

PONAŠANJE BAKTERIJA *Burkholderia cepacia* KOMPLEKSA U VODAMA RAZLIČITE KONCENTRACIJE HRANJIVA

prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Rooseveltov trg 6, Zagreb, Hrvatska
jasna.hrenovic@biol.pmf.hr

Monika Eržen mag. oecol.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Rooseveltov trg 6, Zagreb, Hrvatska

Skupina od 20-ak vrsta bakterija zvanih *Burkholderia cepacia* kompleks (BCC) rasprostranjene su u okolišu, ali su i uzročnici teških infekcija kod ljudi. Na području Republike Hrvatske provedeno je relativno malo istraživanja o prisutnosti ovih bakterija u različitim staništima i utjecaju ovih bakterija na ljude. U ovom radu ispitano je dugoročno ponašanje pet klinički značajnih BCC-ova u vodama različite koncentracije hranjiva. Klinički izolat i četiri izolata izdvojena iz okoliša utjecanim ljudskim tekućim ili krutim otpadom dugoročno su preživjela i čak se umnažala u vodi siromašnoj ili bogatoj hranjivima. Nakon 50 dana praćenja, koncentracija četiri od pet ispitanih izolata u vodi bila je viša od početne koncentracije. S obzirom na potencijal dugoročnog zadržavanja klinički značajnih BCC-ova u vodenim ekosustavima, prisutnost BCC-ova u vodi treba smatrati izvorom sporadičnih infekcija ljudi. Kako bi se izbjegao ovaj javnozdravstveni rizik, potrebno je ukloniti BCC-ove iz ljudskog krutog i tekućeg otpada prije odlaganja u okoliš. U svrhu praćenja epidemiologije BCC-ova potrebno je posvetiti pažnju izolaciji i karakterizaciji BCC-ova u klinici i okolišu.

Ključne riječi: *Burkholderia sp.*, okoliš, patogeni, voda.

1. UVOD

Bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa (BCC) predstavljaju skupinu od 20-ak vrsta nesporogenih, nefermentativnih gram-negativnih bakterija (EUCAST, 2021). Široko su rasprostranjene u tlu, rizosferi biljaka i vodenom okolišu (Bevivino i dr., 2002; Miller i dr., 2002). Od 80-ih godina 20.stoljeća BCC-ovi s predominantnim vrstama *B. multivorans* i *B. cenocepacia*, često se diljem svijeta nalaze kao patogeni u imunokompromitiranih bolesnika. Uzrokuju teške infekcije s različitim kliničkim slikama u hospitaliziranih pacijenata, ali i sporadične vanbolničke infekcije (Isels i dr., 1984; Mahenthalingam i dr., 2005). BCC-ovi posjeduju urođenu rezistenciju na širok spektar antimikrobnih lijekova i stoga je liječenje infekcija uzrokovanih BCC-ima zahtjevno (EUCAST, 2021; Martina i dr., 2020).

Klonovi istog soja BCC-ova identificirani su u okolišu i inficiranim bolesnicima (Baldwin i dr., 2007). Budući

da BCC-ovi nisu dio normalne fiziološke flore čovjeka, zaključuje se da je okoliš primarni izvor infekcija ljudi i prirodno stanište BCC-ova. Nekomolirano ispuštanje ljudskog krutog i tekućeg otpada u okoliš nadalje može obogatiti okoliš klinički značajnim BCC-ima (Hrenović i dr., 2021). Klinički značajni BCC-ovi u okolišu predstavljaju potencijalni izvor sporadičnih infekcija ljudi i javnozdravstveni rizik. Stoga je bitno poznavati potencijal preživljavanja klinički značajnih BCC-ova u različitim okolišima.

U ovom radu ispitano je dugoročno ponašanje pet klinički značajnih BCC-ova u dva sustava, vodi siromašnoj i vodi bogatoj hranjivima.

2. MATERIJAL I METODE

2.1 Izbor bakterijskih izolata

Za pokuse je odabrano pet prethodno karakteriziranih izolata BCC-ova (Hrenović i dr., 2021). Četiri izolata

Tablica 1: Karakteristike BCC-ova izolata korištenih u pokusu (prilagodeno iz Hrenović i dr., 2021).

