Razvoj biofilma bakterije Bacillus cereus na granici voda-zrak

Ćevid, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:384306

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Josipa Ćevid

Razvoj biofilma bakterije *Bacillus cereus* na granici voda-zrak

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za mikrobiologiju na Mikrobiološkom zavodu Prirodoslovno - *matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom* doc. dr. sc. *Tomislava Ivankovića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre ekologije i zaštite prirode.*

ZAHVALA

Kao prvo, zahvalila bih se svom mentoru doc. dr. sc. Tomislavu Ivankoviću na ukazanom povjerenju te na izrazitoj susretljivosti tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na nesebičnoj podršci, motivaciji i ***strpljenju*** *tijekom cijelog studija.*

Također, veliko hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali svojim prisustvom.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Razvoj biofilma bakterije *Bacillus cereus* na granici voda-zrak

Josipa Ćevid
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bakterija *Bacillus cereus* je Gram-pozitivna, pokretljiva, štapićasta bakterija koja može biti obligatno aerobna ili fakultativno anaerobna te spada u rod *Bacillus*. Sveprisutna je u prirodi te je tipični saprofit tla i lako se širi na različite tipove hrane. Endospore su jako hidrofobne i izuzetno otporne na velik broj stresora. Uz to uzrokuje probleme i zbog svoje sposobnosti stvaranja biofilma na različitim supstratima. Bakterijski biofilm je višestanični kompleks formiran od sesilnih zajednica mikroorganizama pričvršćenih na podlogu i uronjenih u matriks koji se sastoji od izvanstaničnih polimernih tvari. Matriks im pruža mehaničku stabilnost, štiti ih od isušenja, djeluje kao prepreka protiv nepovoljnih kemijskih i bioloških utjecaja te pridonosi apsorpciji i skladištenju hranjivih tvari. Glavni cilj ovog istraživanja bio je razviti model stvaranja biofilma bakterije *B. cereus* na granici voda-zrak te je dokazano da interfaza služi kao mjesto širenja velike količine vegetativnih stanica i endospora. Uz to je potvrđeno da je granica voda-zrak povoljno područje za razvoj i razmnožavanje aerobne ili fakultativno anaerobne bakterije poput *B. cereus* jer joj pruža pristup kisiku u plinovitoj fazi i hranjivim tvarima u vodenoj fazi.

(39 stranica, 51 slika, 21 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: *Bacillus cereus*, biofilm, interfaza, matriks, endospora
Voditelj: Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.
Ocjenitelji:
Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.
Dr. sc. Sandra Hudina, doc.
Dr. sc. Zoran Tadić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 14. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Development of bacterial biofilm of *Bacillus cereus* at air-liquid interface

Josipa Ćevid
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Bacillus cereus is a Gram-positive, motile, rod-shaped bacterium that may be obligatory aerobic or facultatively anaerobic and belongs to the genus *Bacillus*. It is ubiquitously present in nature and is a typical soil saprofit that easily spreads to different types of food. Endospores are highly hydrophobic and extremely resistant to a large number of stressors. It also cause problems because of its ability to create biofilms on different substrates. Bacterial biofilm is a multicellular complex formed by sessile microorganisms attached to the substrate and immersed in a matrix consisting of extracellular polymeric substances. The matrix provides them with mechanical stability, protects them from desiccation, acts as an obstacle to adverse chemical and biological influences and contributes to the absorption and storage of nutrients. The main purpose of this study was to develop a model for biofilm formation of *B. cereus* at air-liquid interface and it was proven that the interface serves as a nidus for spreading large amounts of vegetative cells and endospores. It is confirmed that the air-liquid interface is a favorable area for the development and propagation of aerobic or facultatively anaerobic bacteria such as *B. cereus* because it provides access to oxygen (gaseous) and nutrients (liquid phase).

(39 pages, 51 figures, 21 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: *Bacillus cereus*, biofilm, interface, matrix, endospore
Supervisor: Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.
Reviewers:
Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.
Dr. Sandra Hudina, Asst. Prof.
Dr. Zoran Tadić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: September 14th 2017.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Rod *Bacillus* 1
1.2. Vrsta *Bacillus cereus* 3
1.3. Biofilm 5
2. MATERIJALI I METODE: 12
3. REZULTATI 14
3.1. „Nulti“, prvi i treći dan 14
3.2. Uzorci s mijenjanjem medija (6., 9., 15., 21. i 42. dan) 16
3.3. Uzorci bez mijenjanja medija (6., 9., 15. i 21. dan) 22
4. RASPRAVA 27
4.1. „Nulti“, prvi i treći dan 27
4.2. Uzorci s mijenjanjem medija (6., 9., 15., 21. i 42. dan) 28
4.3. Usporedba razvoja bakterije *B. cereus* u svim fazama od 1. do 42. dana s mijenjanjem medija 29
4.4. Model razvoja biofilma bakterije *B. cereus* 34
4.5. Usporedba uzoraka bez mijenjanja medija (6., 9., 15. i 21. dan) s uzorcima s mijenjanjem medija 34
5. ZAKLJUČAK 36
6. LITERATURA 37
7. ŽIVOTOPIS 39

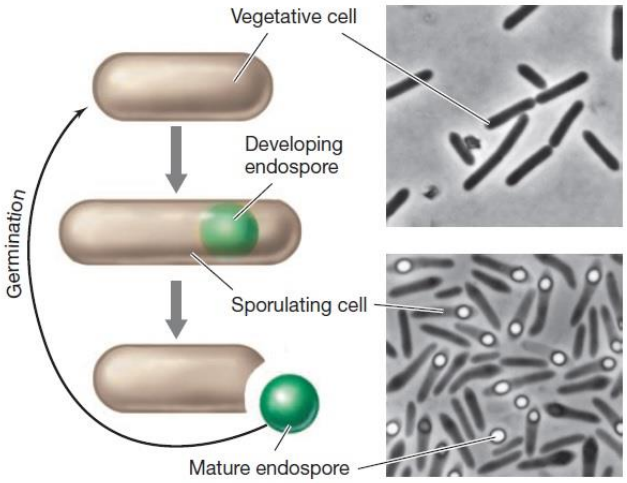
1. UVOD

1.1. Rod *Bacillus*

Bakterija *Bacillus cereus* spada u rod *Bacillus*, red Firmicutes. Naziv bacillus dolazi zbog štapićastog, ovalnog oblika bakterija unutar ovog roda. Vrste roda *Bacillus* su sveprisutne u okolišu, te su aerobne ili fakultativno anaerobne, Gram-pozitivne ili Gram-varijabilne štapićaste bakterije koje stvaraju spore. Veličina vegetativnih stanica ovog roda varira od 2,5 μm do 10 μm, a u promjeru od 0,5 μm do 1,2 μm. Optimalna temperatura rasta se kreće od 25 ˚C do 37 ˚C (Drobniewski 1993). Endospore koje proizvode nisu samo otporne na nepovoljne fizikalne i kemijske uvjete, već neke vrste imaju neobična fiziološka svojstva koja im omogućavaju da preživljavaju ili napreduju u nepovoljnom okolišu, od pustinjskog pijeska i vrućih izvora do Arktičkog tla i od slatkih voda do morskog sedimenta. Rod uključuje termofilne, psihrofilne, acidofilne, alkalofilne, halotolerantne i halofilne predstavnike koji su sposobni rasti na temperaturama, pH vrijednostima i koncentracijama soli na kojima bi moglo preživjeti još samo nekoliko organizama (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/). Ekstremna heterogenost ovog roda odražava se u širokom rasponu ekoloških niša koje mnoge vrste zauzimaju. Većina sojeva je katalaza pozitivna, posjeduju flagele po čitavoj površini tijela i sporuliraju u zraku (Drobniewski 1993).

Ograničenost hranjivih tvari zajednički je okidač sporulacije u rodu *Bacillus*. Mnogi mikroorganizmi, i prokarioti i eukarioti, reagiraju na nepovoljne uvjete pretvaranjem rastućih stanica, zvanih vegetativnim stanicama, u spore, tj. strukture koje ne rastu, toplinski su otporne i odbijaju svjetlost. Stanice ne sporuliraju kad aktivno rastu već samo kada rast prestane zbog iscrpljenja esencijalnog nutrijenta. Stoga, vrste roda *Bacillus*, tipičnog roda bakterija koje stvaraju endospore, prekidaju vegetativni rast i započinju sporuliranje kada, na primjer, ključni nutrijent kao što je ugljik ili dušik postane ograničen. Endospora može godinama ostati u stanju dormancije, ali nakon što se opet pojave povoljni uvjeti, spora brzo klija i mikroorganizam se vraća u svoj normalni stil života. Ovaj proces uključuje tri koraka: aktivaciju, germinaciju (klijanje) i rast (engl. *outgrow*). Aktivacija nastaje kada se endospore zagrijavaju nekoliko minuta na povišenoj, ali subletalnoj temperaturi. Zatim aktivirane endospore klijaju, ali tek kada imaju dovoljnu količinu određenih hranjivih tvari, kao što su neke aminokiseline. Germinacija, koja je obično brz proces (trajanje u minutama), uključuje

gubitak refrakcije endospora, povećanje sposobnosti bojenja i gubitak otpornosti na toplinu i kemikalije. Posljednja faza, rast, uključuje vidljivo bubrenje stanice uslijed unosa vode i sinteze RNA, proteina i DNA. Vegetativna stanica izlazi iz puknute endospore i počinje rasti, ostajući u vegetativnom obliku sve dok okolišni signali ponovno ne potaknu sporulaciju. Kod bakterija, rod *Bacillus* je poznat po formiranju endospora, tj. spora formiranih unutar stanice majke. Prije nastanka endospore stanica se dijeli asimetrično. Manja stanica se razvija u endosporu, koju okružuje veća stanica majka. Jednom kad je razvoj završen, stanica majka se rasprsne, otpuštajući endosporu (Slika 1.) (Madigan i sur. 2015).



Slika 1. Životni ciklus endospore (Madigan i sur. 2015).

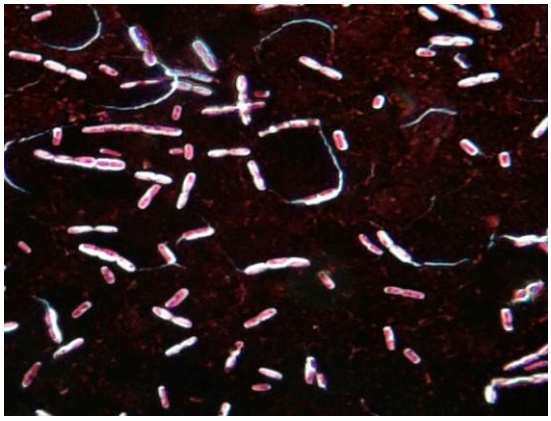
Većina vrsta koje spadaju u rod *Bacillus* su saprofiti (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/). Sve bakterije koje stvaraju endospore su ekološki povezane jer se u prirodi nalaze prvenstveno u tlu. Čak i one vrste koje su patogene za ljude ili druge životinje prvenstveno su saprofitski organizmi tla i inficiraju životinje samo slučajno. Sposobnost proizvodnje endospora bi trebala biti korisna za mikroorganizme tla jer je tlo vrlo promjenjivo okruženje s obzirom na razinu hranjivih tvari, temperaturu i vodene aktivnosti (Madigan i sur. 2015).

Dvije vrste iz roda *Bacillus* smatraju se medicinski značajnima: *B. anthracis* koji uzrokuje antraks i *B. cereus* koji uzrokuje trovanje hranom. *B. thuringiensis* je patogen za kukce te se ponekad koristi kao insekticid, a *B. subtilis* je važan modelni organizam (Drobniewski 1993). *Bacillus cereus* ima bliske fenotipske i genetske (16S rRNA) odnose s nekoliko drugih vrsta roda *Bacillus*, posebno s *B. anthracis* (Bottone 2010).

1.2. Vrsta *Bacillus cereus*

Bakterija *Bacillus cereus* je Gram-pozitivna, pokretljiva, mezofilna, štapićasta bakterija koja može biti obligatno aerobna ili fakultativno anaerobna, te proizvodi centralne endospore koje mogu biti ovalne ili cilindrične (Madigan i sur. 2015). *B. cereus* je tipični saprofit tla i lako se širi na različite tipove hrane, pogotovo biljnog podrijetla, ali se često pronalazi i u mesu, jajima i mliječnim proizvodima (Granum i Lund 1997). S obzirom na to da je sveprisutna u prirodi lako se širi kroz sustave proizvodnje hrane i kontaminacija s njom je gotovo neizbježna. Spore su jako hidrofobne i izuzetno otporne na velik broj stresora zbog čega lako prianjaju na opremu u proizvodnji hrane. Uzrokuje probleme i zbog svoje sposobnosti stvaranja biofilma na različitim supstratima (Wijman i sur. 2007). Neki sojevi *B. cereus* su patogeni za ljude, dok se drugi koriste kao probiotici za životinje (Kamar i sur. 2013).

B. cereus tipično ne proizvodi kapsulu za razliku od *B. anthracis*, ali postoje određeni sojevi koji izlučuju kapsulu (Slika 2.) (Sue i sur. 2006). Kapsula je sluzava opna koju stvaraju samo kapsulogene bakterije na citoplazmatskoj membrani, a izlučuju je na površinu stanične stijenke i služi im za kolonizaciju i zaštitu od nepovoljnih okolišnih uvjeta (Madigan i sur., 2015).



Slika 2. Prikaz kapsule oko *B. cereus* (Izvor: Bakteriološki laboratorij, PMF, Zagreb)

B. cereus može izazvati trovanje hranom te proizvodi dva toksina koji uzrokuju dva različita tipa trovanja hranom, emetični i dijarealni tip (Madigan i sur. 2015). U emetičnom obliku, simptomi su prvenstveno mučnina i povraćanje i te toksine stvaraju vegetativne stanice u hrani. U dijarealnom obliku simptomi su proljev i gastrointestinalna bol, a uzrokuje ga kompleksan enterotoksin kojeg stvara *B. cereus* tijekom vegetativnog rasta u tankom

crijevu (Granum i Lund 1997). *B. cereus* raste u hrani kao što je riža, tjestenina, meso ili umaci koji se kuhaju i ostavljaju na sobnoj temperaturi da se polako ohlade. Zbog toplinskog tretmana endospore ove bakterije klijaju, te nastaje toksin. Ponovno zagrijavanje može ubiti vegetativne stanice *B. cereus*, ali toksin je toplinski stabilan i može ostati aktivan (Madigan i sur. 2015). Povezan je i s prehrambenim proizvodima poput povrća, juha, mlijeka i drugih mliječnih proizvoda. Između 1 i 20% od ukupnog broja izbijanja zaraza hranom u svijetu uzrokovano je s *B. cereus*. Rast vegetativnih stanica obično se događa unutar temperaturnog raspona od 10 do 50 °C, s optimalnim razvojem između 28 i 35 °C. Međutim, pronađene su i psihrofilne varijante *B. cereus*, koje su sposobne rasti na temperaturama nižim od 5 °C. Iako se vegetativne stanice *B. cereus* lako mogu inaktivirati zagrijavanjem, spore su znatno otpornije i mogu uzrokovati kvarenje hrane i nakon naknadnog klijanja (Ultee i sur. 1999). *B. cereus* se lako kultivira i može se preliminarno identificirati kombinacijom mikroskopije i njenih tipično velikih, zrnatih i raširenih kolonija (Madigan i sur. 2015).

