Model rasta bakterijskog biofilma u stacionarnim uvjetima

Rotim, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:090262

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Katarina Rotim

Model rasta bakterijskog biofilma u stacionarnim uvjetima

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

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 edukacije biologije i kemije.

ZAHVALA

Zahvaljujem se, prije svega, svom mentoru doc. dr. sc. Tomislavu Ivankoviću što me strpljivo vodio kroz izradu ovog rada. Također, zahvaljujem na velikoj pomoći, prenošenju znanja i ukazanom povjerenju.

Neizmjerno hvala mojim roditeljima i sestrama na podršci, ljubavi, molitvama i ohrabrenjima tijekom cijelog mog školovanja.

Veliko hvala mojim kolegama Danieli, Hrvoju i Luciji na svoj radosti, iznimnoj potpori i predivnim sjećanjima na studentske dane. Hvala i svim dragim prijateljima zbog kojih sam danas tu gdje jesam.

Posebno hvala mom dečku Franu koji me svojom podrškom nesebično pratio svih ovih godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Model rasta bakterijskog biofilma u stacionarnim uvjetima

Katarina Rotim

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mnoge bakterije mogu postojati kao zajednice vezane na površinu poznate kao biofilmovi. Bakterijski biofilm je sesilna zajednica čije su stanice ireverzibilno povezane sa supstratom i međusobno, te uronjene u matriks izvanstanične polimerne tvari (eng. *extracellular polymeric substance,* EPS) koji su same stvorile. Istraživanje je bilo usmjereno na statičke sustave biofilma koji su posebno korisni za ispitivanje ranijih stadija formiranja biofilma. Za istraživanje su korištene bakterije *Bacillus cereus* i *Acinetobacter junii*. Cilj istraživanja bio je odrediti model rasta biofilma kojeg tvore te vrste bakterija u stacionarnim uvjetima, kao i vizualizirati biofilm, usporediti količine nastalog EPS-a, te usporediti rast planktonskih i imobiliziranih bakterija kroz vrijeme u stacionarnim uvjetima (*batch culture*) te uvjetima kontinuiranog rasta (*continuous culture*). Budući da se pratila biomasa bakterija kroz vrijeme i količina nastalog EPS-a, bakterije su se bojale bojilom Alcian blue i Karbol-fuksinom. Zaključeno je da u stacionarnim uvjetima model rasta bakterijskog biofilma koji se odvija u pet faza nije primjenjiv za bakteriju *B. cereus*, dok je primjenjiv za bakteriju *A. junii*. Također je zaključeno da stacionarni uvjeti pogoduju vrsti *B. cereus*, dok kod bakterije *A. junii* nema značajne razlike u uvjetima kontinuiranog rasta i u stacionarnim uvjetima.

(30 stranica, 13 slika, 28 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: biofilm, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter junii*, stacionarni uvjeti, ekstracelularni matriks
Voditelj: Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.
Ocjenitelji:
Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.
Rad prihvaćen: 07.06.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Bacterial biofilm growth model in stationary conditions

Katarina Rotim

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Many bacteria may exist as surfaces-related communities known as biofilms. Bacterial biofilm is a sessile community whose cells are irreversibly linked to the substrate and mutually, and immersed in the matrix of extracellular polymeric substances (EPS) that they have created. The research was focused on static biofilm systems that are particularly useful for the early stages of biofilm formation. Bacteria *Bacillus cereus* and *Acinetobacter junii* were used for the study. The goal was to determine a model of biofilm created by these bacteria species in stationary conditions. Also, visualize the biofilm, compare the amount of produced EPS and compare the growth of planktonic and immobilized bacteria over time in batch culture and continuous culture. Given that we monitored bacterial biomass through the time and the amount of produced EPS, bacteria were stained with Alcian-blue which dye the EPS and Carbol-fuchsin which dye the cells. It was concluded that in stationary conditions the five stage model of biofilm development is not applicable to *B. cereus*, but is applicable to *A. junii*. It was also concluded that stationary conditions were beneficial for the growth of *B. cereus*, whereas in comparison with *A. junii* there was no significant difference in the stationary assay relative to the continuous growth assay.

(30 pages, 13 figures, 28 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: biofilm, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter junii*, stationary conditions, extracellular matrix
Supervisor: Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.
Reviewers:
Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.
Thesis accepted: 07.06.2018.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Biofilm 1

1.2. Stacionarni uvjeti 3

1.3. Vrsta *Bacillus cereus* 4

1.4. Vrsta *Acinetobacter junii* 6

1.5. Cilj istraživanja 7

2. MATERIJALI I METODE 8

2.1. Priprema medija i sterilne vode 8

2.2. Nasađivanje bakterija 8

2.3. Priprema bakterijske suspenzije 8

2.4. Uzgoj bakterijskog biofilma u tekućem mediju na zrncima zeolita 9

2.4.1. Uzgoj bakterija u eksperimentu s mijenjanjem medija i u eksperimentu bez mijenjanja medija 9

2.4.2. Mikroskopski preparati 10

2.5. Statistika 11

3. REZULTATI 12

3.1. Razvoj biofilma bakterije *Bacillus cereus* u pokusu bez mijenjanja medija 12

3.2. Razvoj biofilma bakterije *Bacillus cereus* u pokusu s mijenjanjem medija 14

3.3. Razvoj biofilma bakterije *Acinetobacter junii* u pokusu bez mijenjanja medija 15

3.4. Razvoj bakterijskog biofilma *Acinetobacter junii* u pokusu s mijenjanjem medija 16

3.5. Broj planktonskih i imobiliziranih bakterija *B. cereus* kojima nije mijenjan medij 17

3.6. Broj planktonskih i imobiliziranih bakterija *B. cereus* kojima je mijenjan medij 18

3.7. Broj imobiliziranih bakterija *B. cereus* kojima nije mijenjan medij i kojima je medij mijenjan 19

3.8. Broj planktonskih i imobiliziranih bakterija *A. junii* kojima nije mijenjan medij 20

3.9. Broj planktonskih i imobiliziranih bakterija *A. junii* kojima je mijenjan medij 21

3.10. Broj imobiliziranih bakterija *A. junii* kojima nije mijenjan medij i kojima je medij mijenjan 22

4. RASPRAVA 23

5. ZAKLJUČAK 26

6. POPIS LITERATURE 27

7. ŽIVOTOPIS 30

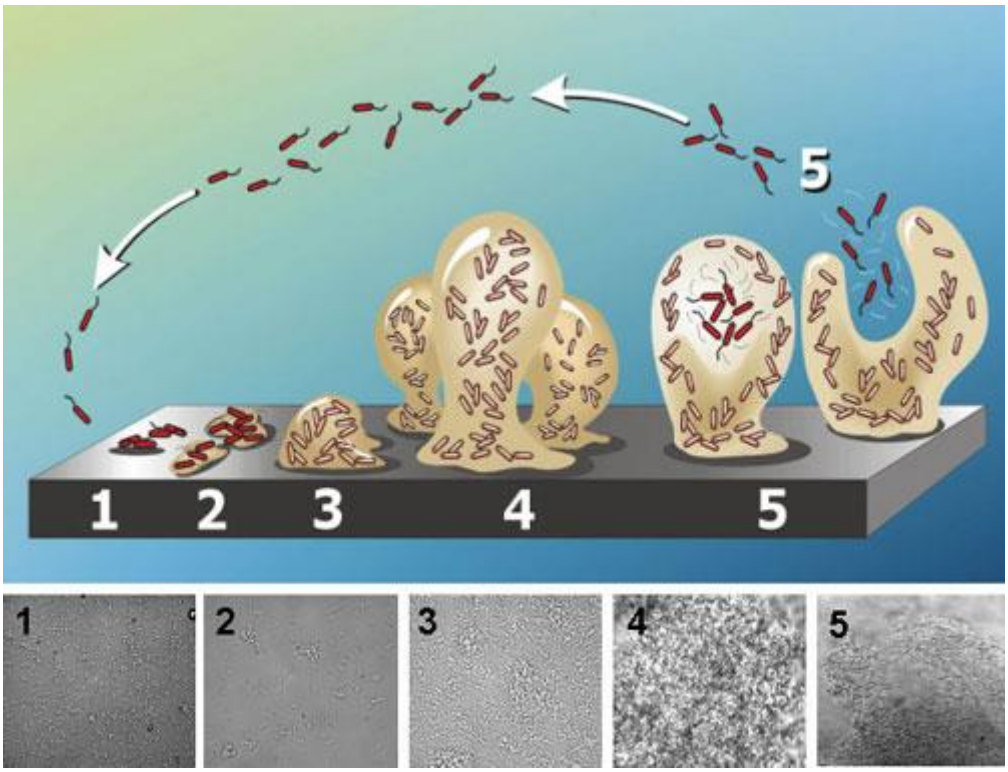
1. UVOD

1.1. Biofilm

U povijesti mikrobiologije, mikroorganizmi su prvenstveno bili karakterizirani kao planktonske, slobodno plivajuće stanice opisane na temelju njihovih karakteristika rasta u medijima bogatim hranjivim tvarima. Ponovno otkriće mikrobiološkog fenomena da se mikroorganizmi pričvrste i rastu na izloženim površinama, koji je prvi opisao van Leeuwenhoek, dovelo je do istraživanja koja su otkrila da površinski povezani mikroorganizmi (biofilmovi) pokazuju osobit fenotip s obzirom na transkripciju gena i brzinu rasta. Pokazano je da mikroorganizmi biofilma potiču specifične mehanizme za početno vezanje na površinu, razvoj strukture zajednice i ekosustava te odvajanje od površine (Donlan 2002). Biofilm je sesilna zajednica mikroorganizama u kojoj se pojedinačne stanice drže zajedno, uronjene u matriks izvanstanične polimerne tvari (eng. *extracellular polymeric substance*, EPS) koji su same proizvele (Vraneš i Leskovar 2009). Izvanstanični polimerni matriks se sastoji od polisaharida, proteina i DNA (Branda i sur. 2015). Ekstracelularni matriks ima brojne uloge. On osigurava mehaničku stabilnost biofilma te štiti mikroorganizme kako se ne bi isušili. Također djeluje i kao zaštita od nepovoljnih bioloških i kemijskih utjecaja poput promjene pH, osmotskog stresa, antibiotika ili imunološke obrane domaćina. EPS pridonosi i apsorpciji i skladištenju hranjivih tvari te omogućava mikroorganizmima komunikaciju i genetsku izmjenu držeći stanice vrlo blizu. Osnovna struktura biofilma ima definiranu arhitekturu i daje optimalno okruženje za razmjenu genetskog materijala između stanica. Ključ razvitka biofilma je interakcija među bakterijama. Bakterije u biofilmu mogu komunicirati na više načina. Komunikaciju među stanicama provode autoinduktori, male signalne ekstracelularne molekule. Takav način komunikacije naziva se detekcija kvoruma (engl. *quorum sensing*). Nakupljanje autoinduktora omogućuje stanicama procjenu stanične gustoće (Hentzer i Givskov 2013). Bakterije se dijele na Gram-pozitivne i Gram-negativne. Osim različitih svojstava stanične stijenke, te dvije vrste bakterija imaju i različite načine komunikacije. Autoinduktori kod Gram-negativnih bakterija su neesencijalne aminokiseline, N-acil-homoserinski laktoni (AHL). Kod Gram-pozitivnih bakterija signalne molekule su oligopeptidi (Bassler 1999). U većini prirodnih okoliša, povezanost s površinom u strukturi poznatoj kao biofilm je prevladavajući način života bakterija (Grillo-Puertas i sur. 2012). Biofilm je često građen od različitih bakterija ili bakterija i gljiva, ali može biti izgrađen i od samo jedne vrste mikroorganizma. Biofilm, kao oblik sesilnog života bakterija, je u prirodi dominantan nad planktonskim oblikom (Kalenić i

sur. 2013). Formiranje biofilma stvara povoljne uvjete za trajni opstanak u prirodnom okolišu (Cairns i sur. 2014). Biofilmovi se mogu pridržavati na biološkim ili nebiološkim površinama (Hall-Stoodley i sur. 2004). Primjeri površina na kojima se može vezati biofilm jesu plastika, metal, kamen, čestice tla, medicinski implantati, te tkiva (Donlan 2002). Bakterije biofilma pokazuju veliku rezistenciju na djelovanje antibiotika i efektorskih molekula imunosnog sustava, te su zaštićene od brojnih negativnih utjecaja iz okoliša (Kalenić i sur. 2013). Biofilmovi mogu imati velik utjecaj na ljude s obzirom na to da mogu preživjeti u prirodnim, medicinskim i industrijskim uvjetima. Primjerice, formiranje biofilmova na medicinskim uređajima koji se koriste u modernoj medicini kao što su implantati i kateteri, često rezultiraju teškim kroničnim infekcijama. Biofilmovi se mogu naći posvuda, na ljudskim tkivima, zubima, trupovima brodova, te u cijevima gdje uzrokuju velike probleme. Međutim, biofilmovi na ljudskim tkivima ne moraju uvijek biti štetni. S obzirom na velike štete i koristi koje biofilmovi mogu činiti, bitno je razumjeti kako rastu bakterije u tim zajednicama (López i sur. 2010).

