

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Ana Brtan

Međuvrsna interakcija u nastajanju biofilma

Završni rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

MEĐUVRSNA INTERAKCIJA U NASTAJANJU BIOFILMA

Ana Brtan

Rad je izrađen na: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju

Mentor: dr. sc. Goran Palijan

Kratak sažetak završnog rada:

Analizom interakcija između svih mogućih kombinacija šest vrsta izoliranih iz tla preko količine stvorenog biofilma pokazano je da prevladava redukcija stvaranja biofilma u 55% slučajeva te u 19% dolazi do indukcije stvaranja biofilma. 19% slučajeva je svrstano u kategoriju neodređenog, iznad prosjeka monokultura, ali ispod indukcije. 2% uzoraka je pokazalo količinu stvorenog biofilma kao zbroj količina biofilma monokultura, te 5% uzoraka pokazuje antagonističku redukciju u stvaranju biofilma.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biofilm, kompeticija, antagonizam, sinergija

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne u sveučilišne knjižnice u Zagrebu

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Biology

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

INTERSPECIES INTERACTIONS IN BIOFILM FORMATION

Ana Brtan

Thesis preformed at: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju

Supervisor: Goran Palijan, PhD

Short abstract:

Through analysis of interspecies interactions by produced biofilm amount between all possible combinations of six species isolated from soil it was established that reduction of biofilm production prevailed with 55% of all analysed combinations. In 19% of all combinations biofilm induction was established. Also, 19% of combinations was classified as unresolved, above monoculture averages but below induction. 2% of combinations showed an amount of produced biofilm as the sum of biofilm amount that the monocultures produced and 5% of combinations showed antagonistic reduction in biofilm formation.

Original in: Croatian

Key words: biofilm, competition, antagonism, synergism

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Thesis Repository of the National and University Library in Zagreb

SADRŽAJ

UVOD.....	1
MATERIJALI I METODE.....	4
REZULTATI.....	6
RASPRAVA.....	11
ZAKLJUČAK.....	17
LITERATURA.....	18

UVOD

Većina bakterija prebiva u višestaničnim zajednicama koje mogu biti pričvršćene za biotičku ili abiotičku podlogu te prebivaju u samoproizvedenom polimernom matriksu koji se sastoji od polisaharida, proteina i DNA (Madsen i sur., 2016; Burmølle i sur., 2014; Høiby i sur., 2010). Ovakav obraštaj nazivamo biofilm te on pruža nekoliko bitnih prednosti bakterijama u biofilmu u usporedbi s njihovim planktonskim ekvivalentima što ih čini sveprisutnima u većini prirodnih staništa uključujući ljudsko tijelo (Liu i sur., 2016). Biofilmovi su također veoma bitni iz kliničkih razloga što uzrokuju različite tipove kroničnih infekcija (Burmølle i sur., 2014). Prema današnjim procjenama, biofilm je uključen u oko 65% svih bakterijskih infekcija (Jamal i sur., 2017). Stvaranje biofilma je povezano s različitim svojstvima koji bakterijama u biofilmovima daju prednost nad planktonskim oblicima: viša otpornost prema antimikrobnim tvarima (Harrison i sur., 2007), zaštita od sastavnih dijelova imunskog sustava domaćina (Jesaitis i sur., 2003), bolje iskorištenje sekretnih spojeva (Xavier, 2011) i druge prednosti. Smatra se da su ove otpornosti rezultat različite ekspresije gena koji su specifični za biofilm te se eksprimiraju samo u biofilmu, a ne eksprimiraju se u planktonskom okruženju (Lee i sur., 2013). Čak 1-2% čitavog genoma (79 gena u *Escherichia coli* i 73 gena u *Pseudomonas aeruginosa*) te više od 800 proteina su različito eksprimirani u usporedbi biofilmskih i planktonskih bakterija (Schembri i sur., 2003; Sauer i sur., 2002; Whiteley i sur., 2001).

Većina istraživanja koja su se bavila biofilmom provedena su na monokulturama te je ovo područje dobro istraženo. Ipak, biofilmovi u prirodnim staništima se uglavnom sastoje od nekoliko vrsta te ovakve tipove biofilma veoma slabo poznajemo. Ipak, dokazano je da međuvrsne interakcije u biofilmu igraju veliku ulogu u stvaranju biofilma, njegovoj fizičkoj i prostornoj strukturi te čak i u njegovoj funkciji (Burmølle i sur., 2006; Lee i sur., 2013) iako je još uvijek nepoznat ukupni opseg utjecaja tih interakcija s obzirom da je to područje koje je i danas vrlo slabo istraženo. Vrste koje borave u ovakvim mikrobnim zajednicama mogu utjecati jedne na druge antagonistički preko kompeticije za resurse i stvaranja inhibitornih spojeva (Rao i sur., 2005) te sinergično pomoću sintrofije, indukcije biofilma ili povišene otpornosti na različite spojeve (Burmølle i sur., 2014).

Bakterije u biofilmu su mnogo zaštićenije od raznih stresnih utjecaja u usporedbi s bakterijama koje žive u planktonu (Jefferson, 2004). Ova pojava se objašnjava kombinacijom izmjenjene strukture i smanjene difuzije tvari kroz matriks biofilma kao i

izmjenjenom genskom ekspresijom te umanjenom brzinom rasta stanica unutar biofilma (Mah i O'Toole, 2001). Ovaj efekt se pokazao sinergistično pojačanim u biofilmovima koji se sastoje od nekoliko vrsta. Demonstrirano je da su viševrsni biofilmovi otporniji na više razine klora u vodi od jednovrsnih biofilmova i planktonskih bakterija (Schwering i sur., 2013).

Velik broj kroničnih infekcija su uzrokovane bakterijama koje se nalaze u biofilmu te ih je vrlo teško iskorijeniti i liječiti zbog već navedenog razoga jače otpornosti u viševrsnim biofilmovima (Burmølle i sur., 2014). Također, osim same otpornosti, međuvrsne interakcije u biofilmu utječu i na ozbiljnost infekcija. Pokazano je zakašnjelo zarastanje rana kada je rana inficirana dvovrsnim biofilmom u kojemu se nalaze *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Rana je zarastala sporije nego rane koje nisu inokulirane te rane koje su inokulirane samo jednom od dvije vrste (Pastar i sur., 2013).

Jedna od veoma bitnih uloga biofilma u prirodi je razlaganje velikog broja različitih spojeva. Dokazano je da razgrađuju organske, kao i anorganske spojeve te danas imaju ulogu u pročišćavanju otpadnih voda kao i u bioremedijaciji (Burmølle i sur., 2014). Fiziokemijska struktura biofilma dopušta suživot različitih bakterija kao što su aerobi i anaerobi. Primjerice, nitrifikatori kojima je potreban kisik te anaerobni denitrifikatori mogu prebivati jedni drugima u blizini zauzimajući različite slojeve biofilma (Terada i sur., 2003).

