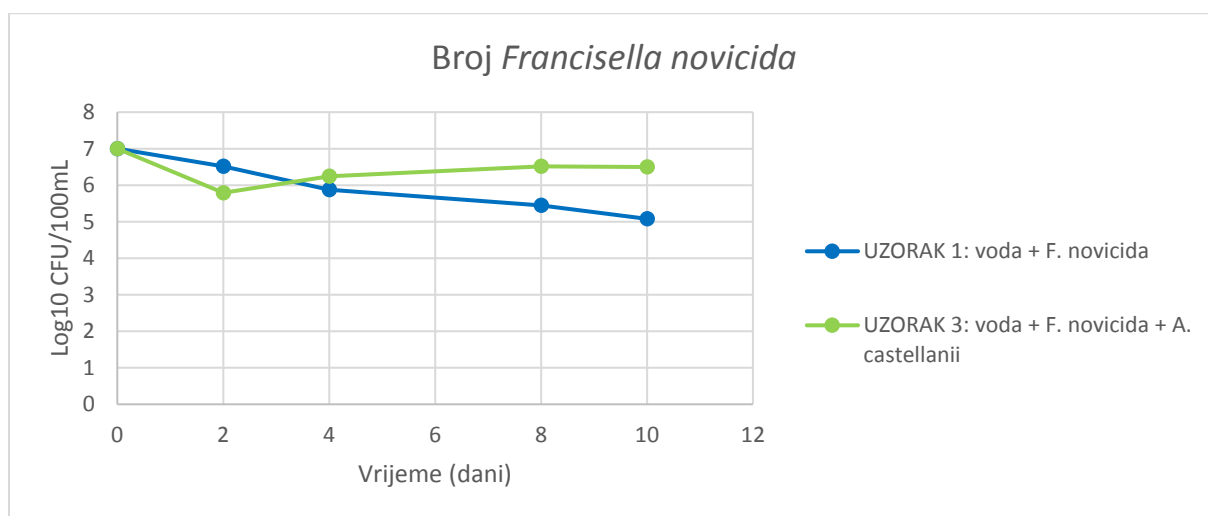
Slika 14. Kinetika rasta *A. castellanii* u vodi iz Lokvarskog jezera. Nakon inkubacije na temperaturi od 25 °C u PYG mediju, praćeno je preživljavanje *A. castellanii* u nesterilnim uzorcima vode iz Lokvarskog jezera u kojima su prethodno dodane bakterija *F. novicida* i ameba *A. castellanii*. Promjena broja *A. castellanii* prikazana je kroz vremensko razdoblje od 10 dana. Uzorci vode su tijekom pokusa čuvani na sobnoj temperaturi.

Iz priloženog grafičkog prikaza (Slika 14.) može se uočiti da je broj ameba pada već drugog dana nakon inokulacije u uzorke vode te četvrtog dana nakon inokulacije prisutstvo ameba u uzorku nije zabilježeno. Dobiveni rezultati pokazuju da je broj *A. castellanii* neznatno bolji u uzorku vode u koji je dodana samo ameba, u odnosu na uzorak vode kojem su dodane i amebe *A. castellanii* i *F. novicida*.

4.9. Kinetika rasta *F. novicida* u vodi iz Lokvarskog jezera

U trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii* u uzorke vode iz Lokvarskog jezera broj *F. novicida* iznosio je $1 \cdot 10^7$ CFU/100 ml. Preživljavanje *F. novicida* u sva tri uzorka nesterilne vode praćeno je kroz vremenski period od 10 dana. Rezultati promjene broja bakterija prikazani su grafički.

Nakon dva dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je $3,3 \cdot 10^6$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $6,2 \cdot 10^5$ CFU/100 ml. Nakon četiri dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je $7,5 \cdot 10^5$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $1,75 \cdot 10^6$ CFU/100 ml. Nakon osam dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je $2,8 \cdot 10^5$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $3,3 \cdot 10^6$ CFU/100 ml. Nakon deset dana rasta broj bakterija u prvom uzorku iznosio je $1,2 \cdot 10^5$ CFU/100 ml te u trećem uzorku $3,15 \cdot 10^6$ CFU/100 ml.



