

INFICIRANJE HIDROBIONATA SA POTENCIJALNO PATOGENIM MIKROORGANIZMIMA

Dragutin Đukić¹, Leka Mandić¹, Monika Stojanova², Vesna Đurović¹,
Bojana Trifunović³

Izvod: U radu su prikazana bakteriološka ispitivanja vode i hidrobionata sa lokaliteta Međuvršje u Čačku. Proučavani biološki parametri su određivani po klasičnoj šemi zasejavanjem na selektivne hranljive podloge. Izolovane kolonije mikroorganizama su identifikovane pomoću test-sistema API 20E i API 20NE. Utvrđeni su podaci prisustva kultura enterobakterija i „nefermentirajućih“ mikroorganizama iz vode, zooplanktona (protozoe, ciklope, dafnije), larvi hironomida prirodnih i antropogenih rezervoara vode. Spektar potencijalno patogenih bakterija u vodi i hidrobiontima bio je prilično širok (16 rodova) i sličnog je sastava. Pokazalo se da je mikroflora hironomida manje heterogena od zooplanktona. Utvrđeno je da najčešće posmatrani mikrobi pripadaju rodovima *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, kao i *Actinomices* i *Candida*. Ovo nas navodi na zaključak da pored nadzemnih ekosistema i vodenih ekosistemi mogu biti stanište mikroorganizama koji su potencijalno patogeni za čoveka i životinje.

Ključne reči: mikroorganizmi, patogeni, voda, hidrobionti.

Uvod

Prema bogatstvu i raznolikosti sastava vrsta organizama koji ih naseljavaju, vodeni ekosistemi – prirodni i antropogeni (polja natapanja, taložnici, ribnjaci i tome slično), ne zaostaju za kopnenim. Bakterije, pa i one koje su potencijalno patogene za čoveka i životinje, potpuno su ravnopravni članovi vodene zajednice, čineći osnovu trofičke piramide i ulazeći u interakciju sa različitim hidrobiontima (Anand i sar., 1983; Fields i sar., 1993; Abd i sar., 2003).

Enterobakterije i nefermentirajući mikroorganizmi široko su rasprostranjeni u prirodi i bakteriološki se otkrivaju (detektuju) u različitim životinjama kopnenih ekosistema. Međutim, podaci o njihovom sastavu u hidrobiontima su oskudni i protivurečni. Protozoe su najbolje proučeni rezervoari (domaćini) ovih mikroorganizama i kao takvi predstavljaju uzročnike mnogih sapronoza. Njihova intenzivna reprodukcija, kratko generacijsko vreme, velika brojnost, dugo preživljavanje u stadijumu mirovanja (ciste), ukazuje na njihov veliki značaj u formi prirodnih rezervoara za patogene bakterije izazivače oboljenja ljudi, životinja i biljaka

¹ Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija
(lekamg@kg.ac.rs);

² Univerzitet Sv. Ćirila i Metodija, Poljoprivredno-prehrabreni fakultet, bul. Aleksandar Makedonski, Skoplje, Severna Makedonija;

³ Grad Čačak, gradska uprava za urbanizam, Ž. Stracimira 2, Čačak, Srbija

(Dogel, 1981; Litvin i sar., 1998; Pushkareva, 2008). Utvrđeno je da se one mogu aktivno razmnožavati u protozoama, dugo perzistirati i na kraju izazivati i potpuno liziranje (Mampel i sar., 2006, Berk i sar., 2008).

Interakcije između slobodno živećih protozoa i legionela u eksperimentu i primerima izolacije bakterija iz ameba, uzetih iz rečne vode i mulja, pružila je osnovu za razmatranje infuzorija i ameba kao rezervoara legionela u prirodi (Rowbotham, 1986; Mampel i sar., 2006). Pažnju istraživača privukli su i drugi mikroorganizmi (salmonele, različite vibrio i pseudomonas vrste, listerije, kampilobakterije i dr.), koji su u interakciji sa protozoama, putem trofičkih lanaca, sposobni da dospeju i do viših organizama (Kaminskaya i sar., 2007; Pushkareva i sar., 2008).