Već je demonstrirano da u viševrsnim biofilmovima može doći do indukcije stvaranja biofilma. Primjerice, Filoche i sur. (2004) su pokazali da je stvaranje biofilma *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus plantarum* u jednovrsnim biofilmovima vrlo slabo. Ipak, kada su uzgojeni u kulturi s vrstama iz roda *Actinomyces*, *L. rhamnosus* povećava stvaranje biofilma 7-20 puta, a *L. plantarum* 4-7 puta u usporedbi s jednovrsnim biofilmom. Ovakvu interakciju nazivamo sinergističnim efektom kojeg definiramo kao povećanje količine stvorenog biofilma u kokulturi u usporedbi s količinom najboljeg proizvođača među monokulturama (Ren i sur., 2015). Smatra se da je indukcija u stvaranju biofilma relativno česta pojava u prirodi iz razloga što biofilm daje određeni stupanj zaštite svim vrstama unutar njega te zato što su biofilmovi prostorno strukturirane zajednice koje mogu blisko udružiti fundamentalno različite vrste bakterija koje imaju različite životne zahtjeve i time omogućavaju međusobne interakcije (Madsen i sur., 2016).

Ove interakcije pokazuju da je viševrsni biofilm drugačiji i kompleksniji od jednovrsnog biofilma te da se rezultati koji su dobiveni na jednovrsnim biofilmovima ne mogu primjenjivati u stvarnim primjerima biofilma iz okoliša.

U ovom radu se ispituje koliko i kako međuvrsna interakcija utječe na indukciju i redukciju pri stvaranju biofilma, a ispituje se na šest vrsta koje su izolirane iz tla za koje se smatra da su prethodno već koegzistirale u njihovom prirodnom okruženju.

MATERIJALI I METODE

Sve upotrebijene kulture u ovom radu su izolirane iz tla. Korišteno je ukupno šest prethodno neodređenih kultura označenih redom oznakama a,b,c,d,e,f. Kulture su nasadene na kosi agar te inkubirane 24 sata na 25°C. Nakon inkubacije priređene su suspenzije stanica sa apsorbancom $OD_{600}=0,068$ sa odstupanjima od $\pm 4.4\%$.

Tablica 1: OD_{600} suspenzije stanica

Kultura	OD600
a	0,071
b	0,068
c	0,070
d	0,067
e	0,068
f	0,066

Nakon pripreve suspenzija određene apsorbance pri 600nm, suspenzije pojedinih kultura te miješane kulture su prve unešene u mikrotitarske pločice, a tek zatim po 20 μ L bujona decimalnog razrjeđenja 1:100, 40 μ L medija M63 5x koncentriranog te 10 μ L otopine glukoze koncentracije 800mg/mL. Također, za svaki uzorak su pripremljeni triplikati. Kako bi u svakom bunariću volumen ukupnog uzorka bio jednak, ukupni volumen suspenzija stanica u svakom bunariću iznosi 130 μ L. U uzorcima s pojedinim kulturama se unosi ukupni volumen od 130 μ L jedne kulture, u uzorcima s dvije kulture volumen pojedine iznosi 65 μ L, s tri kulture 43,3 μ L, četiri kulture 32,5 μ L, pet kultura 26 μ L te konačno u uzorcima sa šest kultura volumen pojedine iznosi 21,7 μ L. U kontrolnim uzorcima, umjesto suspenzije stanica dodavano je 130 μ L sterilne vode, te osim kontrolnih uzoraka mjerena je i apsorbancu uzoraka vode. Nakon izrade uzoraka u mikrotitarskim pločicama, pločice su ponovno inkubirane 24h pri 25°C kako bi se dozvolio razvitak biofilma. Nakon inkubacije, sve pločice su tri puta uzastopno isprane u destiliranoj vodi te bojane. Bojanje je provedeno pomoću 0,1% vodene otopine crystal violet boje. U svaki bunarić je dodavano 225 μ L otopine boje koja je u pločicama ostavljena na 15 minuta. Po isteku 15 minuta, pločice su ponovno tri puta uzastopno isprane u destiliranoj vodi te su

zatim ostavljene na sušenju na zraku 24 sata. Nakon sušenja, u pločice koje su sadržavale uzorke, vodu i kontrolne uzorke je dodano po 1mL 96% otopine etanola. Ekstrakcija se provodila 1 sat po čijem isteku se provodilo mjerenje apsorbance uzoraka pri valnoj duljini 588nm.

REZULTATI

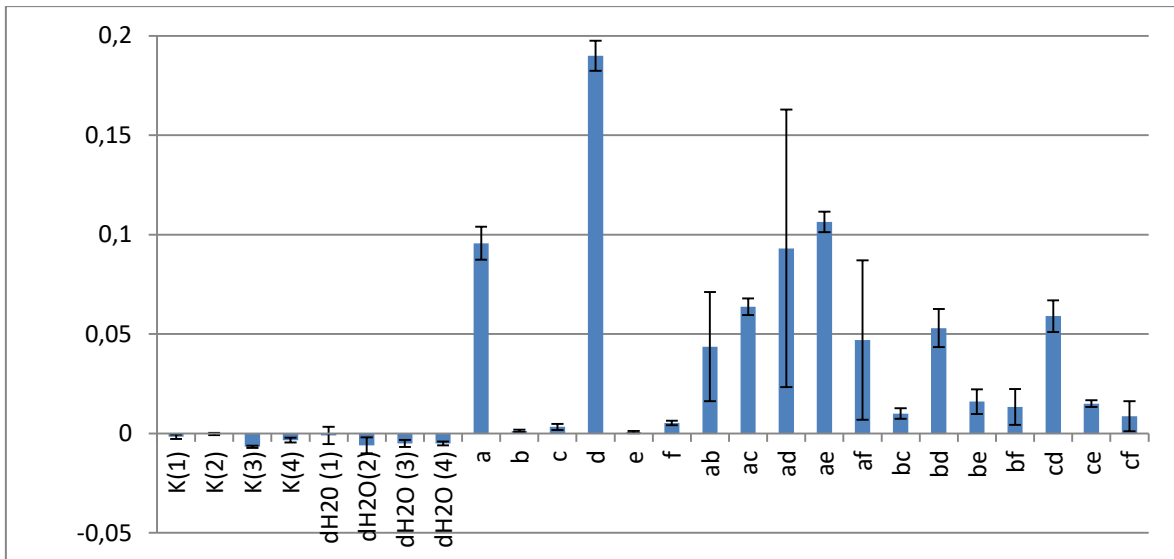
U ovom radu je ukupno procjenjena sposobnost stvaranja biofilma 48 uzoraka što uključuje šest jednovrsnih uzoraka te njihove 42 kombinacije kao viševrsni uzorci. Konačni rezultati mjerenja pri valnoj duljini 588nm su prikazani u Tablici 2. te na Slici 1. i Slici 2. zajedno sa pripadajućim standardnim devijacijama (stdev.s) koje su računane u Microsoft Excelu 2010.