Slika 15. Kinetika rasta *F. novicida* u vodi iz Lokvarskog jezera. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C na BCYE agaru, praćeno je preživljavanje *F. novicida* u nesterilnim uzorcima vode iz Lokvarskog jezera u kojima su prethodno dodane bakterija *F. novicida* i ameba *A. castellanii*. Promjena broja *F. novicida* prikazana je kroz vremensko razdoblje od 10 dana. Uzorci vode su tijekom odvijanja pokusa čuvani na sobnoj temperaturi.

Iz priloženog grafičkog prikaza (Slika 15.) može se uočiti da je broj *F. novicida* u prvom i trećem uzorku nakon desetog dana rasta veći nego u trenutku unosa *F. novicida* i *A. castellanii*. Prvi uzorak je imao konstantan pad broja bakterija nakon naglog porasta do drugog dana, dok treći uzorak bilježi konstantan porast kroz čitav period. Broj *F. novicida* bilježi bolji porast u trećem uzorku vode gdje je prisutan veći broj bakterija nakon desetog dana analize.

5. RASPRAVA

U nedostatku podataka o međusobnom suživotu *F. novicida* i *A. castellanii*, ovim se radom pažnja usmjerava na razinu sposobnosti preživljavanja bakterija u kontaktu s amebama, kao i preživljavanja ameba u kontaktu s bakterijama. Poznato je da bakterijski soj *Francisella novicida* U112 ne uzrokuje bolest opasnu po zdravlje ljudi, ali zbog svoje velike genetske sličnosti s *F. tularensis* često služi kao prvi izbor pri istraživanju tularemije. Kultivacija *F. novicida* ne zahtjeva strogi režim zaštite pa je prema tome pogodna za rukovanje i ispitivanja potrebna za skupljanje podataka o pravilnoj dijagnozi i liječenju bolesti. Poveznica između *F. novicida* i *A. castellanii* je činjenica da amebe učestalo služe kao domaćini bakterijama kada se zajedno nađu u istoj okolini. Pri rukovanju amebnim sojem *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30234 potrebno je imati na umu njenu sposobnost izazivanja amebnog keratitisa i encefalitisa, pogotovo pojedinci koji koriste kontaktne leće. Uzgoj *A. castellanii* je jednostavan i brz za primjenu te je iz tog razloga uzet kao model za usporedbu kinetike rasta bakterija u nesterilnim uzorcima voda Lokvarskog jezera. Vodeni ekosustavi kao što je Lokvarsko jezero su prirodno stanište spomenutih mikroorganizama te su kao takvi poslužili pri izradi ovog rada kako bi time dobiveni rezultati bili što jasniji, precizniji i reprezentativniji.

Dobiveni rezultati istraživanja pokazuju da enterokoki, ukupni koliformi i fekalni koliformi postižu bolji porast u uzorcima vode gdje su prisutne amebe, odnosno lošiji rast je zabilježen u uzorku gdje je dodana *F. novicida*. Amebe su bakterijama poslužile kao izvor hranjivih tvari pa je iz tog razloga porast u vodi s *F. novicida* slabiji jer im ona ne može poslužiti kao domaćin za razmnožavanje. Ukupni koliformi su se uspjeli održati do osmog dana analize, nakon čega dolazi do pada u desetom danu gdje nije bilo zabilježenih preživjelih ukupnih koliforma. Bakterije *C. perfringens* i *E. coli* nisu se uspjele nametnuti za hranjive tvari u nijednom od uzoraka što znači da su ostale bakterije i amebe pokupile sve komponente potrebne za

preživljavanje. *A. castellanii* je preživjela do četvrtog dana analize nakon čega nije bilo zabilježenih ameba u uzorcima. Razlog tome je korištenje amebe kao domaćina za razmnožavanje od strane bakterija. *F. novicida* je bolje rasla u uzorku gdje je dodana *A. castellanii* iz razloga što se okoristila amebom kao izvorom hranjivih tvari za preživljavanje.