Pored protozoa, vodene bakterije koloniziraju i druge hidrobionte (rakove, mkušce, vodene crve, ribe i dr.). S tim u vezi posebno je proučavana interakcija rakova (kopepoda) sa vibrionima kolere. Postoje eksperimentalni dokazi da kopepode pomažu u održavanju velike brojnosti vibriona i njihovo dugotrajno postojanje u vegetativnom stanju na optimalnim temperaturama (25–30°C). Njihov unutrašnji sloj i hitinska kutikula (uz pomoć enzima hitinaze) obezbeđuje hranljive materije za reprodukciju vibriona kolere (Litvin, 1999). Postoje podaci da mkušci pomažu opstanak vibriona kolere, koji se mogu razmnožavati u njima usled priliva rastvorenog kiseonika i mikročestica detritusa, u digestivni sistem (Mikhailova, 2000). Iako ne postoje jasne studije koje otkrivaju mehanizam infekcija i trajanje perzistencije patogenih bakterija u telu ribe, postoje dokazi o kontaminaciji slatkovodnih i morskih riba sa patogenim mikroorganizmima, uključujući uzročnike kolere, tularemije, pseudotuberkuloze, crevne jersinioze, listerioze i drugih infekcija (Bauwens i sar., 1992; Puškareva, 2008). Vibrioni kolere su posebno opasni, jer oni su često izolovani i u epidemijski bezbednim periodima (Mikhailova, 2000). Rezultati su pokazali da je visoka koncentracija ovih bakterija posebno zabeležena u škrgama ribe (do 21 dan), dok je njihov sadržaj u crevima bio beznačajan. Jersinije sadržane u vodi bile su eliminisane u roku od jedne nedelje, a njihov dug opstanak u škrgama se nije mogao objasniti unosom vode (Puškareva, 1994).

Poznavanjem navedenih činjenica cilj ovih istraživanja je bio da se utvrdi spektar enterobakterija, pseudomonasa i velikog broja drugih potencijalno patogenih mikroorganizama u vodi i u tipičnim hidrobiontima, koji naseljavaju prirodne i veštačke slatkovodne sisteme lokaliteta Međuvršje u Čačku.

Materijal i metode rada

Ispitivanja su obavljena na lokalitetu Međuvršja u Čačku 2007. godine. Bakteriološka ispitivanja vode i hidrobionata vršena su po klasičnoj šemi u Zavodu za javno zdravlje u Čačku. Nakon zasejavanja uzorka na selektivno hranljive podloge izolovane kolonije mikroorganizama su identifikovane pomoću test-sistema API 20E i API 20E (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) u Zavodu za javno zdravlje u Novom Sadu. Utvrđivano je prisustva kultura enterobakterija (rodova *Salmonella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* i *Proteus*) i „nefermentirajućih“ *Pseudomonas*, *Acinetobacter*,

Serratia, Aeromonas, Micrococcus, Flavobacterium, Actinomyces i Candida) iz vode, zooplanktona (protozoe, ciklopi, dafnije) i larvi hironomida.

Rezultati istraživanja i diskusija

Uzorkovanje je vršeno u proleće i u jesen, kada je koncentracija bakterija u 1cm³ vode varirala od 10⁵ do 10⁷. Mikrobi pejzaž životne sredine hidrobionata ispitivan je radi dobijanja osnovne slike rasprostiranja mikroorganizama u vodi (tab.1). Nisu identifikovane anaerobne bakterije. Mikrobi zajednica svih uzoraka bila je predstavljena sa osnovnim rodovima familije *Enterobacteriaceae*, osim bakterija rodova *Salmonella*, *Escherichia* i *Proteus*. Nefermentirajuće bakterije su predstavljene rodovima *Pseudomonas* i *Acinetobacter*. Najzastupljeniji su bili predstavnici rodova *Serratia*, *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* i *Actinomyces* i *Candida*.

Paralelno sa analizom mikrobne zajednice vode, vršeno je bakteriološko proučavanje nekih hidrobionata, koji obitavaju u slatkovodnim vodenim basenima. Spektar mikrobne zajednice ciklopa i dafnija ocenjivan je, ne odvajajući ih od protozoa, koje su bile prisutne u ispitivanim uzorcima u koncentraciji 10³ - 10⁵ jedinki u jednom litru. U nekim uzorcima vode uspelo se registrovati do 20 vrsta; najčešće su se nalazili *Stentor*, *Spirostomum*, *Paramaecium* i *Tetrahymena*. U vodi ispitivanog vodenog basena dominirali su *Volvox* (10¹ jed./ml), *Euglena viridis*, *Amoeba proteus*. Niži račići su bili predstavljeni sa *Daphnia* sp. i *Cyclops* sp.

Prema sastavu i raznolikosti potencijalno patogenih mikroorganizama hidrobionti nisu zaostajali za uzorcima vode. U njima su bili prisutni skoro svi predstavnici familije *Enterobacteriaceae*, kao i nefermentirajuće bakterije. Treba istaći da su se u svim uzorcima zooplanktona (dafnije, ciklopi, protozoe), kao i u vodi, najčešće registrovane bakterije rodova *Klebsiella*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, kao i *Actinomyces* i *Candida*. Nešto ređe su se nalazile bakterije rodova *Proteus*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Flavobacter* i *Enterobacter*. *Escherichia*, *Vibrio* i druge bakterije nalazile su se pojedinačno (tab.1).