Tablica 2: OD₅₈₈ uzoraka

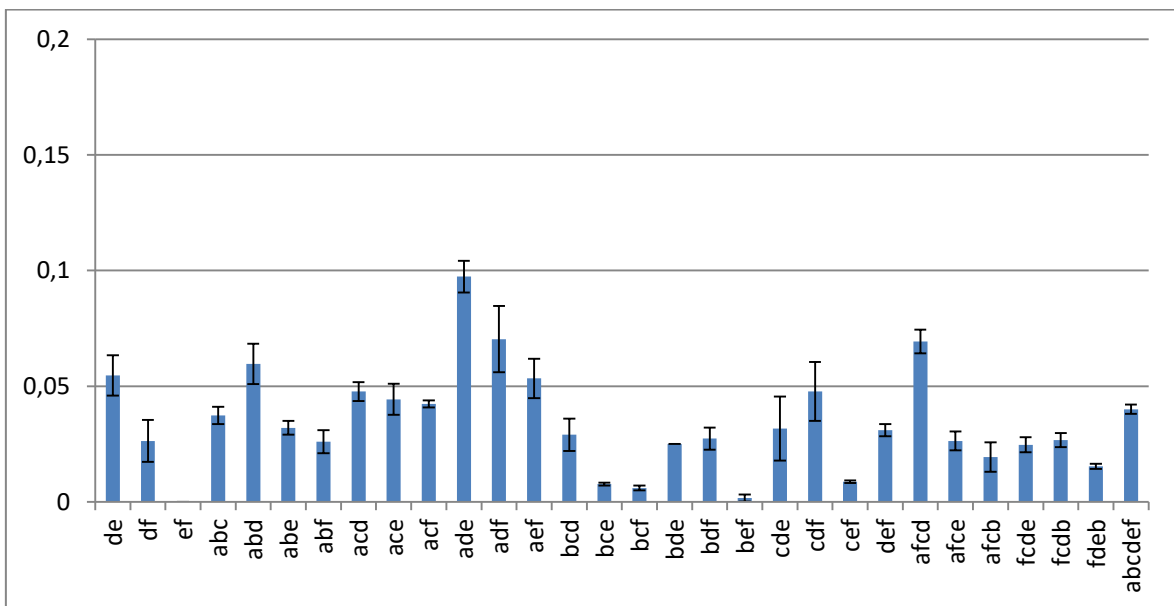
Uzorak	1. mjerenje	2. mjerenje	3. mjerenje
K(1)	-0,003	-0,001	-0,001
K(2)	0	0	-0,001
K(3)	-0,006	-0,007	-0,007
K(4)	-0,002	-0,004	-0,004
dH2O (1)	0,002	0,001	-0,006
dH2O(2)	-0,002	-0,01	-0,006
dH2O (3)	-0,006	-0,006	-0,003
dH2O (4)	-0,006	-0,005	-0,004
a	0,105	0,093	0,089
b	0,002	0,001	0,001
c	0,005	0,003	0,002
d	0,191	0,197	0,182
e	0,001	0	0,001
f	0,006	0,004	0,006
ab	0,061	0,058	0,012
ac	0,065	0,067	0,059
ad	0,147	0,0142	0,118
ae	0,112	0,102	0,105
af	0,001	0,066	0,074
bc	0,013	0,008	0,009
bd	0,054	0,062	0,043
be	0,018	0,021	0,009
bf	0,022	0,014	0,004
cd	0,056	0,068	0,053
ce	0,017	0,014	0,014
cf	0,016	0,009	0,001
de	0,062	0,057	0,045

df	0,033	0,016	0,03
ef	0	0	0
abc	0,04	0,033	0,039
abd	0,067	0,062	0,05
abe	0,035	0,029	0,032
abf	0,031	0,021	0,026
acd	0,052	0,044	0,047
ace	0,05	0,037	0,046
acf	0,041	0,042	0,044
ade	0,092	0,105	0,095
adf	0,081	0,076	0,054
aef	0,045	0,062	0,053
bcd	0,034	0,021	0,032
bce	0,008	0,007	0,008
bcf	0,006	0,005	0,007
bde	0,025	0,025	0,025
bdf	0,031	0,022	0,029
bef	0,002	0	0,003
cde	0,047	0,028	0,02
cdf	0,054	0,056	0,033
cef	0,009	0,008	0,009
def	0,03	0,029	0,034
afcd	0,065	0,068	0,075
afce	0,031	0,024	0,024
afcb	0,012	0,023	0,023
fcde	0,026	0,021	0,027
fcdb	0,024	0,03	0,026
fdeb	0,016	0,014	0,016
abcdef	0,042	0,04	0,038

Iz priložene Tablice 2. te Slike 1. se može iščitati da je od monokultura najbolji proizvođač biofilma kultura pod oznakom d, a na drugom mjestu se nalazi kultura a, a najslabiji proizvođači su kulture e i b.



Slika 1: OD₅₈₈ srednjih vrijednosti izmjerenih uzoraka sa odgovarajućom standardnom devijacijom



Slika 2: OD₅₈₈ srednjih vrijednosti izmjerenih uzoraka sa odgovarajućom standardnom devijacijom

Slika 2. nam prikazuje da kokultura ade proizvodi najveću količinu biofilma od svih kombinacija, a sljedeća najproduktivnija kokultura je adf. Najslabiji proizvođač biofilma od svih uspoređenih kombinacija prikazanih na Slici 1. i Slici 2. je kokultura ef koja uopće nije stvarala biofilm, iako su u monokulturama i kultura e i kultura f stvarale malu količinu biofilma.