Analizom dobivenih podataka potvrđeno je da se bakterije mnogo bolje razmnožavaju u okolini gdje je prisutna *A. castellanii* u odnosu na uzorke vode bez prisustva ameba. Dokazano je da sve analizirane bakterije osim *C. perfringens* i *E. coli* imaju sposobnost da koriste amebu kao domaćina, odnosno kao izvor hranjivih komponenata za razmnožavanje.

Prema prilogu 1. Uredbe o kakvoći voda za kupanje propisano je da izvrsna kakvoća vode zahtijeva do 200 CFU/ml za enterokoke te do 500 CFU/ml za *E. coli* [33]. Rezultati ispitivanja u ovom diplomskom radu su u skladu s propisanim vrijednostima u Uredbi o kakvoći voda za kupanje, odnosno u uzorku vode iz Lokvarskog jezera količina enterokoka je iznosila 22 CFU/ml a količina *E. coli* je iznosila 0 CFU/ml.

Istraživanja provedena na amebama kao domaćinima za preživljavanje bakterija dala su određene rezultate. Amebe s ili bez endosimbionata žive u istim prirodnim okruženjima kao i *L. pneumophila*. Simbionti iz roda *Chlamydia* ograničavaju rast amebe, međutim i osiguravaju joj epigenetsku obranu koja je korisna u prisustvu *L. pneumophila*. Prisutnost simbionata iz roda *Chlamydia* u amebi potiče razmnožavanje i jaču virulenciju *L. pneumophila* u slučaju kada se ova bakterija koristi amebom kao domaćinom [27].

L. monocytogenes se u tijelu čovjeka ne razgrađuje kada se nalazi u *Acanthamoeba* te se kasnije oslobađaju iz trofozoitnih oblika. *Campylobacter jejuni* je sposoban dugo preživjeti u *Acanthamoeba* unutar probavnog sustava čovjeka. Vrste roda *Mycobacterium* ulaze i repliciraju se unutar *A. castellanii* i predstavljaju oportunističke patogene za osobe oboljele od HIV

infekcije. *Salmonella typhimurium* se umnožava u kontraktilnim vakuolama *A. polyphaga* koja joj povećava patogenost [26].

Rod *Acanthamoeba* je najčešći domaćin patogenih bakterija u okolišu te se smatra da 20% spomenute amebe u sebi sadrži unutarstanične bakterije. Mikroorganizmi koji se koriste ovim domaćinom uključuju *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila* i *Vibrio cholerae* [25]. U vodenom ekosustavu je *V. cholerae* okružen bakterijskim grabežljivcima. Odgovor na ovaj biološki stres podrazumijeva izbjegavanje ostalih bakterija na način da napada amebu *Dictyostelium discoideum* u kojoj može preživjeti nepovoljne uvjete [38]. U interakciji *A. castellanii* sa *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila* i *E. coli*, utvrđeno je preživljavanje ovih bakterija u trofozoitima te cistama ameba. Značajno je da je bakterija *A. hydrophila* pokazala veću povezanost, odnosno apsorpciju i preživljavanje unutar *A. castellanii* u usporedbi s *E. aerogenes* i *E. coli*. *Acanthamoeba* uzima neinvazivne bakterije kao izvor hrane, dok invazivne bakterije mogu boraviti i razmnožavati se u amebama, a da ih ne usmrte. Bakterije koriste amebe kao prijenosno sredstvo, poligon za razvijanje otpornosti na druge fagocitne stanice kao što su ljudski makrofagi te za pojačavanje virulencije. Istraživanje je pokazalo da su bakterije *A. hydrophila*, *E. aerogenes* i *E. coli* preživjele proces encistacije te kao biološki vektori imaju potencijal iskoristiti ciste ameba. Unutarstaničnim preživljavanjem u *A. castellanii*, *A. hydrophila*, *E. aerogenes* i *E. coli* su se pridružile skupinama bakterija koje bi mogle imati koristi od *A. castellanii* [39].