Slika 1 prikazuje ciklus razvoja bakterijskog biofilma koji se odvija u pet faza. U prvoj fazi dolazi do vezanja planktonskih bakterija sa supstratom (1). Tijekom inicijalnog vezanja neke planktonske bakterije se vežu te potom odvoje ili se pričvrste samo trenutno, zbog čega se taj prvi stadij naziva i reverzibilno povezivanje. Druga faza razvoja, ireverzibilno vezanje, je faza u kojoj stanice gube sposobnost spontanog i neovisnog kretanja (2). Nakupina stanica koja se formira tijekom ovog razdoblja razvoja biofilma ostaje pričvršćena na supstrat do posljednje faze razvoja biofilma. U trećoj fazi razvoja, maturaciji I, nakupina stanica postupno postaje slojevita, odnosno sve deblja (3). Faza maturacije II, koja je ujedno i četvrta faza, podrazumijeva dostizanje maksimalne veličine stanica unutar staničnih nakupina (4). Istraživanjem je dokazano da se planktonske stanice i stanice iz ove faze bitno razlikuju u strukturi proteina što ukazuje na njihova različita svojstva. Posljednji stadij je disperzija stanica, u kojem se bakterije odvajaju i odlaze iz unutrašnjosti (5). Postoji više razloga zbog kojih dolazi do disperzije stanica. Do ove faze može doći zbog manjka nutrijenata ili mehaničkim uklanjanjem, struganjem (Sauer i sur. 2002).



Slika 1. Shematski prikaz modela razvoja bakterijskog biofilma koji se odvija u pet faza: 1) početno povezivanje, 2) ireverzibilno vezanje, 3) maturacija I, 4) maturacija II i 5) disperzija. Prikazane su mikroskopske slike stadija razvoja biofilma bakterije *P. aeruginosa* (preuzeto sa http://2011.igem.org/Team:Glasgow/Biofilm).

Biofilm može nastati i kao rezultat klonalnog rasta početno vezanih bakterija, umjesto priključivanja novih planktonskih stanica u biofilm (Bejarano i sur. 2017).

1.2. Stacionarni uvjeti

Proučavanje rasta biofilma u stacionarnim uvjetima vrlo je korisno za ispitivanje ranijih stadija formiranja biofilma, uključujući početno prianjanje na površinu i nastajanje mikrokolonije. Na primjer, ove se analize mogu upotrijebiti za identifikaciju signala koji moduliraju prijelaz iz planktonskog oblika u oblik biofilma. Za razliku od analiza koje uključuju sustave kontinuiranog protoka, praćenje razvoja biofilma u stacionarnim uvjetima zahtijeva vrlo malo specijalizirane opreme i relativno je jednostavno za izvođenje. Osim toga, omogućava analizu formiranja biofilma s različitim očitanjima, uključujući mikroskopiranje žive stanice, makroskopsku vizualizaciju obojenih bakterija te njihovu brojnost. Takvo proučavanje razvoja biofilma u stacionarnim uvjetima je vrlo korisno sredstvo za proučavanje nastajanja, rasta i razvoja biofilma, te se koristi pojedinačno ili u kombinaciji s nekim drugim analizama. Jednostavnim promjenama uvjeta, poput medija koji se koristi ili vremena inkubacije, mogu se ispitivati različiti aspekti tih bakterijskih zajednica. Priroda stacionarnih

uvjeta ima i neke nedostatke, budući da se medij s bakterijskom suspenzijom ne opskrbljuje sa svježim medijem niti se propušta zrak, može doći do manjka hranjivih tvari i samim time do nemogućnosti razvoja zrelog biofilma. Poznata su četiri temeljna protokola za rast i analizu biofilmova u stacionarnim sustavima. Jedan od tih protokola je ispitivanje biofilma mikrotitarske ploče (eng. *microtiter plate biofilm assay*) koji je koristan za procjenjivanje bakterijskog pričvršćivanja mjerenjem bojanja vezane biomase. Druga je analiza na granici voda-zrak (eng. *air-liquid interface*, ALI) koja je komplementarna s analizom biofilma mikrotitarske ploče jer omogućuje izravno mikroskopiranje mikroorganizama. Treća analiza je na bazi kolonije (eng. *colony-based biofilm system*). Taj sustav je posebno koristan za praćenje stanične smrti u biofilmovima tretiranim antimikrobnim sredstvima. I naposljetku, Kadouri sistem je sistem slabog protoka (eng. *"low-flow"*) koji može poslužiti kao poveznica između stacionarnih (eng. *static assays*) i protočnih sustava (eng. *continuous-flow system*) (Merritt i sur. 2005).

1.3. Vrsta *Bacillus cereus*

Bakterija *Bacillus cereus* (Slika 2) je Gram-pozitivna, štapićasta, fakultativno anaerobna, pokretna bakterija koja stvara spore. Široko je rasprostranjena zbog svoje sposobnosti da preživljava u nepovoljnim uvjetima. Temperatura rasta je obično u rasponu od 10 do 48 °C, a optimalni rast između 28 i 35 °C. Vrsta *B. cereus* je obično prisutna u okolišima gdje se proizvodi hrana zbog svojih visoko adhezivnih endospora, šireći se na sve vrste hrane. Može uzorkovati neugodne bolesti kod ljudi zbog čega i je jedna od glavnih patogenih bakterija koje se prenose hranom, iako je u većini slučajeva bolest blaga i kratkotrajna. Jedinstvena priroda ove bakterije je u otpornosti na toplinu, sposobnosti oblikovanja endospora, proizvodnji toksina i odlici da može rasti na temperaturama nižim od 7 °C. Takve karakteristike bakterije daju dovoljno prostora da se smatra jednim od glavnih uzročnika bolesti (Abraha i sur. 2017). Poznato je da su neki sojevi ove vrste patogeni za ljude, dok se nekoliko sojeva koristi za poticanje rasta biljaka (Caballero i sur. 2018). Postojanost tog patogena u različitim sredinama rezultat je formiranja spora i biofilmova (Houry i sur. 2010). Bakterija *Bacillus cereus* u ljudi uzrokuje ozbiljne bolesti uzrokovane hranom zbog čega se mora kontrolirati prilikom upotrebe prirodnih konzervansa (Du i sur. 2018). Vrsta *B. cereus* ima slične regulatorne mehanizme i metaboličke puteve kao i bakterija *Bacillus subtilis*, s kojom je usko povezana. Osim što uzrokuje trovanje hranom, bakterija *B. cereus* je također često dijagnosticirana u slučajevima meningitisa, parodontoze ili endoftalmitisa. Ustrajan je kontaminant opreme u prehrambenoj industriji gdje je pronađen u

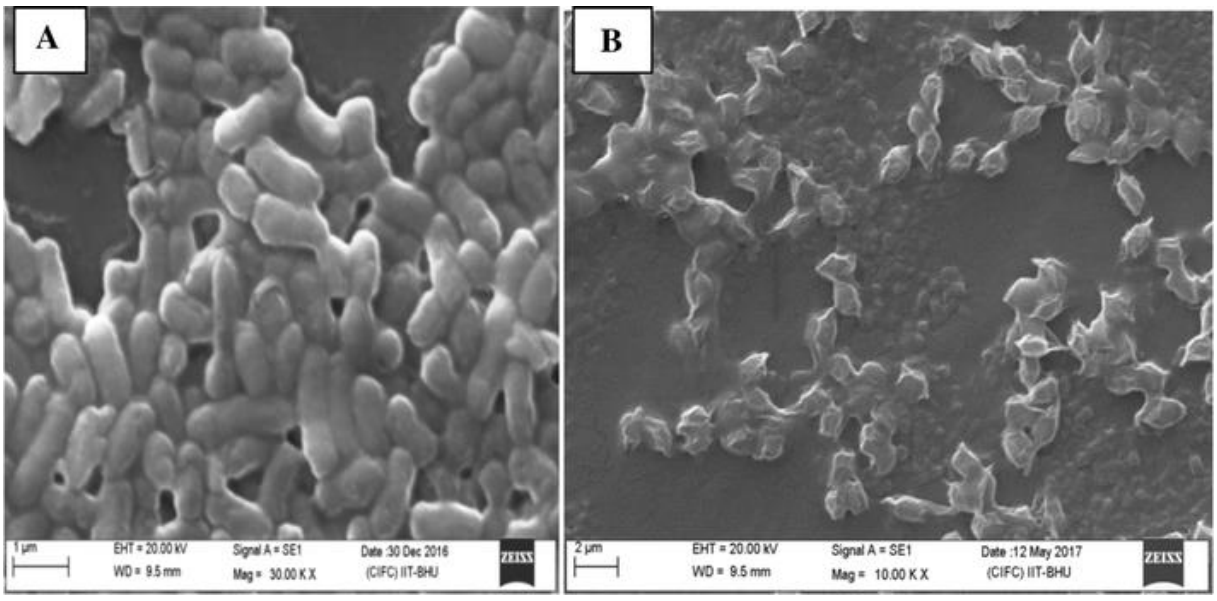
obliku spora i biofilmova vezanih na površinu nehrđajućeg čelika. Zabilježeno je da stvara debeli biofilm na interfazi zrak-voda, ali također može tvoriti tanke biofilmove na uronjenom staklu ili čeliku u uvjetima statičke kulture. (Houry i sur. 2010). Kao što je već rečeno, bakterija *B. cereus* je široko rasprostranjena u okolišu. Može biti otkrivena u neobrađenom mlijeku i mliječnim proizvodima, posebno u vegetativnom obliku koji je izravno izložen kontaktu s tlom. Još jedna važna osobina vrste *B. cereus* je njena sposobnost rasta na temperaturi skladištenja mlijeka (4-7 °C), što uglavnom određuje rok trajanja pasteriziranog mlijeka i mliječnih proizvoda. Bakterija proizvodi toksine koji su uzročnici bolesti koje se prenose hranom i smatra se značajnom opasnošću za javno zdravstvo. Zanimljivo je da spektar sojeva *B. cereus* varira od sojeva koji se koriste kao probiotici za ljude do toksičnih sojeva koji su vrlo otrovni te su bili odgovorni za smrtne slučajeve povezane s hranom (Abraha i sur. 2017).



Slika 2. Bakterije *Bacillus cereus* i endospore koje stvaraju snimljene svjetlosnim mikroskopom, povećanje 1000x. Metoda bojenja Alcian blue.

1.4. Vrsta *Acinetobacter junii*

Bakterija *Acinetobacter junii* (Slika 3) je kokobacil, Gram-negativna, aerobna te nepokretna bakterija koja pripada rodu *Acinetobacter*. Bakterije iz ovog roda prisutne su u tlu i vodi kao slobodnoživući saprofiti te su postali sve prisutniji u raznim infekcijama kod ljudi. Njihova bitna karakteristika je stvaranje rezistencije na antibiotike putem višestrukih mehanizama (Kalenić i sur. 2013). Infekcije izazvane bakterijom *Acinetobacter junii* se ne javljaju često. Opisane su neke epidemije poput septikemije kod novorođenčadi i onkoloških pacijenata s pedijatrije, kao i meningitis, peritonitis te očne infekcije (Traglia i sur 2014). Iako je bakterija *Acinetobacter baumannii* najčešće izolirana vrsta, uzročnik različitih infekcija i najrezistentnija vrsta među pripadnicima roda, stvarna učestalost i uloge ostalih članova roda kao ljudskih patogena može biti maskirana jer je pouzdana fenotipska karakterizacija dugotrajna i teška (Cayô i sur. 2011). Pojava i širenje bakterija rezistentnih na više lijekova je pod pritiskom javnog zdravstvenog problema. Otpornost bakterija na antibiotike uobičajena je u područjima gdje se antibiotici često koriste, a bakterije rezistentne na antibiotike se sve više javljaju u vodenim okolišima. Istražene su vrste roda *Acinetobacter* u otpadnim vodama. Dokazano je da proces pročišćavanja otpadnih voda pridonosi selektivnom povećanju rezistencije bakterija, iz roda *Acinetobacter*, na antibiotike (Zhang i sur. 2009).