Dobijeni rezultati svedoče o tome da vodeni ekosistemi, kao i kopneni, mogu da posluže kao životna sredina enterobakterija, pseudomonasa i drugih mikroorganizama - stvarnih i potencijalnih izazivača bolesti čoveka, životinja ili biljaka, što je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja nekih autora, koji su utvrdili da u prirodi postoji široka rasprostranjenost tih istih potencijalno patogenih bakterija: oni su otkriveni kod sitnih sisara, u njihovim skloništima i u zemljиштima različitih prirodnih oblasti (Djukic i sar., 2015, 2019; Mandić i sar., 2020).

Uloga hidrobionata u opstajanju te mnogobrojne grupe mikroorganizama može biti značajna i vrlo raznolika. S jedne strane, to je konzumiranje bakterija, uključujući i patogene: na primer, postoje dokazi da se dafnije najradije hrane enterobakterijama, doprinoseći, na taj način, samoprečišćavanju vodenih basena (Pavlova i Zuev, 2004). S druge strane, sasvim su realne simbiozne veze potencijalno patogenih bakterija sa različitim hidrobiontima (Rowbotham, 1986; Eliseikina i sar., 2002; Mampel i sar., 2006).

Neposredna epidemiološka opasnost priridnih ili antropogenih vodenih basena u pogledu navedenih potencijalno patogenih bakterija, verovatno, nije velika. Međutim, ona može naglo porasti u objektima koji neposredno okružuju čoveka, posebno u sistemima savremenih urbanih cenoza ili u agrocenozama – pri korišćenju otpadnih voda koje nisu prečišćene (Đukić i sar., 2018).

Tab.1. Učestalost izolovanja potencijalno patogenih mikroorganizama iz vode i zooplanktona u veštačkoj akumulaciji Međuvršje

Tab.1. Frequency of isolation of potentially pathogenic microorganisms from water and zooplankton in the artificial accumulation Međuvršje

Rodovi mikroorganizama <i>Genus of microorganisms</i>	Broj kultura (od 3 uzorka izolovanih iz)		
	<i>Number of cultures (from 3 samples isolated from)</i>		
	vode <i>from water</i>	zooplanktona <i>from zooplankton</i>	
<i>Salmonella</i>	0	-	-
<i>Escherichia</i>	0	0	2
<i>Enterobacter</i>	1	2	3
<i>Klebsiella</i>	3	5	5
<i>Proteus</i>	0	1	3
<i>Citrobacter</i>	1	2	3
<i>Hafnia</i>	2	1	2
<i>Serratia</i>	3	3	4
<i>Aeromonas</i>	3	4	5
<i>Vibrio</i>	2	1	1
<i>Micrococcus</i>	3	1	2
<i>Pseudomonas</i>	3	5	5
<i>Acinetobacter</i>	3	3	5
<i>Flavobacterium</i>	3	2	3
<i>Actinomyces, Candida</i>	3	5	5

Zaključak

Dobijeni rezultati bakteriološka ispitivanja vode i hidrobionata sa lokaliteta Međuvršje u Čačku ukazuju na prisustvo kultura enterobakterija i „nefermentirajućih“ mikroorganizama u vodi, zooplanktonu (protozoe, ciklope, dafnije) i larvama hironomida. Spektar potencijalno patogenih bakterija u vodi i hidrobiontima bio je prilično širok (16 rodova) i sličnog je sastava. Pokazalo se da je mikroflora hironomida manje heterogena od zooplanktona. Utvrđeno je da najčešće posmatrani mikrobi pripadaju rodovima *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, kao i *Actinomices* i *Candida*. Ovo nas navodi na zaključak da pored nadzemnih ekosistema i vodenih ekosistemima mogu biti stanište mikroorganizama koji su potencijalno patogeni za čoveka i životinje.

Napomena

Izradu rada pomoglo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Ugovor br. 451-03-68/2022-14, br. 23 i 7.

