

# Preživljavanje bakterije *Acinetobacter baumannii* u različitim uzorcima tala

---

Ćorak, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Mining, Geology and Petroleum Engineering / Sveučilište u Zagrebu, Rudarsko-geološko-naftni fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:169:203968>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-01**



*Repository / Repozitorij:*

[Faculty of Mining, Geology and Petroleum Engineering Repository, University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

RUDARSKO-GEOLOŠKO-NAFTNI FAKULTET

Diplomski studij geologije

**PREŽIVLJAVANJE BAKTERIJE ACINETOBACTER BAUMANNII U  
RAZLIČITIM UZORCIMA TALA**

Diplomski rad

Kristina Ćorak

G-256

Zagreb, 2018.

## ZAHVALJUJEM...

... mentoru, prof. dr. sc. Goranu Durnu na predloženoj temi, ukazanom povjerenju, strpljenju te pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam na suradnji i razumijevanju, nadam se da sam ispunila Vaša očekivanja.

... prof. dr. sc. Jasni Hrenović, na brojnim stručnim savjetima, pomoći i potpori prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam što ste uvijek našli vremena i imali strpljenja za sva moja pitanja.

... prof. dr. sc. Ani Maričić na sugestijama i korisnim primjedbama pri pisanju ovog rada

... svim profesorima koji su mi predali svoje znanje bez kojega ovaj uspjeh ne bi bio ostvariv

... mojoj obitelji na bezuvjetnoj potpori tijekom cijelog studiranja, hvala Vam što niste sumnjali u mene i moj uspjeh

... ovaj rad posvećujem mojim roditeljima koji su pridonjeli u ostvarenju akademskog naziva **magistra geologije**

**PREŽIVLJAVANJE BAKTERIJE ACINETOBACTER BAUMANNII U RAZLIČITIM  
UZORCIMA TALA  
KRISTINA ČORAK**

*Diplomski rad izrađen:* Sveučilište u Zagrebu  
Rudarsko – geološko – naftni fakultet  
Zavod za mineralogiju, petrologiju i mineralne sirovine  
Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

**Sažetak**

Bakterija *A. baumannii* je emergentni humani patogen koji uzrokuje bolničke i sporadične infekcije. Cilj rada bio je ispitati preživljavanje bakterije *A. baumannii* u uzorcima tala različite pH vrijednosti: paleotlu (pH 2.99), crvenici 5410 (pH 5,79) i crvenici 4908 (pH 7,56) u usporedbi s prirodnom izvorskom vodom kao pozitivnom kontrolom. U prirodnoj izvorskoj vodi broj vijabilnih *A. baumannii* bio je konstantan sa stopom preživljavanja 91 % nakon 50 dana. U paleotlu, 6 % bakterija je preživjelo samo jedan dan zbog kiselog pH. U crvenici 5410 zabilježen je mali pad broja bakterija sa stopom preživljavanja 86 % nakon 50 dana. U crvenici 4908 zabilježen je najveći broj bakterija sa stopom preživljavanja 92% nakon 50 dana. Neznatne razlike preživljavanja u crvenici 4908 u usporedbi s kontrolom ukazuju da crvenica nije sadržavala organske tvari koje bi pogodovale razmnožavanju bakterija tijekom 50 dana. Vrijednost pH tla glavni je čimbenik koji određuje preživljavanje *A. baumannii* u tlu.

Ključne riječi: *A. baumannii*, bakterije, crvenica, paleotlo, pH vrijednost, Istra.

Diplomski rad sadrži: 51 strana, 16 slika, 10 tablica, 45 referenci i 5 web izvora

Jezik izvornika: hrvatski

Diplomski rad pohranjen: Knjižnica Rudarsko-geološko-naftnog fakulteta, Pierottijeva 6, Zagreb

Mentor: Dr.sc. Goran Durn, redoviti profesor RGNF

Ocjenjivači: Dr.sc. Goran Durn, redoviti profesor RGNF

Dr. sc. Jasna Hrenović, redoviti profesor PMF

Dr. sc. Ivan Sondi, redoviti profesor RGNF

Datum obrane: 22. veljače 2018.

**SURVIVAL OF ACINETOBACTER BAUMANNII BACTERIUM IN VARIOUS SOIL  
SAMPLES**

KRISTINA ČORAK

Thesis completed at: University of Zagreb  
Faculty of Mining, Geology and Petroleum Engineering  
Department of Mineralogy, Petrology and Mineral Deposits,  
Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

**Abstract:**

The *A. baumannii* bacterium is an emergent human pathogen, causing hospital and sporadic infections. The aim of this thesis was to test the survival rate of the *A. baumannii* bacterium in soil samples, that have different pH values: paleosol (pH 2.99), Terra rosa 5410 (pH 5,79) and Terra rosa 4908 (pH 7,56) compared to natural spring water as positive control. In natural water source the number of viable *A. baumannii* was constant with the survival rate of 91% after 50 days. In paleosol, 6% of bacteria have lived only one day because of acidic pH. In the Terra Rossa 5410 the test has shown a small decrease in bacterial count with the survival rate of 86% after 50 days. The Terra Rossa 4908 sample had the highest number of bacteria with a survival rate of 92% after 50 days. Insignificant differences in survival in the Terra Rossa 4908 soil in comparison with the control indicate that the Terra Rossa 4908 did not contain organic substances that would favor bacterial replication for 50 days. The main factor that determines the survival of *A. baumannii* in the soil is the pH value.

Keywords: *A. baumannii* bacterium, terra rossa, paleosol, pH value, Istria

Thesis contains: 51 pages, 16 figures, 10 tables, 45 references and 5 web page addresses

Original in: Croatian

Thesis deposited at: The Library of the Faculty of Mining, Geology and Petroleum Engineering

Supervisor: Professor Goran Durn, PhD

Reviewers: Professor Goran Durn, PhD

Professor Jasna Hrenović, PhD

Professor Ivan Sondi, PhD

Date of defense: February 22, 2018.

<b>SADRŽAJ</b> .....	I
<b>Popis slika u tekstu</b> .....	III
<b>Popis tablica u tekstu</b> .....	IV
<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	2
2.1. Geomorfološka građa Istre.....	2
2.2. Geološka građa Istre.....	4
2.3. Pedološka građa Istre.....	7
2.4. Bakterije roda <i>Acinetobacter</i> .....	12
2.4.1. Stanične strukture bakterija roda <i>Acinetobacter</i> .....	14
2.4.2. Rast i metabolizam bakterija roda <i>Acinetobacter</i> .....	15
2.4.3. Rezistencija <i>A. baumannii</i> na antibiotike.....	17
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	21
3.1. Terenska istraživanja.....	21
3.2. Laboratorijska istraživanja.....	27
3.2.1. Izolacija i karakterizacija <i>A. baumannii</i> iz okoliša.....	27
3.2.2. Postava pokusa .....	28
<b>4. REZULTATI</b> .....	36
4.1. Kemijski sastav uzoraka tla .....	36
4.2. Granulometrijski sastav uzoraka tla .....	37
4.3. Mineralni sastav uzoraka tla .....	38
4.4. pH u tlu na početku i kraju pokusa.....	39
4.5. Rezultati određivanja broja <i>A. baumannii</i> .....	40
4.6. Rezultati preživljavanja <i>A. baumannii</i> .....	41

4.6.1. Rezultati preživljanja <i>A. baumannii</i> u kontroli.....	41
4.6.2. Rezultati preživljanja <i>A. baumannii</i> u paleotlu .....	41
4.6.3. Rezultati preživljanja <i>A. baumannii</i> u crvenici 5410.....	42
4.6.4. Rezultati preživljanja <i>A. baumannii</i> u crvenici 4908.....	42
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>44</b>
5.1. Tri Jezerca.....	44
5.2. Monte Coronichi .....	45
5.3. Savudrija .....	45
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>46</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>47</b>

## Popis slika u tekstu

<i>Slika 1.</i> Geomorfološka podjela Istre .....	3
<i>Slika 2.</i> Pedološka karta Istarske županije .....	7
<i>Slika 3.</i> Profil antibiotske rezistencije <i>A. baumannii</i> .....	19
<i>Slika 4.</i> Geološka karta Istre s označenim lokalitetima .....	21
<i>Slika 5.</i> Profil paleotla na lokaciji Tri Jezerca .....	23
<i>Slika 6.</i> Izuzeti uzorak paleotla .....	23
<i>Slika 7.</i> Pedološki profil Monte Coronichi .....	24
<i>Slika 8.</i> Priprema za izuzimanje površinskog uzorka na lokaciji Monte Coronichi .....	25
<i>Slika 9.</i> Pedo-sedimentni kompleks Savudrija s pozicijama izuzetih uzoraka. ....	26
<i>Slika 10.</i> Gram negativne stanice <i>A. baumannii</i> u obliku kokobacila, povećanje 1000x.....	30
<i>Slika 11.</i> Vortex (trešnja uzoraka).....	32
<i>Slika 12.</i> Postupak određivanja broja kolonija.....	32
<i>Slika 13.</i> Serijska razrjeđenja bakterijske suspenzije .....	33
<i>Slika 14.</i> Brojač kolonija i kolonije <i>A. baumannii</i> porasle na hranjivom agaru .....	34
<i>Slika 15.</i> Krupne i sitne kolonije <i>A. baumannii</i> porasle na hranjivom agaru .....	40
<i>Slika 16.</i> Grafički prikaz preživljavanja <i>A. baumannii</i> u tri tipa tla te u pozitivnoj kontroli kroz 50 dana pokusa.....	43



## Popis tablica u tekstu

<b>Tablica 1.</b> Prikaz rezistencije <i>A. baumannii</i> na antibiotike.....	19
<b>Tablica 2.</b> Popis uzoraka izuzetih sa lokacija Tri Jezerca (Horvat, 2014), Monte Coronichi (Tomašić, 2013) i (Beloša, 2017) te Savudrija (Baniček, 2016).....	22
<b>Tablica 3.</b> Kemijski sastav analiziranih uzoraka tla. Rezultati su preuzeti iz radova pod 1,2 i 3. ....	36
<b>Tablica 4.</b> Granulometrijski sastav analiziranih uzoraka tla. Rezultati su preuzeti iz radova pod 1,2 i 3.....	37
<b>Tablica 5.</b> Semikvantitativni mineralni sastav analiziranih uzoraka tla. Rezultati su preuzeti iz radova pod 1,2 i 3. + označava relativni udio minerala u uzorcima (+ je mali udio, ++ je znatan udio, a +++ je dominantan udio), - mineral nije utvrđen u uzorku, ? – mineralna faza nije pouzdano utvrđena, T – tinjčasti minerali, 14 Å – klorit/vermikulit i/ili smektit, MM – miješanoslojni minerali, AC – amorfna komponenta.....	38
<b>Tablica 6.</b> pH vrijednosti na početku i kraju pokusa.....	39
<b>Tablica 7.</b> Rezultati preživljavanja <i>A. baumannii</i> u kontroli (sterilizirana prirodna izvorska voda).....	41
<b>Tablica 8.</b> Rezultati preživljavanja <i>A. baumannii</i> u paleotlu.....	41
<b>Tablica 9.</b> Rezultati preživljavanja <i>A. baumannii</i> u crvenici 5410.....	42
<b>Tablica 10.</b> Rezultati preživljavanja <i>A. baumannii</i> u crvenici 4908.....	42

## 1. UVOD

Rezervoari za patogene mikroorganizme u vodenom okolišu mogu biti ljudski i životinjski otpad te sam okoliš (Fayer i dr. 1998., Hurst i Murphy, 1996.). Bakterija *Acinetobacter baumannii* je emergentni humani patogen. Podaci o prisutnosti *A. baumannii*, gram-negativne bakterije koja uzrokuje bolničke i izvanbolničke infekcije u ljudi i životinja u prirodnom okolišu koji se nalazi pod utjecajem otpada ljudskog podrijetla vrlo su rijetki, a uloga okolišnih izolata u pojavljivanju ljudskih infekcija nije razjašnjena. Ovaj neutrofilni patogen je izoliran iz kiselog paleotla u Istri i smatra se da je izvor zagađanja bolnički otpad ilegalno odložen u napuštenom kamenolomu Tri Jezerca (Hrenović i dr., 2014). Tri izolata ove bakterije povezana s kliničkim izolatima utvrđena su i u tehnosolu na ilegalnom odlagalištu otpada Sovjak u Istri (Hrenović i dr., 2017). Razvidno je da prisutnost klinički značajne bakterije *A. baumannii* u tlu može predstavljati javno zdravstveni rizik za ljudsko zdravlje pa je interesantno utvrditi kakvi su uvjeti za njezino preživljavanje u tlu. U ovom radu ispitano je preživljavanje multiplerezistentne bakterije *A. baumannii*, u kiselom krednom paleotlu Istre te u dvijema crvenicama (lokacije Savudrija i Monte Coronichi) i to kroz period od 50 dana. Navedene crvenice odabrane su zato što je iz prijašnjih istraživanja (Tomašić, 2013; Baniček, 2016; Beloša, 2017) poznato da se radi o crvenicama različite pH vrijednosti. Ideja istraživanja bila je ispitati preživljavanje bakterije *A. baumannii* u uzorcima tala različite pH vrijednosti. Za potrebe izrade ovog diplomskog rada nisu provedena terenska istraživanja već su korišteni uzorci tala iz prijašnjih istraživanja (Tomašić, 2013; Horvat, 2014; Baniček, 2016; Beloša, 2017) koja su provedena u sklopu izrade četiri diplomska rada mineraloško-geokemijsko-mikromorfološke tematike.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Geomorfološka građa Istre

Za opis geomorfološke građe Istre korišteni su materijali s web stranice: <http://istrapedia.hr>. Istra je najveći hrvatski poluotok, površine 3746 km<sup>2</sup>. Nalazi se na sjevernom dijelu Jadrana. Najveći dio površine Istre se nalazi unutar Hrvatske (3130 km<sup>2</sup>), a graniči sa Slovenijom (346 km<sup>2</sup>) i sa Italijom (Milje i Dolina). Najveći dio hrvatskog dijela poluotoka se nalazi u Istarskoj županiji, a manji dio u Primorsko-goranskoj županiji. Kopnena granica Istre je Tršćanski zaljev na zapadu te Preluka na istoku. Sjeverna granica je sjeverni rub Ćićarije.

Tri su temeljne reljefne cjeline geološkog sastava i tala Istre (Slika 1.):

1. Brdoviti sjeverni rub (Bijela Istra)
2. Niže flišno pobrđe (Siva Istra) i
3. Niske vapnenačke zaravni (Crvena Istra)

Brdoviti sjeverni rub je smješten u sjevernom i sjeveroistočnom dijelu poluotoka. To je izdignuto, okršeno kamenito područje koje je građeno od okršenih krednih i paleogenskih vapnenaca.