Slika 3. Bakterije *Acinetobacter junii* izolata CHOO5 snimljene skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) prije (A) i nakon (B) tretmana s toluenom (preuzeto od Singh i sur. 2018).

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je bio odrediti model rasta biofilma kojeg tvore bakterije *Bacillus cereus* i *Acinetobacter junii* u stacionarnim uvjetima (bez kontinuiranog dodavanja svježeg hranjivog medija) te utvrditi razlikuje li se on od modela rasta biofilma u dinamičkim uvjetima (uz kontinuirano dodavanje svježeg hranjivog medija). Cilj je također bio i vizualizirati biofilm, usporediti količine nastalog EPS-a te usporediti rast planktonskih i imobiliziranih bakterija kroz vrijeme, u uzorcima u kojima je mijenjan medij s uzorcima u kojima nije mijenjan medij.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Priprema medija i sterilne vode

U ovom eksperimentu korišten je tekući Luria-Bertani (LB) hranjivi medij, sastava (po 1 L destilirane vode): 10 g triptona (engl. *Tryptone*), 5 g kvaščevog ekstrakta (engl. *yeast extract*) i 5 g natrijeva klorida. U 40 staklenih bočica od 250 mL odmjereno je po 50 mL tekućeg LB-medija i bočice su blago zatvorene čepom. Pripremljene staklene bočice s hranjivim medijem su potom stavljene u autoklav na sterilizaciju. Sterilizacija se odvija 20 minuta na temperaturi od 121 °C. Korištena je i kruta hranjiva podloga Luria-Bertani, sastava (po 1 L destilirane vode): 10 g triptona, 5 g kvaščevog ekstrakta, 5 g natrijeva klorida i 20 g agara.

Sterilna voda (fiziološka otopina, 0.3 % NaCl) pripremljena je tako što je 3 g NaCl-a otopljeno u 1 L destilirane vode. Sterilna voda služila je za ispiranje prilikom mijenjanja medija. Otpipetirano je i po 9 mL sterilne vode u staklene epruvete s čepom, što je služilo za pripravu bakterijske suspenzije i decimalnih razrijeđenja. Sve je sterilizirano u autoklavu.

2.2. Nasađivanje bakterija

Za eksperimentalni dio rada korišteni su sojevi bakterija *Bacillus cereus* i *Acinetobacter junii*. Bakterije su nasađene na krute hranjive podloge LB hranjivog agara. Sterilizirana eza (bakteriološka ušica) napunjena je određenom bakterijom te je napravljen razmaz po agaru u Petrijevoj zdjelici. Postupak je jednak za obje bakterije. Sve korake je bitno izvoditi između dva plamena Bunsenovih plamenika kako bi se izbjeglo zagađenje. Ploče s nasađenim baterijama su potom stavljene u inkubator (Memmert IPP 400, GmbH + Co. KG, Njemačka) na 35°C, 24 h.

2.3. Priprema bakterijske suspenzije

Priređene su bakterijske suspenzije bakterija *B. cereus* i *A. junii* koje su 24 sata rasle na krutoj hranjivoj LB podlozi. Bakterijska suspenzija je napravljena tako što je steriliziranom ezom dva puta uzeta bakterijska biomasa s hranjive podloge i uronjena u plastičnu epruvetu (tip Falcon, 15 mL), u koju je prethodno stavljeno 9 mL sterilne vode iz staklene epruvete. Sa steriliziranom ezom se uzme bakterijska biomasa tako da se napuni ušica eze. Plastična epruveta se zatvori čepom i potom se bakterijska suspenzija vorteksira (Vortex technoKartell

TK3S, Italija) oko 3 minute dok se sve bakterije ne raspršе tj. dok suspenzija ne postane homogena. Postupak je isti za pripremu suspenzija obiju vrsta bakterija.

2.4. Uzgoj bakterijskog biofilma u tekućem mediju na zrncima zeolita

Prirodni mineral zeolit koji je korišten kao podloga za razvoj bakterijskog biofilma dobiven je iz kamenoloma u Donjem Jesenju, Hrvatska. Zeolit je usitnjen i prosijan. Veličina frakcije prirodnog zeolita koji je korišten u ovom eksperimentu iznosi 0.122-0.263 mm. Uzorak je prije početka eksperimenta bio ispran demineraliziranom vodom, osušen na 105 °C tijekom jednog sata i steriliziran autoklaviranjem (121 °C/15 min).

Otpipetirano je 0,5 mL bakterijske suspenzije bakterije *Bacillus cereus* u 40 staklenih bočica s tekućim LB-medijem i 0,5 mL bakterijske suspenzije bakterije *Acinetobacter junii* u preostalih 40 bočica. Bočice su prethodno označene budući da se jednoj skupini uzoraka mijenjao medij tijekom eksperimenta, a drugoj skupini se medij nije mijenjao. Na bočice je, osim naziva vrste određene bakterije i oznake za mijenjanje medija ili bez mijenjanja medija, označen i broj sati jer se iz uzoraka određivao broj bakterija metodom CFU svaka tri sata kroz 24 h koliko je eksperiment trajao. Jedna bočica za svaku skupinu uzoraka određene bakterije bila je priređena i označena za uzimanje uzoraka za mikroskopiranje. Nakon toga su u sve bočice dodana zrnca prirodnog materijala zeolita (0,5 g) na kojima se formirao biofilm. Bočice nisu bile zatvorene do kraja već su se čepovi lagano zatvorili i pričvrstili selotejpom radi lakšeg protoka zraka. Zatim su sve bočice stavljene na miješalice (Orbital Shaker, Biosan OS-10, Latvia) u inkubator na 35 °C. Miješalice su prethodno namještene na miješanje na 150 RPM (revolutions per minute).

2.4.1. Uzgoj bakterija u eksperimentu s mijenjanjem medija i u eksperimentu bez mijenjanja medija

Eksperiment je sa svakom bakterijom proveden na dva načina tako što je za svaku bakteriju bilo 10 uzoraka kojima je mijenjan medij tijekom eksperimenta i 10 uzoraka kojima nije mijenjan medij. Mijenjanje medija je provođeno svaka tri sata tako što se stari medij iz bočice dekantirao, sterilnom vodom su se isprala zrnca zeolita te je dodano 50 mL novog tekućeg LB medija. Potom su bočice vraćene na miješalicu u inkubator. Svim uzorcima je promatran razvoj biofilma te rast planktonskih i imobiliziranih bakterija kroz vrijeme. Svaka tri sata, to jest nakon jedan, tri, šest, devet, 12, 15, 18, 21 i 24 sata je iz uzoraka u kojima je mijenjan medij i uzoraka u kojima medij nije mijenjan napravljen mikroskopski preparat i potom decimalna razrjeđenja za određivanje broja planktonskih i imobiliziranih bakterija.

Svaka tri sata tijekom trajanja eksperimenta uzorcima su napravljena decimalna razrjeđenja za planktonske i imobilizirane bakterije. Za planktonske bakterije razrjeđenja su napravljena tako što se prvo otpipetirao 1 mL uzorka iz staklene bočice i prebacio u epruvetu s 9 mL sterilne vode te su se potom radila sljedeća decimalna razrjeđenja. Za imobilizirane bakterije je prvo dekantirana tekućina iz bočice, potom su zrnca zeolita isprana dva puta s malo sterilne vode i treći put je stavljeno malo sterilne vode s kojom su zrnca naglo prebačena u plastičnu epruvetu. Iz plastične epruvete je dekantirana tekućina i stavljeno je 9 mL sterilne vode iz jedne staklene epruvete. Nakon toga je uzorak vorteksiran tri minute i potom su napravljena sljedeća decimalna razrjeđenja. Iz odgovarajućih razrjeđenja uzorak se nacijepio na ploče s hranjivim agarom metodom razmaza. Ploče su prethodno označene s obzirom na vrstu bakterije, broj proteklih sati i razrjeđenje koje je određeno. Razmaz se radio korištenjem Drygalskog štapića koji se prethodno sterilizirao flambiranjem u 96% etanolu. Namazane ploče stavljene su u inkubator na 35 °C. Nakon inkubacije (24 sata) narasle kolonije su prebrojane pomoću aparata za brojanje kolonija (eng. *colony counter*) i određen je broj bakterija metodom CFU. Preostala zrnca zeolita iz svake bočice su prebačena u prethodno izvagane Petrijeve zdjelice koje su stavljene u suhi sterilizator na 100 °C kako bi se zeolit osušio te nakon hlađenja izvagao. Broj planktonskih bakterija određen je kao CFU mL^{-1}, a imobiliziranih kao CFU g^{-1}.

2.4.2. Mikroskopski preparati

Za mikroskopske preparate se koristila manja frakcija zrnaca (0.122-0.250 mm) prirodnog materijala zeolita koja je stavljena samo u bočice koje su prethodno bile označene za mikroskopiranje. Mikroskopski preparati pripremali su se tako što se predmetno stakalce prvo provuklo kroz plamen Bunsenovog plamenika kako bi se uklonile masne naslage nastale tijekom proizvodnje te se sterilnom plastičnom pipetom uzeo uzorak iz bočice te prenio na predmetno stakalce. Predmetna stakalce je ostavljeno da se osuši i potom je fiksirano, tj. tri puta provučeno kroz plamen, prije bojenja. Mikroskopski preparati bojeni su Alcian blue bojilom koji boji EPS i Karbol fuksinom koji boji stanice. Preparat je uronjen u Alcian blue bojilo dvije minute te potom lagano ispran vodovodnom vodom. Nakon ispiranja preparat je zatim uronjen u Karbol fuksin trideset sekundi. Ponovno je ispran vodovodnom vodom te nježno posušen papirom. Preparati su promatrani na mikroskopu (Olympus CX21, Japan) pomoću imerzijskog objektiva na povećanju x1000, pritom koristeći imerzijsko ulje. Rast biofilma i količina nastalog EPS-a pratili su se vizualno te su se fotografirale mikroskopske slike pomoću mobitela (mobilni uređaj Samsung Galaxy J3 (2016), 8 MP, f/2.2).