U zaraženoj hrani poslije trovanja hranom zabilježeno je 200 do 10^9 *B. cereus* po jednom gramu (ili mililitru) što daje totalnu infektivnu dozu od $5x10^4$ do 10^{11}. Djelomično zbog velikih razlika u količini proizvedenih enterotoksina u različitim sojevima infektivna doza varira od 10^5 do 10^8 vegetativnih stanica ili spora po jednom gramu uzorka. Zbog toga sva hrana koja ima više od 10^3 vegetativnih stanica ili spora *B. cereus* po gramu se ne može smatrati potpuno sigurna za konzumaciju (Granum i Lund 1997).

U prirodi bakterija postoji kao spora i kao vegetativna stanica, a kada kolonizira ljudsko tijelo samo kao vegetativna stanica. Dok je lišena metaboličke aktivnosti, spora *B. cereus* je otporna na ekstremne okolišne uvjete uključujući toplinu, zamrzavanje, sušenje i zračenje te se može smatrati infektivnim sredstvom za ovu bakteriju (Bottone 2010). U prehrambenoj industriji spore *B. cereus* su osobito problematične jer mogu biti otporne na pasterizaciju i gama zračenje (dok je kompeticija drugih vegetativnih bakterija eliminirana), a njihova hidrofobna priroda omogućuje im da prianjaju na različite površine gdje se mogu razmnožavati i sporulirati. U mliječnoj industriji je nemoguće u potpunosti izbjeći prisutnost *B. cereus* u svim uzorcima mlijeka te je to rastući problem za industriju (Andersson i sur. 1995).

Izuzevši trovanja hranom postoji još pet grupa kliničkih infekcija koje uzrokuje *Bacillus cereus*: 1) lokalne infekcije, posebno opekotine, traumatske ili poslijeoperacijske rane i infekcije oka; 2) bakterijemija i septikemija; 3) infekcije centralnog živčanog sustava

koje uključuju meningitis, apscese i infekcije povezane sa šantom; 4) respiratorne infekcije; 5) endokarditis i perikarditis (Drobniewski 1993).

Učestalost infekcija koje nisu povezane s trovanjem hranom vjerojatno će se povećati zbog većeg prepoznavanja *B. cereus* kao patogena i izvan crijeva te zbog veće vjerojatnosti infekcija u novorođenčadi, intravenoznih korisnika droga, imunološki kompromitiranih osoba, uključujući pacijente s AIDS-om i malignim bolestima te pacijente s umjetnim protezama, uključujući ortopedske implantate i cerebrospinalne šantove. Intravenozni korisnici droga su u opasnosti od pribora za ubrizgavanje kao i od samog heroina koji sadrži više kontaminirajućih organizama uključujući *B. cereus* (Drobniewski 1993).

Prirodni okolišni rezervoar za *B. cereus* su raspadajuća organska tvar, svježa i morska voda, povrće i kontaminirani predmeti i probavni trakt beskralježnjaka, od kojih tlo i prehrambeni proizvodi mogu postati kontaminirani što dovodi do prolazne kolonizacije ljudskog crijeva. Spore klijaju kada dođu u kontakt s organskim tvarima ili unutar insektskog ili životinjskog domaćina. Uz to *B. cereus* ima saprofitski životni ciklus u kojem spore klijaju u tlu, uz proizvodnju vegetativnog bacila, koji bi potom mogao sporulirati, održavajući životni ciklus. Defekacijom ili smrću domaćina stanice i spore se otpuštaju u tlo, gdje vegetativne stanice mogu sporulirati i preživjeti sve do njihovog preuzimanja od strane drugog domaćina. Nadalje, kada *B. cereus* raste u tlu, prolazi prebacivanje iz jednostaničnog u višestanični fenotip, što mu omogućuje da se translocira kroz tlo. Ova morfogena faza je analogna rojenju (engl. *swarming*) *B. cereus* na agarnom mediju. *B. cereus* je možda najčešći aerobni nosilac spora u mnogim vrstama tla i sedimenata, prašini i biljkama. *B. cereus* je također često prisutna u sustavima za proizvodnju hrane zbog adhezivne prirode svojih endospora. Ova karakteristika omogućuje bakteriji da se širi na sve vrste hrane. Zbog sveprisutne distribucije *B. cereus* u prehrambenim proizvodima bakterija se unosi u malom broju i postaje dio prolazne humane crijevne flore (Bottone 2010).

1.3. Biofilm

Bakterijski biofilm je višestanični kompleks formiran od sesilnih zajednica mikroorganizama pričvršćenih na podlogu i uronjenih u matriks koji se sastoji od izvanstaničnih polimernih tvari (engl. *extracellular polymeric substance,* EPS) poput proteina, lipida i nukleinskih kiselina koji potječu od bakterija. Uloga matriksa je višestruka: osigurava

mehaničku stabilnost biofilma i štiti mikroorganizme od isušenja; djeluje kao prepreka protiv nepovoljnih kemijskih i bioloških utjecaja (kao što su osmotski stres, promjene pH, promjene koncentracije kisika, antibiotici i antiseptici, imunološka obrana domaćina ili napadi protozoa koji se hrane bakterijama); pridonosi apsorpciji i skladištenju hranjivih tvari i elemenata u tragovima, te je mjesto brojnih izvanstaničnih enzimatskih reakcija i još k tomu omogućava mikroorganizmima da su u bliskom kontaktu što olakšava genetsku izmjenu i bakterijsku komunikaciju. Moglo bi se reći ako je biofilm mikrobiološki grad onda je matriks njegova infrastruktura (Schlafer i Meyer 2016). Bakterijska zajednica unutar biofilma može biti sastavljena od jedne vrste bakterija ili više njih, te se biofilm može razviti na različitim abiotičkim i biotičkim površinama. Iako biofilmovi mješovitih bakterijskih zajednica dominiraju u većini okolina, biofilmovi s jednom vrstom bakterija postoje u različitim infekcijama i na površinama medicinskih implantata (O'Toole i sur. 2000). Bakterije koje se pričvrste na ugrađene medicinske uređaje ili na oštećena tkiva mogu postati uzrok trajne infekcije. Ove se bakterije okruže hidratiziranim matriksom stvarajući sluzavi sloj poznat kao biofilm. Stvaranje biofilma je bitno jer je ovaj način rasta povezan s kroničnom prirodom naknadnih infekcija i s njihovom inherentnom rezistencijom na antibiotsku terapiju (Stewart i Costerton 2001).

Jedan od najplodonosnijih pristupa povijesti mikrobiologije vjerojatno je bilo proučavanje bakterija u uvjetima tako umjetnim da se nitko ne bi usudio kvalificirati ih kao "prirodne". Međutim, uklanjanje bakterija iz njihovih složenih ekosustava kako bi ih se smjestilo u čiste, slobodno pokretne kulture bila je mala cijena za platiti za generiranje bogatstva informacija prikupljenih u stoljeću bakterijskih fizioloških studija. Iako je ta pristranost bila poznata, ali ponekad zaboravljena činjenica, proteklih desetljeća svjedočili smo probojima u mikrobiologiji koji su otkrili sofisticirane percepcije, regulacije i komunikacijske sustave između bakterija kao odgovor na njihovu okolinu (Ghigo 2003).

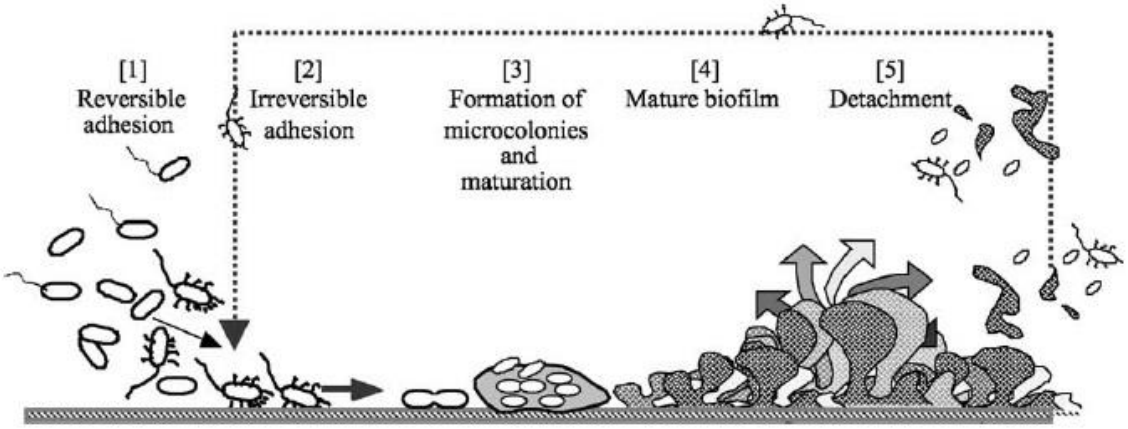
U samo dva desetljeća saznali smo da se biofilmovi sastoje od visoko strukturiranih matriksom ograđenih zajednica čije stanice ekspresiraju gene u uzorku koji se veoma razlikuje od ekspresije gena njihovih planktonskih (slobodno pokretnih) srodnika. Budući da izravna promatranja pokazuju da većina bakterija u prirodnim i patogenim ekosustavima tvore biofilm, ne čini se mudro nastaviti istraživati ove sustave pomoću planktonskih kultura. Novi način razmišljanja je očito potreban jer izravna opažanja strukturalne složenosti i nedvosmislene demonstracije jednog ili više različitih fenotipova biofilma nagovještava novi koncept u kojem su biofilmovi složene diferencirane zajednice. Promatranja biofilmova

formiranih u čistim kulturama bakterija i biofilmova miješanih vrsta u prirodnim ekosustavima pokazuju osnovnu organizaciju u kojoj stanice rastu u mikrokolonijama okruženim matriksom te su odvojene mrežom otvorenih kanala. Važnost ovih složenih struktura, koje su viđene u neposrednim promatranjima živog biofilma pomoću konfokalne laserske pretražne mikroskopije, je u tome da one pokazuju razinu diferencijacije koja zahtijeva sofisticirani sustav međustaničnih signala i stupanj stanične specijalizacije. Jedva je započeto dešifriranje sustava ekoloških znakova i fenotipskih odgovora koji oblikuju mikrobiološke zajednice s više vrsta koje prevladavaju u većini ekosustava i već su i same zajednice počele svjedočiti izuzetno složenom razvojnom procesu. Ovaj razvojni proces je jedinstven u biologiji po tome što uključuje koordiniranu aktivnost nekoliko relativno malih prokariotskih genoma, umjesto jednog ili više velikih i koordiniranih eukariotskih genoma, kako bi se proizvela funkcionalna višestanična zajednica. Ovaj pojam mijenja percepciju položaja bakterija u hijerarhiji živih bića jer su pojedinačne stanice koje smo proučavali u planktonskim kulturama zapravo članovi koordiniranih višestaničnih zajednica čija se kompleksnost i sofisticiranost tek sada počinje cijeniti (Stoodley i sur. 2002).

Kao i u mnogim procesima diferencijacije u različitim biološkim sustavima, proces diferencijacije koji pretvara malu skupinu adherentnih bakterija u gustu zajednicu biofilma zatvorenu u matriksu na koloniziranoj podlozi najprije se percipira kao niz morfoloških promjena. Pojedinačne adherentne stanice koje pokreću formiranje biofilma na površini okružuju samo male količine izvanstanične polimerne tvari i mnoge su sposobne samostalno se kretati pomoću trzanja ili klizanja posredovanih pilusom. Ove pričvršćene stanice još nisu "predane" procesu diferencijacije koji dovodi do formiranja biofilma i mnoge bi zapravo mogle napustiti podlogu da bi nastavile s planktonskim načinom života. Tijekom ove faze reverzibilne adhezije, bakterije pokazuju nekoliko specifičnih ponašanja ovisno o vrsti, koje uključuju valjanje, puzanje, formiranje agregata i formaciju u redovima, prije nego što počnu izlučivati EPS i nepovratno se pričvrste (Stoodley i sur. 2002). Davies i Geesey (1995) su pokazali da je u bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* klaster gena odgovoran za proizvodnju alginata reguliran u roku od 15 minuta od početnog kontakta stanica s koloniziranom površinom i da taj genetički događaj inicira proces formiranja biofilma. Genska regulacija tijekom stvaranja biofilma kontrolira prebacivanje s planktonskog načina rasta na rast biofilma. Kako biofilmovi sazrijevaju, oni razvijaju osnovnu arhitekturu mikrokolonija i vodenih kanala koja je sada dobro prepoznata u prirodnim i in vitro biofilmovima te mnoge stanice mijenjaju fiziološke procese (npr. rastu anaerobno) kao odgovor na uvjete u svojim

nišama. Pojedinačne mikrokolonije mogu se odvojiti od površine ili mogu dovesti do planktonskih revertanata koji plivaju ili plutaju dalje od ovih zatvorenih matriksnih struktura, ostavljajući šuplje ostatke mikrokolonija ili prazne prostore koji postaju dijelovi vodenih kanala. Osim toga, cijele mikrokolonije se mogu prirodno odvojiti od biofilma (bez očitih smetnji u sustavu) iako su mehanizmi koji stoje iza tog fenomena još nejasni. Pretpostavlja se da gladovanje može dovesti do odstranjivanja pomoću nepoznatog mehanizma koji omogućuje bakterijama da traže staništa bogatija hranjivim tvarima. Odvojene stanice iz biofilma vraćaju se planktonskom načinu rasta s čime zatvaraju puni krug životnog ciklusa razvoja biofilma. Ovi procesi nisu nužno sinkronizirani u cijelom biofilmu, ali su često lokalizirani tako da u bilo kojem trenutku mali prostor na površini može sadržavati biofilm u svakoj razvojnoj fazi (Stoodley i sur. 2002).

Kao što možemo vidjeti na slici 3., formacija biofilma se događa u više stadija, prvo stanice dođu u kontakt s površinom (1) na koju se onda ireverzibilno vežu (2), zatim prilijepljene stanice stvaraju matriks i razmnožavaju se, te stvaraju takozvanu mikrokoloniju (3) iz koje će se razviti biofilm (4). Unutar biofilma stanice mogu biti fiziološki diferencirane zbog različitih uvjeta u kojima se nalaze zbog ograničene difuzije nutrijenata i kisika unutar biofilma (Stoodley i sur. 2002). U zadnjem stadiju stanice se mogu odvojiti iz biofilma pasivnim načinom (struganjem, erozijom, promjenama u dostupnosti nutrijenata) ili mehanizmima za koje su odgovorne stanice biofilma (5) (Wijman i sur. 2007).



Slika 3. Model razvoja bakterijskog biofilma (Ghigo 2003).