„Bijela Istra“, obuhvaća područje gorskog hrbata Učke (Vojak, 1401 m) te gorsku skupinu Ćićarije (Planik, 1272 m). Ta područja čine krajnji sjeverozapadni i sjeveroistočni dio istarskog poluotoka. Struktura je navlačna - borana te blokovska. Razlikuju se tri cjeline gorskoga hrpta Učke: sjeverni, srednji i južni hrbat Učke. Ćićarija ima složenu strukturu koja je obilježena nizom hrptova, a odvaja se od gorskoga hrpta linijom Opatija–Vranja i prijevoj (922 m). Gorska skupina Ćićarije ima dinarski smjer pružanja sjeverozapad–jugoistok. (Vlahović i dr., 2008).

Istarsko pobrđe (Siva Istra) je smješteno na sjeverozapadnom i zapadnom dijelu. To područje predstavlja depresiju zapunjenu flišnim materijalom, a s obzirom na veliku zastupljenost gline i njezine sive boje, središnja Istra naziva se „Siva Istra“.

„Siva Istra“ je odvojena od „Bijele Istre“ rasjednim odsjekom visokim i do 100 m. Prostor je snižen zbog djelovanja erozije zbog vodonepropusnosti flišnih naslaga. Također,

za to područje Istre, važne su složene doline rijeka Mirne i Raše s pritocima, a njihovo je oblikovanje uvjetovano sastavom stijena (Vlahović i dr., 2008).

„Crvena Istra“ je smještena na zapadnom i jugozapadnom dijelu Istarskog poluotoka. Dobila je taj naziv zbog velike količine zemlje crvenice koja prekriva zaravan izgrađen od jurskih i krednih karbonatnih stijena. To je zaravnjeno primorsko područje koje se proteže od Piranskoga zaljeva do Plomina. Prostor se podudara sa zapadnoistarskom antiklinalom, gdje su najbolje razvijene zaravni. Nastaju mnogobrojne pukotine, špilje, jame, škrape zbog vapnenačke podloge te zbog kemijskog trošenja.



**Slika 1.** Geomorfološka podjela Istre

Izvor: <http://istra.lzmk.hr/clanak.aspx?id=957>

## 2.2. Geološka građa Istre

Istra čini sjeverozapadni dio nekadašnje Jadranske karbonatne platforme, na kojoj su se u plitkome i toplome moru tijekom jure i krede taložile karbonatne naslage bez terigenog donosa (Vlahović i dr., 2005.). Različita su trajanja emerzije na granici gornje krede i paleogena, a to odražava različit slijed taloženja naslaga. Transgresijom je došlo do taloženja foraminiferskih vapnenaca, a produbljavanjem okoliša, stvaraju se klastične paleogenske naslage (lapor i fliš). Rezultat navedenog je široki stratigrafski raspon, te pojava različitih stijenskih litotipova.

Paleogenske naslage uključuju: foraminiferske vapnence, prijelazne naslage, liburnijske naslage (slatkovodne i brakične sedimente taložene u najnižim dijelovima paleoreljefa), i fliš (Velić i dr., 1995; Durn, 1996). Tijekom emerzija došlo je do uvjeta nastajanja boksita u paleoreljefnim oblicima. Prijelaz plitkomorske u dubokovodnu sedimentaciju dogodio se za vrijeme eocena, te je obilježen flišnim naslagama i turbiditima. Početkom oligocena započela je emerzijska faza u Istri koja traje i danas. U kvartaru izdvajaju se crvenice, les, špiljske naslage te aluvijalni sedimenti (Durn, 1996; Hećimović, 2009).

Na Istarskom poluotoku se izdvajaju slijedeće jedinice (Velić i dr., 1995a i 1995b; Velić i dr., 1995):

- jursko – kredni paleogeni karbonati na jugu i zapadu Istre,
- kredno – paleogeni karbonatno – klastični pojas u istočnoj i sjeveroistočnoj Istri,
- paleogeni flišni bazen središnje Istre.

Karbonatni i flišni sedimenti Istre mogu se podijeliti u četiri megasekvencije u stratigrafskim rasponima (Velić i dr., 1995):

1. megasekvencija bat – donji kimeridž,
2. megasekvencija gornji titon – gornji apt,
3. megasekvencija gornji alb – donji kampan i
4. megasekvencija paleocen – eocen.

### **Megasekvencija (bat – donji kimeridž)**

Za megasekvenciju bat–donji kimeridž, temeljne su značajke oplićavanje i pokrupnjavanje. U vršnom dijelu značajna je pojava *Rovinj breča* (Velić i Tišljari, 1988). Ova megasekvencija je predstavljena različitim tipovima platformnih vapnenaca, a otkrivena je u zapadnoj Istri, između Poreča i Rovinja. Predvladavaju okoliši izoliranih plićaka u plitkom subtajdalu i lagunama (bat – kalovij) gdje se talože deblji slojevi madstona i fosilifernih vekstona. Taj slijed se naziva *Monsena jedinica* (Velić i Tišljari, 1988). Takvi uvjeti se nastavljaju i početkom oksforda gdje se talože peloidni pekstoni i vekstoni (*Lim jedinica* – Velić i Tišljari, 1988). *Muča jedinica* je karakterizirana plićacima i lagunama sa visokom energijom vode (Velić i Tišljari, 1988). *Vrsar* i *Rovinj breče* obilježavaju završetak ove megasekvencije (kraj oksforda – početak kimeridža).

### **Megasekvencija (gornji titon – gornji apt)**

Predvladavaju različiti tipovi peritajdalnih, peletnih i LLH- stromatolitnih vapnenaca, uz pojave breča te ranodijagenetskih i kasnodijagenetskih dolomita. Ova megasekvencija je transgresivno-regresivna te su naslage ove megasekvencije otkrivene od Poreča do Punte Furlan. U mlađem titonu započinje ova megasekvencija, a obilježena je oscilirajućom transgresijom. Značajni su vapnenci *Pietra d'Istria* ili *Kirmenjaki*. Tijekom berijasa i starijeg valendisa u subtajdalnim i intertajdalnim okolišima se talože vapnenci koji su kasnije velikim dijelom kasnodijagenetski dolomitizirani-*Fantazija dolomiti* (Velić i Tišljari, 1988). Mlađi valendis je obilježen parasekvencijama oplićavanja. Razdoblje otriv – barem, značajno je po oplićavanju s LLH stromatolitima. Kraj barema je obilježen pojavom grejnstona. Za apt je značajna regionalna promjena režima i okoliša kojom je zahvaćena cijela Istra.

### **Megasekvencija (gornji alb – donji kampan)**

Megasekvencija ima veliku debljinu, više od 1000 m. Početkom mlađeg alba kreće prvo postupna pa potpuna ingresija. Potkraj alba došlo je do različitih uvjeta i okoliša taloženja, odnosno, sinsedimentacijska tektonska aktivnost dovela je do znatne morfološke promjene na istarskom dijelu Jadranske karbonatne platforme (Velić i dr., 1995). Iz tih razloga u sjevernoj Istri su nastali vrlo različiti okoliši, od kontinuirano plitkovodnoga prijelaza u cenoman (područje Savudrije), plitkovodnih vapnenačkih pješćanih prudova do

razvedenih okoliša u kojima su taloženi bogati tamni rudistni vapnenci (okolica Sv. Lucije) (Vlahović i dr., 2008). U području srednje Istre i Ćićarije značajne su pojave natplimnih ranodijagenetskih dolomita, koji su naknadnim tektogeno-dijagenetskim procesima pretvoreni u razmjerno debeli sloj kasnodijagenetskih dolomita i tektogeno-dijagenetskih breča.

U novije doba u zapadnom dijelu Istre između Rovinja i Poreča su pronađene i manje pojave eocenskih vapnenaca na naslagama donje krede. Te pojave svjedoče da je kopnena faza u tome dijelu Istre trajala znatno duže (čak i do 80 mil. godina). Upravo je to jedan od ključnih dokaza da je zap. dio Istre bio u to doba izdignut, tvoreći prostrani otok na kojem su tijekom dugoga razdoblja krede prebivali dinosauri (Vlahović i dr., 2008).

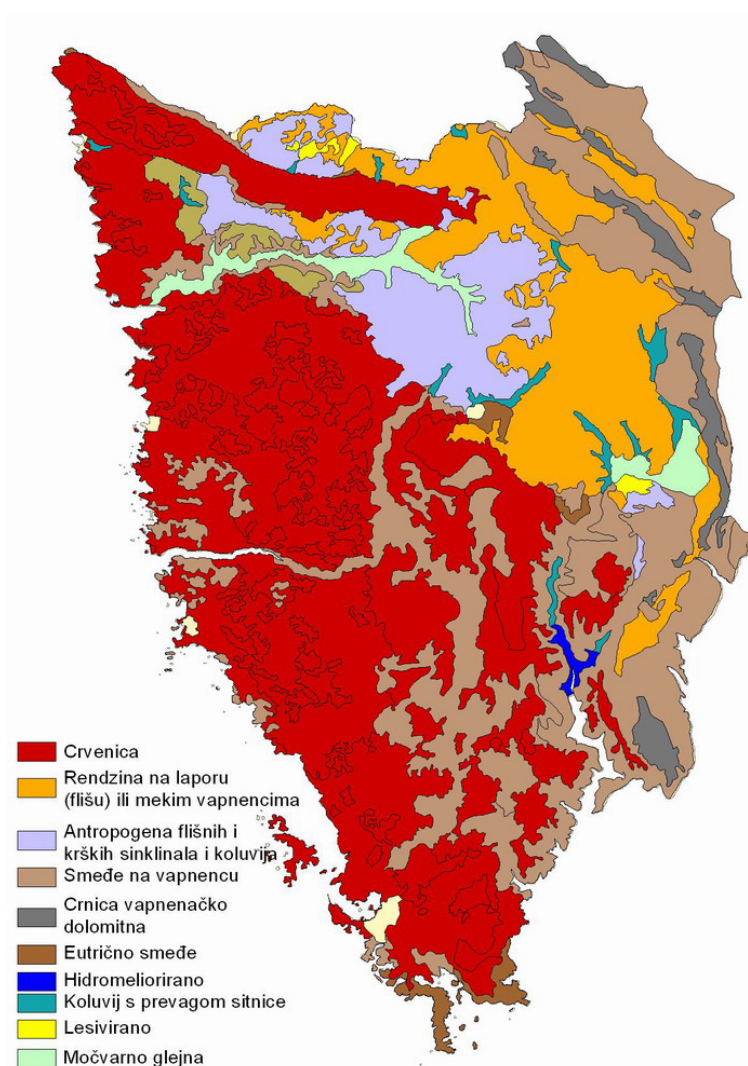
### **Megasekvencija (paleocen-eocen)**

Megasekvencija paleocen–eocen sadržava naslage paleogenske starosti. Taloženje je započelo preplavlivanjem tektonski deformiranoga, okršenoga i reljefno raznolikoga kopna. Dizanje morske razine uzrokovalo je izdizanje velikih nakupina podzemne slatke vode, pa su najniži dijelovi reljefa postupno pretvarani u močvare (u karbonatnim sedimentima se nalaze debele naslage ugljena). Nastavkom dizanja morske razine preplavljen je sve veći dio dotadašnjega kopna. Plitkomorske prostore taloženja karakteriziraju velike količine foraminifera (miliolida, alveolina, numulita i dr.) te se slijed tih naslaga zove *foraminiferski vapnenci* (Vlahović i dr., 2008). Tektonskim deformacijama nekadašnje jadranske karbonatne platforme zbog sažimanja prostora povezanoga s regionalnim događajima u Alpama i Karpatima stvaraju se duboka korita obilježena taloženjem klastičnih naslaga. Te naslage su poznate pod nazivom *fliš*. Flišna sedimentacija je karakterizirana debelim slojevima vapnenačkih breča i pješčenjaka te je zbog otpornosti na eroziju izgrađen npr. Hum, Buzet, Motovun i dr.

Nakon taloženja fliša, cijelo je područje današnje Istre okopnjelo (Vlahović i dr., 2008).

### 2.3. Pedološka građa Istre

Za opis pedološke građe tala Istre korištena je klasifikacija po Škoriću i dr. (1985) te podaci s web stranice <http://istrapedia.hr>. Podaci o površini za svako pojedino tlo u Istri preuzeti su iz Škorić (1987). Zastupljenost tala karakterizirana je crvenicom, rendzinom, koluvijalnim tlom, smeđim tlom, vapnenačko-dolomitnom crnicom, lesiviranim tlom, močvarno glejnim te ostalim tlima prikazanim na **slici 2**.



**Slika 2.** Pedološka karta Istarske županije

Izvor: Prekalj, 2012.



## **„Terra rosa“ ili zemlja crvenica**

Prema klasifikaciji Škorića i dr. (1985) terra rosa (dalje u tekstu će biti korišten hrv. naziv crvenica) spada u odjel automorfni tala i klasu kambičnih tala (A-(B)-C ili R). Prema WRB (World Reference Base for Soil Resources) (2006) crvenice spadaju samo u luvisole.

Crvenica je rezultat intenzivnog kemijskog trošenja karbonatnih stijena, vapnenaca (kemijsko trošenje) te dolomita (fizičko i kemijsko trošenje) pod utjecajem oborinske vode. Prema autorima Boero i Schwertmann (1989), generalni uvjeti pedookoliša pogodni za nastanak crvenice, primjerice dobar protok vode karakterističan za krške terene te neutralni pH nije od bitnijih karakteristika za proces rubifikacije, odnosno ocrveničavanja (nastanak karakteristične crvene boje) ako je izvor željeza autohton ili alohton. Ocrveničavanje je proces peptizacije amorfnih željeznih oksida i hidroksida, koji je omogućen dehidratizacijom željezovih oksida te nastajanja hematita (Kubiena, 1970).

Na području istarske krške zaravni i Bujske antiklinale diskontinuirano se prostiru crvenice te prekrivaju karbonate (vapnenca i dolomite) jurske, kredne i paleogenske starosti. Nadalje, crvenice ispunjavaju pukotine, džepove i udubljenja okršenih karbonata. Debljina naslaga crvenice je varijabilna te je uglavnom riječ o debljini koja iznosi 0.5-1 m ([www.istra-istria.hr](http://www.istra-istria.hr)). S porastom nadmorske visine u smjeru istoka i sjeveroistoka opadaju debljine naslaga crvenica. Primjerice, u krškom reljefu, u udolinama njena debljina prelazi i 10 m (npr. lokalitet Sjenokoša kod Rovinja). Te naslage nastale su ispiranjem crvenice sa vapnenjačkih platoa. Najdeblje naslage crvenice se nalaze u jurskim naslagama između Poreča i Rovinja te krednim naslagama između Umaga i Dalja, no utvrđene su i na zaravnjenom području na jugu Istre, oko Valture i pulskog aerodroma (istočno od Pule), u dolini Budava te na području zapadne obale Raše. Na području Istre, crvenica predstavlja najrasprostranjenije tlo, pokriva 78940 ha, a nalazi se na nadmorskim visinama i do 900 m (Škorić, 1987).