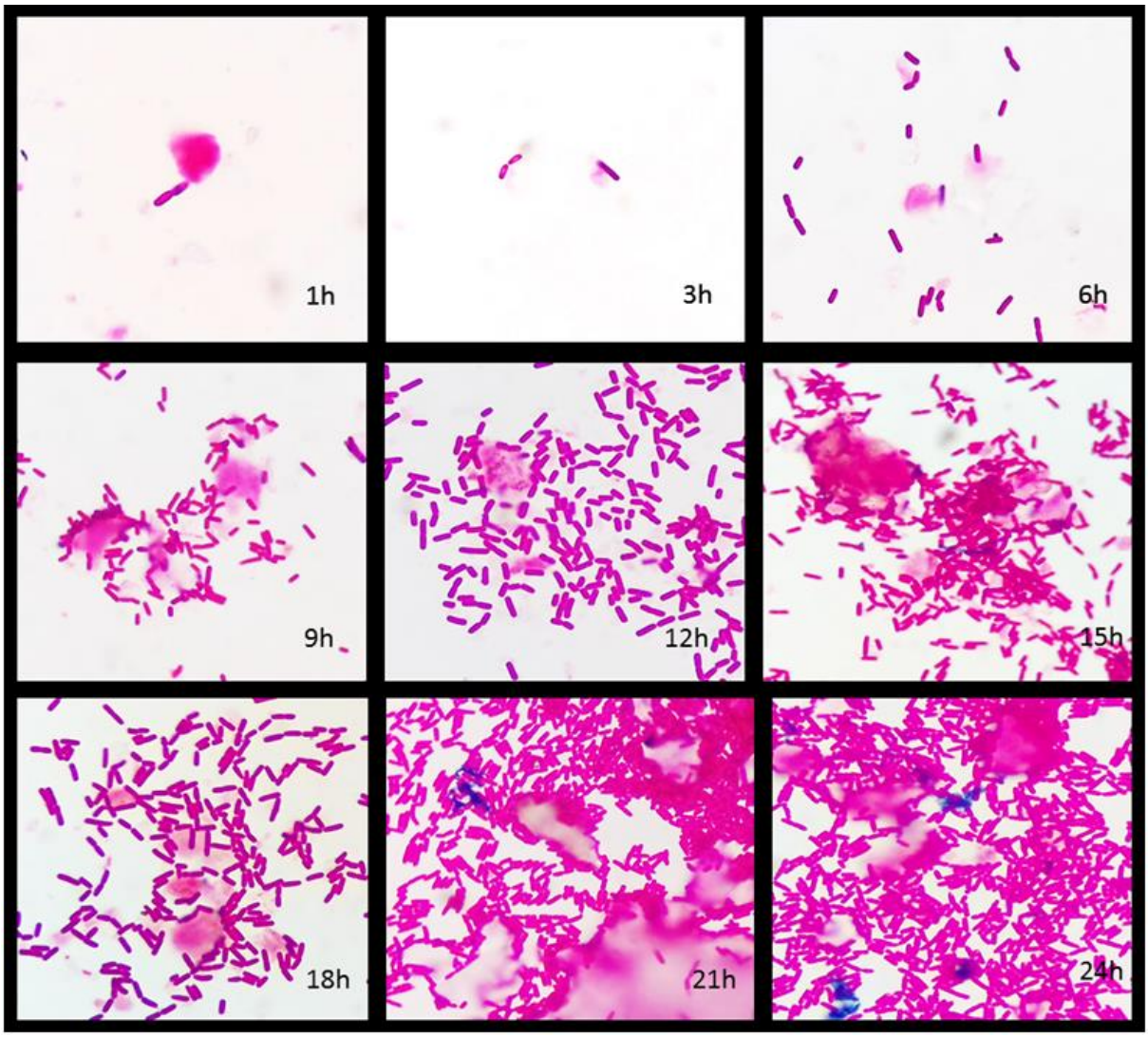
2.5. Statistika

U ovom radu za statističku analizu rezultata korištena je analiza varijanci (ANOVA) s Duncanovom post-hoc analizom, metoda koja se koristi za analizu razlika među skupinama. ANOVA je korisna za usporedbu i određivanje statistički značajne razlike triju ili više skupina ili varijabli. Usporedba imobiliziranih bakterija u pokusima s ili bez mijenjanja medija rađena je pomoću Studentovog t-testa. T-test se koristi kako bi se utvrdilo postoji li značajna razlika između dva seta podataka. Statistička obrada rađena je pomoću „Statistica“ programa (verzija 13.3., TIBCO Software, Tulsa, USA).

3. REZULTATI

3.1. Razvoj biofilma bakterije *Bacillus cereus* u pokusu bez mijenjanja medija

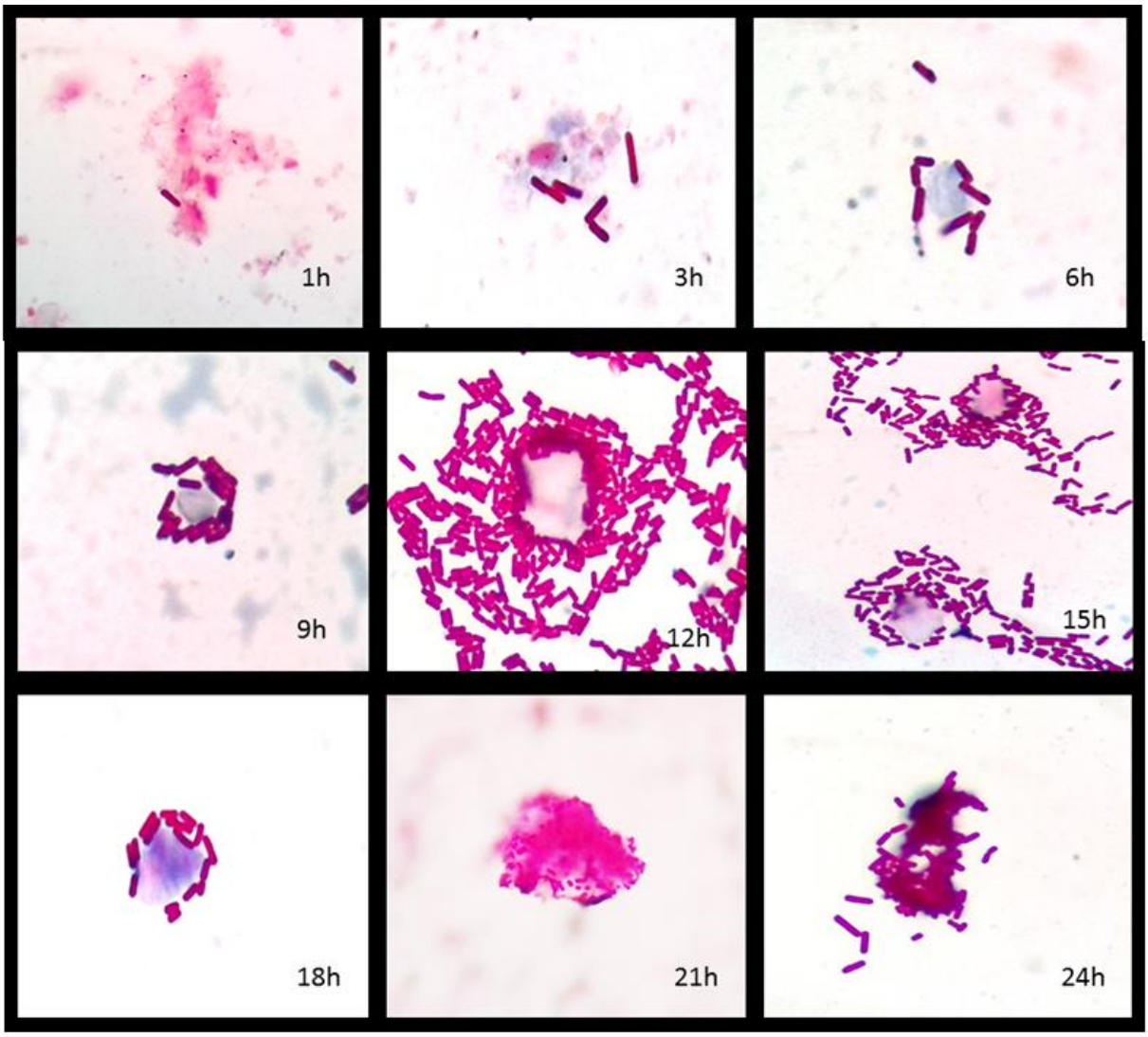
U ovim uzorcima medij nije mijenjan od početka do kraja eksperimenta. Nakon jednog sata bakterije *B. cereus* pronađene su pojedinačno ili u paru, jednim krajem vezane na prirodni materijal zeolit. Nakon tri sata broj bakterija nije se znatno povećao ali su u uzorku vidljive spore. Nakon šest sati vidi se malo veći broj bakterija od kojih su samo neke pričvršćene na zeolit, a ostale se nalaze pojedinačno, u planktonskom obliku. Nakon devet sati pronađene su bakterije *B. cereus* u nakupinama te većinom pričvršćene za prirodni materijal. Daljnjim tijekom eksperimenta bakterijska biomasa se sve više povećava te je ekstracelularni matriks pronađen nakon 15 sati i vidljiv je kao plavo obojenje na zeolitu. Nakon 21 i 24 sata bakterijska biomasa još više raste, te su bakterije sve slabije razlučive. Prilikom zadnje dvije analize uzoraka, ponovno je uočen EPS (Slika 4).



Slika 4. Biofilm bakterija *Bacillus cereus* na česticama zeolita od 1-24 h inkubacije u pokusu bez mijenjanja medija. Metoda bojenja Alcian blue. Povećanje 1000x na svjetlosnom mikroskopu.

3.2. Razvoj biofilma bakterije *Bacillus cereus* u pokusu s mijenjanjem medija

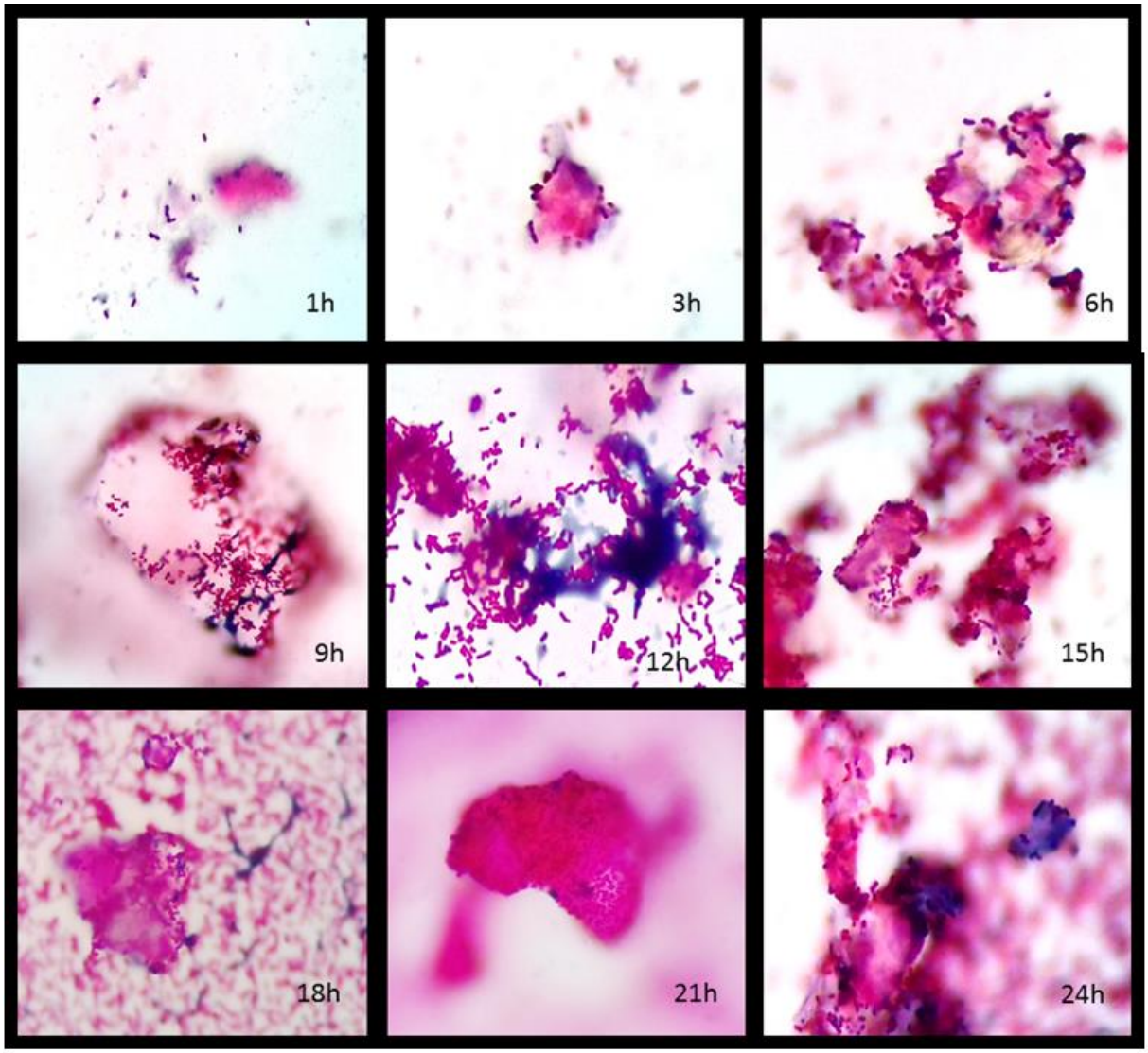
U ovim uzorcima medij je tijekom eksperimenta od 24 h mijenjan svaka tri sata. Nakon jedan sat pronađena je bakterija *B. cereus* pojedinačno, površinski vezana za prirodni materijal zeolit. Nakon trećeg i šestog sata se broj bakterija malo povećao. Nakon 12 sati je broj bakterija znatno porastao, te su bakterije raspoređene kružno oko čestice zeolita. Bakterije se u ovom stadiju nalaze gusto poslagane jedna do druge. Daljnjim tijekom eksperimenta bakterije *B. cereus* su pronađene u velikim nakupinama oko zeolita, te se koncentriraju sve gušće u blizini čestica zeolita. Ekstracelularni matriks je pronađen prvi puta nakon 15 sati, zatim nakon 18, 21 i 24 sata (Slika 5).