Postoje barem tri mehanizma pomoću kojih može doći do formacije biofilma. Jedan od njih je preraspodjela prilijepljenih stanica površinskom pokretljivošću. Drugi mehanizam je pomoću binarne diobe prilijepljenih stanica. Kako se stanice dijele, stanice kćeri se raširе prema van i prema gore od površine vezanja kako bi oblikovale stanične nakupine, na sličan način kao formacija kolonija na agarnim podlogama. Treći mehanizam agregacije je regrutacija stanica iz rasutog fluida u biofilm u razvoju. Relativni doprinos svakog od ovih mehanizama ovisi o uključenim organizmima, prirodi površine koja se kolonizira te fizičkim i kemijskim uvjetima okoline. U oligotrofnim okruženjima zreli biofilmovi mogu se sastojati od male gustoće stanica s relativno malom strukturalnom složenošću. Biofilmu može trebati i do deset dana do strukturalne zrelosti, na temelju mikroskopski izmjerenih fizičkih dimenzija i vizualne usporedbe. Iz tog razloga moramo biti pažljivi da ne pogriješimo interpretaciju retardacije biofilma u početnim događajima vezanja, što je uzrokovano određenim genskim nokautom, uz potpuno suzbijanje razvoja biofilma. U bakterijama *Pseudomonas putida* i *Escherichia coli* pokazano je da se aktivnost stanica u središtima staničnih klastera (engl. *cell clusters*) smanjila kad su klasteri narasli, ali njihova aktivnost može biti obnovljena dodatkom lakše iskoristivog izvora ugljika, što ukazuje na to da se stanična aktivnost u unutrašnjosti klastera može kontrolirati dostupnošću hranjivih tvari (Stoodley i sur. 2002). De Beer i sur. (1994) pokazali su da kanali koji okružuju stanične klastere mogu povećati opskrbu kisikom (i ostalim hranjivim tvarima) bakterijama unutar biofilma, tako povezujući strukturu s funkcijom. Čini se da je struktura biofilma u velikoj mjeri određena proizvodnjom matriksa (koji se sastoji od EPS-a) te joj on pruža strukturalnu podršku za biofilm. Neke studije su pokazale da prekidom proizvodnje EPS-a dolazi do manje strukturne kompleksnosti i do veće osjetljivosti na antimikrobna sredstva, dok je inducirana pretjerana proizvodnja EPS-a imala suprotan učinak (Stoodley i sur. 2002).

U posebnim uvjetima pokretljivost potiče stvaranje biofilma. Pokretljivost je neophodna za bakterije da dođu do površina pogodnih za formiranje biofilma. U statičnim uvjetima dosezanje granice voda-zrak, gdje se stvara biofilm, je veliki zahtjev, dok u protočnom sustavu bakterija može imati pristup dnu staklenog predmetnog stakalca pomoću sedimentacije. Stoga, pokretljivost je važna za formiranje biofilma u staklenim cijevima i mikrotitarskim pločama (stacionarnim sustavima), ali ne i u protočnom sustavu. Pokretljivost također promiče regrutaciju planktonskih stanica unutar biofilma dopuštajući pokretljivim bakterijama da uđu u cijeli biofilm. Konačno, pokretljivost je uključena i u širenje biofilma na staklene površine (Houry i sur. 2010).

Stanice unutar biofilma su okružene matriksom i stanicama u vanjskom sloju biofilma, koji ih štite od grubih utjecaja iz okoliša čime ih čine otpornijima na sredstva za čišćenje i druge antimikrobne tvari. Osim uloge matriksa, niska stopa rasta stanica i obrasci ekspresije gena specifični za biofilm mogu također povećati otpornost stanica biofilma. Stoga, formacija biofilma može uzrokovati velike ekonomske gubitke zbog kvara opreme i skraćivanja vremena između sterilizacije opreme. Kontaminacija proizvoda putem stanica biofilma može uzrokovati naknadno ograničenje roka trajanja i povećati sigurnosne mjere (Wijman i sur. 2007).

Osim ekonomskih problema u industriji biofilmovi su postali i značajan problem za zdravstvene ustanove, budući da su mikroorganizmi povezani s biofilmom manje osjetljivi na antimikrobne lijekove i tretmane. Bakterije u biofilmu mogu biti do 1000 puta otpornije na antibakterijska sredstva od istih organizama koji su uzgojeni planktonski. Takva otpornost nije pokazana samo prema antibioticima i antisepticima već i prema visoko reaktivnim kemikalijama. Predloženo je nekoliko čimbenika koji bi se mogli uzeti u obzir za otpornost biofilma: a) spor rast, b) prisutnost matriksa koji može usporiti difuziju kemikalija ili inaktivirati antibakterijska sredstava i c) fenotipske promjene bakterija koje rezultiraju otpornošću te se pojavljuju u biofilmskom okruženju. Iako je svako od ovih objašnjenja podržano dokazima, jedan mehanizam se ne može uzeti u obzir pri promatranju opće otpornosti (Scher i sur. 2005).

Pričvršćenje na podlogu je prva faza u formiranju biofilma, a kasniji rast često krene uz proizvodnju opsežne mreže izvanstaničnih polimernih tvari koje olakšavaju gusto prianjanje bakterija na stanice kćeri i na podlogu. Bliska fizička povezanost stanica unutar matriksa rezultira strukturom koja ima značajna fizikalna svojstva i koja dovodi do razvoja novih bakterijskih fenotipova (Scher i sur. 2005). Sadržaj i arhitektura biofilmova su vrlo varijabilni i heterogeni te variraju od otvorenih sustava s kanalima i stupovima bakterija do struktura bez očitih pora i gusto nabijenim stanicama, što sugerira da su bakterijski fenotipovi i fiziologija također varijabilni (Constantin 2009). Oni ne ovise samo o bakterijskim sojevima koji čine biofilm, već i o materijalu podloge te rastu i okolišnim uvjetima. Na primjer sadržaj biofilma *Salmonella spp*. varira ovisno o podlozi. Kod biofilmova stvorenih na staklu pokazalo se da je celuloza primarni egzopolisaharid, dok celuloza nije bila glavna komponenta u proizvodnji biofilma na žučnom kamenu. Otpornost salmonele na sredstva za dezinfekciju također varira ovisno o podlozi. Stanice biofilma na nehrđajućem čeliku su bile značajno osjetljivije od onih na plastičnoj podlozi. Većina pozornosti je uglavnom usmjerena

na biofilmove koji se stvaraju na granici čvrste tvari i tekućine ili čvrste tvari i zraka, ali i nekoliko drugih vrsta površina također pružaju ekološke mogućnosti za bakterije. Jedna od njih je i granica između tekućine i zraka koja se rijetko proučavala (Scher i sur. 2005).

U ovom radu fokus će biti na razvoju biofilma upravo na granici voda-zrak jer stvaranje biofilma na toj granici može predstavljati veliki problem industrijskim vodenim sustavima. Granica voda-zrak selektivno pogoduje aerobnim i fakultativno anaerobnim bakterijama jer kada ju koloniziraju pruža im pristup plinovitoj fazi (kisik) i tekućoj fazi (hranjive tvari i voda) (Constantin 2009).

Cilj ovoga rada je istražiti način stvaranja biofilma bakterije *Bacillus cereus* na granici voda-zrak kroz vrijeme i s obzirom na uvjete uzgoja (uz kontinuirano dodavanje svježeg hranjivog medija ili bez dodavanja istog). Te uz pomoć dobivenih rezultata predložiti model stvaranja biofilma bakterije *Bacillus cereus* na granici voda-zrak.

2. MATERIJALI I METODE:

Za eksperimentalni dio rada bakterija *Bacillus cereus* 4080 LBK je nasađena na krutu hranjivu podlogu Luria-Bertani, sastava (po 1 L destilirane vode): 10 g tripton, 5 g kvaščevog ekstrakta, 5 g soli i 20 g agara. Zatim su u autoklavu sterilizirana dvadeset i dva predmetna stakalca te je pripremljen tekući Luria-Bertani medij (LB-medij). Potom je pipetom (LLG Labware, Njemačka) otpipetirano po 20 mL tekućeg LB-medija u velike plastične epruvete (50 mL) koje su zatim sterilizirane u autoklavu. Pripremljena je i sterilna voda sastava: 3 g NaCl po 1 L destilirane vode, s kojom je napunjena bočica sa štrcaljkom, koja je služila za ispiranje viška bakterijske biomase s predmetnih stakalaca, te je otpipetirano i po 9 mL sterilne vode u staklene epruvete i sve također sterilizirano u autoklavu.

Nakon 24 sata rasta bakterije *Bacillus cereus* na krutoj LB hranjivoj podlozi napravljena je bakterijska suspenzija tako što je sterilnom ezom uzeta bakterijska biomasa s hranjive podloge koja je potom dva puta uronjena u epruvetu sa sterilnom vodom. Potom je bakterijska suspenzija vorteksirana (Vortex technoKartell TK3S, Italija) sve dok nije postignuta homogena suspenzija. Postupak je ponovljen u još dvije epruvete. Zatim je otpipetiran po 1 mL bakterijske suspenzije u dvadeset i dvije velike plastične epruvete s tekućim LB-medijem. Epruvete su potom lagano promiješane te su uronjena predmetna stakalca koja su prethodno zagrijana na Bünsenovom plameniku (da bi se uklonile eventualne masne naslage s predmetnog stakalca) i sterilizirana u autoklavu. Predmetna stakalca su služila kao podloga za rast biofilma te su do pola uronjena u tekući medij što je omogućilo promatranje tri faze, dio stakalca koji je u tekućem mediju (vodena faza), interfazu, tj. granicu voda-zrak te dio stakalca koji se nalazi u zraku (plinovita faza). Zatim su sve epruvete s predmetnim stakalcima stavljene u miješalicu (Orbital Shaker, Biosan OS-10, Latvija) koja je prethodno namještena na lagano miješanje na 50 RPM (engl. *revolutions per minute*) te u inkubator (Memmert IPP 400, GmbH + Co. KG, Njemačka) na 30 ˚C te su čepovi na svim epruvetama ostavljeni labavo zatvorenima (zbog protoka kisika).

Eksperiment je proveden u dva dijela, u prvom dijelu je promatran razvoj biofilma nakon jednog, trećeg, šestog, devetog, petnaestog, dvadeset i prvog te četrdeset i drugog dana s mijenjanjem medija svaki treći dan. Mijenjanje medija je provođeno uranjanjem predmetnog stakalca u novo pripremljenu veliku plastičnu epruvetu s tekućim LB-medijem. U drugom dijelu eksperimenta medij nije mijenjan te je promatran razvoj biofilma nakon šestog,

devetog, petnaestog te dvadeset i prvog dana. Uz to, u oba dijela eksperimenta, promatran je i razvoj endospora na predmetnim stakalcima. Zbog toga su uzete po dvije epruvete s LB-medijem i uronjenim predmetnim stakalcem za sve navedene vremenske periode, jedna za promatranje razvoja matriksa, a druga za promatranje endospora. Prije promatranja predmetnih stakalaca s unaprijed određenim vremenom inkubacije pogledan je i „nulti“ dan pod mikroskopom tako da je kapljica bakterijske suspenzije stavljena na dva stakalca (jedno za matriks, a drugo za endospore) koja su zatim ostavljena da se suše na zraku.

Nakon isteka unaprijed određenog vremena inkubacije predmetna stakalca su izvađena iz epruveta pomoću sterilizirane pincete te su zatim isprana sterilnom vodom i ostavljena da se osuše. Prije bojanja predmetna stakalca su fiksirana. Preparati su bojani pomoću dvije metode, Schaeffer-Fulton metoda za bojanje endospora (ES) i Alcian blue za bojanje matriksa (EPS). Za bojanje ES-a prvo je nakapano malahitno zelenilo (Kemika, Hrvatska) na preparat koji smo potom zagrijavali tri puta da bi boja bolje prodrla u spore te se pri tome pazilo da boja ne proklju̇ča. Potom se preparat isprao vodovodnom vodom te je zatim uronjen u boju karbol fuksin (Kemika, Hrvatska) na jednu minutu. Ponovno je ispran vodovodnom vodom te je višak boje pokupljen papirom. Za bojanje EPS-a predmetno stakalce je uronjeno u boju Alcian blue (Kemika, Hrvatska) na tri minute, potom ispran vodovodnom vodom. Zatim je uronjen u karbol fuksin na jednu minutu te ponovno ispran vodovodnom vodom i višak boje je također pokupljen. Istim načinom je obojen i „nulti“ dan. Pripremljeni preparati su promatrani na mikroskopu (Olympus CX21, Japan) uz pomoć imerzijskog ulja na povećanju x1000. Svi dobiveni rezultati su fotografski dokumentirani te su isti upotrijebljeni u ovom radu.

3. REZULTATI

3.1. „Nulti“, prvi i treći dan

U ovom istraživanju proučavan je razvoj biofilma, tj. nastanak matriksa i razvitak endospora nakon unaprijed određenog vremenskog perioda te je prije početka eksperimenta promatran i „nulti“ dan poslije bojanja EPS-a i ES-a. Nije došlo do obojenja matriksa u EPS uzorku (Slika 4.) te je pronađen mali broj pojedinačnih vegetativnih stanica (crveno obojenje) u oba uzorka s tim da je u ES uzorku pronađen mali broj endospora (Slika 5).



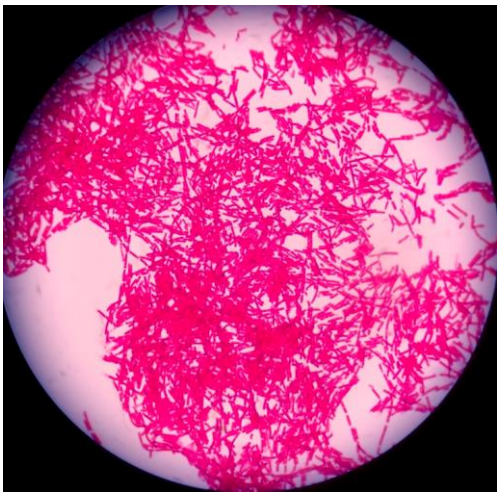
Slika 4. EPS „nulti“ dan



Slika 5. ES „nulti“ dan

Nakon jednog dana na interfazi (granica voda-zrak) EPS preparata pronađen je veći broj vegetativnih stanica (Slika 6.). Izvan interfaze su pronađene samo pojedinačne vegetativne stanice u malom broju (Slika 7.).

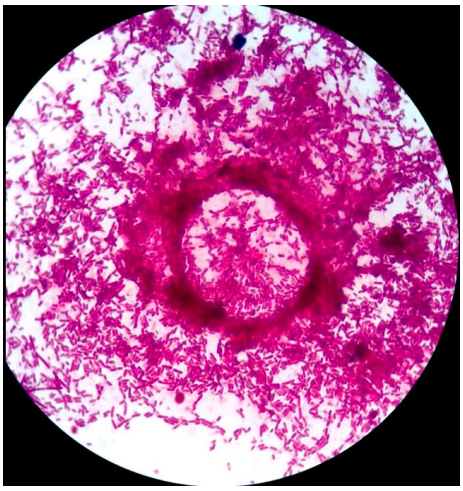
Prvog dana na ES preparatu u području interfaze je također pronađen veliki broj vegetativnih stanica, kao i endospora koje su se zelenkasto obojile (Slika 8.). Izvan interfaze je pronađen puno manji broj endospora i vegetativnih stanica, većinom pojedinačnih, ali pronađeno je i nekoliko mikrokolonija (Slika 9.).



