

PREŽIVLJAVANJE BAKTERIJE *ACINETOBACTER BAUMANNII* U RAZLIČITIM TIPOVIMA VODE

Svjetlana Dekić, mag. oecol.

Prirodoslovno-matematički fakultet,
Biološki odsjek,
Sveučilište u Zagrebu
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb
svjetlana.dekic@biol.pmf.hr

**prof. dr. sc. Jasna Hrenović,
dipl. ing. biol.**

Prirodoslovno-matematički fakultet,
Biološki odsjek,
Sveučilište u Zagrebu
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Acinetobacter baumannii je oportunistički patogen koji izaziva infekcije imunosuprimiranih bolesnika. S obzirom da je nedovoljno podataka o uspješnosti preživljavanja ovog patogena u prirodnom okolišu, cilj rada bio je odrediti stopu preživljavanja *A. baumannii* u različitim tipovima voda. Tri izolata *A. baumannii* višestruko rezistentnih na antibiotike inokulirana su u izvorsku, morsku i izlaznu vodu (efluent) uređaja za pročišćavanje otpadnih voda, te inkubirana na 20°C tijekom 50 dana. U izvorskoj vodi broj vijabilnih *A. baumannii* bio je konstantan sa stopom preživljavanja 92% nakon 50 dana. U morskoj vodi zabilježen je pad broja bakterija sa stopom preživljavanja 67% nakon 50 dana. U efluentu je došlo do umnažanja bakterija, te je broj *A. baumannii* bio veći od inicijalnog broja i nakon 50 dana praćenja. Umnažanje te bolje preživljavanje *A. baumannii* u efluentu u odnosu na izvorsku ili morsku vodu objašnjava se većom dostupnošću nutrijenata. *A. baumannii* višestruko rezistentni na antibiotike sposobni su preživjeti u različitom vodenom okolišu kroz duže vrijeme, što predstavlja mogućnost njihovog širenja putem voda u prirodni okoliš.

Ključne riječi: *Acinetobacter baumannii*, preživljavanje, izvorska voda, morska voda, efluent

1. UVOD

Bakterije roda *Acinetobacter* široko su rasprostranjene u okolišu (Peleg et al., 2008.). Vrste *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii* i *A. calcoaceticus* poznati su ljudski patogeni. Od navedenih vrsta, *A. baumannii* najopasniji je patogen. *A. baumannii* zajedno s vrstama *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* sp. spada u tzv. ESKAPE patogene, što znači da može izbjeći biocidno djelovanje antibiotika, te da navedene vrste predstavljaju nove paradigme u patogenezi, transmisiji i rezistenciji (Pendleton et al., 2013.). Posebnu opasnost predstavljaju sojevi *A. baumannii* rezistentni na karbapenemske antibiotike. Karbapenemi su skupina antibiotika koja se uspješno koristila za tretiranje infekcija uzrokovanih s *A. baumannii*. No međutim, rezistencija na karbapeneme

povećala se od 2008. s 10% na 86% u 2017. godini (CAMS, 2017). *A. baumannii* je Gram-negativni nesporeni kokobacil. Smatra se oportunističkim patogenom koji izaziva infekcije u imunosuprimiranih bolesnika. Izuzetno je opasna bakterija u bolničkom okružju, pogotovo u jedinicama intenzivnog liječenja i operacijskim salama (Towner, 2009.). Putem medicinske opreme (tubusi za ventilaciju i kateteri), koloniziranog osoblja, čak i bolničkog zraka, pacijent može doći u kontakt s *A. baumannii* (Peleg et al., 2008.; Yakupogullari et al., 2016.). Kod imunosuprimiranih bolesnika *A. baumannii* može uzrokovati pneumoniju, bakteremiju, meningitis, infekcije kože, krvožilnog sustava i urinarnog trakta (McConnell et al., 2013.). Osim u bolničkom okružju, zabilježene su i sporadične izvanbolničke infekcije uzrokovane *A.*