Izolat	Porijeklo uzorka	Vrsta	Sekvencijski tip
2/3	tlo na smetlištu	<i>B. multivorans</i>	19
9/5	sediment potoka	<i>B. cenocepacia</i>	1878
9/6	riječna voda	<i>B. cenocepacia</i>	1879
4/4	poljoprivredno tlo gnojeno gnojem od peradi	<i>B. ambifaria</i>	927
5964	bris rane	<i>B. cenocepacia</i>	1876

izdvojena su iz okoliša pod utjecajem krutog ili tekućeg otpada, a jedan izolat je bio klinički izolat iz brisa rane hospitaliziranog pacijenta. Izolati su bili vrste *B. multivorans*, *B. ambifaria* i *B. cenocepacia*. Tri vrste *B. cenocepacia* međusobno su se genetski razlikovale i pripadale različitim sekvencijskim tipovima (Tablica 1).

2.2 Izvedba pokusa

Za pokus su pripremljene serije 250 mL Schott boca sa po 100 mL autoklavirane vode siromašne ili bogate hranjivima, prema protokolu (Dekić i dr., 2018; Tablica 2). Kao voda siromašna hranjivima korištena je komercijalna izvorska voda. Voda bogata hranjivima dobivena je obogaćivanjem 99 mL komercijalne izvorske vode s 1 mL tekuće hranjive podloge Nutrient Broth (Biolife, Italija) sljedećeg sastava po 1 L destilirane vode: mesni ekstrakt 3 g, pepton 5 g te pH vrijednosti 6.8 ± 0.2 .

Tablica 2: Kemijski parametri vode siromašne i bogate hranjivima (prilagodeno iz Dekić i dr., 2018).

Parametar (mg/L)	Voda siromašna hranjivima	Voda bogata hranjivima
Kemijska potrošnja kisika	3	99
Ukupni organski ugljik	<1	44
Ukupni dušik	0.7	13.2
Ukupni fosfor	0.1	1.1

Čiste kulture svakog izolata BCC-ova prekončno su uzgojene na Tryptic Soy Agar (Biolife, Italija) sljedećeg sastava po 1 L destilirane vode: kazein 15 g, pepton iz soje 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g te pH vrijednosti 7.3 ± 0.2 . Načinjene su matične suspenzije svakog izolata (po jedna 10 μ L ušica biomase u 9 mL sterilne fiziološke otopine), a potom je po 1 mL svake bakterijske suspenzije dodano u boce s vodom siromašnom i bogatom hranjivima. Boce su inkubirane na 22 °C bez miješanja tijekom 50 dana.

Na početku pokusa i u određeno vrijeme praćenja, boce su promućkane te su uzeti poduzorci od 1 mL koji su potom decimalno razrijeđeni u sterilnoj fiziološkoj otopini i inokulirani na Tryptic Soy Agar. Bakterijske

kolonije su prebrojavane nakon inkubacije od 48 h na 37 °C.

Broj vijabilnih bakterija određen je u tehničkom triplikatu kao broj bakterijskih kolonija (CFU – Colony Forming Units) te je izražen kao log CFU po 1 mL vode. Postotak preživljavanja pojedinog izolata je izračunat iz omjera broja bakterija u vremenu mjerenja i početnog broja bakterija prema formuli:

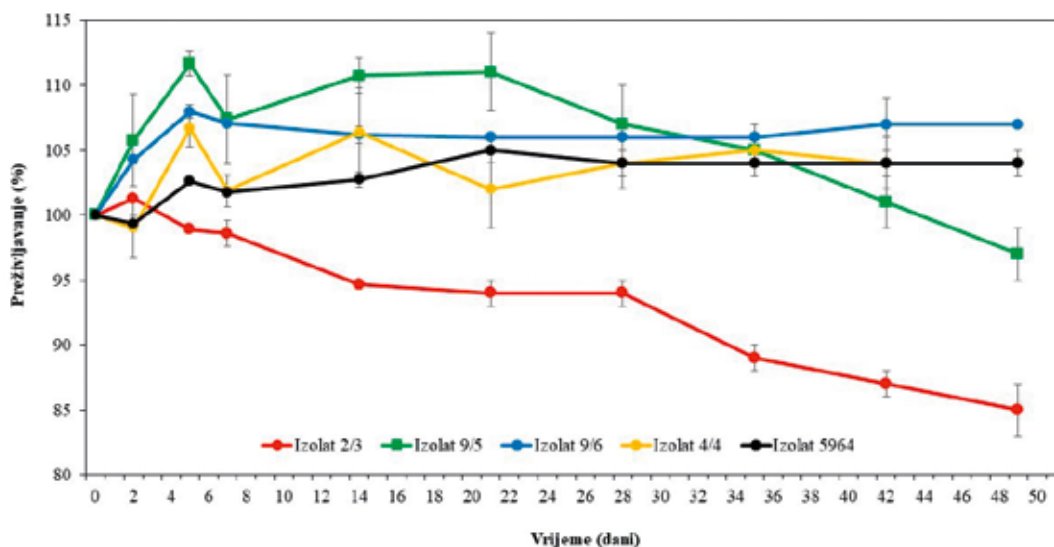
$$\text{Preživljavanje (\%)} = (\log \text{CFU/mL (t)} / \log \text{CFU/mL (t}_0\text{)}) \times 100.$$

Za statističku obradu podataka korišten je program Statistica, verzija 14.0.0.15. Logaritmirane vrijednosti koncentracije bakterija uspoređene su t-testom za nezavisne varijable uz $p < 0.05$.

3. REZULTATI I RASPRAVA

Svih pet ispitivanih izolata BCC-ova uspjelo je preživjeti u vodi siromašnoj hranjivima tijekom 50 dana praćenja (Slika 1). Trend povećanja broja bakterija (do 12 % početne vrijednosti) vidljiv je u prvih pet dana kod svih izolata izuzev izolata 2/3, nakon čega se uočavaju lagane varijacije pada i rasta broja bakterija do kraja praćenja. Povećanje broja bakterija u izvorskoj vodi siromašnoj hranjivima objašnjava se lizom dijela starih iscrpljenih stanica, koje populacija vijabilnih stanica nadalje koristi kao izvor hranjiva za svoje umnažanje. Ova strategija umnažanja bakterija u okolišu siromašnom hranjivima poznata je kao engl. "bust and boom" strategija (Bravo i dr., 2016). Kod *B. multivorans* (izolat 2/3) vidljiv je kontinuirani trend pada broja bakterija nakon sedam dana pokusa. Na kraju pokusa okolišni izolati 9/5, 9/6, 4/4 te klinički izolat 5964 pokazali su statistički značajno bolje preživljavanje (97 - 107 %) u odnosu na izolat 2/3 s konačno najlošijim preživljavanjem od 85 %. Ova statistički značajna razlika na kraju perioda praćenja i dalje je rezultirala visokom koncentracijom izolata 2/3 (5.8 log CFU/mL) u odnosu na ostale izolate s višim postotkom preživljavanja (7.0 log CFU/mL).

Dugoročno preživljavanje izolata BCC-ova u vodi siromašnoj hranjivima u skladu je s opaženim 16-godišnjim preživljavanjem vrste istog roda, *B. pseudomallei* u destiliranoj vodi (Pumpuang i dr., 2011). Ponašanje izolata BCC-ova u vodi siromašnoj hranjivima vrlo je slično ponašanju srodne vrste bakterija, *Pseudomonas aeruginosa*, u destiliranoj vodi (Kovačić i dr., 2018).