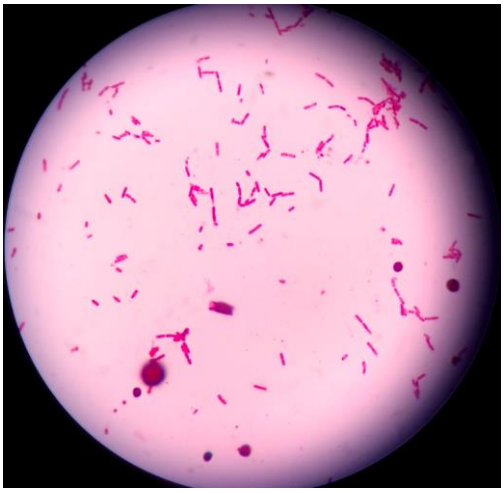
Slika 6. EPS prvi dan - interfaza



Slika 7. EPS prvi dan - izvan interfaze

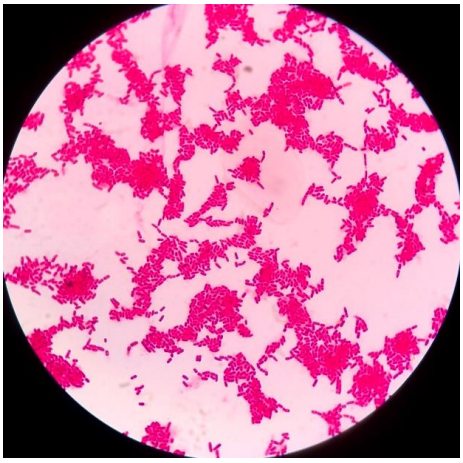


Slika 8. ES prvi dan - interfaza

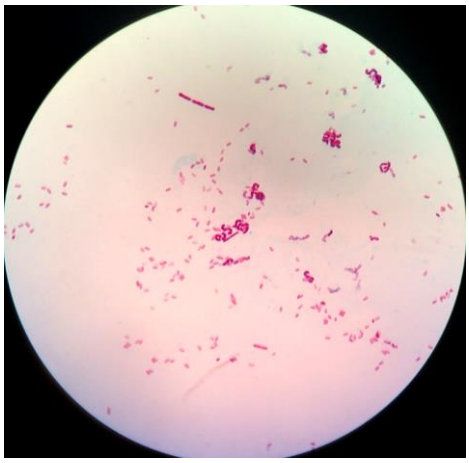


Slika 9. ES prvi dan - izvan interfaze

Nakon trećeg dana makroskopski je primijećeno da bakterijska biomasa tone, tj. da ne stvara pelikule na površini. Na EPS preparatu na donjem dijelu stakalca koje je bilo u vodi pronađen je mali broj pojedinačnih vegetativnih stanica. Pomicanjem prema interfazi došlo je do razvitka mikrokolonija i značajno se povećao broj vegetativnih stanica. U interfazi su pronađene nakupine vegetativnih stanica (Slika 10.), a pomicanjem prema dijelu stakalca koji se nalazi u zraku pronađene su mikrokolonije i pojedinačne vegetativne stanice i veliki broj endospora (Slika 11.). Daljnjim udaljavanjem od interfaze su većinom pronađene endospore uz koju pojedinačnu vegetativnu stanicu.

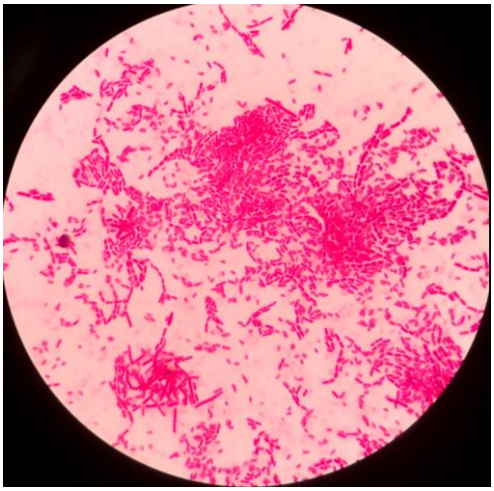


Slika 10. EPS treći dan - interfaza

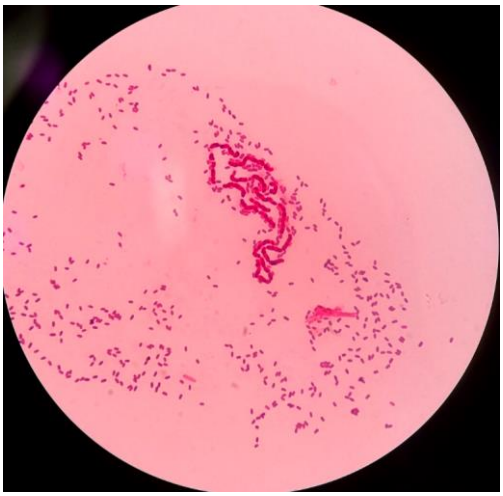


Slika 11. EPS treći dan - zrak

Treći dan na ES predmetnom stakalcu koje je bilo na dnu vodenog medija pronađen je manji broj pojedinačnih vegetativnih stanica, a približavanjem interfazi nađene su mikrokolonije vegetativnih stanica i endospore. U interfazi je pronađen veliki broj endospora kao i veliki broj vegetativnih stanica (Slika 12.). Udaljavanjem od interfaze prema dijelu stakalca koji se nalazi u zraku pronađen je veći broj endospora s malo pojedinačnih vegetativnih stanica (Slika 13.), s tim da su endospore pronađene i relativno visoko na predmetnom stakalcu.



Slika 12. ES treći dan - interfaza

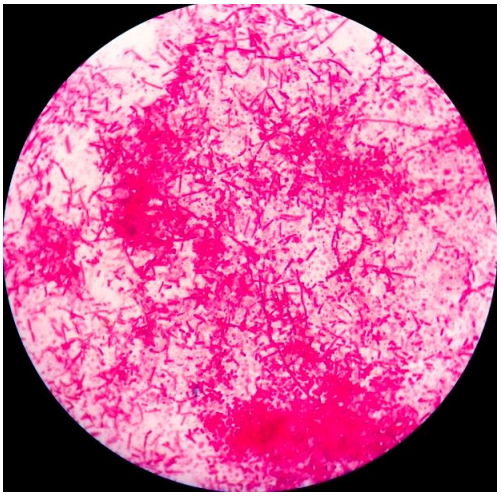


Slika 13. ES treći dan - zrak

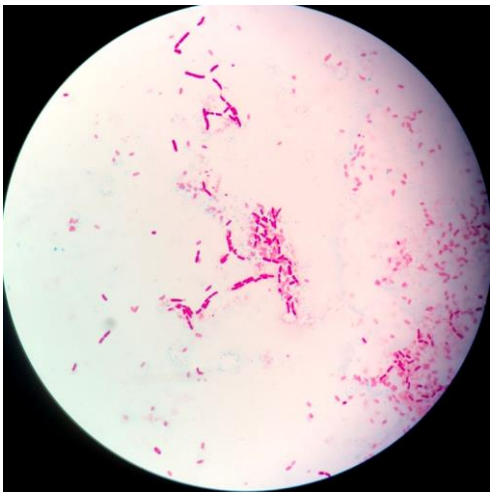
3.2. Uzorci s mijenjanjem medija (6., 9., 15., 21. i 42. dan)

Nakon šestog dana na EPS preparatu na dnu vodenog medija primijećene su samo pojedinačne vegetativne stanice. Približavanjem interfazi uz pojedinačne stanice pronađene su

i mikrokolonije vegetativnih stanica. U interfazi su pronađene nakupine vegetativnih stanica s malom količinom matriksa (plavo obojenje) (Slika 14.), a odmicanjem od interfaze prema dijelu stakalca koji se nalazi na zraku pronađene su endospore i pojedinačne vegetativne stanice s mikrokolonijama (Slika 15.). Daljnjim udaljavanjem pronađen je mali broj vegetativnih stanica i endospora.

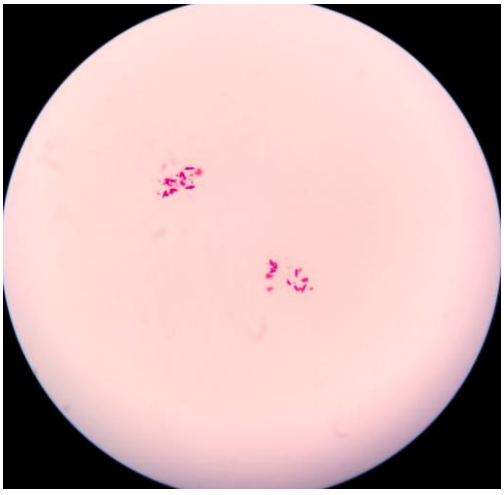


Slika 14. EPS šesti dan - interfaza

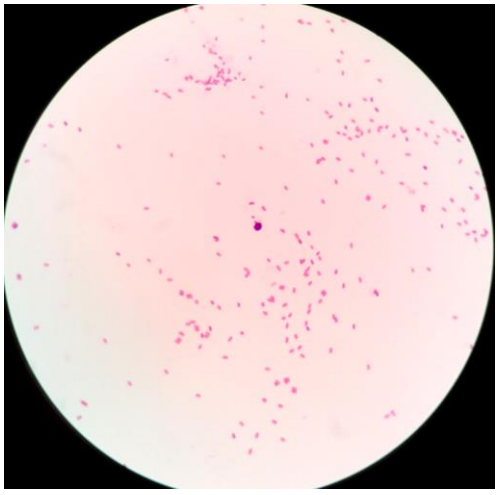


Slika 15. EPS šesti dan - zrak

Šesti dan na ES predmetnom stakalcu u vodenom mediju pronađene su pojedinačne vegetativne stanice s nekoliko endospora, a približavanjem interfazi su primijećene veće količine mikrokolonija (Slika 16.) u odnosu na pojedinačne vegetativne stanice i uz njih su pronađene i endospore. Na interfazi su pronađene velike nakupine vegetativnih stanica. Odmicanjem prema dijelu stakalca u zraku primijećene su velike količine endospora s pojedinačnim vegetativnim stanicama, te nekoliko mikrokolonija. Daljnjim udaljavanjem nađene su velike količine endospora s malim brojem vegetativnih stanica (Slika 17.).

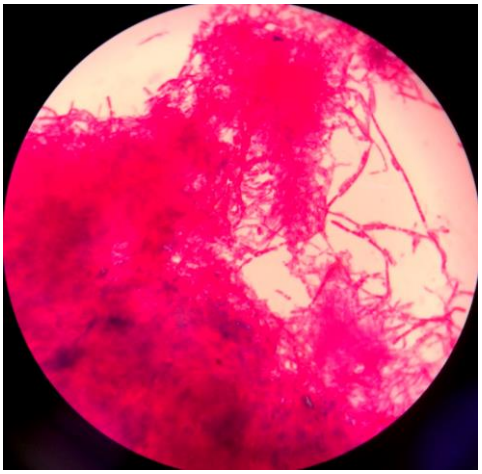


Slika 16. ES šesti dan - vodeni medij

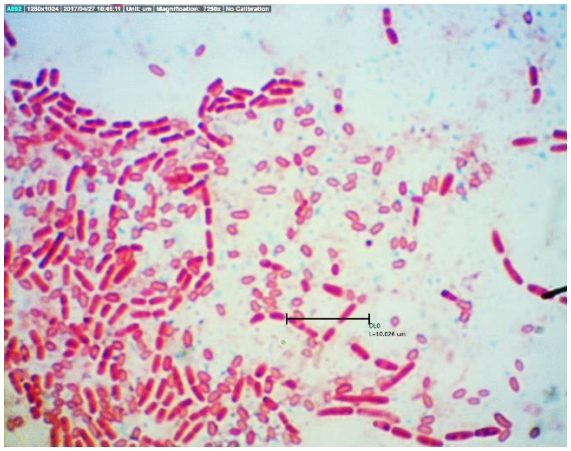


Slika 17. ES šesti dan - zrak

Devetog dana na EPS stakalcu u vodenom mediju pronađene su samo pojedinačne vegetativne stanice. Približavanjem interfazi primijećen je manji broj pojedinačnih vegetativnih stanica, a više mikrokolonija. U interfazi su pronađene velike nakupine vegetativnih stanica s malo endospora, te je primijećen i nastanak matriksa (Slika 18.). Udaljavanjem prema dijelu stakalca u zraku nađene su mikrokolonije, pojedinačne vegetativne stanice i velike količine endospora (Slika 19.), a nastavkom udaljavanja pronađene su velike količine endospora, čak i jako visoko na predmetnom stakalcu, s malim brojem vegetativnih stanica.



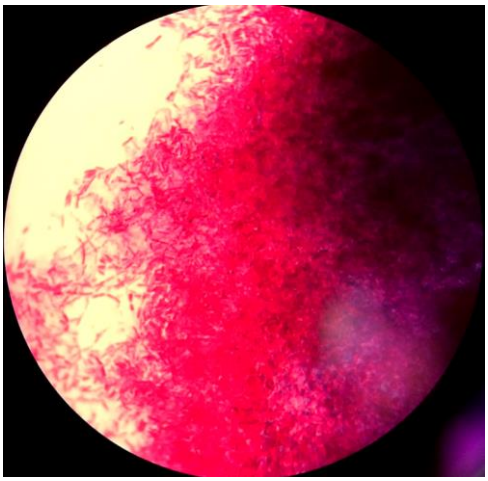
Slika 18. EPS deveti dan - interfaza



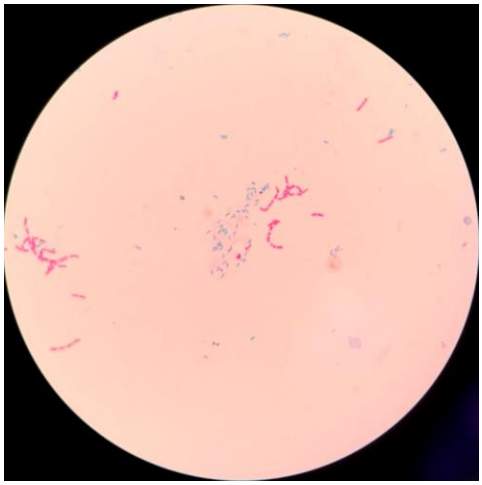
Slika 19. EPS deveti dan - zrak, sa mjerilom

Nakon devetog dana na ES preparatu u vodenom mediju pronađene su pojedinačne vegetativne stanice i mala količina endospora u završnom stadiju razvoja (čitave obojene zeleno). Približavanjem interfazi primijećena je veća količina mikrokolonija s malim brojem endospora u završnom stadiju. U interfazi su pronađene velike nakupine vegetativnih stanica s endosporama u završnom stadiju (Slika 20.). Udaljavanjem od interfaze u dijelu stakalca u zraku prevladavaju endospore u završnom stadiju s mikrokolonijama (Slika 21.).

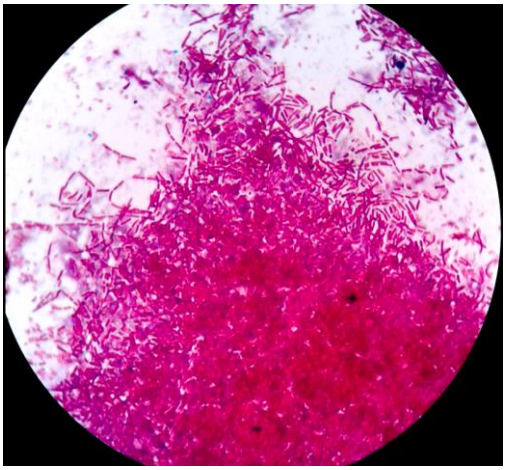
Petnaestog dana na EPS preparatu u vodenom mediju pronađene su samo pojedinačne vegetativne stanice, dok je približavanjem interfazi pronađena manja količina pojedinačnih vegetativnih stanica, a više mikrokolonija. U interfazi je pronađena velika nakupina vegetativnih stanica s malo endospora, te mala količina matriksa (Slika 22.). Udaljavanjem prema dijelu stakalca u zraku nađen je mali broj mikrokolonija i pojedinačnih vegetativnih stanice te veće količine endospora (Slika 23.). Nastavkom udaljavanja pronašli smo većinom endospore, čak i jako visoko na stakalcu.