Slika 5. Biofilm bakterija *Bacillus cereus* na česticama zeolita od 1-24 h inkubacije u pokusu s mijenjanjem medija. Metoda bojenja Alcian blue. Povećanje 1000x na svjetlosnom mikroskopu.

3.3. Razvoj biofilma bakterije *Acinetobacter junii* u pokusu bez mijenjanja medija

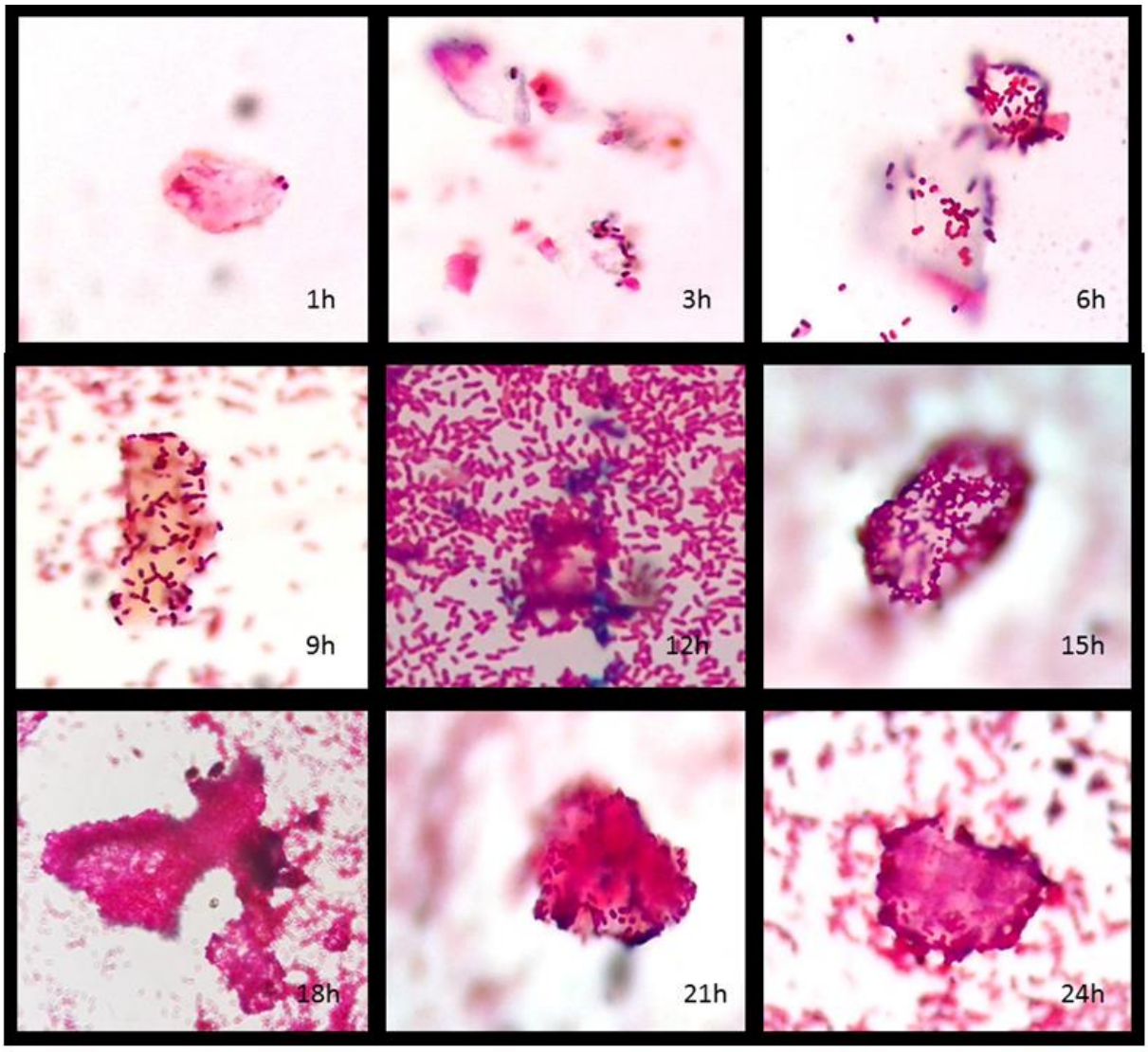
Nakon jedan sat bakterije *A. junii* pronađene su pojedinačno ili u paru, samo nekoliko ih je vezano na prirodni materijal zeolit (Slika 6). Nakon tri sata bakterije su pronađene u malim nakupinama od nekoliko bakterija pričvršćenih na površinu zeolita. Nakon šest sati vidi se znatno veći broj bakterija koje se nalaze u velikim nakupinama, te većinom prekrivaju zeolit. Nakon šest sati uočava se pojava ekstracelularnog matriksa. EPS se također dobro vidi i nakon 9 i 12 sati. Najveća količina EPS-a je vidljiva nakon 12 sati. Nakon 15 sati bakterije su u sve gušćim nakupinama koje prekrivaju gotovo cijelu površinu zeolita. Prolaskom vremena nakupine bakterija postaju znatno veće, ali se raspršenost bakterija po uzorku smanjuje.



Slika 6. Biofilm bakterija *Acinetobacter junii* na česticama zeolita od 1-24 h inkubacije u pokusu bez mijenjanja medija. Metoda bojenja Alcian blue. Povećanje 1000x na svjetlosnom mikroskopu.

3.4. Razvoj bakterijskog biofilma *Acinetobacter junii* u pokusu s mijenjanjem medija

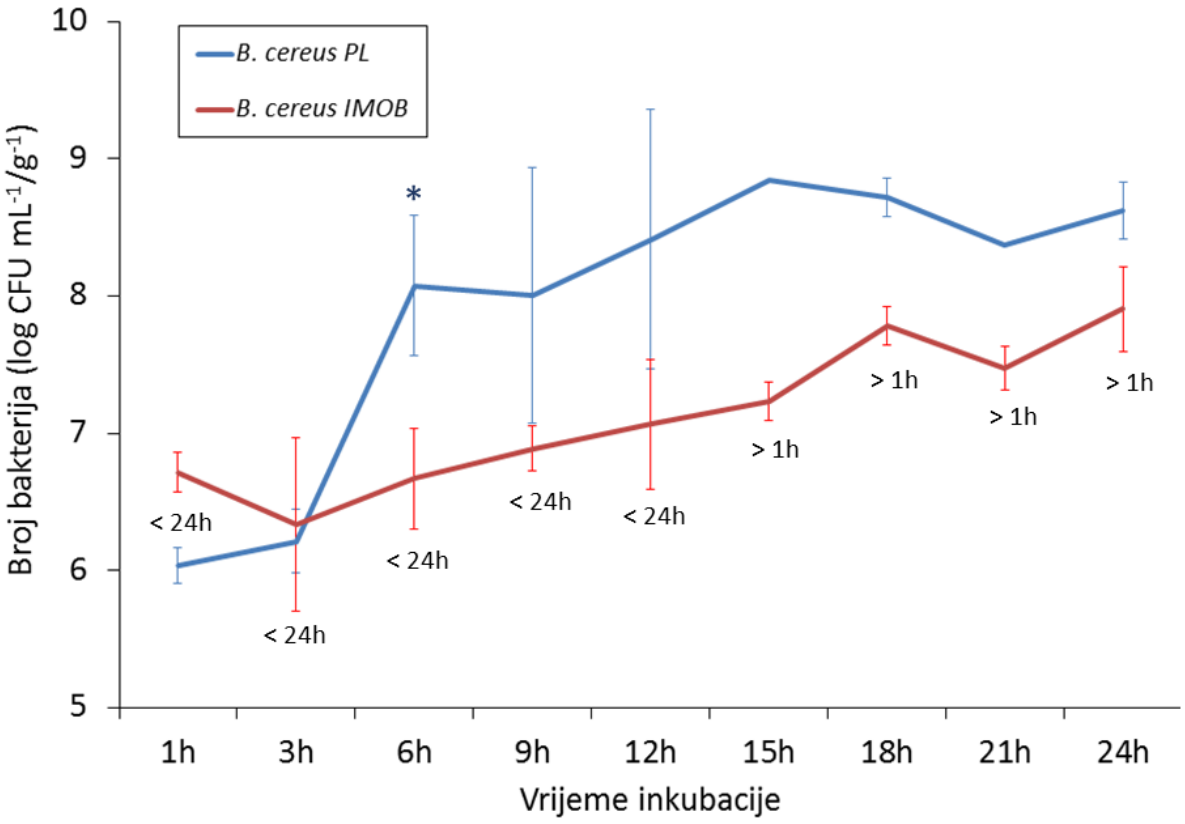
U ovim uzorcima medij je mijenjan svaka tri sata tijekom eksperimenta. Nakon jedan sat pronađene su dvije bakterije *A.junii,* jedna do druge, vezane na prirodni materijal zeolit. Nakon tri sata bakterije su pronađene u malim nakupinama vezane na zeolit te se njihova biomasa povećava kako napreduje tijek eksperimenta. Nakon šest i devet sati bakterije okružuju zeolit i pričvršćuju se u većem broju na njega. Nakon 12 sati primjećuje se pojava ekstracelularnog matriksa, te je broj bakterija znatno porastao (Slika 7). Sve je manji broj slobodno plutajućih bakterija, dok se na samom zeolitu broj bakterija povećava.



Slika 7. Biofilm bakterija *Acinetobacter junii* na česticama zeolita od 1-24 h inkubacije u pokusu s mijenjanja medija. Metoda bojenja Alcian blue. Povećanje 1000x na svjetlosnom mikroskopu.

3.5. Broj planktonskih i imobiliziranih bakterija *B. cereus* kojima nije mijenjan medij

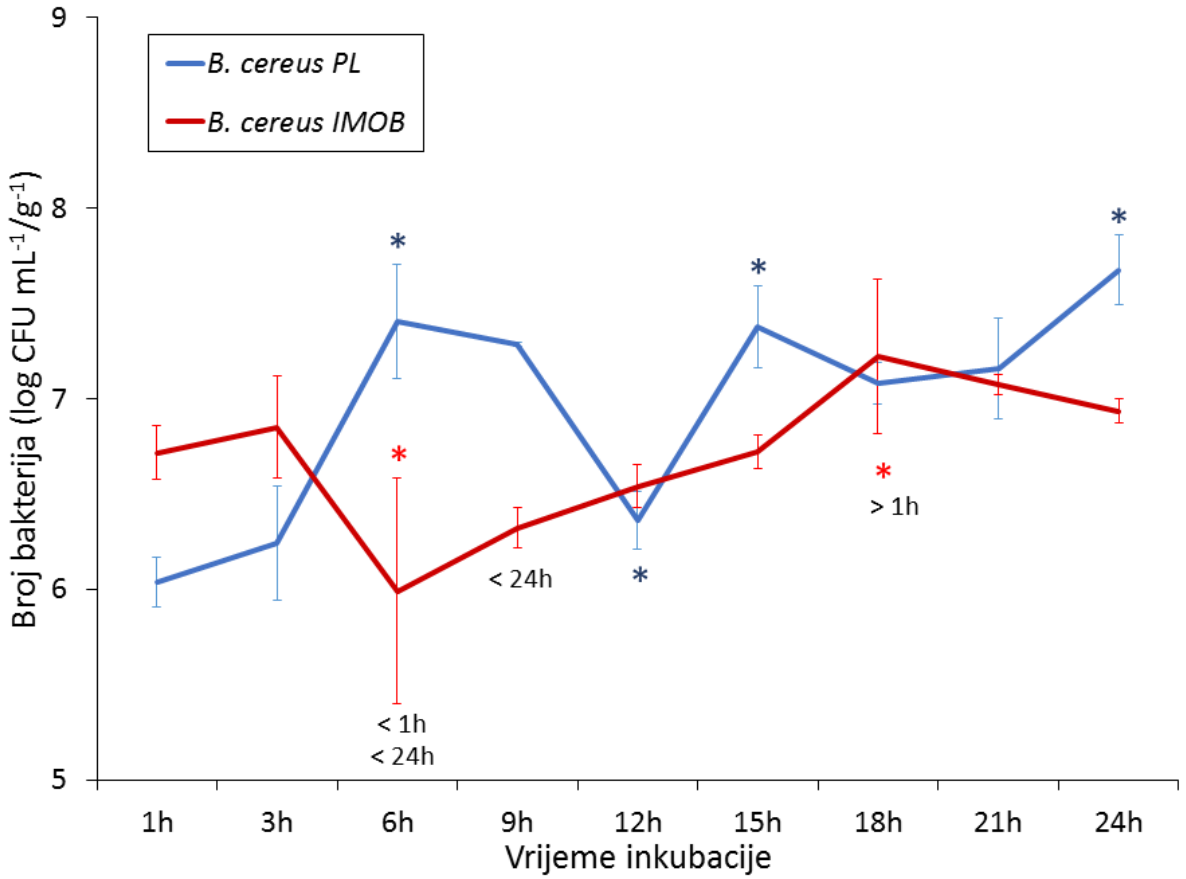
Tijekom prva tri sata uočen je blago rastući trend broja planktonskih bakterija nakon čega se u periodu između trećeg i šestog sata njihov broj znatno povećao. Nakon šestog sata broj planktonskih bakterija je blago pao te zatim kontinuirano rastao s padom od 15.-21. sata, nakon čega je opet rastao. Broj imobiliziranih bakterija tijekom prva tri sata je padao te je potom kontinuirano rastao sve do 18. sata kada je uočen blagi trend pada do 21. sata te je potom broj imobiliziranih bakterija ponovno rastao. Uspoređujući ovisnost broja planktonskih i imobiliziranih bakterija *Bacillus cereus* kojima nije mijenjan medij u odnosu na vrijeme inkubacije uočen je porast i planktonskih i imobiliziranih bakterija (Slika 8).