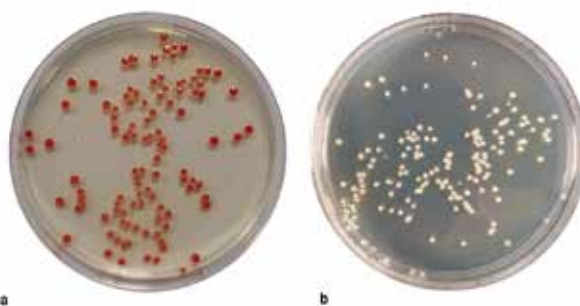
baumannii (Dexter et al., 2015.). Sve veća pojava sojeva višestruko rezistentnih na antibiotike, otpornost na komercijalno dostupne dezinficijense i preživljavanje u nepovoljnim okolišnim uvjetima kroz nekoliko mjeseci čini ovu bakteriju velikom prijetnjom za ljudsko zdravlje (Espinal et al., 2012.; McConnell et al., 2013.; Ivanković et al., 2017.). U prirodnoj površinskoj vodi pronađeno je nekoliko izolata višestruko rezistentnih na antibiotike. U rijeci Seni, nizvodno od Pariza, pronađen je jedan takav izolat *A. baumannii* (Girlich et al., 2010.), a u rijeci Savi, nizvodno od Zagreba, četiri izolata u 10 mL vode (Šeruga Musić et al., 2017.). Prisutnost *A. baumannii* u prirodnim je vodama značajna, jer može predstavljati put zaraze ljudi i životinja. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti stopu preživljavanja *A. baumannii* u različitim tipovima vode kroz 50 dana.

2. MATERIJAL I METODE

U istraživanju su korištena tri okolišna izolata *A. baumannii* izdvojena iz: tla (Hrenović et al., 2017.), sirove bolničke otpadne vode (Kovačić et al., 2017.) te efluenta iz Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba (Hrenović et al., 2016.). Svi ispitivani izolati pokazuju višestruku rezistenciju na antibiotike (Magiorakos et al., 2012.), uključujući karbapeneme. Bakterijska biomasa suspendirana je u sterilnoj destiliranoj vodi s dodatkom 0,3% natrijevog klorida. 1 mL bakterijske suspenzije dodano je u 100 mL tri različita prethodno autoklavirana vodena medija poznate KPK (kemijska potrošnja kisika) vrijednosti. Korišteni vodeni mediji bili su: komercijalno dostupna prirodna izvorska voda (Jana), morska voda uzorkovana u Kaštelanskom zaljevu, te efluent iz Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba. KPK vrijednosti uzoraka voda bile su: izvorska voda=3 mgO₂/L, morska voda=4 mgO₂/L, efluent=24 mgO₂/L. Izmjerena pH vrijednost bila je podjednaka za sva tri ispitivana vodena medija (izvorska voda=7,96; morska voda=7,93; efluent=7,83). U izvorsku vodu inokuliran je izolat iz tla, u morsku vodu izolat iz bolničke otpadne vode i u efluent izolat izdvojen iz istog medija. Eksperiment je bio postavljen u staklenim Shott bocama. Čep nije bio maksimalno zatvoren, kako bi se osigurali aerobni uvjeti. Inokulirani vodeni mediji inkubirani su na 20°C/50 dana uz miješanje (150 rpm). Prva dva dana i nakon toga jednom tjedno po 1 mL iz svakog vodenog medija razrijeđen je u sterilnoj destiliranoj vodi s 0,3% natrijevog klorida metodom decimalnih razrjeđenja (-1 do -9 razrjeđenje), nakon čega je 0,1 mL suspenzije inokulirano na hranjivu podlogu. Nakon inkubacije (42°C/24h), prebrojane su porasle kolonije te je izračunat CFU (colony forming unit), čije vrijednosti su logaritmirane i izražene kao CFU/mL vode. Određivanje broja bakterija provedeno je u triplikatu. Za uzgoj *A. baumannii* korišten je CHROMagar Acinetobacter (CHROMAgar) inkubiran

na 42°C/48h (slika 1 a), dok je za određivanje broja bakterija korišten hranjivi agar na 42°C/24h (Nutrient agar, Biolife) (slika 1 b). Početna koncentracija *A. baumannii* u izvorskoj vodi bila je 7,1 ± 0,4 log CFU/mL, u morskoj vodi 6,6 ± 0,1 log CFU/mL i u efluentu 6,6 ± 0,3 log CFU/mL. Stope preživljavanja izračunate su prema jednadžbi (1) u kojoj log CFU/ml(t) označava broj bakterija na dan mjerenja, dok log CFU/mL(t₀) označava broj bakterija na početku eksperimenta.