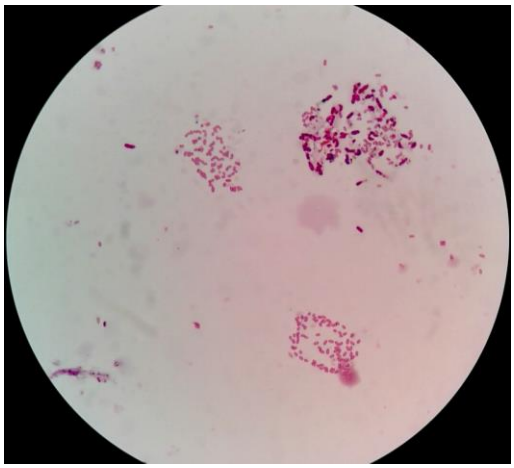
Slika 20. ES deveti dan - interfaza



Slika 21. ES deveti dan - zrak

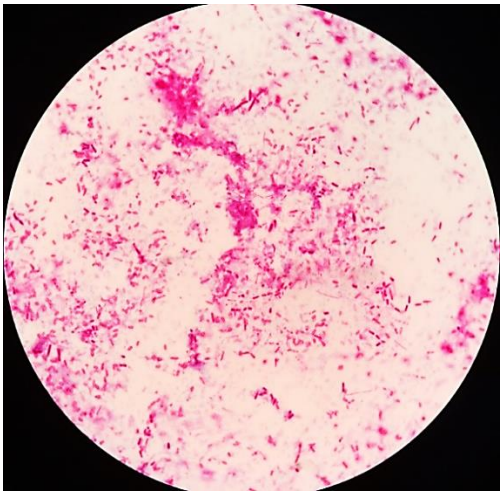


Slika 22. EPS 15. dan - interfaza

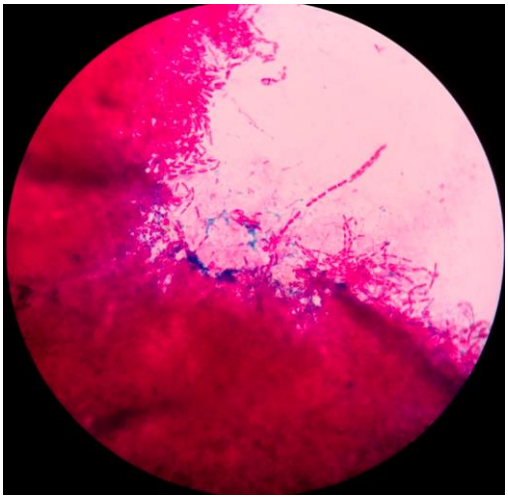


Slika 23. EPS 15. dan - zrak

Nakon dvadeset i jednog dana na EPS preparatu u vodenom mediju pronađen je mali broj endospora s malom količinom pojedinačnih vegetativnih stanica. Pomicanjem prema interfazi pronađen je veliki broj endospora, pojedinačnih vegetativnih stanica te mikrokolonija i mala količina matriksa (Slika 24). U interfazi su pronađene endospore, matriks i velike nakupine vegetativnih stanica (Slika 25.). Na drugom kraju interfaze na granici sa zrakom su pronađene velike nakupine endospora s pojedinačnim vegetativnim stanicama i mikrokolonijama. Udaljavanjem se broj endospora i pojedinačnih vegetativnih stanica smanjio te endospore opet pronalazimo relativno visoko na stakalcu.

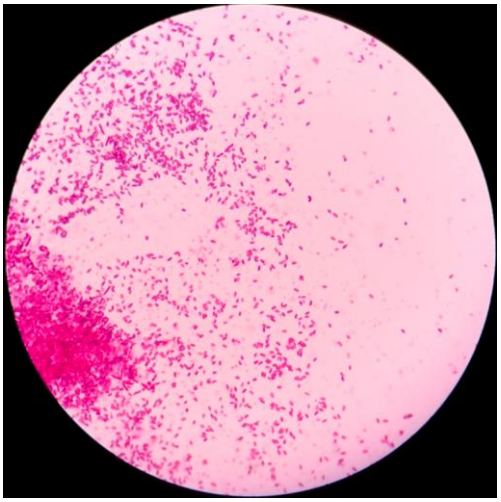


Slika 24. EPS 21. dan - voda/interfaza

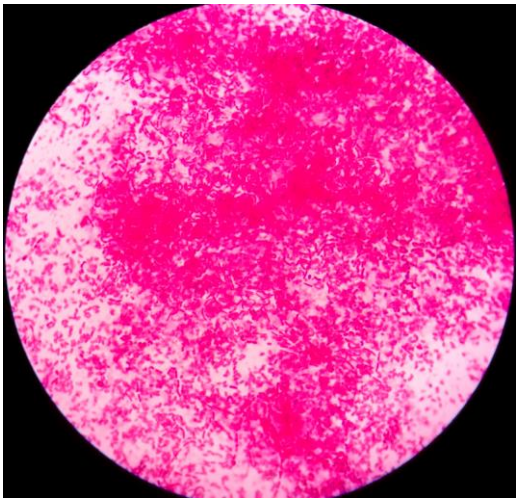


Slika 25. EPS 21. dan - interfaza

Dvadeset i prvi dan na ES predmetnom stakalcu u vodenom mediju pronađene su male količine pojedinačnih vegetativnih stanica i endospora, ali se taj broj veoma povećao približavanjem interfazi (Slika 26.). U interfazi su uočene velike nakupine vegetativnih stanica i endospora (Slika 27.). Udaljavanjem od interfaze smanjila se količina vegetativnih stanica i endospora te su endospore opet pronađene relativno visoko u uzorku s nekoliko mikrokolonija vegetativnih stanica.



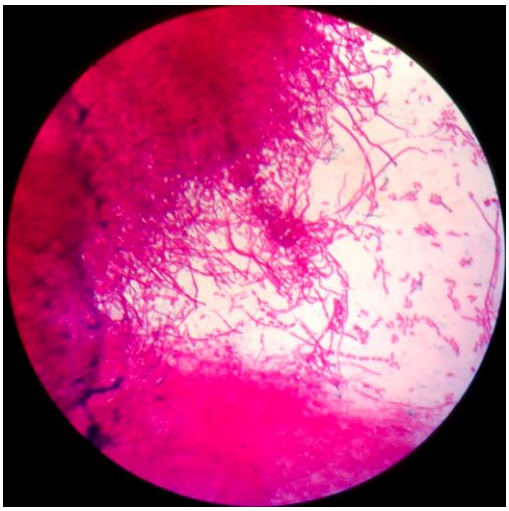
Slika 26. ES dan - granica voda/interfaza



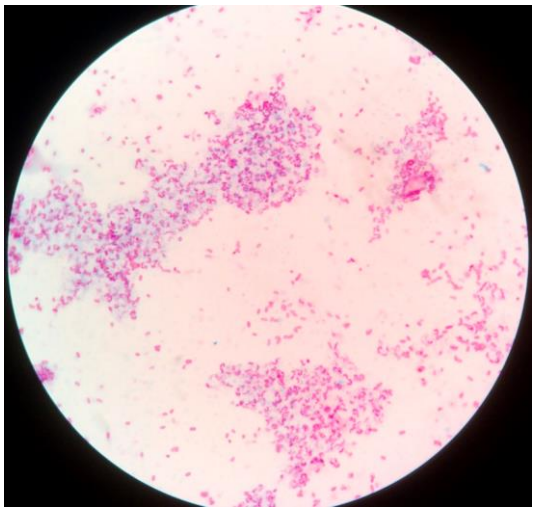
Slika 27. ES 21. dan - interfaza

Nakon četrdeset i drugog dana na EPS predmetnom stakalcu u vodenom mediju pronađena je mala količina pojedinačnih vegetativnih stanica, dok se približavanjem interfazi taj broj sve više povećavao uz nastanak mikrokolonija. U interfazi su uočene velike nakupine vegetativnih stanica, te velika količina matriksa (Slika 28.) dok je u dijelu interfaze bliže zraku pronađena velika količina endospora. Odmicanjem od interfaze pronađene su pojedinačne vegetativne stanice, mikrokolonije i veliki broj endospora te je uočena mala

količina matriksa oko njih (Slika 29.). Daljnjim odmicanjem od interfaze pronađene su velike nakupine endospora visoko na preparatu uz nekoliko pojedinačnih vegetativnih stanica.

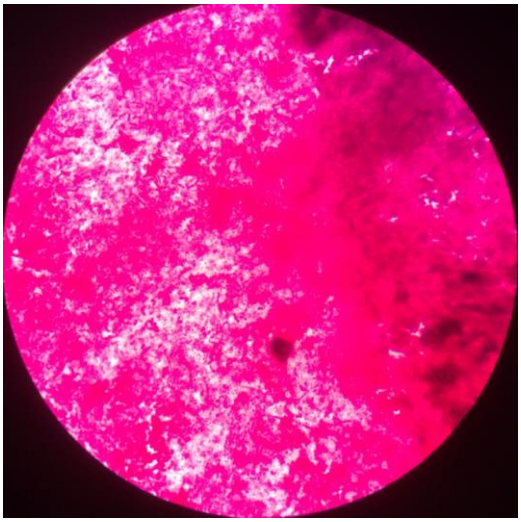


Slika 28. EPS 42. dan - interfaza

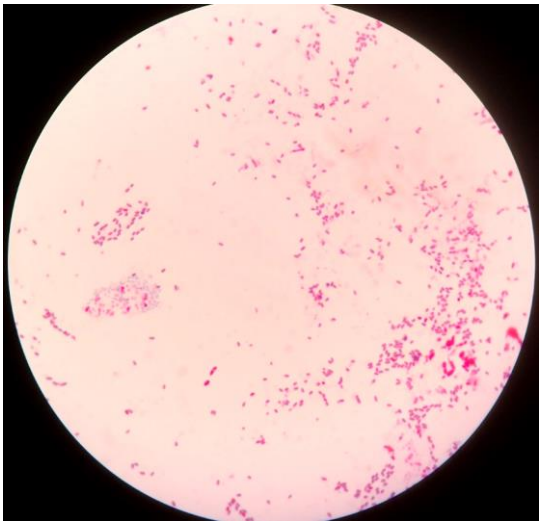


Slika 29. EPS 42. dan - zrak

Četrdeset i drugog dana na ES preparatu u vodenom mediju pronađena je mala količina pojedinačnih vegetativnih stanica i endospora. Približavanjem interfazi taj se broj povećao te su pronađene i mikrokolonije vegetativnih stanica. U interfazi su uočene endospore i velike nakupine vegetativnih stanica (Slika 30.) te se količina endospora značajno povećala na dijelu interfaze bliže zraku. Daljnjim udaljavanjem od interfaze pronađene su endospore i pojedinačne vegetativne stanice s nekoliko mikrokolonija (Slika 31.) te su endospore opet pronađene relativno visoko na predmetnom stakalcu.



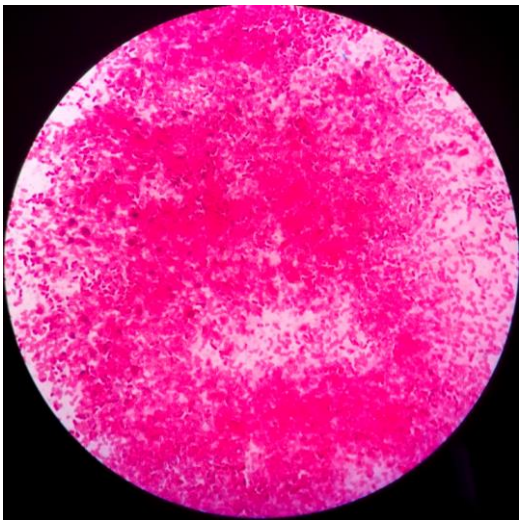
Slika 30. ES 42. dan - interfaza



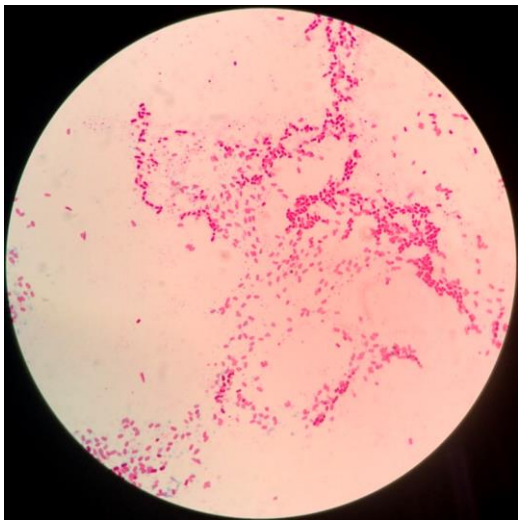
Slika 31. ES 42. dan - zrak

3.3. Uzorci bez mijenjanja medija (6., 9., 15. i 21. dan)

Nakon šestog dana na EPS preparatu na dnu vodenog medija pronađene su endospore, pojedinačne vegetativne stanice i mikrokolonije. Približavanjem interfazi uočena je velika količina endospora i vegetativnih stanica. U interfazi su pronađene nakupine vegetativnih stanica s endosporama i s malom količinom matriksa (Slika 32.). Odmicanjem od interfaze prema dijelu stakalca koji se nalazi na zraku pronađeno je puno više endospora nego pojedinačnih vegetativnih stanica i mikrokolonija (Slika 33.). Daljnjim udaljavanjem pronađena je manja količina endospora i pojedinačnih vegetativnih stanica.

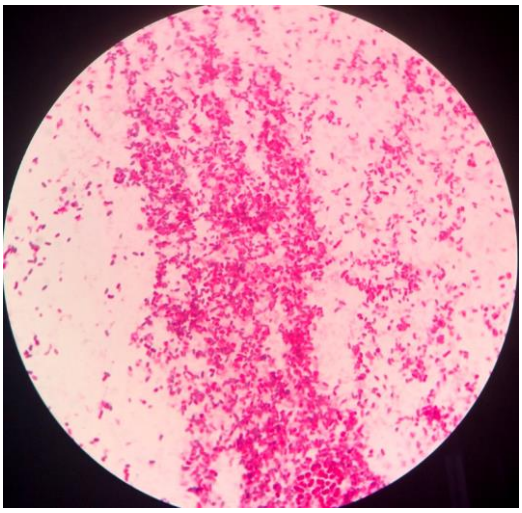


Slika 32. EPS šesti dan - interfaza

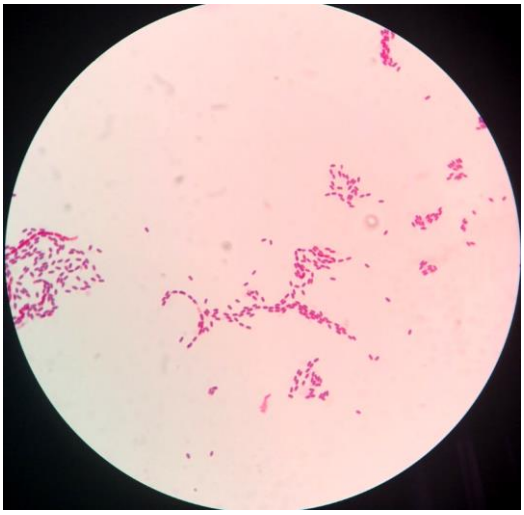


Slika 33. EPS šesti dan - zrak

Šesti dan na ES predmetnom stakalcu u vodenom mediju pronađene su endospore, mikrokolonije i pojedinačne vegetativne stanice. Približavanjem interfazi je pronađena veća količina endospora s vegetativnim stanicama. Na interfazi su uočene velike količine vegetativnih stanica i endospora (Slika 34.), a odmicanjem prema dijelu stakalca u zraku primijećene su većinom endospore s malom količinom mikrokolonija i pojedinačnih vegetativnih stanica (Slika 35.). Daljnjim udaljavanjem pronađene su endospore i nekoliko pojedinačnih vegetativnih stanica relativno visoko na stakalcu.