Slika 8. Ovisnost broja planktonskih (PL) i imobiliziranih (IMOB) bakterija *Bacillus cereus*, kojima nije mijenjan medij, o vremenu inkubacije. Prikazane su srednje vrijednosti od dva replikata te standardna devijacija. * označava statistički značajnu razliku u odnosu na prethodni sat. > 1 h/< 24 h označava statistički značajnu razliku određenog sata u odnosu na 1. ili 24. sat.

3.6. Broj planktonskih i imobiliziranih bakterija *B. cereus* kojima je mijenjan medij

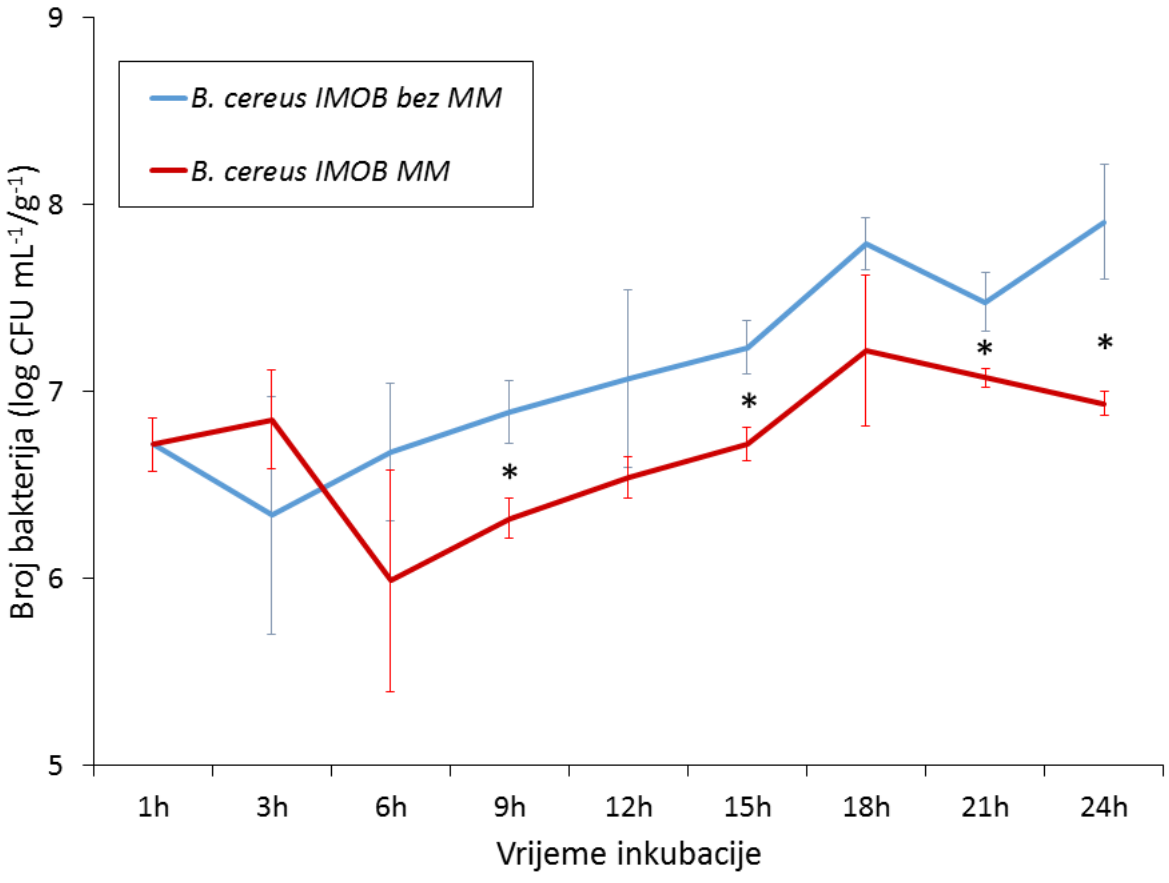
Tijekom prva tri sata uočen je blagi trend rasta broja planktonskih bakterija nakon čega slijedi nagli porast broja bakterija te se nakon šestog sata uočava pad broja i zatim oscilacije u rastu i padu broja bakterija. Kod imobiliziranih bakterija tijekom prva tri sata uočen je blagi trend rasta broja bakterija nakon čega do šestog sata slijedi pad te potom kontinuirani rast broja bakterija do 18. sata kada njihov broj pada sve do kraja izvođenja eksperimenta (Slika 9). Uspoređujući broj planktonskih i imobiliziranih bakterija *Bacillus cereus* kojima je mijenjan medij u ovisnosti o vremenu inkubacije uočeno je da broj planktonskih bakterija puno više oscilira u odnosu na broj imobiliziranih kod kojih je uočen kontinuirani rast od šestog do 18. sata.



Slika 9. Ovisnost broja planktonskih (PL) i imobiliziranih (IMOB) bakterija *Bacillus cereus*, kojima je mijenjan medij, o vremenu inkubacije. Prikazane su srednje vrijednosti od dva replikata te standardna devijacija. * označava statistički značajnu razliku u odnosu na prethodni sat. </> 1 h i < 24 h označava statistički značajnu razliku određenog sata u odnosu na 1. ili 24. sat.

3.7. Broj imobiliziranih bakterija *B. cereus* kojima nije mijenjan medij i kojima je medij mijenjan

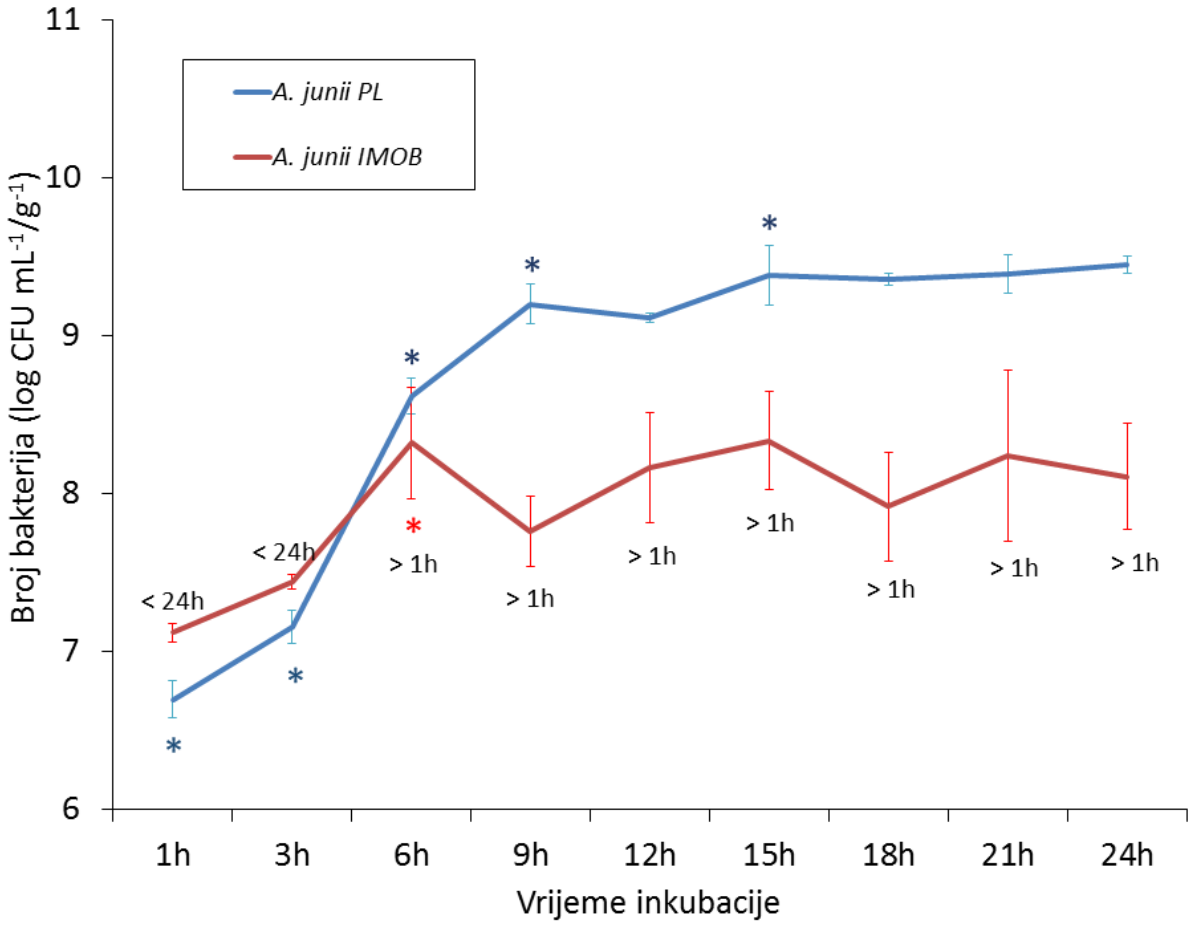
Kod broja imobiliziranih bakterija *Bacillus cereus* kojima nije mijenjan medij uočen je blagi trend pada tijekom prva tri sata eksperimenta nakon čega su kontinuirano rasle do 18. sata kada je uočen pad u broju bakterija, te potom u periodu od 21. do 24. sata ponovan rast. Broj imobiliziranih bakterija *B. cereus* kojima je mijenjan medij je tijekom prva tri sata rastao nakon čega je uočen pad između trećeg i šestog sata te potom kontinuirani rast sve do 18. sata kada je uočen pad u broju bakterija sve do kraja trajanja eksperimenta (Slika 10). Uspoređujući broj imobiliziranih bakterija *B. cereus*, kojima nije mijenjan medij i kojima je mijenjan medij, u odnosu na vrijeme inkubacije uočen je u oba slučaja kontinuirani rast broja bakterija uz blage oscilacije tijekom eksperimenta.



Slika 10. Ovisnost broja imobiliziranih (IMOB) bakterija *Bacillus cereus*, kojima nije mijenjan medij (bez MM) i kojima je mijenjan medij (MM), o vremenu inkubacije. Prikazane su srednje vrijednosti od dva replikata te standardna devijacija. * označava statistički značajnu razliku između dvaju pokusa.