6. ZAKLJUČAK

Analizom rezultata ovog diplomskog rada doneseni su sljedeći zaključci:

- Sve ispitivane bakterije osim *C. perfringens* i *E. coli* preživljavaju u oba uzorka vode u kojima je dodana *A. castellanii*
- Samo ukupni koliformi i *F. novicida* preživljavaju u uzorku vode gdje je dodana samo *F. novicida*
- Broj bakterija se kroz period ispitivanja od 10 dana povećava u oba uzorka gdje je dodana *A. castellanii*
- Broj bakterija se kroz period ispitivanja od 10 dana smanjuje u uzorku gdje je dodana samo *F. novicida*
- *A. castellanii* neznatno bolje preživljava u uzorku bez prisutstva *F. novicida*
- *F. novicida* bolje preživljava u uzorku vode s prisutstvom *A. castellanii*
- Uzimajući u obzir sve ispitivane mikroorganizme, u uzorku s inokuliranom *F. novicida* najbolje preživljava *F. novicida*
- Uzimajući u obzir sve ispitivane mikroorganizme, u uzorku s inokuliranom *A. castellanii* najbolje preživljavaju ukupni koliformi
- Uzimajući u obzir sve ispitivane mikroorganizme, u uzorku s inokuliranim *F. novicida* i *A. castellanii* najbolje preživljavaju ukupni koliformi
- *F. novicida* sprječava rast i razmnožavanje *A. castellanii* i bakterija stalne mikroflore iz vode Lokvarskog jezera uzimajući im hranjive tvari
- *A. castellanii* poboljšava rast i razmnožavanje *F. novicida* i bakterija stalne mikroflore iz vode Lokvarskog jezera služeći im kao domaćin iz kojeg crpe hranjive tvari

- Rezultati ispitivanja u ovom diplomskom radu su u skladu s propisanim vrijednostima u Uredbi o kakvoći voda za kupanje
- Voda iz Lokvarskog jezera je prema Uredbi o kakvoći voda za kupanje voda izvrsne kakvoće