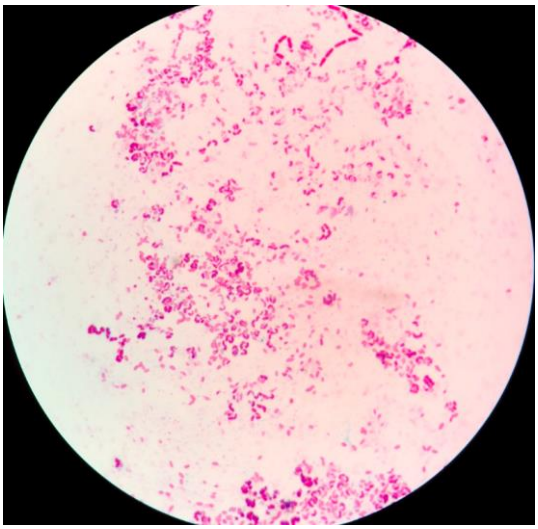


Slika 34. ES šesti dan - interfaza

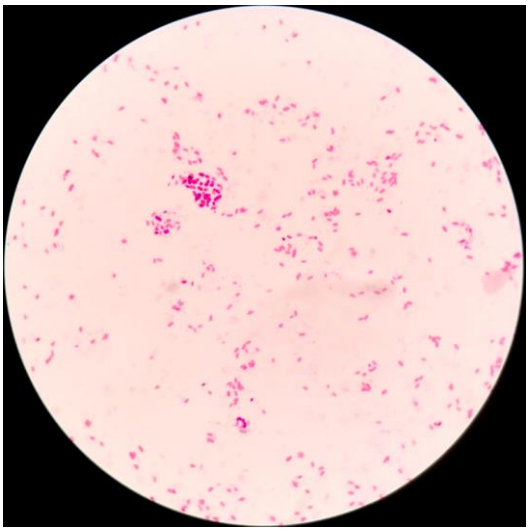


Slika 35. ES šesti dan - zrak

Nakon devetog dana u obje epruvete (EPS i ES) makroskopski je došlo do promjene boje medija, tj. medij je potamnio te je količina bakterijske biomase na interfazi bila značajno manja u usporedbi s uzorcima s mijenjanjem medija. Na dijelu EPS stakalca koji je bio u vodenom mediju pronađena je manja količina pojedinačnih vegetativnih stanica i endospora. U interfazi su pronađene nakupine vegetativnih stanica s endosporama te je uočena mala količina matriksa (Slika 36.). Udaljavanjem prema dijelu stakalca u zraku većinom su pronađene endospore s malom količinom mikrokolonija i pojedinačnih vegetativnih stanica (Slika 37.).



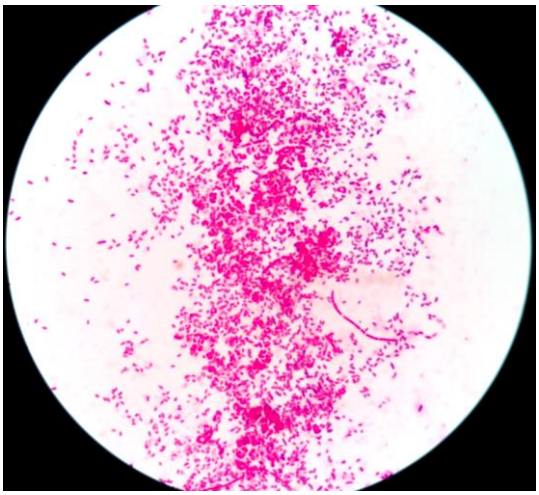
Slika 36. EPS deveti dan - interfaza



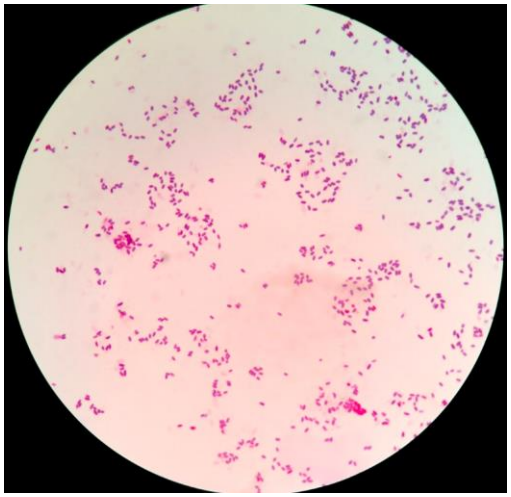
Slika 37. EPS deveti dan - zrak

Devetog dana na ES preparatu u vodenom mediju pronađeno je manje endospora i pojedinačnih vegetativnih stanica u odnosu na deveti dan s mijenjanjem medija. U interfazi su pronađene nakupine vegetativnih stanica i endospora, ali značajno manje količine nego u

uzorcima s mijenjanjem medija (Slika 38.). Udaljavanjem od interfaze u dijelu stakalca koje se nalazi u zraku pronađene su mikrokolonije, pojedinačne vegetativne stanice i velika količina endospora (Slika 39.).

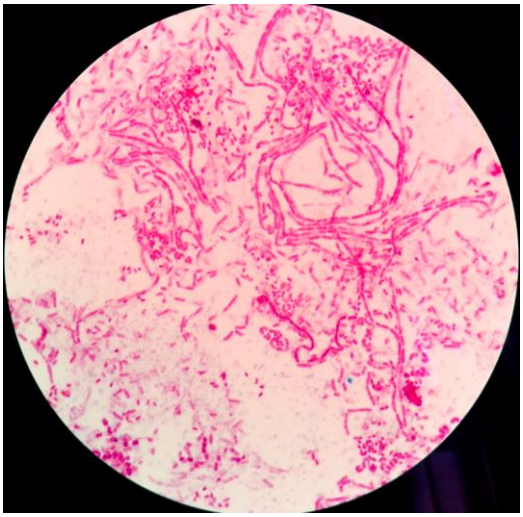


Slika 38. ES deveti dan - interfaza

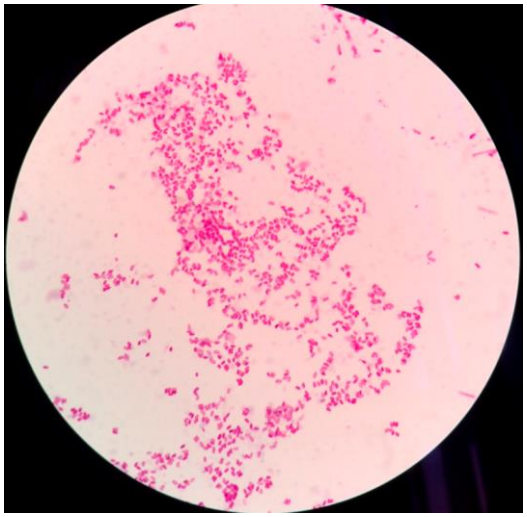


Slika 39. ES deveti dan - zrak

Poslije petnaest dana bez mijenjanja medija na EPS uzorku u vodenom mediju pronađena je mala količina endospora s pojedinačnim vegetativnim stanicama, dok su približavanjem interfazi pronađene i mikrokolonije. U interfazi je pronađena veća količina vegetativnih stanica i endospora s obzirom na ostali dio predmetnog stakalca (Slika 40.). Odmicanjem od interfaze pronađene su velike nakupine endospora s malom količinom pojedinačnih vegetativnih stanica (Slika 41.), a daljnjim odmicanjem pronađeno je samo nekoliko endospora.

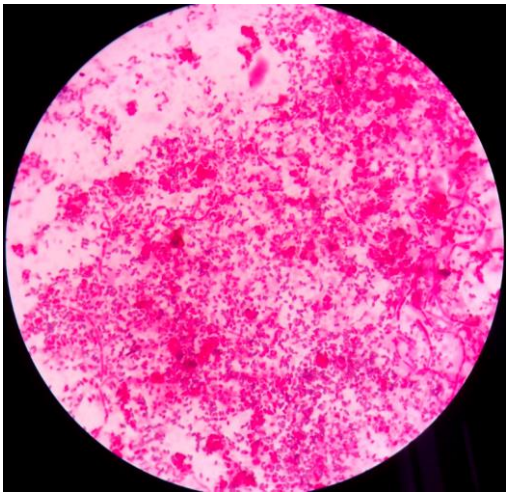


Slika 40. EPS 15. dan - interfaza

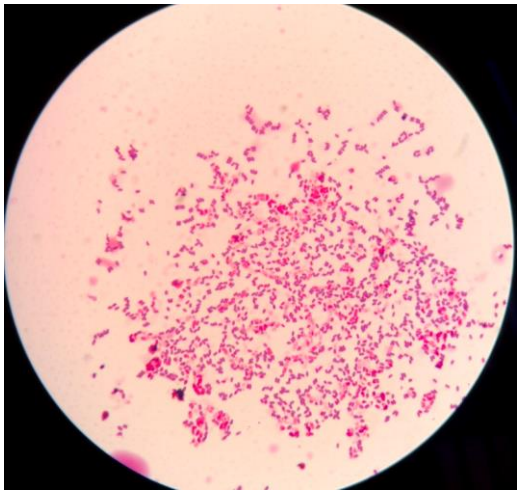


Slika 41. EPS 15. dan - zrak

Petnaestog dana na ES preparatu u vodenom mediju pronađena je mala količina endospora i pojedinačnih vegetativnih stanica, dok se približavanjem interfazi taj broj povećao te su pronađene i mikrokolonije. U interfazi su uočene velike nakupine endospora i vegetativnih stanica, s tim da su endospore bile u značajno većem broju (Slika 42.). Na prijelazu prema zraku pronađene su velike količine endospora i malo pojedinačnih vegetativnih stanica (Slika 43.). Daljnjim udaljavanjem su prevladavale spore s malim brojem pojedinačnih vegetativnih stanica.

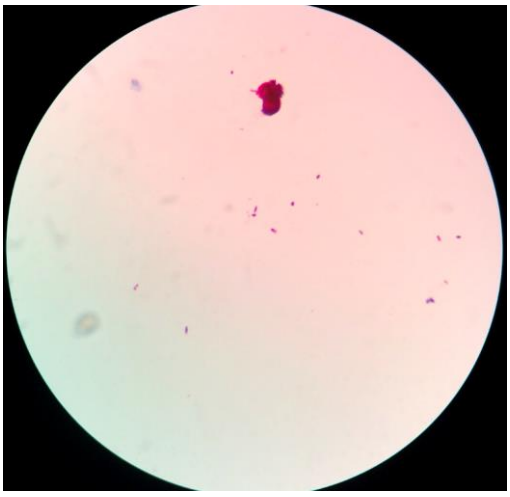


Slika 42. ES 15. dan - interfaza

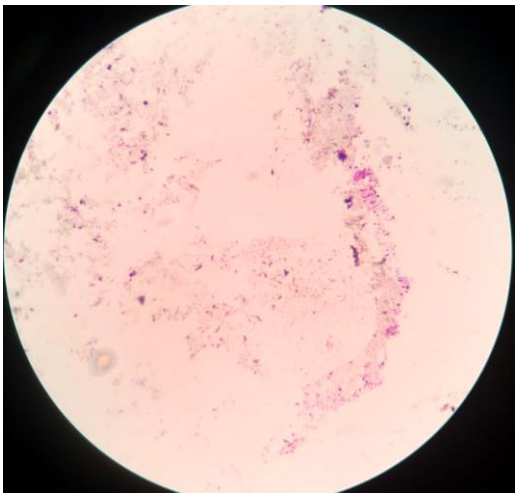


Slika 43. ES 15. dan - zrak

Poslije dvadeset i prvog dana na EPS preparatu u vodenom mediju pronađena je izuzetno mala količina endospora (Slika 44.). U interfazi su uočeni samo ostatci prijašnje bakterijske biomase (Slika 45.). Odmicanjem od interfaze su također pronađeni samo ostatci prijašnjih vegetativnih stanica.

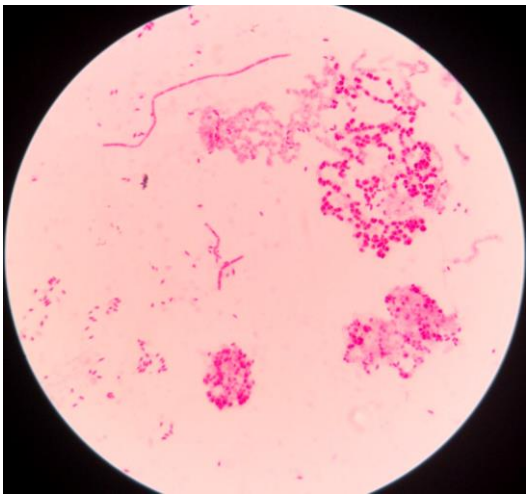


Slika 44. EPS 21. dan - voda

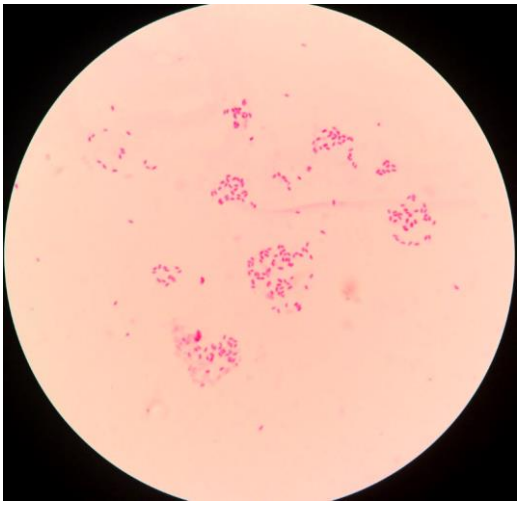


Slika 45. EPS 21. dan - interfaza

Nakon dvadeset i prvog dana na ES preparatu u vodenom mediju pronađen je mali broj endospora i pojedinačnih vegetativnih stanica. Na interfazi je pronađen veći broj vegetativnih stanica i endospora u odnosu na ostatak uzorka (Slika 46.). Udaljavanjem od interfaze pronađeno je više endospora u odnosu na vegetativne stanice te smo opet pronašli endospore jako visoko na stakalcu (Slika 47.).



Slika 46. ES 21. dan - interfaza



Slika 47. ES 21. dan - zrak

4. RASPRAVA

4.1. „Nulti“, prvi i treći dan

Prije početka eksperimenta promatran je „nulti“ dan poslije bojanja EPS-a i ES-a radi referentne vrijednosti. Kao što je bilo i očekivano nije došlo do obojenja matriksa u EPS uzorku, jer se biofilm nije ni mogao razviti s obzirom na to da je samo stavljena kapljica bakterijske suspenzije na predmetno stakalce koje je zatim obojeno. Pronađen je mali broj pojedinačnih vegetativnih stanica u oba uzorka te je u ES uzorku pronađen mali broj obojenih endospora koje su vjerojatno postojale i u EPS uzorku, ali se nisu mogle uočiti.