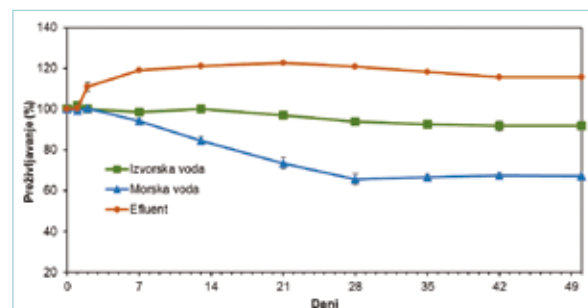
$$\text{Stopa preživljavanja} = \left(\frac{\log \text{CFU/mL}(t)}{\log \text{CFU/mL}(t_0)} \right) * 100 \quad (1)$$



Slika 1: Kolonije *A. baumannii* na različitim agarima korištenim u eksperimentu: a) CHROMagar Acinetobacter b) Nutrient agar (izvor: Dekić, S.)

3. REZULTATI

Rezultati istraživanja prikazani su na slici 2. U izvorskoj vodi, kao ni u morskoj, nije došlo do umnažanja bakterija. U izvorskoj vodi stopa preživljavanja bila je konstantna (100%) do 21. dana, nakon kojega se počinje polako smanjivati do 92% na kraju eksperimenta. U morskoj vodi stopa preživljavanja iznosila je 100% do 7. dana kada počinje opadati. Značajniji pad stope preživljavanja dogodio se između 13. (84%) i 28. dana (66%). Nakon 28. dana stopa preživljavanja ostala je na 67% do kraja eksperimenta. U efluentu su se bakterije umnažale do 21. dana (123%), nakon kojeg umnažanje prestaje, te stopa preživljavanja počinje lagano opadati do 116% na kraju eksperimenta.



Slika 2: Stopa preživljavanja bakterije *A. baumannii* u izvorskoj, morskoj vodi i izlaznoj vodi (efluent) iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda kroz 50 dana praćenja na hranjivom agaru. Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

4. RASPRAVA

Odabir izolata i medija u koje je bakterija *A. baumannii* inokulirana pridonosi većem razumijevanju preživljavanja i mogućih putova širenja ovog opasnog patogena u prirodi. Jedan klinički značajan izolat *A. baumannii* pronađen je u tlu u koji je procijeđena voda iz ilegalno odloženog otpada (Hrenović et al., 2014.). Procjednim vodama *A. baumannii* iz tla može dospjeti u prirodne vode s kojom ljudi i životinje mogu doći u kontakt. Također su izolati *A. baumannii* pronađeni u bolničkoj otpadnoj vodi i efluentu uređaja za pročišćavanje otpadne vode (Hrenović et al., 2016.; Šeruga Musić et al., 2017.) iz kojih *A. baumannii* može dospjeti u prirodni vodeni recipijent, bilo to more ili rijeka. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da *A. baumannii* može uspješno preživjeti kroz 50 dana u prirodnoj izvorskoj i morskoj vodi, kao i u efluentu uređaja za pročišćavanje otpadnih voda. Do umnažanja bakterija u izvorskoj i morskoj vodi nije došlo, što je moguće zbog siromašnosti nutrijentima. Efluent je pročišćena kanalizacijska voda koja još uvijek ima znatno veću koncentraciju nutrijenata od izvorske i morske vode, stoga su se bakterije uspješno umnažale. Bakterije roda *Acinetobacter* podnose pH od 5 do 8, dok je optimalna vrijednost oko 6,5 (Garrity et al. 2005.). pH vrijednost u eksperimentu svih medija bila je blizu gornje granice tolerancije, što može također biti uzrok nedostatku umnažanja u izvorskoj i morskoj vodi. Uzrok izostanka umnažanja te ugibanja bakterija u morskoj vodi, osim navedenih činjenica, može biti prisutnost različitih mineralnih komponenti prisutnih u vodi koje ometaju razvoj bakterija. Male koncentracije klorida u vodi (0,1-0,5%) potiču razvoj bakterija, dok veća koncentracija kao što je u morskoj vodi (3,8-3,9%) može smanjiti njihov rast (Heller et al., 1998.; Rozen i Belkin, 2005.). Trenutno ne postoje literaturni podatci o tome koji