7. LITERATURA

1. Ramakrishnan G. (2017). *Iron and Virulence in Francisella tularensis*
2. Van Hoek M. L., Hoang K. V., Gunn J. S. (2019). *Two-Component Systems in Francisella Species*
3. Ziveri J., Barel M., Charbit A. (2017). *Importance of Metabolic Adaptations in Francisella Pathogenesis*
4. Kinkead L. C., Fayram D. C., Allen L. A. H. (2017). *Francisella novicida inhibits spontaneous apoptosis and extends human neutrophil lifespan*
5. Kingry L. C., Petersen J. M. (2014). *Comparative review of Francisella tularensis and Francisella novicida*
6. Ellis J., Oyston P. C. F., Green M., Titball R. W. (2002). *Tularemia*
7. Sarva S. T., Waldo R. H., Belland R. J., Klose K. E. (2016). *Comparative Transcriptional Analyses of Francisella tularensis and Francisella novicida*
8. Lloyd D. (2014). *Encystment in Acanthamoeba castellanii: A review*
9. Kot K., Lanocha-Arendarczyk N. A., Kosik-Bogacka D. I. (2018). *Amoebas from the genus Acanthamoeba and their pathogenic properties*
10. Lorenzo-Morales J., Khan N. A., Walochnik J. (2015). *An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment*
11. Nomura H., Isshiki Y., Sakuda K., Sakuma K., Kondo S. (2015). *Effects of Oakmoss and its Components on Acanthamoeba castellanii ATCC 30234 and the Uptake of Legionella pneumophila JCM 7571 (ATCC 33152) into A. castellanii*
12. Mowrey-McKee M., George M. (2007). *Contact Lens Solution Efficacy Against Acanthamoeba castellanii*
13. Jarec M. (2019). *Love of the road and memories in the water: Affects in infrastructural spaces in Gorski kotar*
14. Harmon S. M., Kautter D. A., Peeler J. T. (1971). *Comparison of Media for the Enumeration of Clostridium perfringens*
15. Wohlsen T. D. (2011). *Comparative evaluation of chromogenic agar CM1046 and mFC agar for detection of E. coli and thermotolerant coliform bacteria from water samples*
16. Grabow W. O., Du Preez M. (1979). *Comparison of m-Endo LES, MacConkey, and Teepol media for membrane filtration counting of total coliform bacteria in water*
17. Niemi R. M., Ahtiainen J. (1995). *Enumeration of intestinal enterococci and interfering organisms with Slanetz-Bartley agar, KF streptococcus agar and the MUST method*
18. Mavridou A., Smeti E., Mandilara G. et al. (2010). *Equivalency testing of TTC Tergitol 7 agar (ISO 9308-1:2000) with five culture media for the detection of E. coli in water samples in Grece*
19. Chatfield C. H., Cianciotto N. P. (2013). *Culturing, Media, and Handling of Legionella*
20. Heredero-Barmejo I., San Juan Martin C. et al. (2012). *Acanthamoeba castellanii: in vitro UAH-TI7c3 trophozoite growth study in different culture media*
21. Apicella M. A., Post D. M., Fowler A. C., Jones B. D., Rasmussen J. A., Hunt J. R., et al. (2010). *Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of Francisella tularensis*
22. Berry J. L., Pelicic V. (2015). *Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives*
23. Miller S. I., Ernst R. K., Bader M. W. (2005). *LPS, TLR4 and infectious disease diversity. Nat Rev Microbiol.*
24. Tan Y., Kagan J. C. (2014). *A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide*

25. Goni P., Fernandez M. T., Rubio E. (2014). *Identifying endosymbiont bacteria associated with free-living amoebae*
26. Balczun C., Scheid P. L. (2017). *Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance*
27. König L., Wentrup C. et al. (2019). *Symbiont-Mediated Defense against Legionella pneumophila in Amoebae*
28. 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.
29. Kalenić S. i sur., *MEDICINSKA MIKROBIOLOGIJA*, Medicinska naklada, Zagreb, 2019.
30. <http://tz-lokve.hr/lokvarsko-jezero/?menu=8>
31. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2017_12_125_2848.html
32. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_07_66_1285.html
33. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2010_04_51_1220.html
34. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:5667:-1:ed-3:v1:en>
35. <http://biologija.unios.hr/webbio/wp-content/uploads/2013/predavanja/mikrobiologija-bakteriologija.pdf>
36. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/86558dat.pdf>
37. <https://punkufer.dnevnik.hr/clanak/putovanja/vikend-u-prirodi-na-lokvarsko-jezero-i-pijane-zabe--629616.html>
38. Conner J. G., Teschler J. K., Jones C. J., Yildiz F. H. (2017). *Staying alive: Vibrio cholerae's cycle of environmental survival, transmission, and dissemination*
39. Yousuf F. A., Siddiqui R., Khan N. A. (2013). *Acanthamoeba castellanii of the T4 genotype is a potential environmental host for Enterobacter aerogenes and Aeromonas hydrophila*

Životopis pristupnika

Osobne informacije

Ime i prezime: Ivan Vidinić

Datum i mjesto rođenja: 12. Svibnja 1996., Rijeka

Adresa i mjesto stanovanja: Korzo 8, Rijeka, Hrvatska

Državljanstvo: Hrvatsko

Spol: muško

Mobitel: +385981676425

Email: vidinicivan@gmail.com

Obrazovanje

2003.-2011.: Osnovna škola "Nikola Tesla" Rijeka

2011.-2015.: Salezijanska klasična gimnazija Rijeka

2015.-2021.: Medicinski fakultet Rijeka