Tipove interakcija između vrsta smještamo u jednu od pet kategorija: indukcija, redukcija, antagonistička redukcija, suma monokultura te nerazrješeno (Madsen i sur., 2016). Indukcija stvaranja biofilma nastaje kada kokultura proizvede više biofilma od najboljeg pojedinačnog proizvođača te se smatra sinergičnom interakcijom među vrstama. Ako u kokulturi ne dolazi do kompeticije za resursima, očekuje se da će svaka vrsta stvarati istu količinu biofilma kao i u monokulturi te se kao rezultat očekuje zbroj količina mase biofilma monokultura. Kod redukcije dolazi do stvaranja manje količine biofilma u kokulturi nego u prosjeku monokultura te konačno, kod antagonističke redukcije se stvara manja količina biofilma u kokulturi od najslabijeg producenta biofilma koji je prisutan u kokulturi. Također, prema Madsen i sur. (2016) postoji i peta kategorija u koju svrstavamo sve iznad prosjeka monokultura ali ispod indukcije, takve biofilmove nazivamo nerazrješanim. Za sve izračune u procesu klasifikacije korištene su srednje vrijednosti dobivene iz triplikata uzoraka. Uspoređivana je srednja vrijednost izmjerenih apsorbanci triplikata kokultura sa apsorbancama najboljih i najslabijih pojedinih proizvođača u kokulturi, kao i sa sumom te prosjekom svih monokultura prisutnih u kokulturi. Dobiveni rezultati klasifikacije uzoraka su prikazani u Tablici 3. Kao što je prikazano, više od pola uzoraka je svrstano u kategoriju redukcije, a najmanje u kategoriju sume, a odmah do nje se nalazi i kategorija antagonističke redukcije, dok su kategorija indukcije i kategorija neodređenog po broju svrstanih uzoraka jednake.

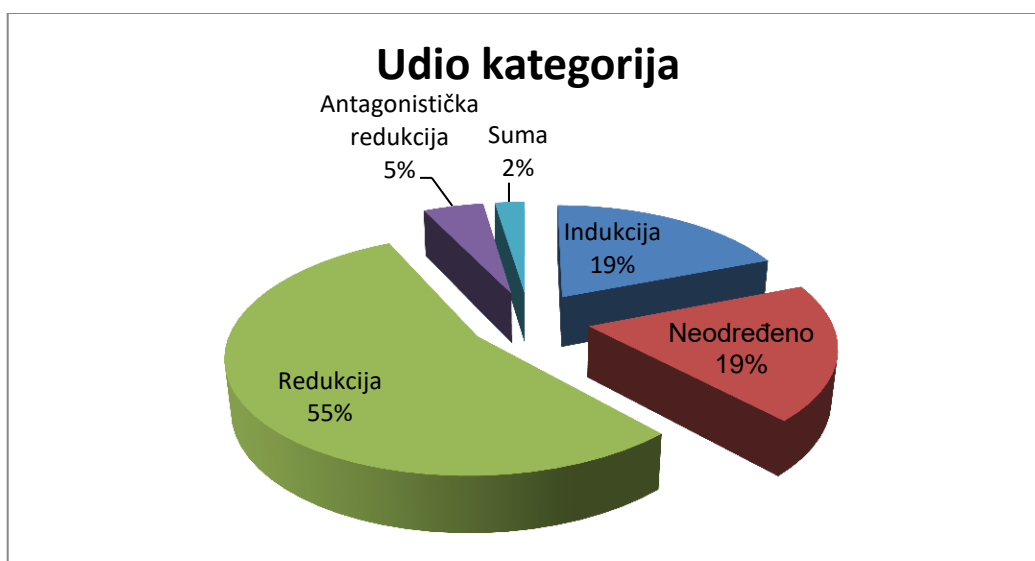
Tablica 3: Uzorci svrstani po pripadajućim kategorijama

Indukcija	Neodređeno	Redukcija	Antagonistička redukcija	Suma
ae, bc, be, bf, ce, bce, bcf, cef	ac, af, abc, acf, ade, aef, afce, abcdef	ab, bd, cd, de, df, abd, abe, abf, ace, acd, adf, bcd, bde, bdf, bef, cde, cdf, def, afcd, afcb, fcde, fcdb, fdeb	ad, ef	cf

U kategoriji redukcije, najzastupljenija monokultura u kombinacijama je kultura d koja se nalazila u 17 od 23 kombinacije, a kultura b je bila prisutna u 12 kombinacija. U kategoriji indukcije, kulture b, c i e su bile jednako zastupljene u 5 od 8 kombinacija, a najmanje zastupljena kultura je kultura d koja nije prisutna ni u jednoj kombinaciji unutar

ove kategorije. Unutar kategorije neodređenih uzoraka, kultura a je prisutna u svih 8 kombinacija, a najmanje prisutna je kultura b sa samo 2 prisutne kombinacije.

Postotci zastupljenosti kategorija su prikazani na Slici 3. Prema ovim podacima, međuvrsne interakcije u stvaranju biofilma u 55% slučajeva (23 uzorka) rezultiraju redukcijom produkcije biofilma u usporedbi s indukcijom koja iznosi samo 19% (8 uzoraka). U neodređenu kategoriju je svrstano 19% uzoraka, u kategoriju antagonističke redukcije 5% (2 uzorka), a u kategoriju sume samo 2% (1 uzorak).



Slika 3. Udio kategorija

RASPRAVA

Prirodni biofilm je u većini slučajeva sastavljen od nekoliko vrsta bakterija, a ne samo od jedne te je za prirodne biofilme karakteristična velika gustoća stanica te njihova prostorna bliskost (Li i Tian, 2012). Ovo je slučaj osobito u biofilmu tla koje je bogato nutrijentima što omogućava stvaranje ogromnog broja biofilmova sa velikom bioraznolikošću. U uvjetima velike bioraznolikosti, dostupnih nutrijenata i drugih ograničavajućih čimbenika olakšano je stvaranje različitih međuvrskih interakcija između bakterija unutar biofilma (Ren i sur., 2015).

Prihvaćena je činjenica da su bakterije društvena bića te da samim time imaju i društvena ponašanja koja se danas sve više otkrivaju i shvaćaju. Društvena ponašanja bakterija su veoma bitna iz razloga što bitno utječu na druge bakterije, a time i na strukturu te stvaranje mnogovrsnih biofilmova u kojima se te bakterije nalaze. Činjenica je da društveni fenotipovi bakterija utječu na evolutivni fitnes bakterija koje se nalaze oko njih (Nadell i sur., 2016). Društveni fenotip je fenotip koji ima pozitivan ili negativan utjecaj na reproduktivnost drugih jedinki koji je djelomično evoluirao baš zbog tog efekta. Izmjenom reproduktivne brzine susjednih stanica te utjecajem na mogućnost njihovog preživljavanja, društveni fenotipi utječu na strukturu biofilma što mijenja njegovu funkciju te u slučaju patogenih bakterija, njihovu virulenciju (Inglis i sur., 2009; Mitri i sur., 2011). Zbog takvih utjecaja, u istraživanjima biofilma se mora uzeti u obzir ravnoteža između kompeticije i kooperacije među bakterijama u biofilmu. Društvena evolucija pokušava objasniti društveni fenotip te iznosi kako ju određuju tri faktora: troškovi fenotipa djelujuće bakterije, efekti na fitnes primatelja te genetska povezanost dvaju bakterija. Ako su stanice u interakciji istog genotipa, kooperativne interakcije su vjerojatnije, ali ako su različitog genotipa kompeticija je favorizirana (Nadell i sur., 2016). Također, veoma bitnu ulogu u određivanju interakcija unutar biofilma ima i prostorna struktura, osobito za kooperativne interakcije kroz spojeve koji se izlučuju u ekstracelularni prostor, a imaju pozitivan učinak na stanice u okolini. Ako u biofilmu postoje nakupine stanica istog genotipa pri visokoj gustoći naseljenosti, kooperativne interakcije su favorizirane s obzirom da su susjedne stanice na koje se djeluje klonovi. Ipak, ako u biofilmu postoji nekoliko vrsta koje su prostorno izmješane, uglavnom dolazi do antagonističkih interakcija, iako se može dogoditi da između njih prevladava komenzalizam ili čak i mutualizam (Mitri i sur., 2011; Nadell i sur., 2016). Mnogi mikroorganizmi zahtijevaju prisutnost javnih dobara koje