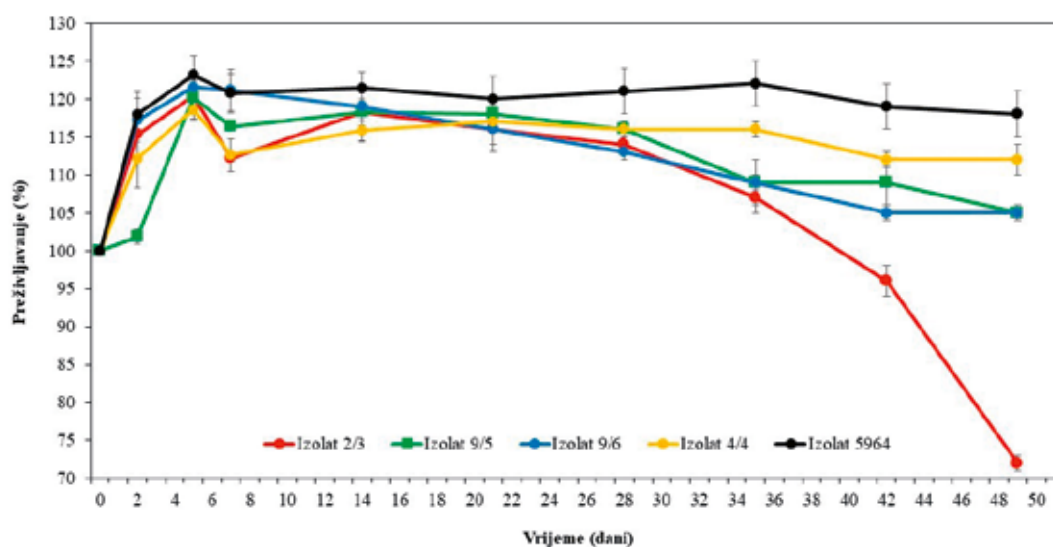
Slika 1: Ponašanje izolata BCC-ova u vodi siromašnoj hranjivima tijekom 50 dana praćenja. Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaki izolat. Početna koncentracija bakterija iznosila je 6.8 ± 0.1 log CFU/mL.

U vodi bogatoj hranjivima (Slika 2) svih pet ispitivanih izolata BCC-ova pokazalo je logaritamsku fazu umnažanja u prvih pet dana praćenja, nakon čega je slijedila stacionarna faza održavanja broja bakterija do kraja perioda praćenja, osim za izolat 2/3. Za izolat *B. multivorans* 2/3 uočen je pad broja bakterija ispod početnih vrijednosti nakon 42 dana praćenja. Na kraju pokusa okolišni izolati 9/5, 9/6, 4/4 te klinički izolat 5964 pokazali su statistički značajno bolje preživljavanje (105 – 118 %) u odnosu na izolat 2/3 s konačno najlošijim preživljavanjem od 72 %. Ovdje valja napomenuti da preživljavanje *B. multivorans* od 72 % podrazumijeva smanjenje početnog broja bakterija za dva reda veličine, pri čemu nakon 50 dana praćenja u vodi i dalje nalazimo visoku koncentraciju bakterija od 5.1 log CFU/mL.

U vodi siromašnoj i bogatoj hranjivima izolat *B. multivorans* (2/3) pokazala je lošije dugoročno preživljavanje u odnosu na ostale izolate koji su pripadali

vrstama *B. ambifaria* i *B. cenocepacia*, bez obzira na porijeklo uzorka iz kog su izolirani ili međusobne genetske razlike (Tablica 1). Ova su opažanja u skladu s prethodno opisanim lošijim dugoročnim preživljavanjem *B. multivorans* u odnosu na *B. cenocepacia* u riječnoj vodi (Hrenović i dr., 2021). Unatoč lošijem preživljavanju *B. multivorans*, koncentracije izolata BCC-ova u vodi siromašnoj i bogatoj hranjivima nakon 50 dana praćenja bile su visoke, a za ostala četiri izolata više od početne koncentracije.

Rezultati ukazuju na visok potencijal preživljavanja, pa čak i umnažanja klinički značajnih BCC-ova u različitim tipovima voda. Ukoliko klinički značajni BCC-ovi budu uneseni u vodene ekosustave putem nepročišćenih otpadnih voda ili ispiranjem iz krutog ilegalno odbačenog otpada (Hrenović i dr., 2021), dugoročno će se zadržati u ekosustavu. Osim toga, putem voda, osobito tekućica,



Slika 2: Ponašanje izolata BCC-ova u vodi bogatoj hranjivima tijekom 50 dana praćenja. Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaki izolat. Početna koncentracija bakterija iznosila je 6.9 ± 0.2 log CFU/mL.

mogu biti raspršene mnogo dalje od primarnog mjesta unosa u ekosustav.