Različita su mišljenja o postanku crvenica pa tako pojedini autori smatraju da su se crvenice razvile iz netopivog ostatka karbonata (vapnenca ili dolomita), na čije stvaranje je utjecao ishodišni materijal, a ne klima. Škorić (1979) smatra da je za vrijeme otapanja karbonatne stijene, netopivi ostatak bio podvrgnut procesima trošenja. Pojedini autori smatraju da je crvenica nastala iz materijala nanošenog na vapnenačko-dolomitnu podlogu procesima ispiranja (Olson i dr., 1980; Rapp, 1984). Danas, većina smatra da su crvenice

poligenetske prirode (Šinkovec, 1974; Durn i dr., 1992; Durn i Aljinović, 1995; Durn i dr., 1999).

### **Rendzina na laporu ili mekim vapnencima**

Prema klasifikaciji Škorića i dr. (1985) rendzina spada u odjel automorfni tala i humusno-akumulativnu klasu tala (A-C ili R). Rendzina je mlado tlo koje je podložno trošenju. Uglavnom je riječ o plitkim poroznim tlima prekrivenim vegetacijom (<http://istrapedia.hr>). Takav tip tla najčešće sadrži molični horizont ispod kojeg je rastrošeni matični supstrat (Škorić, 1986). Rendzina je najviše zastupljena na području fliša, a prekriva 26500 ha Istre.

### **Smeđe tlo na vapnencu**

Prema klasifikaciji Škorića i dr. (1985) smeđe tlo spada u odjel automorfni tala i klasu kambičnih tala (A-(B)-C ili R). Smeđe tlo na vapnencu nastaje na blažim oblicima reljefa, odnosno gdje je erozija slabije izražena (<http://istrapedia.hr>). Dubina smeđeg tla ide od 30-60 cm. Na blažim oblicima reljefa istarske ploče, smeđa tla se izmjenjuju s crvenicama, dok se u planinskim predjelima izmjenjuju s crnicama. Nadalje, u prijelaznoj zoni smeđa tla se izmjenjuju iz flišne Istre prema krednom dijelu Istre (Škorić, 1987). Smeđe tlo je nekarbonatno staro tlo s humusnim horizontom moličnog (Amo) ili ohričnog (Aoh) tipa koji leži neposredno na kambičnom horizontu B(rz) tipa (Škorić, 1986). Smeđe tlo na vapnencu i dolomitu (kalkokambisol) je najzastupljenije tlo nakon crvenice, zauzima 56300 ha Istre (Škorić, 1987). Takvi tipovi tala se uglavnom razvijaju na mezozojskim vapnencima, ali i numulitnim i alveolinskim vapnencima.

### **Vapnenačko-dolomitna crnica (kalkomelanosol)**

Vapnenačko-dolomitna crnica je mlado plitko tlo, dubine do 30 cm. Prema klasifikaciji Škorića i dr. (1985) kalkomelanosol spada u odjel automorfni tala i humusno-akumulativnu klasu (A-C ili R). Kalkomelanosol nastaje utjecajem klime i vegetacije na ogoljene karbonate (vapnence i dolomite) koji se sporo troše. Nadalje, vapnenačko-dolomitna crvenica sadrži molični (Amo) ili organski (Ao) horizont koji leži na čvrstim karbonatima (Škorić, 1986). Šumska vegetacija je zaslužna za akumulaciju humusa (viši predjeli Istre). Kalkomelanosoli prekrivaju 11048 ha Istre.

### **Regosol**

Prema klasifikaciji Škorića i dr. (1985) rendzina spada u odjel automorfni tla i nerazvijenu klasu tala (A-C ili R). Prekriva 16959 ha Istre. Javlja se u flišnoj zoni te u prijelaznoj zoni fliša i krša.

### **Koluvijalno tlo**

Prema klasifikaciji Škorića i dr. (1985) koluvijalno tlo spada u automorfna tla i nerazvijenu klasu tala (A-C ili R). Koluvijalno tlo koje se naziva još i „koluvij“ je tlo s (A) ili Ap horizontom. Nastaje ispiranjem tla i supstrata s viših terena, bilo da je riječ o bujicama ili površinskim vodama ili recentnom sedimentacijom erodiranog materijala u podnožju tih terena (Škorić, 1986). Koluvij je vezan za flišno područje Istre, odnosno područje koje je građeno od lapora, mekih vapnenaca te pješčenjaka. U manjem omjeru koluvij se javlja i u rubnim vapnenačkim predjelima. Ovaj tip tla zauzima površinu od 11332 ha Istre.

### **Eutrično smeđe tlo**

Prema klasifikaciji Škorića i dr. (1985) eutrično smeđe tlo (eutrični kambisol) spada u odjel automorfni tala i klasu kambičnih tala (A-(B)-C ili R). To je tlo s moličnim (Amo) ili ohričnim (Aoh) humusnim horizontom te leži malo iznad kambičnog (B)v horizonta (Škorić, 1986). Eutrični kambisol na području Istre prekriva preko 5000 ha, a javlja se na koluviju, lesolikim sedimentima i flišnim, pretežno laporovitim naslagama. Najrasprostranjeniji je na koluviju koji prekriva vapnenačka područja, a veže se na kompleks crvenica i kalkokambisola.

### **Distrično smeđe tlo**

Distrična smeđa tla (distrični kambisol) prema klasifikaciji Škorića i dr. (1985) spadaju u odjel automorfni tala i klasu kambičnih tala (A-(B)-C ili R (Škorić i dr., 1985). Ta tla imaju ohrični (Aoh) ili umbrični (Aum) humusni horizont ispod kojeg se nalazi kambični B(v) horizont (Škorić, 1986). Distrični kambisol se naziva i kiselim smeđim tlom jer se formira na kiselim stijenama. Najviše zauzima središnji dio Istre te prekriva 3763 ha.

### **Lesivirano tlo**

Lesivirano tlo (luvisol) ima ohrični (Aoh) ili umbrični(Aum) humusni horizont ispod kojeg se nalazi eluvijalni horizont (E), a ispod kojeg slijedi iluvijalni argiluvični Bt horizont (Škorić, 1986). Levisirano tlo pokriva 3420 ha Istre.

### **Pseudoglej**

Prema klasifikaciji Škorića i dr. (1985) pseudoglej spada u odjel hidromorfih tala i klasu glejna tla (A-G). Takav tip tla nema jasne podjele na redukcijski i oksidacijski horizont pa je osnovni dijagnostički znak pojava mramoriranog g-horizonta specifične morfologije (Škorić i dr., 1985). Pseudoglejna tla prekrivaju površinu od 5014 ha Istre, a javljaju se na području fliša te rubnim vapnenačkim predjelima.

### **Močvarno-glejna tla**

Prema klasifikaciji Škorića i dr. (1985) močvarno-glejna tla spadaju u odjel hidromorfih tala i klasu glejna tla (A-G). Močvarno-glejna tla prekrivaju 4968 ha Istre, a razvijena su na fluvijalnim i koluvijalnim sedimentima vlažnih istarskih dolina i polja (duže ili kraće zadržavanje vode). Takva tla sadrže humusni Aa horizont koji je > 50 cm (plići) sa znakovima hidromorfizma ispod kojeg slijedi glejni horizont s jasno definiranim Gso i Gr pothorizontima (Škorić, 1986).

### **Rigolano tlo (Rigosol)**

Prema klasifikaciji Škorića i dr. (1985) rigolano tlo (euterični kambisol) spada u odjel automorfih tala i klasu antropogena tla (P-C ili R). Taj tip tla je rigolanjem pomiješan s dva ili više horizonata ili slojevima do dubine od 60 cm (Škorić, 1986). U Istri takvo tlo pokriva 45698 ha površine te se na njemu nalaze vinogradi, voćnjaci i sl.

Osim gore navedenih tala, u manjoj mjeri, prisutna su tla s površinom manjom od 3000 ha: kamenjar (litosol), livadsko tlo, smonica (vertisol), tlo deponija (deposol), aluvijalno ili fluvijativno tlo (fluvisol), livadsko tlo, hidromeliorirano tlo i solana, te vertični kambisol.

## 2.4. Bakterije roda *Acinetobacter*

Povijest roda *Acinetobacter* veže se uz rani početak 20. stoljeća (1911. god.) kad je Beijerinck, nizozemski mikrobiolog, opisao organizam pod imenom *Micrococcus calcoaceticus* (Peleg i dr., 2008). Organizam je bio izoliran iz tla obogaćivanjem u minimalnom mediju kalcij-acetatu. Tijekom sljedećih desetljeća, opisani su slični organizmi te im je dodijeljeno najmanje 15 različitih vrsta, uključujući *Diplococcus mukcosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratus* i *Achromobacter mucosus* (Peleg i dr., 2008). Aktualni naziv roda, *Acinetobacter* (od grčkoga ακινετος [akinetos], tj. nepokretan), predložili su Brisou i Prévot 1954. godine kako bi odvojili nepokretne od pokretnih mikroorganizama unutar roda *Acinetobacter*. U sveobuhvatnom istraživanju Baumann i dr. (1968) su zaključili da prethodno gore navedene vrste pripadaju jednom rodu, za koju je predložen naziv *Acinetobacter* te da ih nije moguće klasificirati u različite vrste na temelju fenotipskih karakteristika. Na temelju novih taksonomskih podataka, predloženo je da se članovi roda *Acinetobacter* klasificiraju u novu obitelj Moraxellaceae unutar reda Gammaproteobacteria, koja uključuje rodove *Moraxella*, *Acinetobacter* te *Psychrobacter*. Bouvet i Grimont (1986) su na temelju DNA-DNA hibridizacijskih studija odredili 12 DNA (hibridizacijskih) skupina ili genospecijalnih vrsta, od kojih su neki dobili nazive vrsta, uključujući *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* i *A. lwoffii*. Bouvet i Jeanjean (1989), Tjernberg i Ursing (1989), te Nishimura i dr. (1988) opisali su daljnje genomske vrste roda *Acinetobacter*, uključujući i imenovanu vrstu *A. radioresistens*. Neke od nezavisno opisanih (genomskih) vrsta pokazale su se kao sinonimi, npr. *A. lwoffii* i *Acinetobacter* genomske vrste 9 ili *Acinetobacter* genomske vrste 14, opisanih od Bouvet i Jeanjean (14BJ) i *Acinetobacter* genomske vrste 13, koje su opisali Tjernberg i Ursing (13TU). Nedavno je opisano 10 dodatnih vrsta *Acinetobacter*, uključujući 3 vrste ljudskog podrijetla, *A. parvus*, *A. schindleri* i *A. ursingii*, te 7 vrsta izoliranih iz aktivnog mulja: *A. bayvii*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandoii* i *A. gernerii*, povećavajući stvarni broj valjano opisanih (genomskih) vrsta na 31, od čega 17 su dobile valjane nazive vrsta. *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, genomska vrsta *Acinetobacter* 3 i genomskih vrsta *Acinetobacter* 13TU, usko su povezane te se teško međusobno razlikuju fenotipskim svojstvima. Stoga je predloženo da ove vrste

upućuju na *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks. U ovoj skupini je 80% kliničkih infekcija uzrokovanih *Acinetobacter spp.* (Manchanda i dr., 2010). Od 1954. godine do danas se mogu razlikovati 57 imenovanih vrsta i 5 neimenovanih vrsta (Peleg i dr., 2008).

Rod *Acinetobacter*, obuhvaća Gram-negativne, strogo aerobne, nefermentirane, nesporogene, nepokretne, katalaza-pozitivne, oksidaza-negativne bakterije, sa sadržajem DNA G + C od 39-47% (Manchanda i dr., 2010). Bakterije roda *Acinetobacter* se prirodno pojavljuju u tlu i vodi (Baumann, 1968) te su prisutni i u kanalizaciji (Warskow i Juni, 1972). Procjenjuje se da je najmanje 0,001% ukupnog broja kultiviranih, heterotrofnih, aerobnih populacija u tlu i vodi *Acinetobacter spp.* (Baumann, 1968). Javljaju se u sirovom, opranom i zamrznutom povrću (Gennari i Stegagno, 1986), u svježim, smrznutim i pohranjenim ribljim proizvodima (Gennari i Stegagno, 1985) te u pokvarenom mesu, mlijeku i siru (Gennari i dr., 1992). Također, neke vrste roda *Acinetobacter* se pojavljuju u fiziološkoj flori kože i dišnog sustava (Bergogne-Bitirezin i Towner, 1996). U ljudi *Acinetobacter* može biti dio bakterijske flore kože, naročito u vlažnim područjima kao što su aksile, prepone i nožni prsti, do 43% zdravih odraslih osoba može imati kolonizaciju kože i sluznice. Najčešće izolirane vrste uključuju *A. lwoffii* (58%), *A. johnsonii* (20%), *A. junii* (10%) te *Acinetobacter 3* (6%) (Manchanda i dr., 2010).

Vrsta *A. calcoaceticus* pronađena je u vodi i tlu te na povrću. Vrsta *Acinetobacter 3* nađena je u vodi i tlu, na povrću i na ljudskoj koži. *A. johnsonii* pronađena je u vodi i tlu, na ljudskoj koži te u ljudskom izmetu. *A. lwoffii* i *A. radioresistens* nađeni su na ljudskoj koži. Genomski tipovi *Acinetobacter 11* nađeni su u vodi i tlu, na povrću, te u ljudskom crijevnom traktu.

Bakterije roda *Acinetobacter* uzrokuju širok spektar infekcija te uključuju upalu pluća, meningitis, infekcije mokraćnog trakta i infekcije rana (Manchanda i dr, 2010). Unutar roda najpoznatija je vrsta *A. baumannii*, mikroorganizam koji je prepoznat kao značajni uzročnik bolničkih infekcija u svim zemljama svijeta. Smatra se da je infekcija *A. baumannii* izazvana isključivo onečišćenjem i prijenosom u bolničkom okruženju (Goić-Barišić, 2012). Glavna karakteristika bakterije *A. baumannii* je sposobnost preživljavanja u vlažnom i suhom okruženju pri čemu stvaranje biofilma ima značajnu ulogu (Hrenović i dr., 2014). Biofilm predstavlja zajednicu dobro strukturiranih mikrokolonija koja ima sposobnost dugotrajnog preživljavanja i izmjene genskog materijala (Goić-Barišić, 2012).