koriste kako bi mogli efikasno iskorištavati rezervoare nutrijenata iz okoliša. Javna dobra su uglavnom sekundarni metaboliti čija je produkcija zahtjevna te iz tog razloga može doći do pojave mutanata koji iskorištavaju stanice koje produciraju javna dobra bez vlastitog prinosa (West i sur., 2007; Boyle i sur., 2013). Najpoznatiji primjer stvaranja javnih dobara je *Pseudomonas aeruginosa* koji je također svojevrsni model mikrobijalne socijalne evolucije. *P. aeruginosa* stvara siderofor pyoverdinin, malu molekulu koja služi prikupljanju željeza. Kada je željezo u malim koncentracijama, produkcija siderofora je korisna te producirajuće stanice nadmašuju mutante, no u situaciji kada željeza ima više nego dovoljno, mutanti nadmašuju producirajuće stanice kada su uzgajani u čistim kulturama. Do takve kompetitivne prijetnje dolazi zbog metaboličkog troška stanica koje produciraju siderofore. U miješanim kulturama, mutanti također nadmašuju producirajuće bakterije jer koriste siderofore bez uloženog troška u njihovu produkciju (West i sur., 2007).

Regulacija društvenih ponašanja se uglavnom provodi preko smanjenja reproduktivnog utroška fenotipa. Osim smanjenja troška, regulacija društvenih ponašanja povećava vjerojatnost da će njihov društveni učinak djelovati na ciljane stanice (Nadell i sur., 2016). Mnogo kooperativnih sekrecijskih fenotipa su regulirani preko *quorum sensing*-a koji uključuje izlučivanje i reagiranje na autoinducere, molekule koje ukazuju na gustoću stanica (Schuster i sur., 2013; Ng i Bassler, 2009). Uz to, regulacija se provodi i osjećanjem stresora kao što je izgladnjivanje i degradacija stanične stijenke koje kompetitor uzrokuje u blizini ciljane stanice (Cornforth i Foster, 2013; Nadell i sur., 2016).

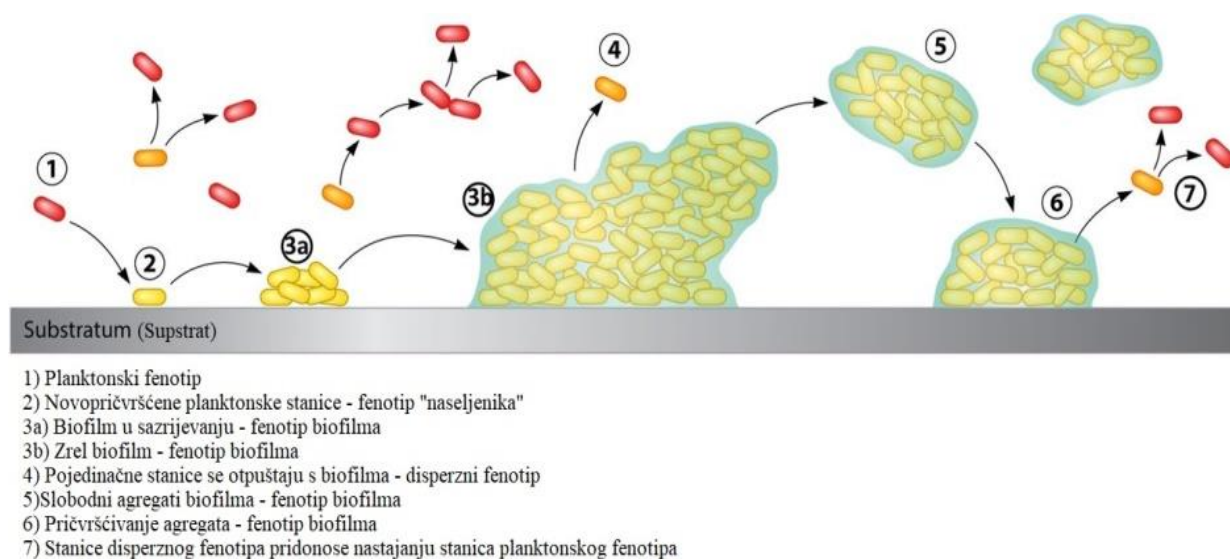
Društvene interakcije utječu na strukturu i prostorni razmještaj fenotipova u populaciji. Primjerice, sekrecija javnih dobara preko ograničenog kretanja te ograničenih nutrijenata u biofilmu može dovesti do stvaranja nakupina nekog genotipa na jednom mjestu. Osim toga, mutualizam i antagonističke interakcije također utječu na raspored genotipa u zajednicama (Nadell i sur., 2010). Također, rast biofilma je uglavnom ograničen na stanice koje se nalaze na rubu naseljenog područja ili zajednice, tako da reproduktivni fitness stanice ovisi o njoj udaljenosti od fronte grupe, odnosno o njenom fizičkom položaju u zajednici (Hallatschek i Nelson, 2007).