U Hrvatskoj su bakterije BCC-ova zapostavljene u istraživanju. Unatoč postojanju centara za cističnu fibrozu u tri bolnice, ne postoje izvješća o kliničkim izolatima u Hrvatskoj, osim opisa ovdje ispitanog izolata 5964. Od okolišnih izolata u Hrvatskoj, identificirana su dva izolata iz mediteranske dagnje (Maravić i dr., 2012) te sedam izolata iz okoliša utjecanim ljudskim otpadom (Hrenović i dr., 2021). U budućim istraživanjima potrebno je obratiti pažnju na izolaciju i karakterizaciju BCC-ova u klinici i okolišu, te spriječiti mogućnost širenja klinički značajnih BCC-ova putem vodnih tijela.

4 ZAKLJUČAK

Klinički značajni BCC-ovi mogu dugoročno preživjeti i umnažati se u vodi bogatoj hranjivima, ali čak i u vodi siromašnoj hranjivima. Navedenim rezultatima potvrđuje se činjenica da je voda prirodno stanište BCC-ova, pa čak i izolata koji su od kliničkog značenja. Stoga se prisutnost BCC-ova u vodi treba smatrati izvorom sporadičnih infekcija ljudi. Jedna od mogućnosti izbjegavanja ovog javnozdravstvenog rizika je uklanjanje BCC-ova iz ljudskog krutog i tekućeg otpada prije odlaganja u okoliš.

LITERATURA:

- Baldwin, A.; Mahenthalingam, E.; Drevinek, P.; Vandamme, P.; Govan, J.R.; Waine, D.J.; LiPuma, J.J.; Chiarini, L.; Dalmastri, C.; Henry, D.A.; Speert, D.P.; Honeybourne, D.; Maiden, M.C.J.; Dowson, C.G. (2007): Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 458-461.
- Bevivino, A.; Dalmastri, C.; Tabacchioni, S.; Chirarinni, L.; Belli, M.L.; Piana, S.; Materazzo, A.; Vandamme, P.; Manno, G. (2002): *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources in Italy: genomovar status and distribution of traits related to virulence and transmissibility. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 846-851.
- Bravo, Z.; Orruño, M.; Parada, C.; Kaberdin, V.R.; Barcina, I.; Arana, I. (2016): The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606t under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state. *Archives of Microbiology*, 198, 399-407.
- Dekić, S.; Hrenović, J.; Ivanković, T.; van Wilpe, E. (2018): Survival of ESKAPE pathogen *Acinetobacter baumannii* in water of different temperatures and pH. *Water Science & Technology*, 78, 1370-1376.
- EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2021): Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 11.0.
- Hrenović, J.; Šeruga Musić, M.; Drmić, M.; Pešorda, L.; Bedenić, B. (2021): Characterization of *Burkholderia cepacia* complex from environment influenced by human waste. *International Journal of Environmental Health Research*, in print. <https://doi.org/10.1080/09603123.2021.1943325>
- Isles, A.; Machlusky, I.; Corey, M.; Gold, R.; Prober, C.; Fleming, P.; Levison, H. (1984): *Pseudomonas cepacia* infections in cystic fibrosis: an emerging problem. *The Journal of Pediatrics*, 104, 206-210.
- Kovačić, A.; Tafra, D.; Hrenović, J.; Goić-Barišić, I.; Dumanić T. (2018): Preživljavanje bakterije *Pseudomonas aeruginosa* u destiliranoj vodi. *Hrvatske vode*, 26, 157-238.
- Mahenthalingam, E.; Urban, T.A.; Goldberg, J.B. (2005): The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 144-156.
- Maravić, A.; Skocibušić, M.; Sprung, M.; Samanić, I.; Puzina, J.; Pavela Vrančić, M. (2012): Occurrence and antibiotic susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex in coastal marine environment. *International Journal of Environmental Health Research*, 22, 531-542.
- Martina, P.F.; Martinez, M.; Rivas, S.; Leguizamon, L.; Von Specth, M.; Ferreras, J. (2020): *Burkholderia cepacia* complex: 11 years of surveillance in patients with cystic fibrosis in Posadas, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 52, 176-182.
- Miller, S.C.M.; LiPuma, J.J.; Parke, J.L. (2002): Culture-based and non-growth-dependent detection of the *Burkholderia cepacia* complex in soil environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3750-3758.
- Pumpuang, A.; Chantratita, N.; Wikraiphat, C.; Saiprom, N.; Day, N.P.J.; Peacock, S.J.; Wuthiekanun, V. (2011): Survival of *Burkholderia pseudomallei* in distilled water for 16 years. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105, 598-600.