3.8. Broj planktonskih i imobiliziranih bakterija *A. junii* kojima nije mijenjan medij

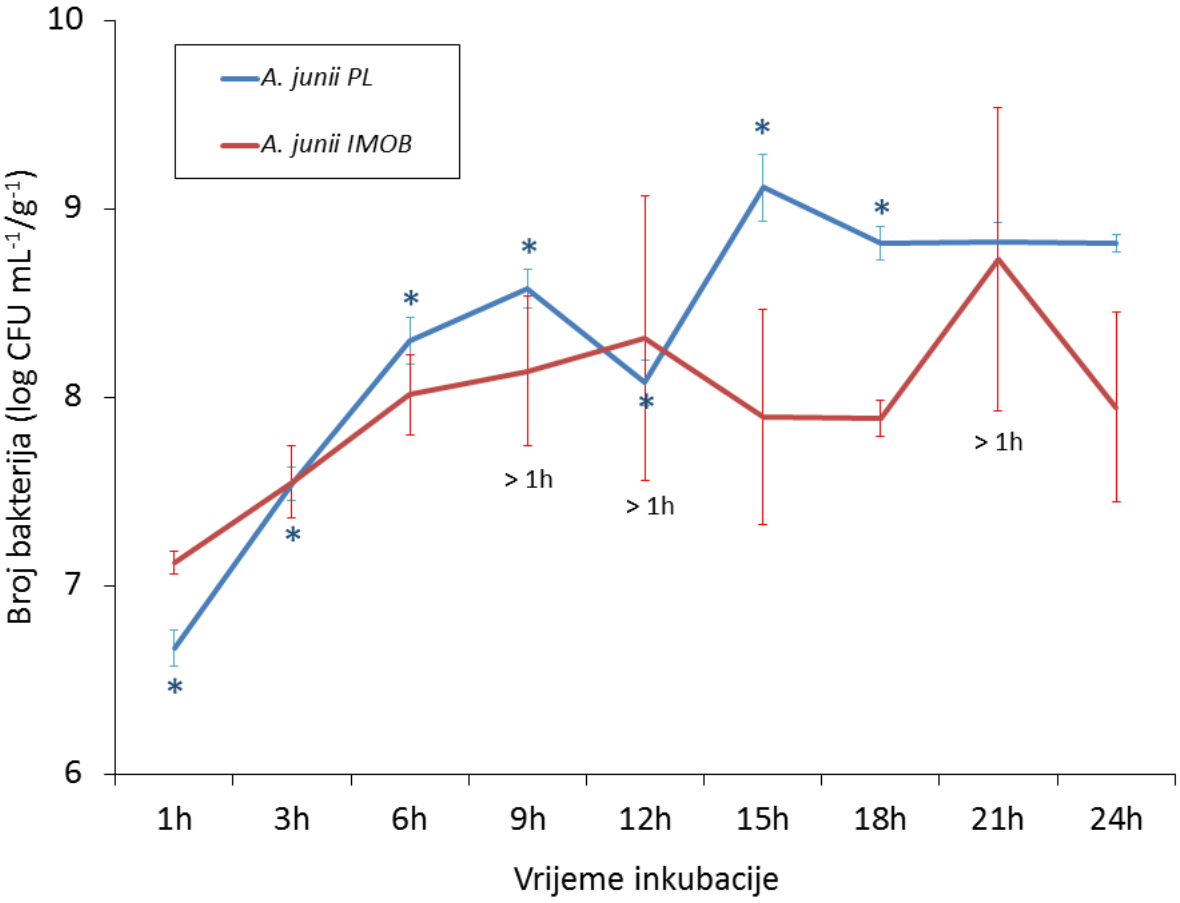
Broj planktonskih bakterija *Acinetobacter junii* je rastao od početka eksperimenta, s naglijim trendom rasta u periodu od trećeg do šestog sata. Nakon devetog sata je uočen blagi pad broja bakterija te potom rast od 12. do 15. sata eksperimenta nakon čega broj bakterija u periodu od 15. do 21. sata stagnirao i nakon toga blago rastao. Broj imobiliziranih bakterija *A. junii* je tijekom prvih šest sati inkubacije rastao nakon čega je uočen pad broja bakterija od šestog do devetog sata te potom ponovan rast te oscilacije u padu i rastu broja imobiliziranih bakterija do kraja eksperimenta (Slika 11). Uspoređujući broj planktonskih i imobiliziranih bakterija *A. junii*, kojima nije mijenjan medij, o vremenu inkubacije uočen je kontinuirani rast broja planktonskih bakterija, dok je broj imobiliziranih bakterija u početku rastao te potom oscilirao do kraja trajanja eksperimenta.



Slika 11. Ovisnost broja planktonskih (PL) i imobiliziranih (IMOB) bakterija *Acinetobacter junii*, kojima nije mijenjan medij, o vremenu inkubacije. Prikazane su srednje vrijednosti od dva replikata te standardna devijacija. * označava statistički značajnu razliku u odnosu na prethodni sat. > 1 h/< 24 h označava statistički značajnu razliku određenog sata u odnosu na 1. ili 24. sat .

3.9. Broj planktonskih i imobiliziranih bakterija *A. junii* kojima je mijenjan medij

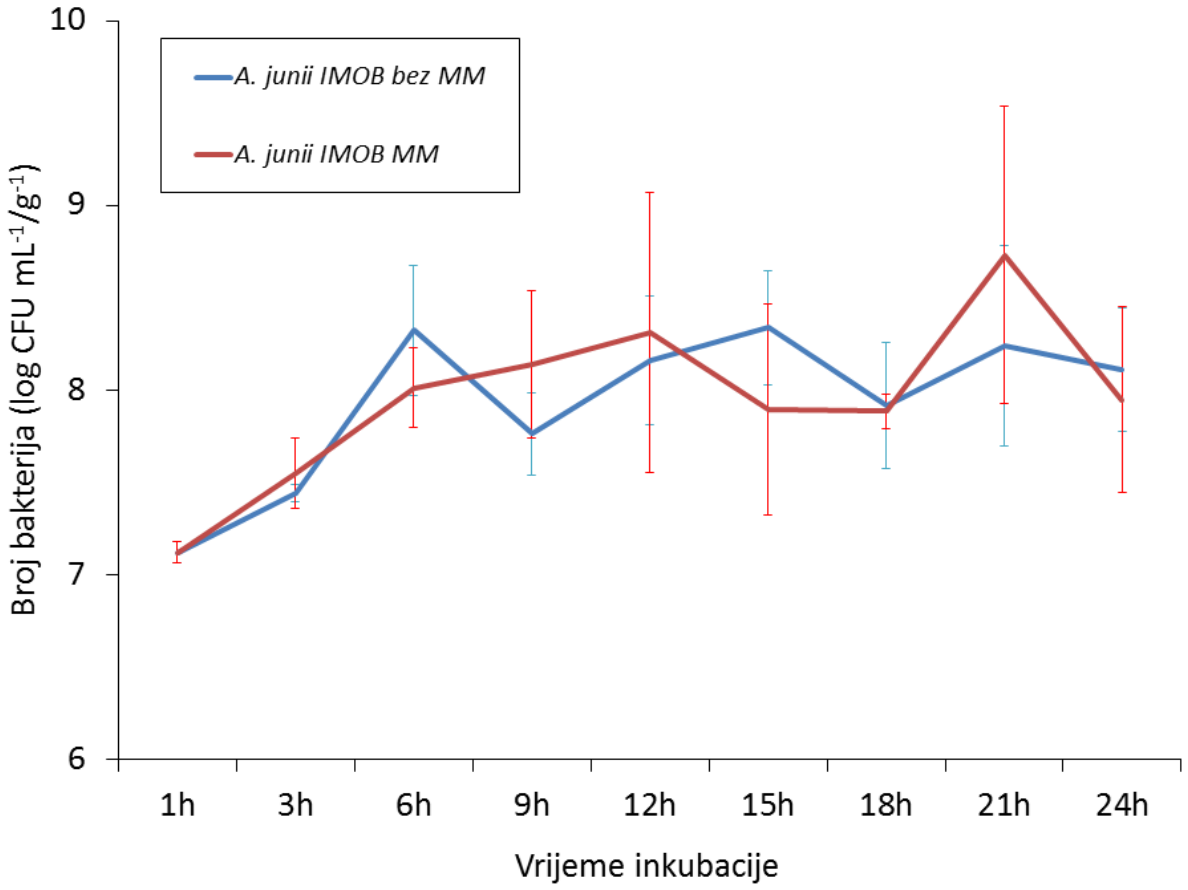
Broj planktonskih bakterija *Acinetobacter junii* je naglo rastao tijekom prvih devet sati eksperimenta nakon čega je uočen nagli pad broja bakterija u periodu između devetog i 12. sata. Nakon 12. sata je broj planktonskih bakterija *A. junii* opet rastao do 15. sata nakon čega je uočen ponovni pad od 15. do 18. sata te je potom broj planktonskih bakterija stagnirao do kraja eksperimenta. Broj imobiliziranih bakterija *A. junii* je kontinuirano rastao tijekom prvih 12 sati inkubacije nakon čega je uočen pad od 12. do 15. sata te potom stagnacija broja bakterija od 15. do 18. sata eksperimenta. Nakon 18. sata uočen je nagli rast broja bakterija do 21. sata, zatim nagli pad do 24. sata eksperimenta (Slika 12). Uspoređujući broj planktonskih i imobiliziranih bakterija *A. junii*, kojima je mijenjan medij, ovisno o vremenu inkubacije uočen je rast broja bakterija u oba slučaja do devetog sata eksperimenta nakon čega je vidljivo kako broj bakterija do kraja eksperimenta oscilira u oba slučaja.



Slika 12. Ovisnost broja planktonskih (PL) i imobiliziranih (IMOB) bakterija *Acinetobacter junii*, kojima je mijenjan medij, o vremenu inkubacije. Prikazane su srednje vrijednosti od dva replikata te standardna devijacija. * označava statistički značajnu razliku u odnosu na prethodni sat. > 1 h označava statistički značajnu razliku određenog sata u odnosu na 1. ili 24. sat.

3.10. Broj imobiliziranih bakterija *A. junii* kojima nije mijenjan medij i kojima je medij mijenjan

Broj imobiliziranih bakterija *Acinetobacter junii* kojima medij nije mijenjan je rastao tijekom prvih šest sati trajanja eksperimenta nakon čega su vidljive oscilacije u padu i rastu broja bakterija sve do kraja trajanja vremena inkubacije. Tijekom prvih 12 sati trajanja eksperimenta uočen je rast broja imobiliziranih bakterija kojima je mijenjan medij tijekom eksperimenta te potom u drugom dijelu eksperimenta uočene su oscilacije u padu i rastu broja imobiliziranih bakterija kod kojih je medij mijenjan. U oba slučaja uočen je rast broja imobiliziranih bakterija *A. junii* tijekom prvih šest sati trajanja eksperimenta nakon čega su uočene oscilacije broja bakterija u oba primjera (Slika 13).



Slika 13. Ovisnost broja imobiliziranih (IMOB) bakterija *Acinetobacter junii*, kojima nije mijenjan medij (bez MM) i kojima je mijenjan medij (MM), o vremenu inkubacije. Prikazane su srednje vrijednosti od dva replikata te standardna devijacija. * označava statistički značajnu razliku između dvaju pokusa.

4. RASPRAVA

Prethodna istraživanja su pokazala da formiranje biofilma prolazi kroz niz koraka koji po završetku formiraju zrelu trodimenzionalnu strukturu na abiotičkim i biotičkim površinama. Neki od istraženih modela formiranja biofilma ukazuju na sudjelovanje bakterijske pokretljivosti pomoću koje planktonske stanice razviju biofilm iz tekućeg medija ili formiranje i rast mikrokolonija kao posljedica umnožavanja stanica pričvršćenih na čvrstu površinu (Tomaras i sur. 2003).