#### **2.4.1. Stanične strukture bakterija roda *Acinetobacter***

Stanice u logaritamskoj fazi rasta imaju tendenciju da budu oblika štapića, dok stanice u stacionarnoj fazi rasta su sferne te imaju nešto manji promjer od štapića (Baumann i dr., 1968b). Stanice se obično javljaju u parovima, a ponekad i u lancima. Kolonije uglavnom nisu pigmentirane. Elektronska mikroskopija tanjeg dijela stanice otkrila je staničnu stijenkiju tipičnu za Gram-negativne bakterije (Breuil i dr., 1975; Scott i dr., 1976). Peptidoglikan sadrži muraminsku kiselinu, glukozamin, alanin te D-glutaminsku kiselinu (Martin i dr., 1973, Horisberger, 1977). Jedan soj roda *Acinetobacter* pokazao je lipopolisaharide koji sadrže D-glukozu, glukozamin, galaktozamin, lipid A, etanolamin, masne kiseline, fosfate i protein (eng. PBP – penicillin-binding protein) (Adams i dr., 1970). Sastav polisaharida nije isti u svim proučavanim sojevima (Borneleit i Kleber, 1991). Brojna istraživanja razjasnila su strukturu lipopolisaharida O-antigena iz raznih *Acinetobacter* sojeva (Vinogradov i dr., 1997; Haseley i Wilkinson, 1997; Haseley i dr., 1997, 1998). Zbog prisutnosti deoksi-šećera, aminokiselina i razgranatih polimera, pokazano je da O-antigeni roda *Acinetobacter* imaju izrazitu hidrofobnost, koja je u skladu sa sposobnošću da *Acinetobacter* raste na hidrofobnim supstratima (Haseley i dr., 1997). Evolucija roda *Acinetobacter* rezultirala je velikom raznolikošću površinskih antigena, mnogi od njih su kapsularni. Vanjske membrane *A. calcoaceticus* i *A. radioresistens* sadrže nekoliko jedinstvenih proteina u rasponu molekulske mase od 12.000 do 50.000 daltona (Fischer i dr., 1984; Nishimura i dr., 1986a). Glavna vanjska membrana proteina *A. calcoaceticus* ima molekulsku masu od 38.000 daltona, za razliku od *A. radioresistens*, koji ima dva glavna proteina vanjske membrane molekularne težine od 39.000 i 42.000 daltona (Nishimura i dr., 1986a). Dvije studije koje su ispitivale veći broj sojeva pokazale su da je dobra korelacija između proteina vanjske membrane i DNA-DNA hibridizacijske skupine (Ino i Nishimura, 1989; Dijkshoorn i dr., 1990). Vanjska membrana *A. baumannii* djeluje kao prirodna prepreka mnogim antibioticima (Delcour, 2009). Bakterije roda *Acinetobacter* ne tvore spore, i ne posjeduju strukture za aktivno pokretanje, iako se može javljati pokretanje u obliku trzanja i kliženja (Towner, 2006).

#### 2.4.2. Rast i metabolizam bakterija roda *Acinetobacter*

Većina sojeva *Acinetobacter* može rasti u jednostavnom mineralnom mediju koji sadrži jedan izvor ugljika i izvor energije kao što su etanol, acetat, laktat, piruvat, malat, ili ketoglutarat. Rijetki sojevi roda *Acinetobacter* imaju zahtjevne faktore rasta te se takvi sojevi često spontano vraćaju na prototrofiju (mutiranje bakterije) kada se uzgajaju u laboratoriju (Warskow i Juni, 1972). Amonijeve i nitratne soli služe kao izvori dušika (Jyssum i Joner, 1965). Većina bakterija roda *Acinetobacter* nisu u mogućnosti reducirati nitrat u nitrit u uobičajenom testu redukcije nitrata te je to moguće u nekoliko sojeva (Riley i Weaver, 1974).

Budući da je rod *Acinetobacter* oksidaza-negativan, nedostaje citokrom c (Baumann i dr., 1968a). Odsutnost NAD-izocijanat dehidrogenaze te relativno spor rast s acetatom kao jedini izvorom ugljika, ukazuje da za rod *Acinetobacter*, ciklus trikarboksilne kiseline važniji je u sintezi aminokiselina (posebno aspartat, glutamat i prolin) i porfirina nego što je općenito stanično disanje.

*Acinetobacter sp.* ne može rasti na glukozi jer sadrži aldoza-dehidrogenazu te sposobnost brzog zakiseljavanja glukoznog medija (glukonsko formiranje kiseline), kao i medija koji sadrže druge šećere d-ksilozu, l-arabinozu, d-galaktozu, d-manozu, maltozu, laktozu i celobiozu (Hauge, 1960). Takvi sojevi roda *Acinetobacter* proizvode dvije glukozne dehidrogenaze, topljive i membranske vezane enzime (Matsushita i dr., 1989; Duine i dr., 1982). Dvije glukozne dehidrogenaze su različiti enzimi (Duine, 1991). Oba enzima koriste pirolokinolin kinon (PQQ, metoksatin) kao koenzim (Duine, 1991).

S obzirom da rod *Acinetobacter* nije pokretljiv, rast u tekućim medijima zahtijeva aeraciju ili miješanje. Rast se može odvijati od pH 5.0 do 8.0, s optimalnim pH za rast je od približno 6.5 (Baumann, 1968; Juni, 1982).

Budući da su aromatski spojevi dostupni putem raspadnutih mrtvih biljnih i životinjskih tkiva, nije iznenađujuće otkriće da *Acinetobacter sp.* može degradirati organske spojeve poput benzonata, p-hidroksibenzonata, mandelata, kinata i triptofana (Fewson, 1991). Organske hranjive tvari uključuju šećere, masne kiseline, alifatske alkohole, nerazgranate ugljikovodike, dikarboksilne kiseline, aminokiseline i mnoge aromatske i alicikličke spojeve (Baumann i dr., 1968b). Aromatski spojevi su toksični za



većinu mikroorganizama (Schirmeret i dr, 1997). Rano istraživanje razgradnje aromatskih spojeva roda *Acinetobacter* pokazalo je da se ovi spojevi pretvaraju u b-ketoadipate, te da su sukcinati i acetil CoA produkti degradacije b-ketoadipata (Stanier i Ornston, 1973). Određene značajke aromatske biosinteze aminokiselina su jedinstvene i karakteristične za sve *Acinetobacter sp.* (Byng i dr., 1985).

Koristeći plazmide, moguće je mobilizirati kromosome *Acinetobacter sp.* i konjugirati prijenos kromosomskih gena na soj primatelja (Towner i Vivian, 1976b). *Acinetobacter* kromosomi kodiraju gene za sintezu nekoliko restriksijskih endonukleaza i vjerojatno, njihovih odgovarajućih modifikacijskih enzima. To uključuje AccI i AccII (Roberts, 1985), AccIII (Kita i dr., 1985), AlwNI (Morgan i dr., 1987), AcII (Degtyarev i dr., 1992), AjoI (Nowak i sur., 1994), AspM (Zelinskaia i dr., 1996), i AccBSI (Abdurashitov i dr., 1997). Određeni *Acinetobacter sp.* razgrađuju i izlučuju polimere koji emulgiraju ugljikovodike, kao što su ulja, dajući te tvari raspoložive za degradaciju u vodenoj otopini (Gutnick i dr., 1991; Navon-Venezia i dr., 1995). *Acinetobacter sp.* koji posjeduje sposobnost razgradnje alkana uključuje rubredoksin, rubredoksin reduktazu i citokrom P-450 (Asperger i Kleber, 1991; Geissdörfer i dr., 1995). Sojevi koji pokazuju hemolizu na krvnim agar pločama luče fosfolipazu (Lehmann, 1971, 1973).

Polifosfati se nakupljaju u otpadnim vodama nekih *Acinetobacter sp.* (Gutnick i dr., 1991; Kortstee i dr., 1994). Čini se da su ti organizmi odgovorni za uklanjanje anorganskog fosfata iz kanalizacije kroz njihovu povezanost s aktivnim muljem (Fuhs i Chen, 1975; Buchan, 1983); prisutnost  $K^+$  čini se neophodnim za unos fosfata (Van Groenestijn i dr., 1988). Soj iz aktivnog mulja koji akumulira velike količine anorganskih polifosfata (3,7-5,7 mg P / 100 mg suhe težine stanica), identificiran je kao *A. johnsonii* (Bonting i dr., 1992). Anorganski polifosfati mogu poslužiti kao rezerva energije, kao i poli- $\beta$ -hidroksibutirati i jednostavni esteri od voska, koji se akumuliraju u mnogim sojevima roda *Acinetobacter* (Fixter i Sherwani, 1991).

### 2.4.3. Rezistencija *A. baumannii* na antibiotike

*A. baumannii* je jedan od organizama koji prijete trenutnom antibiotskom dobu. interes za *Acinetobacter*, i od strane znanstvene i javne zajednice, naglo je porastao posljednjih godina. (Peleg i dr., 2008). Među pacijentima u bolnicama klinički izolati *A. baumannii* često su otporni na uobičajeno korištene antibiotike (Keen i dr., 2011), **slika 3**.

Rezistentnost na antibiotike može se očitovati kroz nekoliko mehanizama:

- (1) mutacijom u genima koji kodiraju antibiotike,
- (2) prevencijom antibiotskog prodiranja u stanicu,
- (3) aktivnim efluksom antibiotika iz stanične sredine,
- (4) zaobilaskom antibiotika,
- (5) neenzimskom zaštitom
- (6) enzimskom modifikacijom, ili
- (7) enzimskom posredovanom antibiotskom modifikacijom ili destrukcijom. (Hooper, 2009)

Antibiotici iz različitih izvora se ispuštaju u okoliš kroz neadekvatno gospodarenje otpadom (Keen i dr., 2011). Sukladno tome, okoliš predstavlja ogroman rezervoar antibiotske rezistencije gena. Mobilizacija gena mikroorganizama širi se horizontalnim prijenosom kroz populacije te to predstavlja razlog postojanja veze između ekološke rezistencije i bolnice. Geni se brzo kreću kroz bakterijsku populaciju vertikalnom i horizontalnom transformacijom, posredovanom transdukcijom faga i konjugacijom (Keen i dr., 2011).

*A. baumannii* uglavnom razvija rezistenciju na karbapeneme zbog produkcije karbapenemaza iz skupine B (VIM; IMP, SIM) ili D (OXA), a razlog je gubitak porina vanjske membrane (CarO) ili pojačana aktivnost efluks pumpi. Izolati *A. baumannii* koji proizvode oksacilinazu, pokazuju najčešće multiplu rezistenciju na većinu antibiotika uključujući sve  $\beta$ -laktame, aminoglikozide i fluorokinolone pa je najčešće kolistin lijek izbora (Bedenić i dr., 2015).

Stečene oksacilinaze grupe OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 i OXA-143 uzrokuju visok stupanj rezistencije na karbapeneme. Po cijelom svijetu proširena je skupina OXA-23. U Grčkoj te Francuskoj je opisana skupina OXA-58, dok je skupina OXA-24/40 opisana u Španjolskoj, Portugalu, SAD-u, Tajvanu itd. Skupina OXA-143 je opisana do sada samo u Njemačkoj (Bedenić i dr., 2015). Stečene oksacilinaze su uglavnom smještene na plazmidima te su prenosive s jedne bakterijske stanice na drugu.

U filogenetskoj skupini oksacilinaza OXA-51/69 nalaze se urođeni enzimi vrste *A. baumannii*. Rezistencije na karbapeneme nema ukoliko ne postoji pojačana ekspresija gena blaOXA-51 zbog insercijske sekvence smještene ispred gena (Bedenić i dr., 2015).

Vrste roda *Acinetobacter* imaju različitu rezistenciju na lijekove (**Tablica 1**), jer se odnose na široku lepezu genotipova i fenotipa. Različiti pojmovi poput "višestruka otpornost na lijekove" (MDR), "intenzivno otporan na lijekove" (XDR), i „panrezistentan“ (PDR) korišteni su kako bi se opisala antimikrobna rezistencija *Acinetobacter spp.* (Manchanda i dr., 2010). 'MDR *Acinetobacter spp.*' može se definirati kao izolat otporan na najmanje tri klase antimikrobnih sredstava - svi penicilini i cefalosporini (uključujući kombinacije inhibitora), flurokvinoloni i aminoglikozidi. 'XDR *Acinetobacter spp.*' izolat rezistentan je na tri razreda gore opisanih antimikrobnih sredstava (MDR) te je rezistentan i na karbapeneme. "PDR *Acinetobacter spp.*" izolat mora biti XDR *Acinetobacter spp.* koji je rezistentan na polimiksine i tigeciklin. Gore navedene definicije su opisane u vidu različitih mehanizama otpornosti i antimikrobnih lijekova koji se koriste za liječenje različitih *Acinetobacter spp.* infekcija. Ove definicije pomažu jasno definirati rezistentnost i racionalnu antimikrobnu terapiju (Manchanda i dr., 2010).

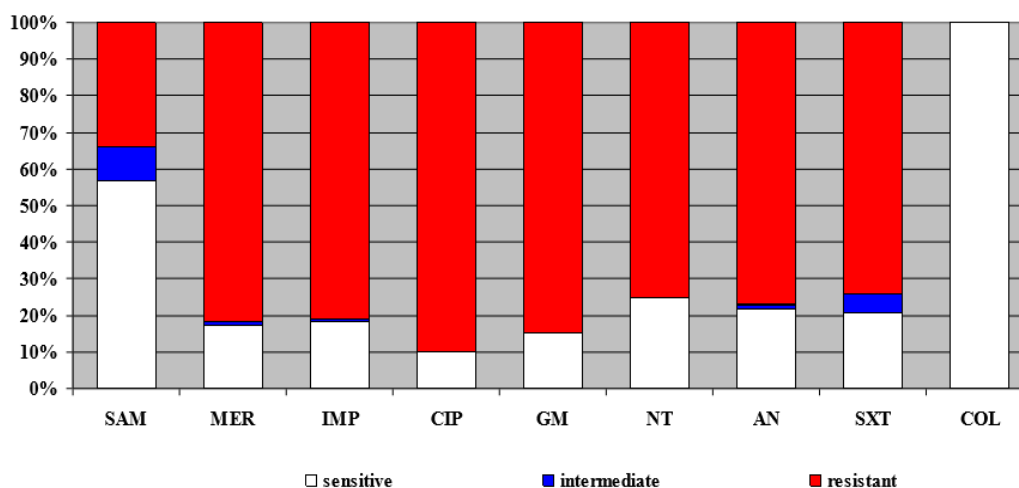
**Tablica 1.** Prikaz rezistencije *A. baumannii* na antibiotike

Izvor: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2014.