Literatura

- Abd, H., Johansson, T., Golovlid, J., Sandstrom, G., Forsman, M. (2003): Survival and Growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellani*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(1): pp. 600–606.
- Anand, C.M., Skinner, A.R., Malic, A., Kurtz, J.B. (1983): Interaction of *L. pneumophila* and a Free Living Amoeba (*Acanthamoeba palestensis*). *J. Hyg.*, 91, (2): 167–178.
- Bauwens, L., Snops, S., and de Meurichy, W. (1992): Isolation of *Erysipelothrix phusiopathiae* from Frozen Fish and Fish-Eating Animals at Antwerp. *Zoo, Acta Zool. Pathol. Antverp.*, 82: 41–46.
- Berk, S.G., Faulkner, G., and Gaurdina, E. (2008): Packaging of Live *Legionella pneumophila* into Pellets Expelled by *Tetrahymena* spp, *Appl. Env. Micr.*, 74 (7): 2187–2199.
- Dogel, V.A., (1981): Zoologiya bespozvonochnykh (Invertebrate Zoology), Moscow: Vysshaya Shkola.
- Đukic D., Mandic L., Vesovic-Moracanin S. (2015): Zajednički patogeni viših biosfernih organizama. Savetovanje o biotehnologiji, Čačak, 13-14. Mart, Zbornik radova, Vol. 20(22): 497-513.
- Đukić D., Mandić L., Lutovac Mitar, Vesković Slavica, Đurović Vesna (2019): Microbiological Aspects of Technical Damage of the Land. 1 st International Symposium: Modern Trends in Agricultural Production and Environmental Protection, July 20-05., Tivat-Montenegro, Book of Proceedings, pp. 29-61
- Đukić D., Vsevolod Jemcev, Aleksandar Semenov, Galina Iutinska, Olga Selicka (2018): Ekološka biotehnologija (knjiga 2), Agronomski fakultet u Čačku, 754 str.
- Fields, B.S., Fields, S.R., Chin Loy, J.N., and White, E.N. (1993): Attachment and Entry of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis*, *J. Infect. Dis.*, (167): 1146–1150.
- Kaminskaya, A.A., Pushkareva, V.I., and Ermolaeva, S.A. (2007): Role of Association of Protozoans *Tetrahymena pyriformis* and Bacteria *Burkholderia cepacia* during Formation of Biofilms, *Usp. Sovrem. Biol.*, 1, 44–49.
- Mampel, J., Spirig, T., Weber, S.S., Janus, A.J., Haagensen, Soren, M., and Hilbi, H. (2006): Planktonic Replication Is Essential for Biofilm Formation by *Legionella pneumophila* in Complex Medium under Static and Dynamic Flow Conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (4): 2885–2895.
- Mandić L., Đukić D., Pešaković M., Đurović V. (2020): Sanitary assessment of soil in the municipality of Čačak based on the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. *Acta Agriculturae Serbica*, 25(49), 65-69
- Mikhailova, A.E. (2000): Factors of *Vibrio cholerae* Persistence in Water Bodies. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 6, 99–104.

- Pavlova, I.B. and Zuev, V.S. (2004): The State of *Salmonella typhimurium* Population in Aquatic Medium under the Effect of Temperature. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 5, 16–19.
- Pushkareva, V.I. (1994): Pathogenic Bacteria in Soil and Aquatic Communities, Doctoral (Biol.) Dissertation, Moscow, 1994.
- Pushkareva, V.I., Ermolaeva, S.A., and Litvin, V.Yu. (2008): Pathogenic *Listeria* and Soil Protozoans: Coupling of Life Cycles, Usp. Sovrem. Biol., 3: 245–251.

INFECTION OF HYDROBIONS BY POTENTIALLY PATHOGEN MICROORGANISMS

Dragutin Đukić¹, Leka Mandić¹, Monika Stojanova², Vesna Đurović¹,
Bojana Trifunović³

Abstract

The results of isolation and identification (API test-systems) of the cultures of Enterobacteria and “non-fermentating” microorganisms from water, zooplankton (protozoa, cyclopes, daphnias), chironomids larvae of natural and anthropogenic water reservoirs are produced. Spectrum of potentially pathogenic bacteria in water and in the hydrobionts was rather wide (16 genera) and of similar composition. Microflora of chironomids proved to be less heterogenous than that of zooplankton. The most frequently observed microbes were found to belong to *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, as well as to *Actinomyces* and *Candida*. Both aquatic and overground ecosystems can be a habitat of microorganisms that are potentially pathogenic to man and animals.

Key words: microorganisms, pathogens, water, hydrobionts

¹ University of Kragujevac, Faculty of Agronomy in Čačak, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia (lekamg@kg.ac.rs);

² University of Ss. Cyril and Methodius, Faculty of Agricultural Sciences and Food, Aleksandar Makedonski blvd, Skopje, North Macedonia;

³ City of Cacak, city administration for urbanisms, Ž. Stracimira 2, Cacak, Serbia.