BEHAVIOR OF THE *BURKHOLDERIA CEPACIA* COMPLEX IN WATERS WITH DIFFERENT NUTRIENT CONCENTRATIONS

Abstract. A group of about 20 bacteria species called the *Burkholderia cepacia* complex (BCC) are widespread in the environment, but they are also the cause of severe infections in humans. In the Republic of Croatia, relatively little research has been conducted on the presence of these bacteria in different habitats and the impact these bacteria have on humans. The paper examines the long-term behaviour of five clinically significant BCC bacteria species in waters with different nutrient concentrations. The clinical isolate and four isolates extracted from the environment impacted by human liquid or solid waste survived in the long term and even multiplied in nutrient-poor or nutrient-rich water. After a 50-day monitoring, the concentration of four out of the five tested isolates in water was higher than the initial concentration. Considering the potential for a long-term retention of clinically significant BCC bacteria species in aquatic ecosystems, the presence of the BCC in water should be considered as a source of sporadic human infections. In order to avoid this public health risk, the BCC should be removed from human solid and liquid waste before its disposal in the environment. For monitoring of the BCC epidemiology, it is necessary to pay attention to the isolation and characterization of the BCC both in the clinics and the environment.

Key words: bacteria, *Burkholderia* sp., environment, pathogens, water.

VERHALTEN VOM *BURKHOLDERIA CEPACIA*-KOMPLEX IN GEWÄSSERN BEI UNTERSCHIEDLICHEN NÄHRSTOFFKONZENTRATIONEN

Zusammenfassung. Etwa zwanzig Spezies vom *Burkholderia cepacia*-Komplex (BCC) kommen in der Umgebung vor und sind Erreger von schweren Infektionen bei Menschen. Auf dem Gebiet Kroatiens sind relativ wenige Untersuchungen zur Anwesenheit dieser Bakterien in verschiedenen Lebensräumen oder zu den Auswirkungen dieser Bakterien auf Menschen durchgeführt worden. In diesem Artikel wird langfristiges Verhalten von fünf klinisch relevanten Bakterien *Burkholderia cepacia* in Gewässern mit unterschiedlichen Nährstoffkonzentrationen untersucht. Das klinische Isolat und vier andere, aus der von menschlichen flüssigen oder festen Abfällen beeinflussten Umwelt isolierten Isolate, überlebten und sogar vermehrten sich im nährstoffreichen aber auch im nährstoffarmen Wasser. Nach 50 Tagen Überwachung war die Konzentration der vier Isolate (von insgesamt fünf untersuchten Isolaten) im Wasser höher als die Anfangskonzentration. Unter Berücksichtigung des Potenzials einer langfristigen Retention vom klinisch relevanten *Burkholderia cepacia*-Komplex in aquatischen Ökosystemen soll die Anwesenheit des *Burkholderia cepacia*-Komplexes im Wasser als Infektionsquelle bei Menschen angesehen werden. Um diese Gefahr für die öffentliche Gesundheit zu vermeiden, soll der *Burkholderia cepacia*-Komplex aus dem menschlichen festen und flüssigen Abfall vor der Entsorgung entfernt werden. Zum Zwecke der Überwachung der Epidemiologie des *Burkholderia cepacia*-Komplexes ist es notwendig, auf Isolierung und Charakterisierung des *Burkholderia cepacia*-Komplexes sowohl in Klinik als auch in Umwelt zu achten.

Schlüsselwörter: Bakterien, *Burkholderia cepacia*, Umwelt, Krankheiterreger, Wasser