ANTIBIOTIK ANTIBIOTIC	Broj izolata No. of isolates	% rezistentnih (% intermedijarnih) izolata % of resistant (% of intermediate) isolates	Raspon lokalnih rezultata* Range of local results*
Ampicilin + sulbactam	1 532	34 (9)	2 (20) - 80 (2)
Meropenem	1 677	82 (1)	37 (0) - 96 (0)
Imipenem	1 678	81 (1)	35 (0) - 96 (0)
Ciprofloksacin	1 677	90 (0)	46 (0) - 100 (0)
Gentamicin	1 678	85 (0)	35 (0) - 100 (0)
Netilmicin	1 407	75 (0)	35 (2) - 100 (0)
Amikacin	1 582	77 (1)	33 (6) - 96 (0)
Co-trimaxazole	1 573	74 (5)	36 (6) - 100 (0)
Colistin	1 381	0 (0)	0 (0) - 1 (0)

\* rezultati centara s malim brojem izolata (<30) nisu uzeti u obzir  
results from the centers with small number of isolates (<30) were not taken into consideration

*Acinetobacter baumannii*. (1.10. - 31.12. 2014.) - osjetljivost na antibiotike u RH  
- sensitivity to antibiotics in Croatia



**Slika 3.** Profil antibiotske rezistencije *A. baumannii*

Izvor: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2014.

Problemi uzrokovani bakterijom *A. baumannii* u bolničkim okruženjima pogoršavaju se zbog povećanja otpornosti na uobičajeno korištene antimikrobne lijekove, njihovu sposobnost stvaranja biofilmova na abiotskim površinama i njihov visok stupanj otpornosti na sušenje i dezinfekciju, što dovodi do dugoročnih problema u bolničkom okruženju.

Kontaminacija u bolničkom okruženju, uz prenošenje infekcije unutar bolnice, općenito se prepoznaje kao glavni izvor za pojavu epidemije u bolnici. Probavni trakt koloniziranih pacijenata može biti važan epidemiološki rezervoar višestruko rezistentne bakterije *A. baumannii* iz kog bi bakterije mogle migrirati kroz otpadne vode u okoliš (Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2014.)

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Terenska istraživanja

Za potrebe izrade ovog diplomskog rada nisu provedena terenska istraživanja već su korišteni uzorci tala iz prijašnjih istraživanja (Tomašić, 2013; Horvat, 2014; Baniček, 2016; Beloša, 2017), lokacije su označene na **slici 4** brojevima (crvena boja). Na **slici 4**. lokalitet Tri Jezerca je označen brojem 1, lokalitet Monte Coronichi brojem 2 te lokalitet Savudrija brojem 3.



**Slika 4.** Geološka karta Istre s označenim lokalitetima

Izvor: <http://istra.lzmk.hr>

Prijašnja istraživanja su izvršena na tri lokacije: Tri Jezerca, Monte Coronichi te Savudriji (**Tablica 2**) i provođena su u sklopu izrade četiri diplomska rada mineraloško-geokemijsko-mikromorfološke tematike. U **tablici 2.** prikazani su uzorci koji su uzeti za ovaj rad, dubina profila s kojeg su uzeti uzorci te tipovi tala.

**Tablica 2.** Popis uzoraka izuzetih sa lokacija Tri Jezerca (Horvat, 2014), Monte Coronichi (Tomašić, 2013) i (Beloša, 2017) te Savudrija (Baniček, 2016)

Lokacija	Laboratorijski broj	Dubina profila (cm)	Tip tla
Tri Jezerca	4616	0-40	paleotlo
Monte Coronichi	5410	0-30	crvenica
Savudrija	4908	730-750	crvenica

#### Lokalitet Tri Jezerca

Lokalitet Tri Jezerca se nalazi blizu Sv. Lovreča (**Slika 4**). U okviru terenskih radova za potrebe izrade diplomskog rada Viktora Horvata profil zeleno-sivkastih glina sa lokaliteta Tri Jezerca pažljivo je očišćen i pripremljen za uzorkovanje (**Slika 5**). Debljina zeleno-sivkastih glina na lokaciji istraživanja iznosi 93 cm (Horvat, 2014). One su povezane s regionalnom pojavom donjeg apta-donjeg alba te pokazuju jasan dokaz o subaerskoj ekspoziciji i smatraju se paleotlima. U kamenolomu Tri Jezerca te gline se nalaze u paleokrškim udubljenjima razvijenim u vapnencima donjeg apta, odnosno arhitektonsko-građevnog kamena, poznatog kao „Istarski žuti“ (Hrenović i dr., 2014).

„Istarski žuti“ eksploatira se iz nekoliko kamenoloma u središnjoj Istri. Međutim, napušteni dio kamenoloma Tri Jezerca trenutno se koristi kao ilegalno odlagalište otpada.



**Slika 5.** Profil paleotla na lokaciji Tri Jezerca

Izvor: Horvat, 2014



**Slika 6.** Izuzeti uzorak paleotla

Poremećeni uzorak paleotla izuzet je iz gornjeg dijela profila (0 do 40 cm) odmah ispod vapnenca donjealbske starosti (**Slika 6, Tablica 2**).



### Lokalitet Monte Coronichi

Lokalitet Monte Coronichi se nalazi blizu Umaga (**Slika 4**). U okviru terenskih radova za potrebe izrade diplomskog rada Elizabete Tomašić profil crvenice debljine 300 cm pažljivo je očišćen i pripremljen za uzorkovanje (**Slika 7**). Na lokaciji je ukupno izuzeto 12 uzoraka (Tomašić, 2013; Beloša 2017). Za potrebe izrade ovog diplomskog rada izuzet je površinski uzorak s dubine 0 do 30 cm (**Tablica 2, Slika 8**).



**Slika 7.** Pedološki profil Monte Coronichi

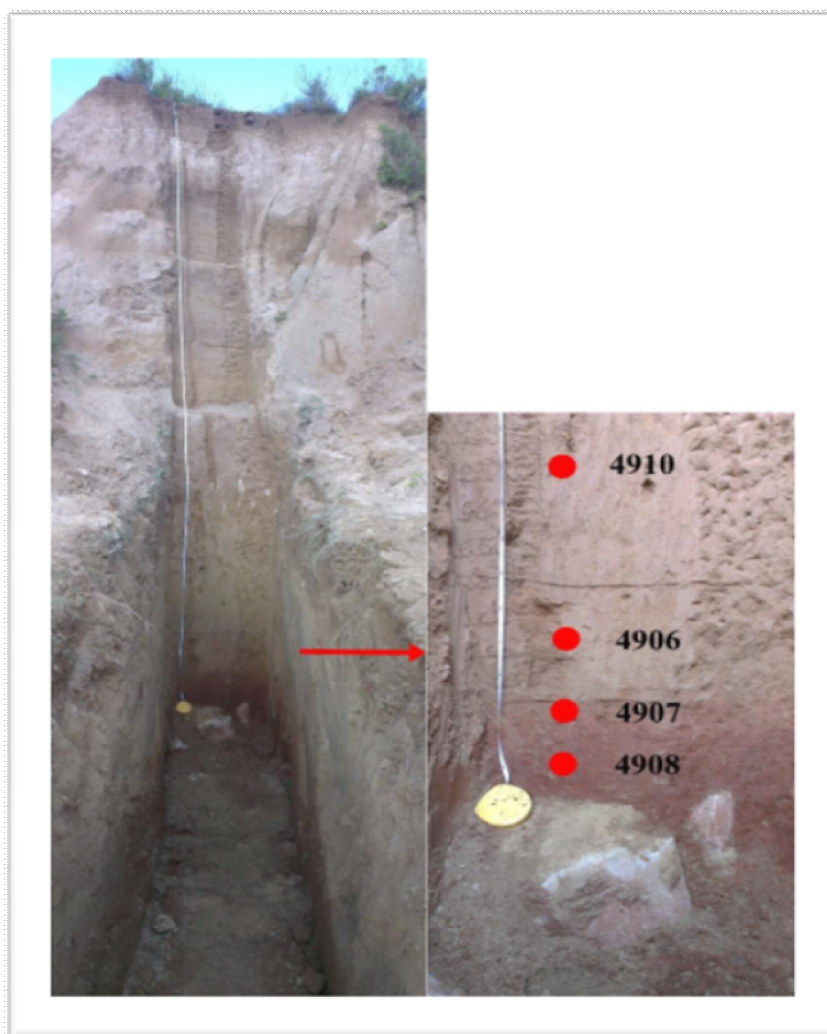
Izvor: Tomašić, 2013.



*Slika 8.* Priprema za izuzimanje površinskog uzorka na lokaciji Monte Coronichi

## Lokalitet Savudrija

Lokalitet Savudrija nalazi se na Rtu Savudrija (**Slika 4**). U okviru terenskih radova za potrebe izrade diplomskog rada Ivone Baniček otvoren je cjeloviti profil pedo-sedimentnog kompleksa do kontakta s gornjekrednim rudistnim vapnencima debljine 750 cm (**Slika 9**). Na lokaciji je ukupno izuzeto 4 uzorka (Baniček, 2013). Za potrebe izrade ovog diplomskog rada izuzet je najdonji uzorak s dubine 730 do 750 cm (**Tablica 2, Slika 9**).



**Slika 9.** Pedo-sedimentni kompleks Savudrija s pozicijama izuzetih uzoraka.

Izvor: Baniček, 2016.

## 3.2. Laboratorijska istraživanja

Mineraloška, granulometrijska i geokemijska ispitivanja uzoraka tla provedena su u okviru istraživanja Tomašić (2013), Horvat (2014), Baniček (2016) i Beloša (2017) pa će se u poglavlju 4 (Rezultati) prikazati rezultati analiza preuzeti od navedenih autora. Laboratorijska istraživanja za potrebe izrade ovog diplomskog rada provedena su na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

### 3.2.1. Izolacija i karakterizacija *A. baumannii* iz okoliša

U istraživanju je korišten okolišni izolat *A. baumannii* iz paleotla (Hrenović i dr., 2014). *A. baumannii* izoliran je iz aerobno kultiviranih ploča hranjivog agara. Karakteriziran je rutinskim bakteriološkim tehnikama: bojanjem po Gramu, sposobnošću rasta na 42°C, reakcijama katalaze i oksidaze te biokemijskim svojstvima u komercijalnom sustavu Vitek 2 (bioMérieux) (Hrenović i dr., 2014).

Profil antibiotske rezistencije određen je na osnovu osjetljivosti na karbapeneme (imipenem, meropenem), kombinaciji penicilina i inhibitora β-laktamaza (ampicilin-sulbaktam), trimetoprim-sulfametoksazoli, aminoglikozidima (amikacin, gentamicin, tobramicin) i fluorokinolonima (ciprofloksacin, levofloksacin).

Osjetljivost je prvo određena difuzijskim testovima te potvrđena vrijednostima minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) korištenjem AST-XN05 i AST-N233 kartica za sustav Vitek 2 ili za kolistin i ampicilin-sulbaktam putem E-testova (AB Biodisk) (Hrenović i dr., 2014). Rezultati su interpretirani prema Europskom odboru za kriterije za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti kliničkih izolata *Acinetobacter sp.* (EUCAST, 2017).

### **3.2.2. Postava pokusa**

#### **3.2.2.1. Sterilizacija uzoraka tla i vode**

Za uzorke tala (paleotla te crvenice) koji su uzeti iz LAGEM-a laboratorija Rudarsko-geološko-naftnog fakulteta, korištena je sterilizacija vodenom parom pri povećanom tlaku u autoklavu (Antolović i dr., 2016). U tlačni aparat, stavljene su uzorci te se hermetički zatvorili. Zagrijavanjem vode nastala je vodena para koja je potiskivala zrak iz autoklava. Osnovni čimbenici koji su bili potrebni za ovu vrstu sterilizacije su: tlak vodene pare, temperatura i vrijeme. U autoklavu sterilizacija uzoraka tala se vršila pri temperaturi od 121°C i tlaku od 2 atm ( $2 \cdot 10^5$  Pa) ukupnog trajanja 20 min.

Autoklav se koristio zbog sterilizacije (ubijanja vegetativnih i sporogenih mikroorganizama) u tlima (Antolović i dr., 2016). Na isti je način sterilizirana prirodna izvorska voda (komercijalno dostupna Jana) koja se koristila kao pozitivna kontrola i medij za suspenziju tala.

Suspenzije tala (paleotlo, crvenice 5410 i 4908) pripremljene su u Falcon epruvetama (15ml). U epruvete se redom dodavalo po 1 g uzorka tla, ukupno 3 uzorka. Nakon što je odvagano po 1 g tla za svaki uzorak, otpipetirano je po 10 ml suspenzije *A. baumannii* u prirodnoj izvorskoj vodi te su na taj način pripremljene suspenzije sva tri uzorka tla.

### 3.2.2.2. Bojenje po Gramu

Tijekom provođenja pokusa uzorci su bojani po Gramu kako bi vizualizirali bakterije. Hans Christian Gram 1884. godine je postao zaslužan za metodu složenog bojanja bakterijskih stanica. To je ujedno jedna od najpoznatijih i najvažnijih metoda složenih bojanja. Bakterijske stanice se s obzirom na reakcije bojenja dijele na Gram pozitivne i Gram negativne.

Razlikuju se 4 tipa bakterijskih stanica:

- a) Gram negativne
- b) Gram pozitivne
- c) Gram neosjetljive ( ne mogu se obojiti ili vrlo slabo) te
- d) Gram varijabilne (ne mogu se odrediti kojoj skupini pripadaju)

(Antolović i dr., 2016).

Bojenje po Gramu objašnjava se debljinom mureinskog sloja u Gram-pozitivnih bakterija. Kod Gram-pozitivnih bakterija zbog debljine mureina stanične stijenke stvoreni kompleks kristal violeta i lugola teže će se isprati 96%-tnim alkoholom, a u Gram-negativnih relativno će se lako isprati iz stanice zbog tankog peptidoglikanskog sloja.

Bojenje po Gramu je važno u ovom radu kako bi se se utvrdilo kako *A.Baumannii* reagira na pojedine antibiotike. Primjerice, na osnovi bojenja po Gramu može se s određenom sigurnošću odmah započeti s antibiotskom terapijom (Stilinović i Hrenović, 2009.).

#### Postupak bojanja:

Bakterije se prvo bojaju kristal violet ili gencijana violet bojom po cijelom preparatu te tako stoje jednu minutu. Nakon toga boja se ocijedi i ispere vodom. Potom se na preparat nanosi Lugolova otopina, otopina joda u kalijevu jodidu koja stoji 1 min, nakon čega se bakterije oboje ljubičasto-plavo. Predmetnica se ukosi i preparat ispere 96%-tnim etanolom. Neke bakterije se tijekom ispiranja alkoholom odboje, te se naknadnim bojenjem safraninom oboje crveno. Kontrastno bojilo (safranin) se ostavi da reagira na preparatu 3 minute. Nakon zadnjeg ispiranja vodom preparat se posuši filter papirom. One bakterije koje su zadržale ljubičasto-plavu boju i nakon ispiranja alkoholom, ostaju jednake i nakon bojenja safraninom- gram pozitivne stanice (Antolović i dr., 2016).