Nakon jednog dana primjećuje se velika razlika u usporedbi s „nultim“ danom. Na interfazi (granica voda-zrak) oba uzorka (EPS i ES) pronađen je veći broj vegetativnih stanica, s tim da su u ES uzorku pronađene i endospore na interfazi kojih je vjerojatno i bilo u EPS uzorku, ali nisu bile toliko uočljive. Dok je izvan interfaze u vodenom i plinovitom mediju oba uzorka pronađen samo mali broj pojedinačnih vegetativnih stanica s malom količinom endospora u ES uzorku.

Nakon trećeg dana makroskopski je primijećeno da bakterijska biomasa tone, tj. da ne stvara pelikule na površini. Ali na oba uzorka na donjem dijelu stakalca, koje je bilo u tekućem mediju, najčešće nije pronađeno ništa ili jako mali broj pojedinačnih vegetativnih stanica. Stoga bez obzira na to što se na dnu uzorka nalazila velika količina bakterijske biomase to područje nije pogodovalo početku stvaranja biofilma na predmetnom stakalcu (vjerojatno zbog nedostatka kisika). Nakon tri dana inkubacije u oba uzorka i u vodenom i plinovitom mediju bliže interfazi je primijećena veća brojnost vegetativnih stanica i endospora. U interfazi je došlo do razvitka mikrokolonija i značajno se povećao broj vegetativnih stanica i endospora, ali još uvijek nije došlo do razvoja matriksa. U usporedbi s radovima Wijman i sur. (2007) i Lindsay i sur. (2006), koji su se također bavili razvojem biofilma bakterije *B. cereus*, u kojima je do razvitka biofilma došlo nakon 24 h ili 48 h ovi rezultati su bili iznenađujući. Uz to su pronađene endospore relativno visoko na predmetnom stakalcu u plinovitom mediju što je potvrda da *B. cereus* sporulira u zraku kao što je već uočeno istraživanjem Drobniewski (1993).

4.2. Uzorci s mijenjanjem medija (6., 9., 15., 21. i 42. dan)

Nakon šestog dana inkubacije s mijenjanjem medija u oba uzorka na dnu vodenog medija primijećene su samo pojedinačne vegetativne stanice s malim brojem endospora u ES uzorku. U vodenom mediju približavanjem interfazi uz pojedinačne stanice pronađene su i veće količine mikrokolonija vegetativnih stanica u usporedbi s pojedinačnim vegetativnim stanicama te je pronađen manji broj endospora u ES uzorku. U interfazi su pronađene nakupine vegetativnih stanica u oba uzorka s malom količinom matriksa u EPS uzorku. Odmicanjem od interfaze prema plinovitom mediju pronađene su endospore i pojedinačne vegetativne stanice s mikrokolonijama. Daljnjim udaljavanjem pronađen je mali broj pojedinačnih vegetativnih stanica i endospora čija je količina bila znatno veća u ES uzorku.

Poslije devet dana inkubacije u vodenom mediju pronađene su samo pojedinačne vegetativne stanice, s tim da su u ES uzorku pronađene i endospore u završnom stadiju razvoja. Približavanjem interfazi primijećeno je manje pojedinačnih vegetativnih stanica, a više mikrokolonija te su u ES uzorku također uočene endospore u završnom stadiju razvoja. U interfazi su pronađene velike nakupine vegetativnih stanica s malim brojem endospora u završnom stadiju te su primijećene i veće količine matriksa u EPS uzorku. Udaljavanjem od interfaze prema dijelu stakalca u plinovitom mediju pronađene su mikrokolonije, pojedinačne vegetativne stanice i velike količine endospora u završnom stadiju, a nastavkom udaljavanja pronađene su velike količine endospora u završnom stadiju, čak i jako visoko na stakalcu, s malim brojem pojedinačnih vegetativnih stanica.

Petnaestog dana na EPS preparatu u vodenom mediju pronađene su samo pojedinačne vegetativne stanice, dok je približavanjem interfazi pronađena manja količina pojedinačnih vegetativnih stanica u usporedbi s mikrokolonijama. U interfazi su pronađene velike nakupine vegetativnih stanica s malim brojem endospora, te mala količina matriksa. Udaljavanjem prema dijelu stakalca u plinovitom mediju uočen je mali broj mikrokolonija i pojedinačnih vegetativnih stanice te veće količine endospora. Nastavkom udaljavanja pronašli smo većinom endospore, čak i jako visoko na stakalcu. Nažalost nemamo podatke o ES uzorku poslije petnaest dana inkubacije, ali bi podatci vjerojatno bili jako slični EPS uzorku jer se već sad primjećuje određeni model razvoja biofilma bakterije *B. cereus* o čemu će više biti rečeno u nastavku rasprave.

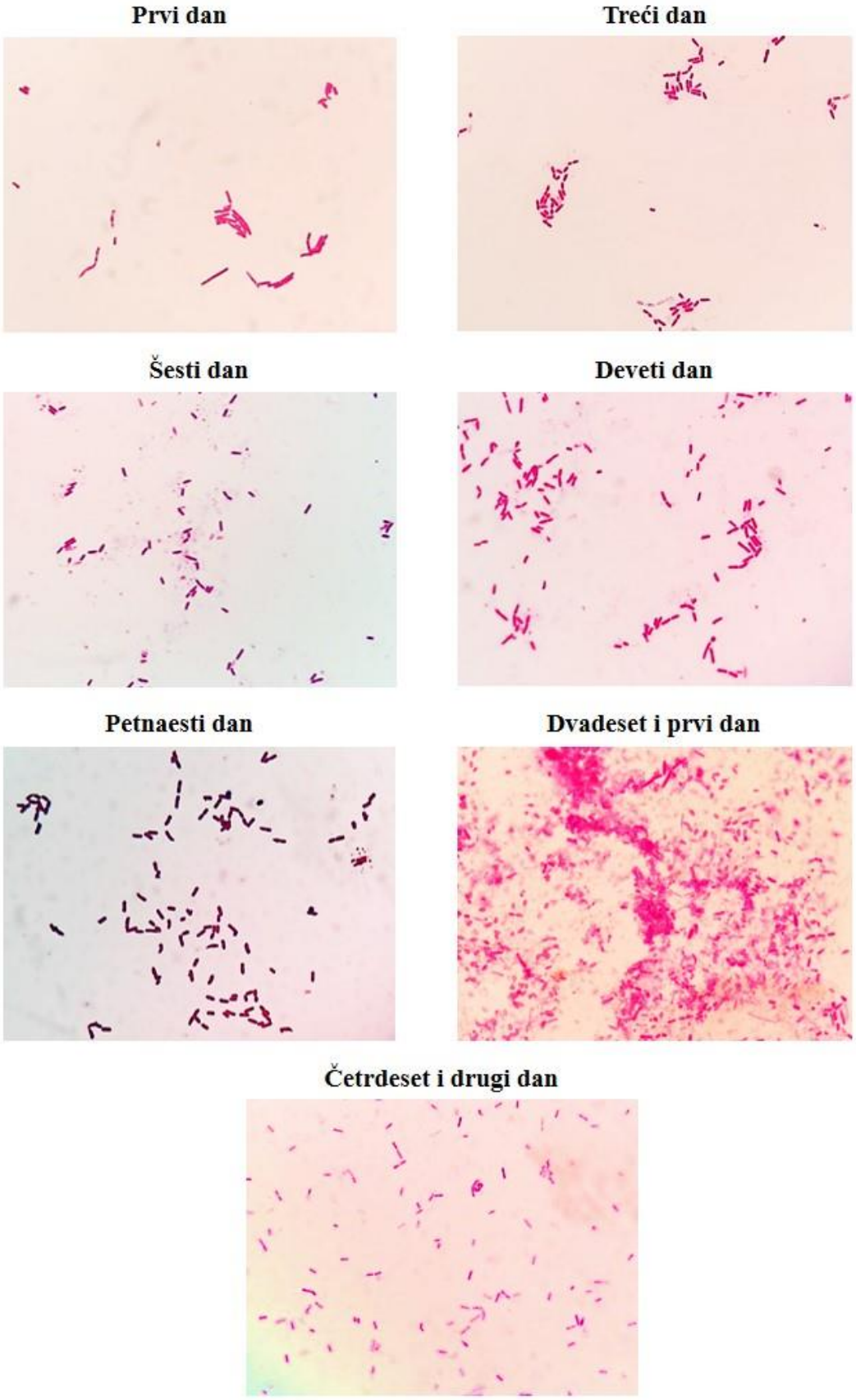
Nakon dvadeset i jednog dana na oba uzorka u vodenom mediju pronađen je mali broj pojedinačnih vegetativnih stanica i endospora, čiji se broj značajno povećavao približavanjem interfazi te je uz njih pronađen veliki broj mikrokolonija i mala količina matriksa u EPS uzorku. U interfazi su pronađene velike nakupine vegetativnih stanica i endospora s matriksom u EPS uzorku. Na drugom kraju interfaze u plinovitom mediju su pronađene velike nakupine endospora s pojedinačnim vegetativnim stanicama i mikrokolonijama. Udaljavanjem od interfaze broj endospora i pojedinačnih vegetativnih stanica se smanjio te endospore opet pronalazimo relativno visoko na stakalcu.

Nakon četrdeset i drugog dana u oba uzorka u vodenom mediju pronađena je mala količina pojedinačnih vegetativnih stanica s endosporama u ES uzorku, dok se približavanjem interfazi taj broj sve više povećavao uz nastanak mikrokolonija. U interfazi su uočene endospore i velike nakupine vegetativnih stanica te velika količina matriksa u EPS uzorku, dok je u dijelu interfaze bliže zraku pronađena velika količina endospora u oba uzorka. Odmicanjem od interfaze pronađene su pojedinačne vegetativne stanice, mikrokolonije i veliki broj endospora, te je uočena mala količina matriksa u EPS uzorku. Daljnjim odmicanjem od interfaze u oba uzorka su pronađene velike nakupine endospora visoko na preparatu uz nekoliko pojedinačnih vegetativnih stanica.

Kao i u radu Constantin (2009) iz svega navedenog bi se moglo pretpostaviti da je interfaza pogodno područje za razvoj i razmnožavanje aerobne ili fakultativno anaerobne bakterije poput *B. cereus* jer joj pruža pristup kisiku u plinovitom mediju i hranjivim tvarima u vodenom mediju. Uz to se može pretpostaviti da interfaza nije samo pogodno područje za razvitak vegetativnih stanica već i za sporulaciju bakterije *B. cereus* te su do sličnih pretpostavki došli i Wijman i sur. (2007).

4.3. Usporedba razvoja bakterije *B. cereus* u svim fazama od 1. do 42. dana s mijenjanjem medija

Radi bolje usporedbe razvoja bakterije *B. cereus* u vodenoj fazi, interfazi i plinovitoj fazi napravljen je slikoviti prikaz EPS uzoraka za svaku fazu kronološki poredan od prvog do četrdeset i drugog dana. U vodenoj fazi kao što se može primijetiti na slici 48. prevladavaju uglavnom mikrokolonije vegetativnih stanica u usporedbi s pojedinačnim vegetativnim stanicama i endosporama, s tim da se njihov broj povećava s duljim vremenom inkubacije.

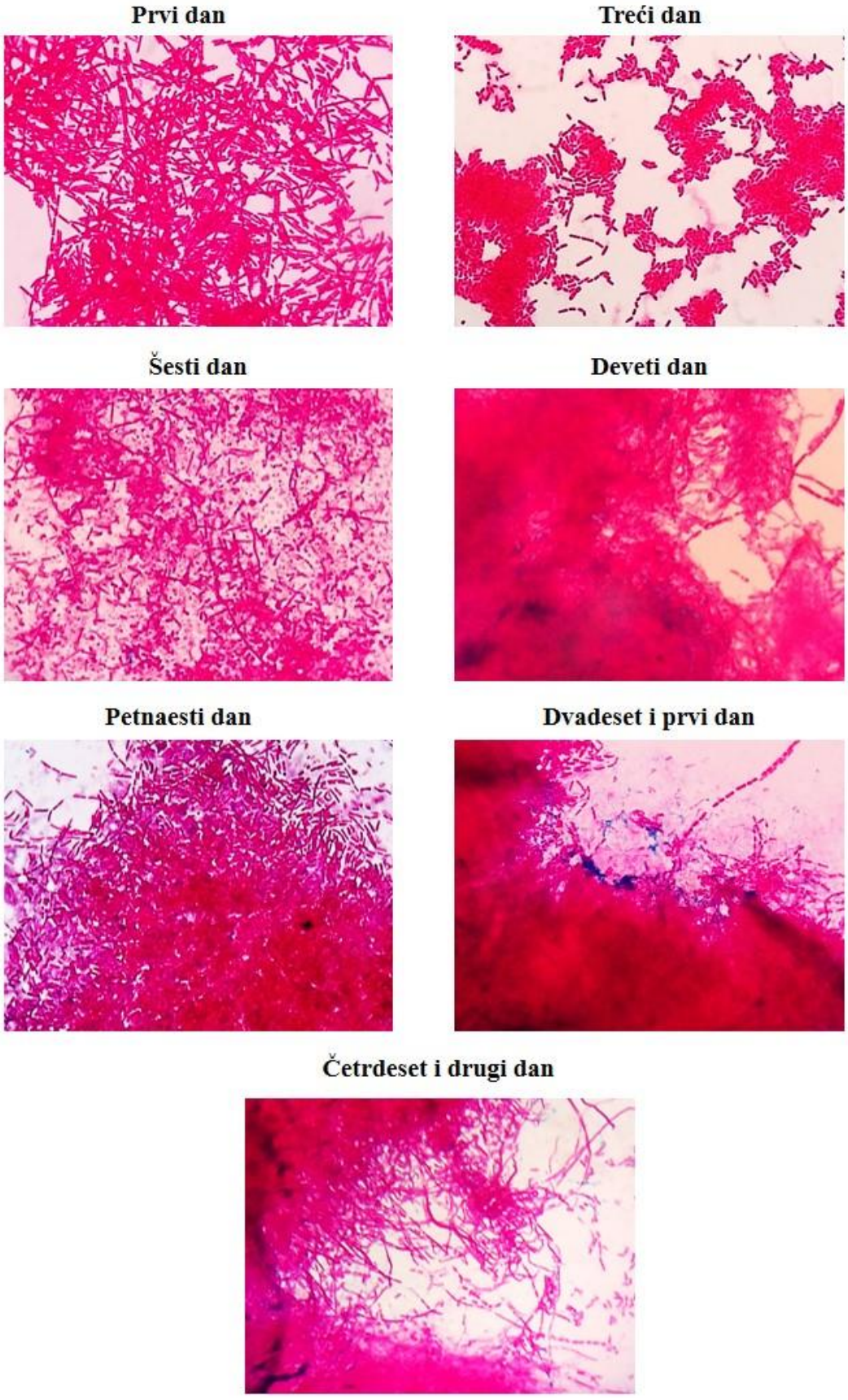


Slika 48. Kronološki poredan razvoj bakterije *B. cereus* u vodenom mediju u EPS uzorcima s mijenjanjem medija.