Prostorna segregacija vrsta u biofilmu pogoduje interakcijama između stanica istog genotipa te potiče ulaganje u kooperativne odnose koji povisuju ekološku produktivnost segregiranih klonalnih grupa te kao rezultat potiče i produktivnost biofilma (Nadell i sur., 2016). Do miješanja vrsta u biofilmu može doći zbog čestog raspršenja i rekolonizacije,

homogene rasprostanjenosti nutrijenata kao i difuzne pokretljivosti stanica (Nadell i sur., 2010). Očekivanje kod miješanja različitih vrsta je da će doći do kompeticije te da će kompetitivni fenotip prevladati. Ovakvi odnosi su doveli do evolucije mnogih mehanizama kompeticije kao što su brz rast, različit put do resursa te iskorištavanje tih resursa (Nadell i sur., 2016). Ipak, najpoznatiji mehanizam kompeticije u bakterija je proizvodnja toksina širokog i uskog spektra, što uključuje i različite vrste antibiotika. Danas se smatra da antibiotici u prirodi ne služe isključivo kao kompetitivno sredstvo, već da u subletalnim dozama mogu služiti kao kooperativni signali između vrsta koje sudjeluju u održavanju homeostaze čitave bakterijske zajednice (Linares i sur., 2006; Oliveira i sur., 2015). Antibiotici ipak primarno imaju ulogu eliminacije kompeticije te tako pružaju dobrobit onim genotipima koji su na njih otporni. Eliminirane stanice se nakon lize koriste kao sirovi materijali što uključuje i njihov genetski materijal (Borgeaud i sur., 2015). Osim štetnih djelovanja, miješanje vrsta unutar biofilma može imati i korisne posljedice za bakterije u interakciji. Primjerice, *Bacteroides* spp. probavlja polisaharide i izlučuje acetat kao metabolički produkt koji se dalje može iskoristiti kao izvor ugljika drugim bakterijama (Karlsson i sur., 2011). Također, može doći i do stvaranja sintrofičkih veza među bakterijama u kojima metabolički produkti jedne vrste koriste drugoj vrsti, a druga vrsta zauzvrat na neki način potpomaže prvoj. Dolfing i sur. (2008) su pokazali rast zajednice na metanoatu. Zajednice su se sastojale od *Moorella* sp. ili *Desulfovibrio* sp. i partnerske bakterija koja konzumira vodik. Nakon dodatka metanoata kao jedinog izvora ugljika, porasti biomase su se očitovali samo u kokulturama sa vodik-konzumirajućim partnerom ili u kulturama gdje je vodik dodano oduziman iz sustava što ukazuje na sintrofičku degradaciju vodika.

Međuvrsne interakcije između bakterija imaju utjecaj već pri samom stvaranju biofilma (James i sur., 1995). Formacija biofilma je veoma kompleksan proces u kojem bakterije iz planktonskog oblika života prelaze u sesilni što je prikazano na Slici 4. Stvaranje biofilma se može podijeliti na nekoliko faza: pričvršćivanje, razvoj biofilma te odvajanje. U fazi pričvršćivanja, planktonske stanice se pričvršćuju za podlogu. U pravilu, što je podloga grublja i hidrofилnija, olakšava se pričvršćivanje stanica na nju te se biofilm razvija brže. Nakon pričvršćivanja stanica na podlogu, one prolaze kroz diobu te se stvaraju mikrokolonije i počinje proizvodnja polimernih tvari koje čine matriks biofilma te nastaju vodom ispunjeni kanali koji služe za transport nutrijenata unutar biofilma. Naposljetku, dolazi do odvajanja pojedinačnih ili grupa stanica kao posljedica rasta ili

odvajanja agregata biofilma koji sadrže bakterijske stanice (Donlan, 2001; Jamal i sur., 2015).



Slika 4: Shema formiranja biofilma (Web 1)

Interakcije među vrstama započinju već pri pričvršćivanju stanica za podlogu. Dokazano je da pričvršćivanje jedne vrste može negativno, neutralno i pozitivno utjecati na pričvršćivanje druge vrste za podlogu. (James i sur., 1995, navedeno u McEldowney i Fletcher, 1987). Također, danas je poznato da međuvrsne interakcije mogu rezultirati povećanim stvaranjem biofilma, zaštitom slabije otpornih vrsta te izmjenjenom funkcijom samog biofilma (Burmølle i sur., 2014). Postoje razni tipovi odnosa između bakterijskih vrsta, ali se oni generalno mogu podijeliti na kompeticijske te sinergične odnose. Odnosi među vrstama su veoma komplicirani te njihova kompleksnost dodatno raste sa brojem vrsta unutar zajednice iz razloga što prostorna bliskost stanica pogoduje komunikaciji između njih preko kemijskih signala (Røder i sur., 2016). U ovakvim kompleksnim uvjetima može doći do pojave podjele rada te i raznih kooperativnih djelatnosti. Ipak kako bi se održala ravnoteža između stanica, dolazi do pojave i kompeticijskih i antagonističkih odnosa (Li i Tian, 2012).

Gusta naseljenost stanica koje imaju slične životne zahtjeve dovodi do kompeticije za nužne ograničene resurse kao što je svjetlo, nutrijenti te naravno, životni prostor. Ekološka kompeticija se dijeli na dvije grupe: eksploatatorsku te interfernu kompeticiju.

Eksploatatorska kompeticija se odnosi na odnose između organizama u kojemu jedan organizam ograničava mogućnost pristupa i dostupnost resursa drugom organizmu. Primjerice, Yamamoto i sur. (2010) su proveli eksperiment u kojemu su prikazali proces kompeticije za kisik između *Brevibacillus* sp. i *Pseudoxanthomonas* sp. U početnim fazama je obligatni aerob *Brevibacillus* dominirao, ali se situacija izmjenila zbog jake kompeticije za kisik te je u kasnijim fazama dominirao fakultativni aerob *Pseudoxanthomonas*.

Interferna kompeticija je pojam kojim označavamo mehanizme koji smanjuju mogućnost preživljavanja drugog organizma. Djeluje preko inhibicije rasta, izmjene okoliša, toksičnih metaboličkih produkata, malih antimikrobnih spojeva, inhibicije adhezije, inhibicije komunikacije između stanica i izmjene razvitka biofilma (Rendueles i Ghigo, 2015).

Sinergični odnosi između različitih vrsta u biofilmu dovode do raznih prednosti ovakvog života. Povišena otpornost na antibiotike, bolje iskorištenje hranjivih tvari preko sintrofije, indukcije stvaranja biofilma te drugih. Točno objašnjenje pojave kooperacije između različitih vrsta bakterija još nije poznato, no jedna od mogućih teorija je hipoteza crne kraljice, koja ovakvu pojavu objašnjava kao posljedicu dugotrajnog suživota. Kako bi se povećao fitnes kolonije, neke vrste „brišu“ neke životne funkcije koje im onda pružaju okolne bakterije. Ovim se razvije dugotrajna ovisnost i nužnost daljnjeg suživota s drugim vrstama koje im pružaju određenu izgublenu funkciju (Morris i sur., 2012).

Da li će odnos između dvije vrste biti singergičan ili kompetitivan uglavnom odlučuje njihova filogenetska povezanost koja određuje i preklapanje njihovih ekoloških niša. Poznato je da srodnije vrste imaju veće izgleda za antagonističke interakcije od onih filogenetski udaljenijih iz razloga što srodnije vrste uglavnom koriste iste ili slične resurse te imaju slične ekološke zahtjeve što dovodi do kompeticije između vrsta za ograničenim faktorima. Iz tog razloga se smatra da je antagonizam najčešći između metabolički sličnih vrsta te da su antagonističke vrste uglavnom generalisti koji izmjenjuju efikasno iskorištavanje manjeg broja resursa za neefikasno iskorištavanje velikog broja resursa te antagoniziranje druge specijalističke vrste (Russel i sur., 2017). Također, društvena ponašanja bakterija ovise o prethodnoj koegzistenciji tih vrsta u prirodnom okolišu, osobito kod blisko srodnih vrsta (Madsen i sur., 2016).