U vanjskim slojevima stanične stijenke gram negativnih stanica stvoreni kompleks kristal violeta i lugola (Stilinović i Hrenović, 2009) lako se ispiru pa stanice ostaju nebojene.

Mikroskopirati se može imerzijskim objektivom uz pomoć imerzijskog ulja, **slika 10** (Antolović i dr., 2016).



**Slika 10.** Gram negativne stanice *A. baumannii* u obliku kokobacila, povećanje 1000x

Izvor: PMF, Zavod za mikrobiologiju, Zagreb

### 3.2.2.3. Određivanje broja *A. baumannii* u tlima

Hranjive podloge su otopine tvari koje bakterijama omogućuju rast i razmnožavanje bakterija u određenim laboratorijskim uvjetima. Za određivanje broja bakterija u radu je korišten hranjivi agar (Nutrient agar, Biolife):

- pepton 5g
- mesni ekstrakt 3 g
- agar 15 g destilirana voda 1000 ml
- pH 7,0 ± 0,2

Nakon pripreme hranjivog agara, napravljena su decimalna razrjeđenja na hranjivu podlogu, ploče su inkubirane te su brojane bakterije. U mikrobiološkom laboratoriju određen je broj bakterija u uzorcima tala te u kontroli.

Broj bakterija u uzorku je uglavnom velik, pa se prije naciepljivanja na hranjivu podlogu uzorak treba razrijediti kako bi se porasle kolonije mogle izbrojati. U ovom radu koristi se neizravna metoda za određivanje broja mikroba, a to je priprava deseterostrukih serijskih razrjeđenja iz osnovne bakterijske suspenzije koja se naciepljuje na hranjive podloge (Stilinović i Hrenović, 2009), **slika 13**. Prilikom razrjeđivanja bili su potrebni sterilni uvjeti rada kako bi se spriječila kontaminacija uzoraka.

Tijekom razdoblja pokusa (tijekom 50 dana) periodički se uzimalo 0,1 mL uzorka koji je služio za praćenje broja preživjelih bakterija. Uzorci su se uzimali iz inkubator-tresilice, koja služi za istovremeni uzgoj većeg broja bakterija (stalna trešnja uzoraka). Nakon što su uzeti uzorci iz tresilice, pojedinačno su protreseni na Vortexu 3 minute kako je prikazano na **slici 11** te se serijski razrjeđivali naciepljivanjem deseterostrukih razrjeđenja u sterilnoj fiziološkoj otopini, koja je homogenizirana i naciepljena na hranjivi agar u Petrijevoj zdjelici u volumenu od 0,1 mL na površinu agara Drigalskim štapićem koji je prethodno flambiran.

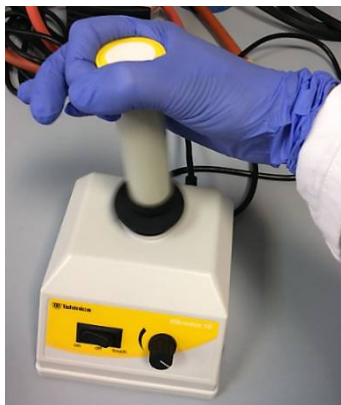


### Postupak deseterostrukih razrjeđenja

Postupak se vrši na način da se u niz epruveta pipetom stavlja 9 mL fiziološke otopine. Zatim se 1 mL suspenzije bakterijske kulture pipetom prenosi u prvu epruvetu. Nakon homogeniziranja suspenzije 1mL iz prve epruvete prenosi se u drugu epruvetu s 9mL fiziološke otopine. Postupak se na taj način ponavlja do zadnje epruvete niza (**Slika 12**).

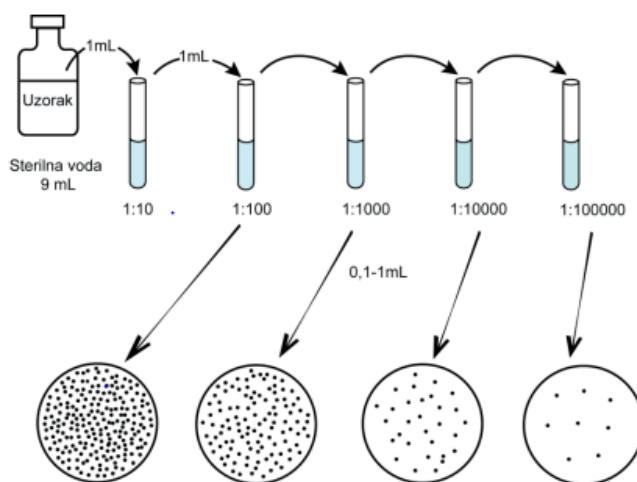
Nakon toga slijedi nacjepljivanje po 100  $\mu$ L na čvrstu hranjivu podlogu. To je jedan od mogućih načina nacjepljivanja te se isti koristio u ovom radu.

Prednost izrade desetostukih serijskih razrjeđenja bakterijske suspenzije je njegova osjetljivost, a nedostatak je što je sporiji od izravnih metoda brojanja (Antolović i dr. 2016).



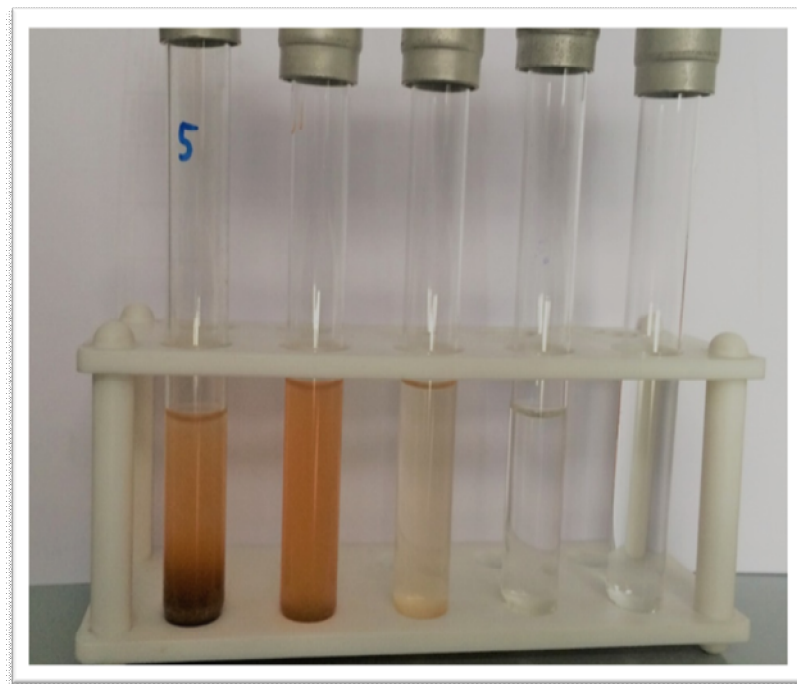
**Slika 11.** Vortex (trešnja uzoraka)

Fotografirala: Kristina Ćorak



**Slika 12.** Postupak određivanja broja kolonija

Izvor: Stilinović i Hrenović (2009)



**Slika 13.** Serijska razrjeđenja bakterijske suspenzije

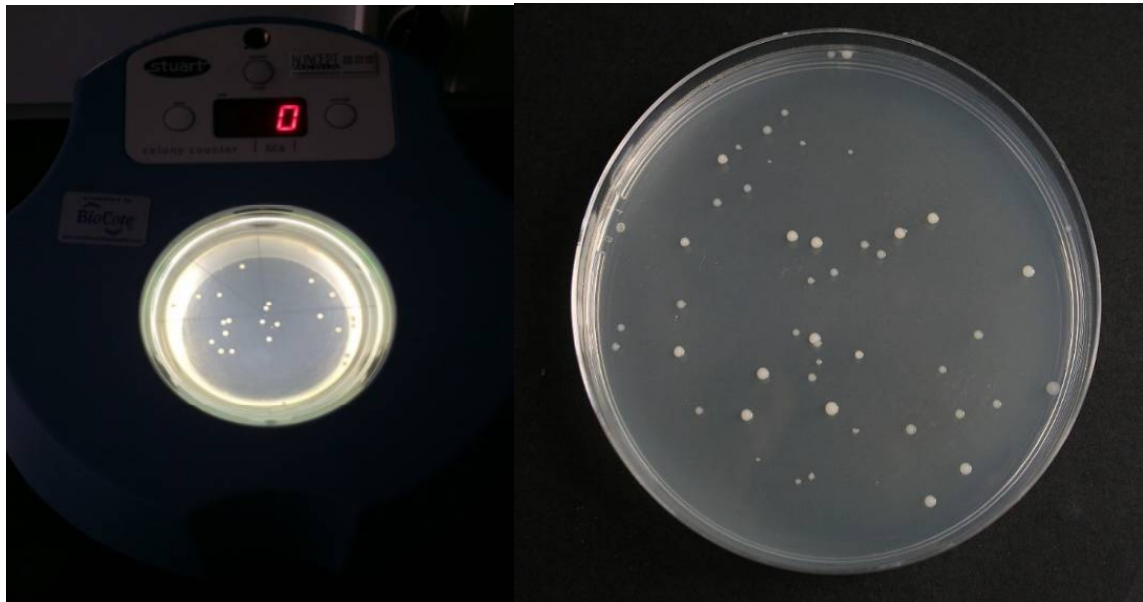
Fotografirala: Kristina Ćorak

Uzorci su inkubirani pri 42°C kroz 24 h te je određivan broj poraslih kolonija (Slika 14). Broj kolonija računat je:

$$\text{CFU/mL} = \frac{\text{broj kolonija} \cdot \text{faktor razrjeđenja}}{\text{volumen uzorka}} \quad (3-1)$$

Broj bakterija izražen je kao  $\log_{10}$  CFU/ mL. CFU (engl. colony forming unit) predstavlja svaku poraslu koloniju (Antolović i dr., 2016). Statistički valjan uzorak je onaj koji na hranjivoj podlozi ima između 10 i 300 kolonija (Antolović i dr. 2016).

Brojač kolonija je olakšao brojanje označavanjem kolonija pomoću markera na Petrijevoj zdjelici. Brojač ima zvučni signal te senzor za pritisak markera te ugrađenu svjetiljku za bolju vidljivost (Antolović i dr., 2016).



**Slika 14.** Brojač kolonija i kolonije *A. baumannii* porasle na hranjivom agaru

Izvor: fotografirala Kristina Ćorak

#### 3.2.2.4. Određivanje pH tla

pH vrijednost tla u ovom istraživanju utvrđena je primjenom pH-metra WTW s pripadajućom elektrodom. Izmjerene su pH vrijednosti za svaki uzorak tala te za kontrolu i to na početku i kraju pokusa.

#### 3.2.2.5. Izračun preživljavanja bakterije *A.baumannii* u različitim uzorcima

Izračun preživljavanja bakterije *A. baumannii* u različitim uzorcima tala (paleotlo, crvenica 5410 i crvenica 4908) te kontrole se vršio tijekom trajanja pokusa, odnosno 50 dana. Stope preživljavanja bakterije *A. baumannii* izračunate su prema jednadžbi (1) u kojoj  $\log \text{CFU/ml}(t)$  označava broj bakterija na dan mjerenja, dok  $\log \text{CFU/mL}(t_0)$  označava broj bakterija na početku eksperimenta.

$$\text{Stopa preživljavanja} = \left( \frac{\log \text{CFU/ml}(t)}{\log \text{CFU/ml}(t_0)} \right) * 100 \quad (3-2)$$

Aritmetička sredina se dobila na način da se zbroj vrijednosti preživljavanja podijelio s njihovim brojem.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Kemijski sastav uzoraka tla

Rezultati kemijske analize uzoraka prikazani su u **tablici 3**.

**Tablica 3.** Kemijski sastav analiziranih uzoraka tla. Rezultati su preuzeti iz radova pod **1** (Hrenović i dr., 2014), **2** (Beloša, 2017) i **3** (Baniček, 2016).

Oksid	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MgO	CaO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	TiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	MnO	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	LOI	Suma	
Jedinica	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Uzorak	Dubina (cm)													
4616 <sup>1</sup>	0 - 40	51,42	24,30	5,59	2,69	1,09	0,23	5,14	1,26	0,02	n.a.	n.a.	7,65	99,39
5410 <sup>2</sup>	0 - 30	62,52	16,55	6,59	0,55	0,32	0,51	1,33	1,21	0,14	0,20	0,032	9,80	99,77
4908 <sup>3</sup>	730 - 750	56,53	15,61	6,04	1,52	4,49	0,67	1,70	0,85	0,07	0,12	0,031	12,20	99,82

Paleotlo (uzorak 4616) je u odnosu na crvenice obogaćeno s Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MgO i K<sub>2</sub>O. Navedeno upućuje da su glavne mineralne faze u uzorku filosilikati, poglavito illitični materijal. U odnosu na crvenicu s lokacije Monte Coronichi (5410), crvenica iz Savudrije (uzorak 4908) znatno je obogaćena na CaO. Navedeno može uputiti da kao mineralnu fazu sadrži kalcit.

## 4.2. Granulometrijski sastav uzoraka tla

Rezultati granulometrijske analize prikazani su u **tablici 4**.

**Tablica 4.** Granulometrijski sastav analiziranih uzoraka tla. Rezultati su preuzeti iz radova pod **1** (Horvat, 2014), **2** (Tomašić, 2013) i **3** (Baniček, 2016).

Oksid		pijesak	silt	glina
Jedinica		%	%	%
Uzorak	Dubina (cm)			
4616 <sup>1</sup>	0 - 40	0,3	16,8	82,9
5410 <sup>2</sup>	0 - 30	2,7	41	56,3
4908 <sup>3</sup>	730 - 750	12,5	45	42,5

Paleotlo (uzorak 4616) je u odnosu na crvenice bitno obogaćen frakcijom čestica glina koja predstavlja predominantnu frakciju u tom uzorku (**Tablica 4**). Crvenica s lokacije Monte Coronichi (5410), u odnosu na crvenicu iz Savudrije (uzorak 4908) sadrži više glinovite frakcije i bitno manje frakcije dimenzije pijeska. Bitno viši udjel frakcije pijeska u uzorku 4908 može biti posljedica povećanog udjela kalcita na što upućuje i kemijski sastav (**Tablica 3**).

### 4.3. Mineralni sastav uzoraka tla

Rezultati mineralnog sastava uzoraka prikazani su u **tablici 5**.

**Tablica 5.** Semikvantitativni mineralni sastav analiziranih uzoraka tla. Rezultati su uzeti iz radova **1** (Horvat 2014), **2** (Tomašić, 2013) i **3** (Baniček,2016). + označava relativni udio minerala u uzorcima (+ je mali udio, ++ je znatan udio, a +++ je dominantan udio), - mineral nije utvrđen u uzorku, ? – mineralna faza nije pouzdano utvrđena, T – tinjčasti minerali, 14 Å – klorit/vermikulit i/ili smektit, MM – mješanoslojni minerali, AC – amorfna komponenta.