ekološki čimbenici i u kojoj mjeri utječu na preživljavanje *A. baumannii* u okolišu. Štimac et al. (2010.) pratili su preživljavanje bakterije *K. pneumoniae* u izvorskoj, morskoj, destiliranoj vodi i vodi iz slavine kroz šest mjeseci. Rezultati su pokazali da *K. pneumoniae* najduže preživljava u destiliranoj vodi, dok je preživljavanje u izvorskoj vodi bilo najkraće. Ti se rezultati razlikuju od rezultata ovog istraživanja, gdje je stopa preživljavanja *A. baumannii* u izvorskoj vodi gotovo konstantna. Legnani et al. (1999.) pratili su preživljavanje bakterije *P. aeruginosa* u prirodnoj mineralnoj vodi s različitim vrijednostima ukupnog ugljika i ukupnih otopljenih tvari kroz pet godina. Rezultati su pokazali da se *P. aeruginosa* uspješno umnaža i preživljava u uvjetima pokusa u svim medijima. Wendt et al. (1997.) pokazali su da *A. baumannii* može uspješno preživjeti, osim u vlažnom okolišu i na različitim podlogama bez vode (keramika, plastika, guma, nehrđajući čelik). Sve navedeno upućuje na zaključak da je *A. baumannii* otporna bakterija koja može preživjeti duže vrijeme u različitim okolišima.

5. ZAKLJUČAK

A. baumannii uspješno preživljava u izvorskoj vodi, morskoj vodi i efluentu uređaja za pročišćavanje otpadnih voda kroz 50 dana praćenja. U izvorskoj i morskoj vodi ne dolazi do umnažanja bakterija, dok je efluent pogodniji medij za preživljavanje i umnažanje *A. baumannii*.

ZAHVALA

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Prirodno stanište klinički značajnih *Acinetobacter baumannii*“ (br. IP-2014-09-5656). ■

LITERATURA

- Croatian Academy of Medical Sciences (2017.): Antibiotic resistance in Croatia, 2016. CAMS, Zagreb.
- Dexter, C.; Murray, G.L.; Paulsen, I.T.; Peleg, A.Y. (2015.): Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 13(5), 567–573.
- Espinal, P.; Martí, S.; Vila, J. (2012.): Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. Hosp. Infect.*, 80(1), 56–60.
- Garrity, G.M.; Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T. (2005.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume Two, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria, Springer, New York.
- Gerlich, D.; Poirel, L.; Nordmann, P. (2010.): First isolation of the blaOXA-23 carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 54(1), 578–9.
- Heller, R.; Höller, C.; Süßmuth, R.; Gundermann, K.O. (1998.): Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26(1), 64–8.
- Hrenović, J.; Durn, G.; Goić-Barišić, I.; Kovačić, A. (2014.): Occurrence of an environmental *Acinetobacter baumannii* strain similar to a clinical isolate in paleosol from Croatia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(9), 2860–2866.
- Hrenović, J.; Goić-Barišić, I.; Kazazić, S.; Kovačić, A.; Ganjto, M.; Tonkić, M. (2016.): Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. *Eurosurveillance*, 21(15), 1–10.
- Hrenović, J.; Durn, G.; Musić, M.S.; Dekić, S.; Troškot-Čorbić, T.; Škorić, D. (2017.): Extensively and multi drug-resistant *Acinetobacter baumannii* recovered from technosol at a dump site in Croatia. *Sci. Total Environ.*, 607–608, 1049–1055.
- Ivanković, T.; Goić-Barišić, I.; Hrenović, J. (2017.): Reduced susceptibility to disinfectants of *Acinetobacter*