Bakterije izolirane iz tla koje su korištene u ovom radu su kombiniranim kokulturama pokazale sinergične odnose u 19% slučajeva. Ipak, većina radova danas govori o prevladavanju sinergičnih odnosa među različitim vrstama bakterija u biofilmovima. Primjerice, Ren i sur. (2015) su proveli eksperiment sa sedam vrsta bakterija izoliranih iz tla. Rezultati tog eksperimenta su pokazali da 63% četveročlanih kokultura pokazuje sinergične odnose u obliku povećane biomase kokultura u odnosu na monokulture. U dvije kokulture promatrane u ovom radu je količina biomase porasla za više od pet puta u odnosu na monokulture, a deset kokultura koje su pokazale sinergistične odnose su se sastojale od vrsta koje su slabi proizvođači biofilma. Također, u slučaju određene četveročlane kokulture izolirane sa morske alge *Ulva australis* koja se sastojala od *Microbacterium phyllosphaerae*, *Shewanella japonica*, *Dokdonia donghaensis* i *Acinetobacter lwoffii* povećanje biofilma u odnosu na monokulture iznosi više od 167% te uz porast stvaranja biofilma, ova kokultura je pokazala i povećanu otpornost na antimikrobne agente vodikov peroksid i tetraciklin (Burmølle i sur., 2006).

S druge strane, više od pola kombiniranih kokultura u ovom radu je pokazalo smanjenje stvaranja biofilma (55% redukcija, 5% antagonistička redukcija) što ukazuje na postojanje kompetitivnih interakcija među vrstama u kokulturama, kao i moguću filogenetsku srodnost. Makovcova i sur. (2017) su prikazali kompetitivne odnose između bakterija u oralnom biofilmu gdje je količina biomase kokulture *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus enterica* ili *Raoultella planticola* bila manja nego u monofilmu. U radu Rao i sur. (2005) je u kokulturi *Pseudoalteromonas tunicata* potpuno suzbila drugu kompetitivnu vrstu u biofilmu osim ako je druga vrsta pokazivala visoku inhibitornu aktivnost prema *P. tunicata* ili u slučaju ako je ta vrsta bila otporna prema antimikrobnom proteinu koji *P. tunicata* proizvodi. Također, vrste prisutne u oralnom biofilmu *Streptococcus gordinii* i *Streptococcus sanguinis* koriste prisutnost kisika te produkciju vodikovog peroksida (H₂O₂) za efikasnu kompeticiju prema *Streptococcus mutans* (Kreth i sur., 2008).

ZAKLJUČAK

Međuvrsne interakcije u biofilmu su od velike važnosti zbog njihovih utjecaja na strukturu i sastav biofilma, otpornost bakterija koje borave u njemu, njihovu virulenciju te razna druga svojstva. Zbog mogućnosti izmjene ovih svojstava, proučavanje interakcija u biofilmu nam daje nova saznanja koja se mogu koristiti u različitim područjima kao što je kliničko okruženje te razvitak novih tretmana za bolesti uzrokovane bakterijskim biofilmom. Do danas je u većini slučajeva pokazana sinergija između različitih vrsta koje su prethodno u prirodi živjele jedna blizu druge. Ipak, ne trebamo pretpostaviti sinergične odnose jer u nekim slučajevima kompetitivni odnosi prevladavaju. Prema ovdje iznesenim rezultatima, više od pola promatranih kokultura ne pokazuje sinergične već kompetitivne odnose koji se očituju u smanjenju količine biofilma u odnosu na monokulture od kojih se kokultura sastoji. Pretpostavljeno je da su sve korištene vrste u prirodnom okruženju prethodno postojale u blizini jedna druge te stupale u međuvrsne interakcije. Do kompetitivnih odnosa između ovih vrsta dolazi zbog njihove metaboličke sličnosti te filogenetske srodnosti koja dovodi do preklapanja njihovih ekoloških niša. Preklapanje ekoloških niša vrsta ih dovodi u poziciju gdje vrste pokušavaju eliminirati kompeticiju kako bi došle do ograničenih resursa. Eliminacijom kompeticije ili izmjenom njihove reproduksijske brzine i fitnesa dolazi do izmjene količine stvorenog biofilma.

LITERATURA

- Borgeaud S., Metzger L. C., Scignari T., Blokesch M. (2015) The type IV secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science* Vol. 347 (6217), 63-67
- Boyle K. E., Heilmann S., van Ditmarsch D., Xavier J. B. (2013) Exploiting social evolution in biofilms. *Current Opinion in Microbiology* Vol. 16, 207-212
- Burmølle M., Webb J. S., Rao D., Hansen L. H., Sørensen S. J., Kjelleberg S. (2006) Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 72, No. 6, 3916-3923
- Burmølle M., Ren D., Bjarnsholt T., Sørensen S. J. (2014) Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends in Microbiology* Vol. 22, No. 2., 84-91
- Burmølle M. (2015) Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. *Food Microbiology* 51, 18-24
- Cornforth D. M., Foster K. R. (2013) Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nature Reviews Microbiology* Vol. 11(4), 285-293
- Dolfing J., Jiang B., Henstra A. M., Stams A. J. M., Plugge C. M. (2008) Syntrophic Growth on Formate: a New Microbial Niche in Anoxic Environments. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 74, No. 19, 6126-6131
- Donlan R. M. (2001) Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Healthcare Epidemiology* Vol. 33, 1387-1392
- Filoche S. K., Anderson S. A., Sissons C. H. (2004) Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology Immunology* 19, 322-326
- Hallatschek O., Nelson D. R. (2007) Gene surfing in expanding populations. *Theoretical Population Biology* Vol. 73, 158-170
- Harrison J J., Ceri H., Turner R. J. (2007) Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Review Microbiology* Vol. 5, 928-938

- Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35,322-332
- Inglis R. F., Gardner A., Cornells P., Buckling A. (2009) Spite and virulence in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* Vol. 106, No. 14, 5703-5707
- Jamal M., Tasneem U., Hussain T., Andleeb S. (2015) Bacterial Biofilm: It's Composition, Formation and Role in Human Infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol. 4., 1-14
- Jamal M., Ahmad., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M. A., Hussain T., Ali M., Rafiq M., Kamil M. A. (2017) Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* xx, 1-5
- James G. A., Beaudette L., Costerton J. W. (1995) Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* Vol. 15., 257-262
- Jefferson K. K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* Vol. 236(2), 163-173
- Jesaitis A. J., Franklin M. J., Berglund D., Sasaki M., Lord C. I., Bleazarad J. B. (2003) Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization on neutrophil and biofilm interactions. *Journal of Immunology* Vol. 171, 4329-4339
- Karlsson F. H., Nookaew I., Petranović D., Nielsen J. (2011) Prospects for systems biology and modeling of the gut microbiome. *Trends in Biotechnology* Vol. 29, No. 6., 251-258
- Kreth J., Zhang Y., Herzberg M. C. (2008) Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference with *Streptococcus*. *Journal of Bacteriology* Vol. 190, No.13, 4632-4640
- Li Y-H., Tian X. (2012) Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors* Vol. 12, 2519-2538
- Linares J. F., Gustafsson I., Baquero F., Martinez J. L. (2006) Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *PNAS* Vol. 103, No. 51, 19484-19489
- Liu W., Røder H. L., Madsen J. S., Bjarnsholt T., Sørensen S. J., Burmølle M. (2016) Interspecific Bacterial Interactions are Reflected in Multispecies Biofilm Spatial Organization. *Frontiers in Microbiology* Vol. 7:1366

- Lee K. W. K., Periasamy S., Mukherjee M., Xie C., Kjelleberg S., Rice S. A. (2013) Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *The ISME Journal* Vol. 8, 894-907
- Madsen J. S., Røder H. L., Russel J., Sørensen H., Burmølle M., Sørensen S. J. (2016) Coexistence facilitates interspecific biofilm formation in complex microbial communities. *Environmental Microbiology* Vol. 18(8), 2565-2574
- Mah T. F. C., O'Toole G. A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* Vol. 9, No. 1, 34-39
- Makovcova J., Babak V., Kulich P., Masek J., Slany M. Cincarova L. (2017) Dynamics of mono- and dual-species biofilm formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria. *Microbial Biotechnology* 10(4), 819-832
- Mitri S., Xavier J. B., Foster K. R., (2011) Social evolution in multispecies biofilm. *PNAS* Vol. 108, 10839-10846
- Morris J. J., Lenski R. E., Zinser E. R. (2012) The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through Adaptive Gene Loss. *mBio* Vol. 3, No. 2: e00036-12
- Nadell C.D., Drescher K., Foster K. R. (2016) Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 14, 589-600
- Nadell C. D., Foster K. R., Xavier J. B. (2010) Emergence of Spatial Structure in Cell Groups and the Evolution of Cooperation. *PLoS Computational Biology* Vol. 6 (3):e1000716
- Ng W-L., Bassler B. L. (2009) Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annual Reviews of Genetics* Vol. 43, 197-222
- Oliveira N. M., Martinez-Garcia E., Xavier J., Durham W. M., Kolter R., Kim W., Foster K. R. (2015) Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. *PLOS Biology* Vol. 13(8):e1002232
- Pastar I., Nusbaum A. G., Gil J., Patel S. B., Chen J., Valdes J., Stojadinović O., Plano L. R., Tomić-Canić M., Davis S. C. (2013) Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS One* Vol. 8(2):e56846

- Rao D., Webb. J. S., Kjelleberg S. (2005) Competitive Interactions in Mixed-Species Biofilms Containing the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. Applied and Environmental Microbiology Vol 71, No.4., 1729-1736
- Ren D., Madsen J. S., Sørensen S. J., Burmølle M. (2015) High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. The ISME Journal Vol. 9, 81-89
- Rendueles O., Ghigo J-M. (2015) Mechanisms of Competition in Biofilm Communities. Microbiology Spectrum Vol. 3(3), MB-009-2014
- Russel J., Røder H. L., Madsen J. S., Burmølle M., Sørensen S. J. (2017) Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. PNAS Vol.114, No. 40, 10684-10688
- Røder H. L., Raghupathi P. K., Herschend J., Brejnrod A., Knøchel S., Sørensen S. J., Sauer K., Camper A. K., Ehrlich G. D., Costerton J. W., Davies D. G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. Journal of Bacteriology 184(4). 1140-1154
- Røder H. L., Sørensen S. J., Burmølle M. (2016) Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? Trends in Microbiology, Vol. 24(6), 503-513
- Schembri M. A., Kjærgaard, Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. Molecular Microbiology 48 (1), 253-267
- Schuster M., Sexton J., Diggle S. P., Greenberg E. P. (2013) Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing: From Evolution to Application. Annual Review of Microbiology Vol. 67, 43-63
- Schwering M., Song J., Louie M., Turner R. J., Ceri H. (2013) Multi-species biofilms derived from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. Biofouling Vol. 29 (8), 217-228
- Terada A., Hibiya K., Nagai J., Tsuneda S., Hirata A. Nitrogen Removal Characteristics and Biofilm Analysis of a Membrane-Aerated Biofilm Reactor Applied to High-Strength Nitrogenous Wastewater Treatment. Journal of Bioscience and Bioengineering Vol. 95, No. 2, 170-178

Web 1. mBio Predictive Computer Models for Biofilm Detachment Properties in *Pseudomonas aeruginosa* <http://mbio.asm.org/content/7/3/e00815-16/F1.expansion.html> (2.6.2018.)

West S. A., Diggle S. P., Buckling A., Gardner A., Griffin A. S. (2007) The Social Lives of Microbes. *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* Vol. 38, 53-77

Whiteley M., Bangerter M.G., Bumgarner R. E., Parsek M. R., Teitzel G. M., Lory S., Greenberg E.P. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Nature* Vol. 413, 860-864

Xavier J. B. (2011) Social interaction in synthetic and natural microbial communities. *Molecular systems biology* Vol. 7:483

Yamamoto K., Haruta S., Kato S., Ishii M., Igarashi Y. (2010) Determinative Factors of Competitive Advantage between Aerobic Bacteria for Niches at the Air-Liquid Interface. *Microbes and Environments* Vol. 25, No. 4, 317-320

PRILOZI

Prilog 1. Naslovna stranica završnog rada

Prilog 2. Temeljna dokumentacijska kartica na hrvatskom jeziku

Prilog 3. Temeljna dokumentacijska kartica na engleskom jeziku

Prilog 4. Tablica 1. OD₆₀₀ suspenzije stanica

Prilog 5. Tablica 2. OD₅₈₈ uzoraka

Prilog 6. Slika 1. OD₅₈₈ srednjih vrijednosti izmjerenih uzoraka sa odgovarajućom standardnom devijacijom

Prilog 7. Slika 2. OD₅₈₈ srednjih vrijednosti izmjerenih uzoraka sa odgovarajućom standardnom devijacijom

Prilog 8. Tablica 3. Uzorci svrstani po pripadajućim kategorijama

Prilog 9. Slika 3. Udio kategorija

Prilog 10. Slika 4. Shema formiranja biofilma