UZORAK	KALCIT I DOLOMIT	KVARC	PLAGIOKLAS	K FELDSPAT	GOETHIT	HEMATIT	PIRIT, JAROZIT I GIPS	T	KAOLINIT	14Å	KLORIT	MM	AC
4616 <sup>1</sup>	-	+	+	-	+	-	+	+++	-	-	-	++	+
5410 <sup>2</sup>	-	++	+	+	-	+	-	++	++	+	?	+	+
4908 <sup>3</sup>	8	24	8	1	+	+	-	++	+	?	+	+++	+

Glavne mineralne faze u paleotlu (uzorak 4616) su tinjčasti minerali (ilitični materijal) i mješanoslojni minerali glina (**Tablica 5**). Za razliku od crvenica, uzorak paleotla sadrži pirit, jarozit i gips. Getit, jarozit i gips u paleotlu su produkti trošenja piritu i vapnenaca unutar kojih se paleotlo nalazi (Horvat, 2014). Glavne mineralne faze u crvenicama su filosilikati. U crvenici s lokacije Monte Coronichi (5410) dominantne faze su kaolinit i ilitični materijal dok su u uzorku crvenice iz Savudrije (uzorak 4908) glavne mineralne faze filosilikata mješanoslojni minerali glina i ilitični materijal (**Tablica 5**). U uzorku 4908 utvrđene su karbonatne mineralne faze (kalcit i dolomit) što je u skladu s rezultatima kemijske i granulometrijske analize (**Tablice 3 i 4**).

#### 4.4. pH u tlu na početku i kraju pokusa

Izmjerene su pH vrijednosti za svaki uzorak tla te za kontrolu i to na početku i kraju pokusa (**Tablica 6**).

**Tablica 6.** pH vrijednosti na početku i kraju pokusa

Uzorci tla	pH vrijednost na početku pokusa	pH vrijednost na kraju pokusa
kontrola	6,92	7,83
paleotlo	2,99	2,72
crvenica (5410)	5,79	5,63
crvenica (4908)	7,56	7,82

pH vrijednost na početku pokusa je kisela za paleotlo (koncentracija vodikovih atoma  $<10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup>), neutralna za kontrolu (prirodna izvorska voda), srednje kisela za crvenicu 5410, te lužnata za crvenicu 4908.

Nakon završetka pokusa (50 dana), pH se povisio u kontroli i crvenici (4908), dok se smanjio u crvenici (5410) i paleotlu (**Tablica 6**).



#### 4.5. Rezultati određivanja broja *A. baumannii*

Rezultati određivanja broja *A. baumannii* pokazali su da se sitne kolonije pojavljuju pri uvjetima ugibanja stanica (**Slika 15**). Na **slici 15** prikazane su sitne i krupne kolonije nakon 24h inkubacije pri 42°C na hranjivom agaru. Vidljivo je da se razvijaju okrugle, lagano konveksne, glatke kolonije.



**Slika 15.** Krupne i sitne kolonije *A. baumannii* porasle na hranjivom agaru

Izvor: PMF, Zavod za mikrobiologiju, Zagreb

#### 4.6. Rezultati preživljavanja *A. Baumannii*

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da *A. baumannii* može uspješno preživjeti kroz 50 dana u kontroli (prirodnoj izvorskoj vodi) te u crvenicama 5410 i 4908 (Slika 16). Bakterije su se uspješno umnažale u crvenicama zbog pH koji je viši od 5 dok je u paleotlu došlo do uginjanja bakterija zbog kiselog pH (Slika 16).

##### 4.6.1. Rezultati preživljavanja *A. baumannii* u kontroli

Rezultati iz tablice 7. pokazuju da izolat ima sposobnost preživljavanja u danim uvjetima svih 50 dana. Preživljavanje *A. baumannii* od 91% u kontroli na temelju zadnjeg dana pokusa, pokazuje da bi se preživljavanje vjerojatno nastavilo duži period vremena.

**Tablica 7.** Rezultati preživljavanja *A. baumannii* u kontroli (sterilizirana prirodna izvorska voda)

Kontrola	start	1 dan	2 dan	7 dan	14 dan	21 dan	28 dan	35 dan	42 dan	50 dan
CFU/mL	4,5*10 <sup>7</sup>	6,7*10 <sup>7</sup>	8,5*10 <sup>7</sup>	7,2*10 <sup>7</sup>	5,5*10 <sup>7</sup>	1,1*10 <sup>8</sup>	2,4*10 <sup>7</sup>	2,0*10 <sup>7</sup>	2,2*10 <sup>7</sup>	8,3*10 <sup>6</sup>
log CFU/mL	7,6	7,8	7,9	7,9	7,7	8,0	7,4	7,3	7,3	6,9
Preživljavanje (%)		102	104	103	101	105	97	95	96	91

##### 4.6.2. Rezultati preživljavanja *A. baumannii* u paleotlu

Iz rezultata preživljavanja *A. baumannii* u paleotlu (Tablica 8), vidljivo je da je preživljavanje bilo samo jedan dan, što je rezultat kiselog pH. U kiselom tlu nije moguć daljnji rast i preživljavanje bakterije. **Tablica 8.** Rezultati preživljavanja *A. baumannii* u paleotlu

Paleotlo	start	1 dan	2 dan	7 dan	14 dan	21 dan	28 dan	35 dan	42 dan	50 dan
CFU/mL	4,5*10 <sup>7</sup>	3,3*10 <sup>0</sup>	1*10 <sup>0</sup>	1*10 <sup>0</sup>	1*10 <sup>0</sup>	1*10 <sup>0</sup>	1*10 <sup>0</sup>	1*10 <sup>0</sup>	1*10 <sup>0</sup>	1*10 <sup>0</sup>
log CFU/mL	7,6	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
Preživljavanje (%)		6	0	0	0	0	0	0	0	0

#### 4.6.3. Rezultati preživljavanja *A. baumannii* u crvenici 5410

Iz rezultata preživljavanja *A. baumannii* u crvenici 5410 (Tablica 9), vidljivo je da mikroorganizmu odgovaraju pH uvjeti crvenice (5410). *A. baumannii* ima sposobnost preživljavanja svih 50 dana pokusa. S obzirom na postotak zadnjeg dana pokusa, preživljavanja od 86%, vrlo vjerojatno ovo preživljavanje bi moglo potrajati duže vremena.

**Tablica 9.** Rezultati preživljavanja *A. baumannii* u crvenici 5410

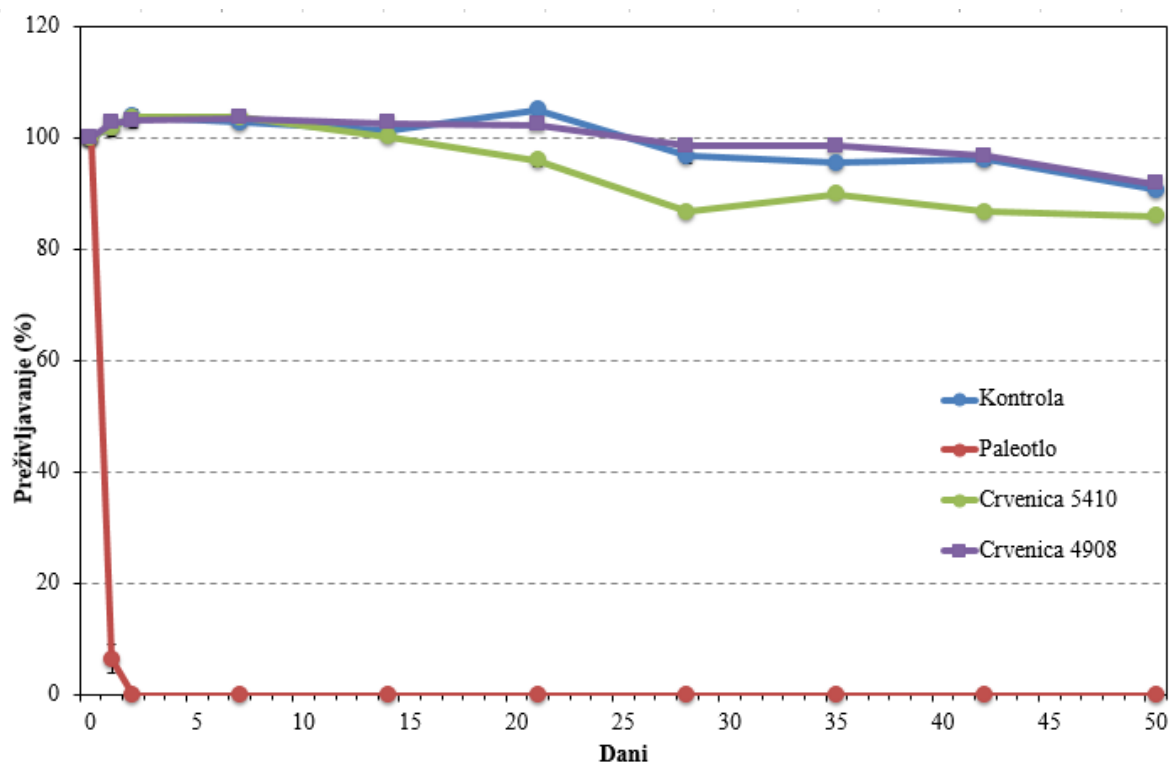
Crvenica (5410)	start	1 dan	2 dan	7 dan	14 dan	21 dan	28 dan	35 dan	42 dan	50 dan
CFU/mL	4,5*10 <sup>7</sup>	6*10 <sup>7</sup>	8,5*10 <sup>7</sup>	8,4*10 <sup>7</sup>	4,5*10 <sup>7</sup>	2,1*10 <sup>7</sup>	4,3*10 <sup>6</sup>	7,4*10 <sup>6</sup>	4,2*10 <sup>6</sup>	3,7*10 <sup>6</sup>
log CFU/mL	7,6	7,8	7,9	7,9	7,6	7,3	6,6	6,9	6,6	6,6
Preživljavanje (%)		102	104	104	100	96	87	90	87	86

#### 4.6.4 Rezultati preživljavanja *A. baumannii* u crvenici 4908

Rezultati preživljavanja *A. baumannii* u crvenici 4908 (Tablica 10) ukazuju da je preživljavanje *A. baumannii* vrlo slično kao i kod crvenice (5410). Razlike su minimalne, kao npr. 14 dan preživljavanje u crvenici (5410) je 100%, dok je kod crvenice (4908) preživljavanje 103% pa je taj postotak gotovo zanemariv.

**Tablica 10.** Rezultati preživljavanja *A. baumannii* u crvenici 4908

Crvenica (4908)	start	1 dan	2 dan	7 dan	14 dan	21 dan	28 dan	35 dan	42 dan	50 dan
CFU/mL	4,5*10 <sup>7</sup>	6,9*10 <sup>7</sup>	7,4*10 <sup>7</sup>	8,2*10 <sup>7</sup>	6,9*10 <sup>7</sup>	6,6*10 <sup>7</sup>	3,4*10 <sup>7</sup>	3,3*10 <sup>7</sup>	2,5*10 <sup>7</sup>	1,0*10 <sup>7</sup>
log CFU/mL	7,6	7,8	7,9	7,9	7,8	7,8	7,5	7,5	7,4	7,0
Preživljavanje (%)		103	103	103	103	102	98	98	97	92



**Slika 16.** Grafički prikaz preživljavanja *A. baumannii* u tri tipa tla te u pozitivnoj kontroli kroz 50 dana pokusa

Iz grafičkog prikaza (**Slika 16**) je vidljivo da je preživljavanje u paleotlu završilo odmah nakon prvog dana, dok je preživljavanje u kontroli te crvenicama 5410 i 4908 trajalo svih 50 dana, a moglo bi trajati i duže vrijeme. S kiselošću pH dolazi do smanjenog preživljavanja bakterija. Nadalje, iz navedenog grafičkog prikaza vidi se da su minimalne razlike u preživljavanju kontrole te crvenica 5410 i 4908.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Tri Jezerca

Tijekom prijašnjih istraživanja glinovitih sedimenata u kamenolomu Tri Jezerca, utvrđeno je da je glinoviti sediment (paleotlo) erozijski ostatak tala i sedimenata akumuliranih u paleokrško udubljenje djelovanjem oscilirajuće morske transgresije. Time je završila emerzijska faza (Durn i dr., 2003, 2006). Emerzija je u Istri trajala duže nego na ostalim dijelovima Jadranske karbonatne platforme (Velić i dr., 1989). Na temelju mineraloških te geokemijskih istraživanja utvrdilo se da je glinoviti sediment bio podvrgnut procesima pedogeneze i dijageneze.

Glavne mineralne faza u paleotlu su ilitični materijal te pravilno i nepravilno interstratificirani illiti/smektiti (**tablica 5**). Udjel nepravilno interstratificiranog illita/smektita veći je od udjela pravilno interstratificiranog illit/smektita (Hrenović i dr., 2014). Pretpostavlja se da je taj sastav posljedica illitizacije smektita. U uzorku su kao sporedne mineralne faze utvrđeni pirit, gips, jarozit i goethit. Zbog trošenja pirita istraživano paleotlo ima izrazito kiseli pH (**Tablica 6**). Reakcija otapanja pirita stvara vodenu otopinu s  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  i  $\text{H}^+$  ionima. Kristali gipsa recentno nastaju unutar istraživanog paleotla zbog trošenja pirita koji se nalaze u oksidacijskim uvjetima. Sulfatni ioni ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) reagiraju s ionima  $\text{Ca}^{2+}$  iz metorskih voda procjeđenih kroz krovinske vapnence, te tako dolazi do kristalizacije gipsa (Horvat, 2014). Posljedično nastaje i goethit. Unutar istraživanog paleotla, sulfatna kiselina nastala oksidacijom pirita otapa i ilitični materijal, oslobađajući kalij koji se veže sa željezom i sulfatnim ionom formirajući jarosit (Horvat, 2014).