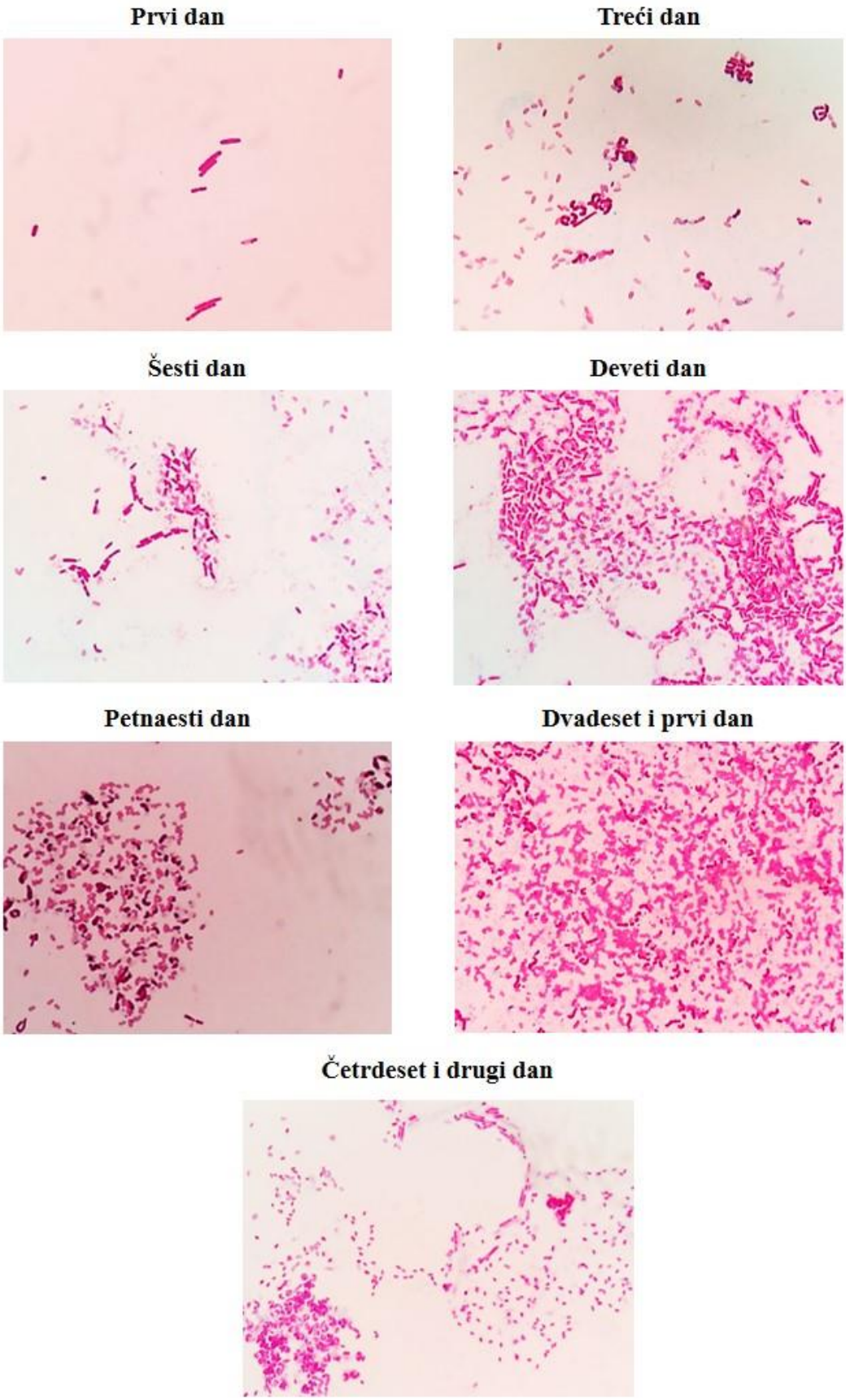
Petnaestog i četrdeset i drugog dana u vodenoj fazi nije toliko vidljivo proporcionalno povećavanje u usporedbi s danima prije njih, ali do toga je došlo zbog greške u fotodokumentaciji, tj. nije slikano isto područje na predmetnom stakalcu.

U kronološki poredanim rezultatima na interfazi u EPS uzorku može se lijepo vidjeti povećavanje količine matriksa od šestog dana do četrdeset i drugog dana (Slika 49.). Te se isto tako može zamijetiti povećanje broja vegetativnih stanica i endospora od prvog do četrdeset i drugog dana.

Na slici 50. vidi se povećanje broja mikrokolonija i endospora s povećavanjem vremena inkubacije s tim da količina endospora dominira u dvadeset i prvom i četrdeset i drugom danu u usporedbi sa mikrokolonijama. Mogući razlog za to je povećanje kompeticije zbog povećanja bakterijske biomase u uzorcima.



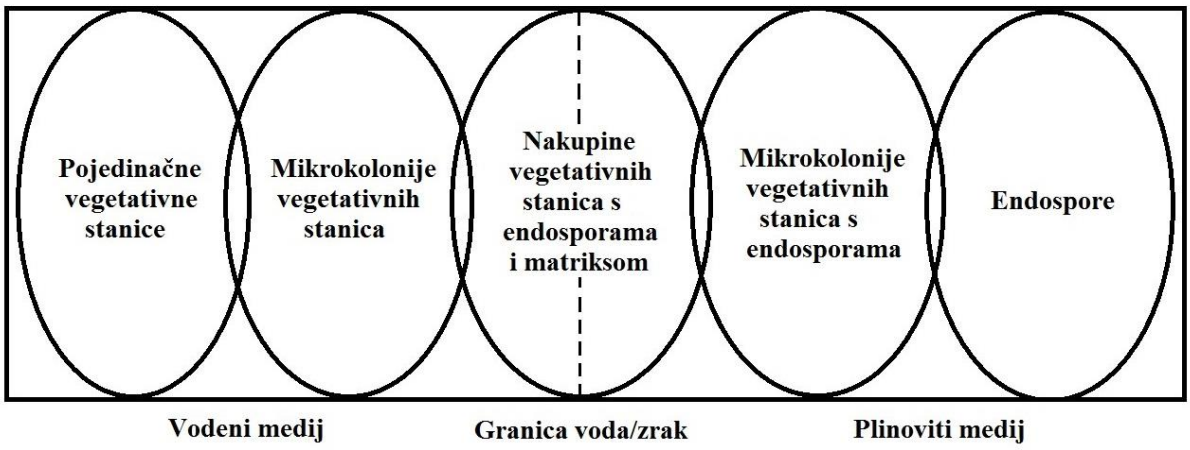
Slika 49. Kronološki poredan razvoj bakterije *B. cereus* u interfazi u EPS uzorcima s mijenjanjem medija.



Slika 50. Kronološki poredan razvoj bakterije *B. cereus* u plinovitoj fazi u EPS uzorcima s mijenjanjem medija.

4.4. Model razvoja biofilma bakterije *B. cereus*

Pomoću podataka dobivenih iz eksperimenta s mijenjanjem medija razvijen je model stvaranja biofilma bakterije *B. cereus* na predmetnom stakalcu kao što je prikazano na slici 51. Tijekom čitavog eksperimenta na dnu predmetnog stakalca u vodenom mediju su uglavnom uočene samo pojedinačne vegetativne stanice, dok je približavanjem interfazi došlo do nastanka mikrokolonija vegetativnih stanica. Na granici voda-zrak je došlo do razvitka velikih nakupina vegetativnih stanica s endosporama (čiji se broj značajno povećavao s dužim vremenom inkubacije) te je šestog dana došlo do razvitka matriksa čija se količina također povećavala s duljim vremenom inkubacije. Udaljavanjem od interfaze prema plinovitom mediju su uglavnom pronađene mikrokolonije s većom količinom endospora, dok su daljnjim udaljavanjem od interfaze uglavnom pronađene samo endospore i to često u velikom broju.



Slika 51. Model razvoja biofilma bakterije *B. cereus* na predmetnom stakalcu

4.5. Usporedba uzoraka bez mijenjanja medija (6., 9., 15. i 21. dan) s uzorcima s mijenjanjem medija

Nakon šestog i devetog dana inkubacije bez mijenjanja medija makroskopski je primijećeno da nije došlo do taloženja bakterijske biomase kao što je bio slučaj u svim uzorcima s mijenjanjem medija već se stvorila pelikula na granici voda-zrak. Iz toga bi se moglo zaključiti da se bakterijski biofilm ne razvija dodatno iz postojećih stanica pričvršćenih za podlogu već da podlogu koloniziraju i slobodno pokretne stanice iz uzorka. U oba uzorka poslije šest dana inkubacije bez mijenjanja medija pronađeni su slični podatci u usporedbi s uzorcima s mijenjanjem medija, uz jednu iznimku, a to je veća količina endospora u sve tri

faze (vodenoj fazi, interfazi i plinovitoj fazi). Dok je poslije devet dana inkubacije primijećena značajno manja količina vegetativnih stanica i endospora u svim fazama u usporedbi s devetim danom s mijenjanjem medija te je i makroskopski došlo do zamućenja medija.

Poslije petnaestog i dvadeset i prvog dana inkubacije bez mijenjanja medija makroskopski je primijećeno da bakterijska biomasa tone, tj. da više nema pelikulu na granici voda-zrak te se makroskopska količina bakterijske biomase na predmetnom stakalcu dodatno smanjila u usporedbi s devetim danom bez mijenjanja medija. U oba uzorka poslije petnaest dana inkubacije primijećena je još manja količina vegetativnih stanica i endospora u svim fazama u usporedbi s devetim danom bez mijenjanja medija te je također količina endospora bila veća u usporedbi s vegetativnim stanicama. Dok su poslije dvadeset i jednog dana inkubacije pronađeni većinom ostatci prijašnje bakterijske biomase u svim fazama s malim brojem endospora.

Iz svega navedenog bi se moglo pretpostaviti da ne mijenjanje medija jako loše utječe na bakteriju *B. cereus* što se najbolje vidi iz uzoraka poslije dvadeset i jednog dana inkubacije gdje je skoro došlo do kompletnog nestanka vegetativnih stanica i endospora bakterije *B. cereus* na predmetnom stakalcu. Razlog tomu je vjerojatno nedostatak hranjivih tvari u tekućem mediju. Ali isto tako možemo primijetiti povećanje sporulacije šestog, devetog i petnaestog dana kao odgovor bakterije *B. cereus* na nepovoljne uvjete. Zanemarivanjem smanjivanja količine vegetativnih stanica i endospora u usporedbi s uzorcima s mijenjanjem medija primjećujemo da je model razvoja biofilma sličan kao i onaj pretpostavljen za uzorke s mijenjanjem medija uz iznimku da su endospore dominirale u usporedbi s vegetativnim stanicama te da su pronađene u svim fazama.

5. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem razvijen je model stvaranja biofilma bakterije *B. cereus* na granici voda-zrak u kojem je dokazano da u vodenom mediju ne dolazi do razvitka biofilma već prevladavaju samo pojedinačne stanice. Formacija biofilma se događa samo u interfazi dok u plinovitom mediju prevladavaju endospore kao dokaz da bakterija *B. cereus* sporulira u zraku.

Također, rezultatima ovog istraživanja dokazano je da postojeći model razvoja bakterijskog biofilma nije primjenjiv u stacionarnim sustavima poput onog upotrijebljenog u ovom eksperimentu jer bi po tom modelu u ovom eksperimentu trebalo doći do razvitka biofilma i u vodenom i plinovitom mediju. Stoga bi u budućnosti trebalo odvojiti model razvoja biofilma u stacionarnom sustavu od modela razvoja biofilma u protočnom sustavu jer se jedan model ne može primijeniti u oba sustava.

Uz to, uz pomoć uzoraka s ne mijenjanjem medija može se pretpostaviti da se bakterije ne šire samo iz postojećeg biofilma, već da biofilm koloniziraju i slobodno pokretne bakterije. Te se isto tako dobiveni model razvoja biofilma bakterije *B. cereus* može primijeniti i na uzorke s ne mijenjanjem medija uz iznimku što endospore dominiraju poslije devet dana inkubacije u svim uzorcima kao odgovor na nepovoljne uvjete te da poslije dvadeset i prvog dana inkubacije dolazi do odumiranja bakterijske biomase.

Ovim radom dokazano je da biofilm bakterije *B. cereus* služi kao mjesto iz kojeg se može širiti velika količina vegetativnih stanica i endospora te da je granica voda-zrak pogodno područje za razvoj i razmnožavanje aerobnih ili fakultativno anaerobnih bakterija poput *B. cereus* jer im pruža pristup kisiku u plinovitom mediju i hranjivim tvarima u vodenom mediju.

6. LITERATURA

1. Andersson, A., Rönner, U., Granum, P. E. (1995): What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?. *International journal of food microbiology*, *28*(2), 145-155.
2. Bottone, E. J. (2010): *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical microbiology reviews*, *23*(2), 382-398.
3. Constantin, O. E. (2009): Bacterial biofilms formation at air liquid interfaces. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, *5*, 18.
4. Davies, D. G., Geesey, G. G. (1995): Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Applied and environmental microbiology*, *61*(3), 860-867.
5. De Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. (1994): Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and bioengineering*, *43*(11), 1131-1138.
6. Drobniewski, F. A. (1993): *Bacillus cereus* and related species. *Clinical microbiology reviews*, *6*(4), 324-338.
7. Ghigo, J. M. (2003): Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt?. *Research in microbiology*, *154*(1), 1-8.
8. Granum, P. E., Lund, T. (1997): *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology letters*, *157*(2), 223-228.
9. Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., Gohar, M. (2010): Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*, *156*(4), 1009-1018.
10. Kamar, R., Gohar, M., Jéhanno, I., Réjasse, A., Kallassy, M., Lereclus, D., Sanchis, V., Ramarao, N. (2013): Pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains as revealed by phenotypic analysis. *Journal of clinical microbiology*, *51*(1), 320-323.
11. Lindsay, D., Brözel, V. S., Von Holy, A. (2006): Biofilm-spore response in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* during nutrient limitation. *Journal of food protection*, *69*(5), 1168-1172.
12. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A (2015): Brock biology of microorganisms (14th edition). Pearson Education, Harlow.
13. National Center for Biotechnology Information. Medical Microbiology. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/ (pristup 15. kolovoza 2017.)

14. O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. (2000): Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, *54*(1), 49-79.
15. Scher, K., Romling, U., Yaron, S. (2005): Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Applied and enviromental microbiology*, *71*(3), 1163-1168.
16. Schlafer, S., Meyer, R. L. (2016): Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *Journal of microbiological methods*, *138*, 50-59.
17. Stewart, P. S., Costerton, J. W. (2001): Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The lancet*, *358*(9276), 135-138.
18. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W. (2002): Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, *56*(1), 187-209.
19. Sue, D., Hoffmaster, A. R., Popovic, T., Wilkins, P. P. (2006): Capsule production in *Bacillus cereus* strains associated with severe pneumonia. *Journal of clinical microbiology*, *44*(9), 3426-3428.
20. Ultee, A., Kets, E. P. W., Smid, E. J. (1999): Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, *65*(10), 4606-4610.
21. Wijman, J. G., de Leeuw, P. P., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., Abee, T. (2007): Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and environmental microbiology*, *73*(5), 1481-1488.

7. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Josipa Ćevid

Datum i mjesto rođenja: 19.02.1992., Split, Hrvatska

Adresa prebivališta: Zagrebačka 21, 22320, Drniš

Broj mobilnog telefona: 095/848-8504

E-mail adresa: jcevid@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2015. – 2017. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, diplomski studij Ekologija i zaštita prirode, Modul kopnene vode

2010. – 2015. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, preddiplomski sveučilišni studij Biologija

2006. – 2010. Srednja škola Ivana Meštrovića, Drniš, opća gimnazija

VJEŠTINE:

Poznavanje jezika: engleski (aktivan), talijanski (pasivan), njemački (pasivan)

Kompjuterski programi: MS Office (Word, Excel, PowerPoint), GIS softver

Vozačka dozvola: B kategorija