- baumannii* biofilms on glass and ceramic. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 68, 99–108.
- Kovačić, A.; Šeruga Musić, M.; Dekić, S.; Tonkić, M.; Novak, A.; Rubić, Ž.; Hrenović, J.; Goić-Barišić, I. (2017.): Transmission and survival of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outside hospital setting. *International Microbiology*, in print.
- Legnani, P., Leoni, E., Rapuano, S., Turin, D., Valenti, C. (1999.): Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: A 5-year study. *Int. J. Food. Microbiol.*, 53(2–3), 153–158.
- Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; Paterson, D.L.; Rice, L.B.; Stelling, J.; Struelens, M.J.; Vatopoulos, A.; Weber, J.T.; Monnet, D.L. (2012.): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18(3), 268–281.
- McConnell, M.J.; Actis, L.; Pachón, J. (2013.): *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37(2), 130–155.
- Peleg, A.Y.; Seifert, H.; Paterson, D.L. (2008.). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21(3), 538–82.
- Pendleton, J.N.; Gorman, S.P.; Gilmore, B.F. (2013.): Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 11(3), 297–308.
- Rozen, Y.; Belkin, S. (2005.): Survival of enteric bacteria in seawater: Molecular aspects. *Ocean Heal. Pathog. Mar. Environ.*, 25, 93–107.
- Šeruga Musić, M.; Hrenović, J.; Goić-Barišić, I.; Hunjak, B.; Škorić, D.; Ivanković, T.; (2017.): Emission of extensively-drug resistant *Acinetobacter baumannii* from hospital settings to the natural environment. *J. Hosp. Infect.* doi:10.1016/j.jhin.2017.04.005.
- Štimac, I.; Vasiljev Marchesi, V.; Tomljenović, M.; Rukavina T. (2010.): Preživljavanje vrste *Klebsiella pneumoniae* u različitim uzorcima voda. *Hrvatske vode*, 18(71), 13–18.
- Towner, K.J. (2009.): *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J. Hosp. Infect.*, 73(4), 355–363.
- Wendt, C.; Dietze, B.; Dietz, E.; Den, H.R. (1997.): Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces. *J. Clin. Microbiol.*, 35(6), 1394–1397.
- Yakupogullari, Y.; Otlu, B.; Ersoy, Y.; Kuzucu, C.; Bayindir, Y.; Kayabas, U.; Tugal, T.; Kizilkaya, C. (2016.): Is airborne transmission of *Acinetobacter baumannii* possible: A prospective molecular epidemiologic study in a tertiary care hospital. *Am. J. Infect. Control*, 44(12), 1595–1599.

Survival of *Acinetobacter baumannii* in different water types

Abstract. *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic bacterial pathogen which causes infections in immunosuppressed patients. Considering insufficient data on the survival success rate of this pathogen in the natural environment, the purpose of this paper was to determine the *A. baumannii* survival rate in different water types. Three *A. baumannii* isolates with multiple antibiotic resistance multiply were inoculated in spring water, sea water and wastewater treatment plant effluent and incubated on 20°C in the period of 50 days. The number of viable *A. baumannii* in spring water was constant, with a survival rate of 92% after 50 days. In sea water, there was a recorded decrease of the bacterial numbers with a survival rate of 67% after 50 days. The bacteria in the effluent multiplied, and the number of *A. baumannii* was higher than the initial number even after 50 days of monitoring. The multiplication of bacteria and improved survival of *A. baumannii* in the effluent in comparison to spring or sea water is attributed to higher nutrient availability. *A. baumannii* with multiple antibiotic resistance can survive in different aquatic environments for a longer time period, which provides an opportunity for its spreading through water into the natural environment.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, survival, spring water, sea water, effluent

Überleben des Bakteriums *Acinetobacter baumannii* in verschiedenen Wassertypen

Zusammenfassung. *Acinetobacter baumannii* ist ein opportunistischer Erreger von Infektion bei immunsupprimierten Patienten. Da die Angaben zum erfolgreichen Überleben dieses Pathogens in der natürlichen Umwelt unzureichend sind, war das Ziel dieser Arbeit die Überlebensrate von *A. baumannii* in verschiedenen Wassertypen festzustellen. Quellwasser, Meereswasser und Abwasser aus der Kläranlage wurden mit drei Isolaten von mehrfach Antibiotika-resistentem *A. baumannii* inokuliert und bei 20°C für 50 Tage inkubiert. In der Quellwasser wurde die Anzahl von variablen *A. baumannii* konstant mit einer Überlebensrate von 92 Prozent nach 50 Tagen. Im Meereswasser wurde eine Senkung der Anzahl der Bakterien mit einer Überlebensrate von 67 Prozent nach 50 Tagen beobachtet. Im Abwasser kam es zur Vermehrung der Bakterien, so war die Bakterienanzahl höher als die ursprüngliche Anzahl sogar nach 50 Tagen. Die Vermehrung und die höhere Überlebensrate von *A. baumannii* im Abwasser im Vergleich zu Quellwasser und Meereswasser wird durch das höhere Vorhandensein von Nährstoffen im Abwasser erklärt. Die mehrfach Antibiotika-resistenten *A. baumannii* können in verschiedenen Wassertypen für eine längere Zeit überleben, folglich können sie sich über Gewässer weiter in die natürliche Umwelt verbreiten.

Schlüsselwörter: *Acinetobacter baumannii*, Überleben, Quellwasser, Meereswasser, Abwasser