Izvjешća o pojavi održivog klinički važnog patogena *A. baumannii* u prirodi su rijetka. Klinički značajan izolat *A. baumannii* pronađen je u paleotlu kamenoloma Tri Jezerca (Hrenović i dr., 2014.). U uzorku paleotla koji je osušen na 50°C tijekom 72 sata, otkriveno je 60 do 100 CFU/g aerobno uzgojenih heterotrofnih neutrofilnih bakterija (Hrenović i dr., 2014). Populacija je predstavljala samo jedan morfološki tip kolonije. Karakterizacija kolonije pokazala je da je izolirana bakterija *A. baumannii*. Očigledno, isušivanje i visoke temperature nisu imale značajno negativan utjecaj na opstanak populacije *A. baumannii* u svježem paleotlu (Hrenović i dr., 2014). Ispitivani okolišni

izolat *A. baumannii* pokazao je sličnost s kliničkim izolatom s kojim je uspoređen. Najbliže medicinske ustanove udaljene su od kamenoloma Tri Jezerca 10-ak km. Zbog toga je teško vjerovati da izolirana vrsta *A. baumannii* iz paleotla potječe iz bolničkih otpadnih voda (Hrenović i dr.,2014). Obzirom da se u neposrednoj blizini pedološkog profila Tri Jezerca nalazi otpad, Hrenović i dr. (2014) pretpostavljaju da je izvor zagađanja bolnički otpad ilegalno odložen u napuštenom kamenolomu. Iz rezultata preživljavanja *A. baumannii* u paleotlu (**Tablice 6 i 8; Slika 16**), vidljivo je da je preživljavanje bilo samo jedan dan, što je rezultat kiselog pH. Provedeno istraživanje pokazalo je da u kiselom tlu nije moguć daljnji rast i preživljavanje bakterije. Niski pH je bio glavni razlog smanjenja broja *A. baumannii* u kontaktu s paleotlom. Vrlo visok sadržaj potencijalno toksičnih teških metala u paleotlu (Hrenović i dr., 2014) nije bitno utjecao za preživljavanje *A. baumannii*.

## 5.2. Monte Coronichi

Crvenica je silozna glina koja kao glavne mineralne faze sadrži kaolinit i illitični materijal (**Tablice 4 i 5**). Relativno nizak pH, neuobičajen za crvenicu (**Tablica 6**) posljedica je odsustva karbonatnih mineralnih faza. Crvenica 5410 u interakciji s bakterijom *A. baumannii* je pokazala preživljavanje svih 50 dana. Iz grafičkog prikaza (**Slika 16**) vidljivo je da bakterija *A.baumannii* može preživjeti i duži period od 50 dana u crvenici 5410, što znači da ima dovoljno nutrijenata za rast i razmnožavanje bakterija.

## 5.3. Savudrija

Crvenica je glinoviti silt koji kao glavne mineralne faze sadrži mješanoslojne minerale glina i illitični materijal (**Tablice 4 i 5**). Relativno povišen pH, neuobičajen za crvenicu (**Tablica 6**) posljedica je prisutnih karbonatnih mineralnih faza (**Tablica 5**). Preživljavanje bakterije *A. baumannii* u uzorku crvenice 4908 je gotovo jednaka preživljavanju u uzorku crvenice 5410 (**Slika 16**). Pretpostavlja se da je blago lužnat pH kod 4908 odgovoran za rast i preživljavanje bakterije. Iz **tablice 10** vidljivo je da je preživljavanje moguće i dulji period od 50 dana.

## 6. ZAKLJUČAK

U okviru ovog rada korišteni su uzorci tala koji su izuzeti tijekom prijašnjih istraživanja na lokalitetima Tri Jezerca, Monte Coronichi te Savudrije kako bi se moglo na istima izvršiti laboratorijsko istraživanje preživljavanja bakterije *A. baumannii*. Zaključeno je da *A. baumannii* uspješno preživljava u uzorcima crvenica (4908 te 5410) kroz 50 dana, te u kontroli (prirodna izvorska voda), dok u paleotlu (4616) preživljava samo jedan dan. Preživljavanje u kontroli i crvenicama 4908 te 5410 vjerojatno bi potrajalo i duži period vremena od 50 dana zbog toga jer raspon pH od 5 do 8 omogućuje preživljavanje ove bakterije. Neznatne razlike preživljavanja u crvenici 4908 u usporedbi s kontrolom ukazuju da crvenica nije sadržavala organske tvari koje bi pogodovale razmnožavanju bakterija tijekom 50 dana. Zbog niskog pH paleotla, izolat *A. baumannii* ne može preživjeti duže od jednog dana. Za sada ne postoje literaturni podaci o tome koji ekološki čimbenici i u kojoj mjeri utječu na preživljavanje *A. baumannii* u okolišu.

Iz rada se može zaključiti da je *A. baumannii* otporna bakterija koja može preživjeti duže vrijeme u različitim tlima. Prisutnost klinički značajne bakterije *A. baumannii* u tlu može predstavljati javno zdravstveni rizik za ljudsko zdravlje.

## 7. LITERATURA

AKADEMIJA MEDICINSKIH ZNANOSTI HRVATSKE (2014): Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj, 54-56 str.

ANTOLOVIĆ, R., FRECE, J., GOBIN, I., HRENOVIĆ, J., KOS, B., i dr. (2016): *Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije*. Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, p. 172.

BANIČEK, I. (2016): Mineraloške, geokemijske, pedofizikalne i mikromorfološke značajke paleotla smještenog na dnu les-paleotlo sekvence na Savudriji, Istra; Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, 118 str.

BEDENIĆ, B., SARDELIĆ, S., LADAVAC, M. (2015): Multirezistentne bakterije, *Acta Med Croatica* (69), 211-216

BELOŠA, L. (2017): Mineraloške, geokemijske, mikromorfološke i agroekološke karakteristike pedosedimentnog kompleksa na lokaciji monte Coronichi (Istra); Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, 143 str.

BENAC, Č. (1994): Inženjerskogeološke osobitosti obalnog pojasa i podmorja riječkog zaljeva–Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 152 str.

BOERO, V., i SCHWERTMANN, U. (1989): Iron oxide mineralogy of Terra Rossa and it's genetic implications. *Geoderma*. 44, 319-327 p.

BOGNAR, A., KLEIN, V., TONČIĆ-GREGL, R., ŠERCELJ, A., MAGDALENIĆ, Z. i CULIBERG, M. (1983): Kvartarne naslage otoka Suska i Baške na otoku Krku i njihovo geomorfološko značenje u tumačenju morfološke evolucije kvarnerskog prostora.– *Geografski glasnik* 45: 7–32

DURN, G. (1996): Origin, composition and genesis of Terra Rossa in Istria.–Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, p. 204.

DURN, G. i ALJINOVIĆ. D. (1995): Teška mineralna frakcija u terra rosama istarskog poluotoka, Hrvatska. 1. Hrvatski geološki kongres, Opatija, Knjiga sažetaka, 31.

DURN, G., OTTNER, F., MINDSZENTY, A., TIŠLJAR, J. i MILEUSNIĆ, M. (2006): Clay mineralogy of bauxites and palaeosols in Istria formed during regional subaerial



exposures of the Adriatic Carbonate Platform.- In: Vlahović, I., Tibljaš, D. & Durn, G. (eds.): 3rd Mid-European Clay Conference: Field Trip Guidebook, University of Zagreb, Faculty of Science and Faculty of Mining, Geology and Petroleum Engineering, 3-30.

DURN, G., OTTNER, F., SLOVENEK, D. (1999): Mineralogical and geochemical indicators of the polygenetic nature of terra rosa in Istria, Croatia. *Geoderma*, 91, 125-150.

DURN, G., OTTNER, F., TIŠLJAR, J., MINDSZENTY, A. i BARUDŽIJA, U. (2003): Regional Subaerial Unconformities in Shallow-Marine Carbonate Sequences of Istria: Sedimentology, Mineralogy, Geochemistry and Micromorphology of Associated Bauxites, Palaeosols and Pedo-Sedimentary Complexes.- In: Vlahović, I. & Tišljari, J. (eds): Evolution of Depositional Environments from the Paleozoic to the Quaternary in the Karst Dinarides and the Pannonian Basin. 22nd IAS Meeting of Sedimentology, Opatija September 17-19, 2003, Field Trip Guidebook, 207-254.

DURN, G., SLOVENEK, D., ŠINKOVEC, B. (1992): Eolian influence on terra rosa in Istria. 7th International congress of ICSOBA, Balatonalmádi–Tapolca, Hungary, Abstracts, 89.

GOIĆ-BARIŠIĆ, I. (2012): Multiplerezistentni *Acinetobacter baumannii* (MRAB) – deset godina nakon pojave prvih izolata u Hrvatskoj-ISSN 1331-2820, redni broj članka: 708, Klinički zavod za mikrobiologiju KBC Split

GOIĆ-BARIŠIĆ, I., HRENOVIĆ, J., KOVAČIĆ, A. i ŠERUGA MUSIĆ, M. (2016): Emergence of Oxacillinases in Environmental Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Associated with Clinical Isolates, number 7.

GORDON N.C i WAREHAM D.W (2009): Evaluation of CHROMagar *Acinetobacter* for Detection of Enteric Carriage of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Samples from Critically Ill Patients

HEĆIMOVIĆ, I. (2009): Tumač geološke karte Republike Hrvatske M 1 : 300 000. Poglavlje o Kvartaru, Geološki institut, Zagreb.

HORVAT, V. (2014): Mineraloške, geokemijske i mikromorfloške karakteristike krednog paleotla u kamenolomu Tri jezera; Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, 193 str.

HRENOVIĆ, J., DURN, G., GOIĆ-BARIŠIĆ, I. i KOVAČIĆ, A. (2014): Occurrence of an Environmental *Acinetobacter baumannii* Strain Similar to a Clinical Isolate in Paleosol from Croatia, 2014, 80(9):2860

HRENOVIĆ, J., DURN, G., SERUGA MUSIC, M., DEKIĆ., TROSKOT-CORBIC, T., SKORIĆ, D (2017): Extensively and multi drug-resistant *Acinetobacter baumannii* recovered from technosol at a dump site in Croatia; *Science of the Total Environment* 607-608

KEEN L. P., MONTFORTS M.M. H. (2011): *Antimicrobial resistance in the environment*

KURBIĀNA, W.L. (1970): *Micromorphological features in soil geography*. Rutgers University Press, New Brunswick, 240 p.

MANCHANDA, V., SANCHAITA, S., SINGH NP (2010): *Journal of Global Infectious Diseases*; Sep-Dec; 2(3): 291–304.

OLSON, C.G., RUHE, R.V., MAUSBACH, M.J. (1980): The Terra Rossa limestone contact phenomena in Karst, Southern Indiana. *Soil Sci.Soc.Am. J.*, 44, 1075-1079.

OTTNER, F., DURN, G., SCHWAIGHOFER, B. i TIŠLJAR, J. (1999): Clay minerals in paleosols of Cretaceous age in Istria, Croatia.–*Chinese Science Bulletin*, 44, Suppl. 1, Climatic Change: Paleopedological and Soil Rocks Magnetic Approaches, 145–151, Beijing.

PELEG., Y. A, SEIFERT., H, PETERSON L. D. (2008): *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen.

PREKALJ, B. (2012): Utjecaj erozije tla vjetrom na fizikalne i kemijske značajke erozijskog nanosa na području Čepić polja

RAPP, A. (1984): Are terra rosa soils in Europe eolian deposits from Afrika?. *Geologiska Foreninges et Stocholm Forhandlingar*, 105, 161-168.

SLOVENEĆ, D. (2011): *Opća mineralogija*.–Rudarsko-geološko-naftni fakultet Sveučilišta u Zagrebu - Zagreb; 350 str.

STILINOVIĆ, B., HRENOVIĆ, J. (2009): *Praktikum iz bakteriologije*

ŠINKOVEĆ, B. (1974): Jurski glinoviti boksiti zapadne Istre, *Geološki vjesnik*, 27, 217-226.

- ŠKORIĆ, A. (1979): Dvoslojni profili tla na području terra rose u Istri. *Zemljište i biljka*, 28, 111-131.
- ŠKORIĆ, A. (1986): Postanak, razvoj i sistematika tla. Posebno izdanje poljoprivredne znanstvene smotre, Zagreb, 172str.
- ŠKORIĆ, A., FILIPOVSKI, G., ČIRIĆ, M., (1985): Klasifikacija tala Jugoslavije, Sarajevo. cit.u. (ŠKORIĆ, 1986)
- ŠKORIĆ, A., 1987. Pedosfera Istre. Projektni Savjet Pedološke Karte Hrvatske, Posebna izdanja, knjiga 2, Zagreb, 192str.
- TOMAŠIĆ, E. (2013): Tlo kao jedna od značajki istarskog „terroira“; Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, 91.str.
- TOWNER K. (2006): The genus *Acinetobacter*; The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Gamma Subclass, Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt. Springer, New York. Volume 6, pp. 746-758.
- VELIĆ, I., MATIČEC, D., VLAHOVIĆ, I. i TIŠLJAR, J. (1995): Stratigrafski slijed jurskih idonjokrednih karbona (bat-gornji alb) u zapadnoj Istri (Stratigraphic succession of Jurassic and Lower Cretaceous carbonates (Bathonian–Upper Albian) in western Istria).- 1.hrvatski geološki kongres (Opatija 1995)-Vodič ekskurzije (ur. Vlahović, I. & Velić, I.), Ekskurzija A, Zagreb, 31-66.
- VELIĆ, I., TIŠLJAR, J. (1988): Litostratigrafske jedinice u dogeru i malmu zapadne Istre (zapadna Hrvatska, Jugoslavija); *Geološki vjesnik*, 41, 25–49, Zagreb.
- VELIĆ, I., TIŠLJAR, J. i SOKAČ, B. (1989): The variability of thicknesses of the Barremian, Aptian and Albian Carbonates as a Consequence of Changing Depositional Environments and Emersions in Western Istra (Croatia, Yugoslavia).– *Mem. Soc. Geol. Italia*, 40, 209–218, Roma.
- VELIĆ, I., TIŠLJAR, J., MATIČEC, D., VLAHOVIĆ, I. (1995b): Opći prikaz geološke građe Istre; U: Vlahović, I. & Velić, I. (ed.): Vodič ekskurzija, 1. Hrvatski geološki kongres, 5-30, Zagreb.

VELIĆ, I., TIŠLJAR, J., VLAHOVIĆ, I., MATIČEC, D (1995a): Platformni facijesi od gornjega titona do gornjeg alba u zapadnoj Istri i prijelaz u tempestitne, kliniformne i rudistne biolititne facijese donjega cenomana u južnoj Istri (ekskurzija B); U: Vlahović, I., Velić, I. (ed.): Vodič ekskurzija, 1. Hrvatski geološki kongres, 67–110, Zagreb

VLAHOVIĆ, I., TIŠLJAR, J., MATIČEC, D. i VELIĆ, I. (2008): Geologija Istre–Istarska enciklopedija. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. (URL:<http://istra.lzmk.hr/> )

VLAHOVIĆ, I., TIŠLJAR, J., VELIĆ, I. i MATIČEC, D. (2005): Evolution of the Adriatic Carbonate Platform: palaeogeography, main events and depositional dynamics. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 220(3-4), 333-360. znanstvene smotre, Zagreb, 172str.

Web izvori:

<http://istra.lzmk.hr>

<http://istrapedia.hr>

<http://enciklopedija.hr>

<http://glossary.periodni.com>

<http://istra-istria.hr>