S obzirom na rezultate opisane u ovom istraživanju može se zaključiti da bakterijski biofilmovi rastu po različitim modelima u stacionarnoj fazi. Također, možemo pretpostaviti da bakterija *B. cereus* ne slijedi model klonalnog rasta odnosno da bakterije ne bujaju stalno na istom mjestu što je dokaz da se pokretne bakterije *B. cereus* iz okoliša cijelo vrijeme prihvaćaju i otpuštaju s podloge. Kod bakterije *A. junii* možemo pretpostaviti da slijedi model rasta bakterijskog biofilma koji se odvija u pet faza te klonalni rast, no ne možemo potvrditi da je bilo klonalnog rasta budući da se ne razlikuje značajno broj imobiliziranih bakterija na početku eksperimenta i na kraju, u oba pokusa (s i bez mijenjanja medija), što dovodi do zaključka da bakterije koje su se zalijepile na početku eksperimenta su ostale vezane i do samoga kraja. Mogući razlog toga što su bakterije *A. junii* cijelo vrijeme bujale na istom mjestu je i nepostojanje sustava za aktivno pokretanje kod te vrste. Pokretljivost bakterija ima bitnu ulogu prilikom kolonizacije bakterija na podlozi na kojoj se razvija biofilm. U radu Houry i sur. (2010) istražena je uloga flagelarnog aparata u formiranju biofilma bakterije *B. cereus*. Otkriveno je da prisutnost flagela smanjuje adheziju bakterije na staklenu površinu. Pretpostavljeno je da flagelarni aparat ne pogoduje interakciji između staklene površine i bakterijske stanične stijenke. Iako, u određenim uvjetima pokretljivost bakterija može pomoći u formiranju biofilma. Smatra se da pokretljivost igra ključnu ulogu u razvitku biofilma i da određuje njegov model nastanka na staklenim površinama. Kako bi bakterije mogle doći u područje povoljnih uvjeta za formiranje biofilma, bitna karakteristika je njihova pokretljivost. Na primjer, u statičnim uvjetima, bakterije kojima je potreban kisik za rast će aktivno migrirati na područje interfaze zrak-voda, dok se u stanicama toka bakterije mogu nalaziti na donjoj strani interfaze budući da bakterije imaju konstantan dotok kisika i hranjivih tvari (eng. *continuous culture*).

Uspoređujući uvjete rasta u pokusima u kojima medij nije mijenjan tijekom inkubacije s onima u kojima je mijenjan medij svaka tri sata vidljivo je da broj imobiliziranih bakterija *B. cereus* se izraženije povećava u pokusu gdje medij nije mijenjan te nema stalnog dotoka nutrijenata i kisika. Pretpostavlja se da razvoju biofilma bakterije *B. cereus* pogoduju stacionarni uvjeti u kojima nema stalnog dotoka kisika i hranjivih tvari, jer se u suprotnom tijekom stalnog dotoka broj bakterija ne povećava u tolikoj mjeri. Pokazano je u radu Donlan (2002) da u laboratorijskom istraživanju koncentracija hranjivih tvari korelira s brojem vezanih bakterijskih stanica što potvrđuju i rezultati ovog istraživanja.

Bakterija *B. cereus* koja lako oblikuje biofilmove na različitim površinama proučavana je u radu Oosthuizen i sur. (2002). Pokazalo se da se bakterija *B. cereus* lako prilagođava načinu rasta s gustim strukturama biofilma koji se razvijaju unutar 18 sati nakon inokulacije kada se kao površina koristi staklena vuna. U ovom istraživanju rezultati ukazuju na nastanak EPS-a nakon 15 h što je dokaz formiranja biofilma. Takvi rezultati su se pokazali i u pokusu u kojem bakterijama nije dodavan svježi hranjivi medij, ali i u pokusu u kojem je bakterijama kontinuirano dodavan svježi hranjivi medij.

U radu Lindsay i sur. (2006) praćena je dinamika formiranja biofilma vegetativnih stanica i endospora *B. cereus* i *B. subtilis*. Rezultati su pokazali da nakon pričvršćivanja spora na površinu, spore klijaju pod povoljnim (*B. cereus*), pa čak i nepovoljnim (*B. subtilis*) hranjivim uvjetima, što rezultira biofilmovima koji sadrže i spore i vegetativne populacije. Pokazano je također da vegetativne stanice *B. cereus* pokazuju nisku sklonost stvaranja spora u vezanom i planktonskom obliku rasta, u mediju koji je ograničen hranjivim tvarima. Rezultati ovog istraživanja podudaraju se s rezultatima rada Lindsay i sur. (2006) obzirom da su spore bakterija *B. cereus* rijetko uočene u uzorcima. Sporulacija u vezanim populacijama roda *Bacillus* je važna za mnoge prehrambene industrije, poput industrije za preradu mlijeka, gdje se bacilli rutinski izdvajaju iz populacija pričvršćenih na površinu opreme za preradu.

Formiranje biofilma kod više sojeva bakterije *Bacillus cereus* proučavano je u radu Wijman i sur. (2007). Utvrđeno je da stvaranje biofilma u mikrotitarskim pločama ovisi o vremenu inkubacije, temperaturi i mediju, kao i o upotrebljenom soju. Kod nekih sojeva je prikazano formiranje biofilma unutar 24 h i naredna disperzija unutar sljedeća 24 h. Koristili su se odabrani sojevi za kvantitativnu analizu formiranja biofilma na nehrđajućem čeliku. Rezultati su pokazali da se razvio gust biofilm bakterije *B. cereus* na interfazi zrak-voda, dok je količina formiranog biofilma puno manja u potopljenim sustavima.

Nepokretna bakterija *Acinetobacter baumannii* proučavana je u radu Gaddy i Actis (2009). Ovaj mikroorganizam preživljava u bolničkim okruženjima unatoč nepovoljnim uvjetima kao što su suša, manjak hranjivih tvari i antimikrobni tretmani. Pretpostavlja se da je mogućnost ove vrste da preživi u takvim uvjetima upravo sposobnost stvaranja biofilma. Bakterija *A. baumannii* tvori biofilmove na abiotskim površinama kao što su polistiren i staklo, ali i na biotičkim površinama poput epitelnih stanica. Ova bakterija ne posjeduje flagele što ju čini nepokretnom, no uz pomoć cjevastih nastavaka (pili) se lakše veže na površinu. Dokazano je da pili i produkcija proteina za vezanje na površinu igraju glavnu ulogu u inicijaciji i sazrijevanju biofilma nakon početnog vezanja na abiotičku površinu. Bakterija *Acinetobacter junii* koja je proučavana u našem istraživanju, također je nepokretna bakterija iz roda *Acinetobacter*. Iz rezultata ovog istraživanja vidljivo da se bakterije *A. junii* već nakon jednog sata u pokusu u stacionarnim uvjetima i u pokusu u uvjetima kontinuiranog rasta nalaze u prvoj fazi, od pet faza, razvoja bakterijskog biofilma. U toj prvoj fazi dolazi do vezanja planktonskih bakterija na supstrat što potkrepljuju mikroskopske slike preparata. Vjerojatno i bakterija *A. junii*, poput istražene bakterije *A. baumannii*, pomoću nastavaka pili lakše adherira na površinu i samim time počinje formirati biofilm.

U ovom istraživanju pratio se i razvoj ekstracelularnog polisaharidnog matriksa te je uočeno da se kod bakterije *A. junii* EPS pojavljuje ranije nego kod bakterije *B. cereus*, u pokusima bez mijenjanja medija i u pokusima s mijenjanjem medija. EPS ima značajnu ulogu u formiranju biofilma. Tako je u provedenim istraživanjima na bakteriji *Staphylococcus epidermis* pokazano da bakterije gube sposobnost formiranja biofilma ako su geni odgovorni za sintezu ekstracelularnog matriksa inaktivirani (Marić i Vraneš 2007). Kada će se ekstracelularni matriks stvoriti ovisi o vrsti proučavane bakterije, mediju u kojem se nalazi te podlozi koja služi za razvoj biofilma. Trebalo bi svakako istražiti kako različiti uvjeti utječu na formiranje biofilma i samim time proizvodnju ekstracelularnog matriksa. Trebalo bi mijenjati uvjete poput temperature, pH ili kemijskih agensa te pratiti tijek razvoja biofilma.

5. ZAKLJUČAK

- Iz opisanih rezultata može se zaključiti da u stacionarnim uvjetima model rasta bakterijskog biofilma koji se odvija u pet faza nije primjenjiv za bakteriju *B. cereus*, dok je primjenjiv za bakteriju *A. junii*.

- U pokusu u kojem nije mijenjan medij broj imobiliziranih bakterija *B. cereus* kontinuirano raste, dok se u pokusu gdje je mijenjan medij broj imobiliziranih bakterija periodički svakih šest sati značajno mijenja vjerojatno zbog toga što se su se mijenjanjem medija uklanjale planktonske bakterije koje su bile prisutne u mediju pa samim time se mijenjao i broj imobiliziranih bakterija. Uz to, bakterije *B. cereus* su pokretne i stalno su se vezale i odvajale, što im otežava stvaranje biofilma.

- Kod bakterije *A. junii* nema statistički značajne razlike za nijedan sat u broju imobiliziranih bakterija u pokusima s i bez mijenjanja medija što dovodi do zaključka da bakterije koje su se vezale na početku inkubacije su ostale vezane do kraja inkubacije, to jest do kraja trajanja eksperimenta.

6. POPIS LITERATURE

1. Abraha, A., Bikila, T., Alemu, S., Muktar, Y. (2017): *Bacillus cereus* isolation and load from raw cow milk sold in Markets of Haramaya District, eastern Ethiopia. *Int J food contam*., 4:15-21
2. Bassler, B. L. (1999): How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbil*., 2:582-587
3. Bejarano, A., Sauer, U., Mitter, B., Preininger, C. (2017): Parameters influencing adsorption of *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN onto bentonite, silica and talc for microbial inoculants. *Appl Clay Sci.*, 141:138-145
4. Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. (2005): Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*., 13:20–26
5. Caballero, J., Peralta, C., Molla, A., Del Valle, E. E., Caballero, P., Berry, C., Felipe, V., Yaryura, P., Palma, L. (2018): Draft Genome Sequence of *Bacillus cereus* CITVM-11.1, a Strain Exhibiting Interesting Antifungal Activities. *J Mol Microbiol Biotechnol*., 28:47-51
6. Cairns, L. S., Hobley, L., Stanley-Wall, N. R. (2014): Biofilm formation by *Bacillus suptilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol Microbiol*., 93:587-598
7. Cayô, R., Yañez San Segundo, L., Pérez del Molino Bernal, I. C., García de la Fuente, C., Bermúdez Rodríguez, M. A., Calvo, J., Martínez-Martínez, L. (2011): Bloodstream infection caused by *Acinetobacter junii* in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogenic haematopoietic cell transplantation. *J Med Microbiol*., 60:375-377
8. Donlan, R. M. (2002): Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*., 8:881-890
9. Du, H., Yang, J., Lu, X., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H., Zhang, C., Lu, F. (2018): Purification, Characterization, and Mode of Action of Plantaricin GZ1-27, a Novel Bacteriocin against *Bacillus cereus*. *J. Agric. Food Chem.*, 15:1-37
10. Gaddy, J. A., Actis, L. A. (2009): Regulation of *Acinetobacter baumanii* biofilm formation. *Future Microbil.*, 4:273-278

11. Grillo-Puertas, M., Villegas, J. M., Rintoul, M. R., Rapisarda, V. A. (2012): Polyphosphate degradation in stationary phase triggers biofilm formation via LuxS quorum sensing system in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 7:56-62
12. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. (2004): Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*., 2:95-108
13. Hentzer, M., Givskov, M. (2003): Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*., 112:1300-1307
14. Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., Gohar, M. (2010): Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiol.*, 4:1009-1018
15. http://2011.igem.org/Team:Glasgow/Biofilm (pristupljeno: 27. travnja 2018.)
16. Kalenić, S., Abram, M., Batinić, D., Beader, N., Bedenić, B., Bošnjak, Z., Budimir, A., Drenjančević, D., Katalinić-Janković, V., Lukić-Grlić, A., Ljubin-Sternak, S., Mareković, I., Mlinarić-Galinović, G., Mlinarić-Missoni, E., Plečko, V., Presečki-Stanko, A., Presečki, V., Punda-Polić, V., Rukavina, T., Sviben, M., Tambić-Andrašević, A., Tićac, B., Vilibić-Čavlek, T., Vraneš, J., Vučković D., Žmak, Lj. (2013): Medicinska mikrobiologija. *Medicinska naklada*, Zagreb
17. Lindsay, D., Brözel, V. S., Von Holy, A. (2006): Biofilm-spore response in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* during nutrient limitation. *J Food Prot.*, 69:1168-1172
18. López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010): Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*., 2:28-39
19. Marić, S., Vraneš, J. (2007): Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Period Biolog*., 109:115-121
20. Merritt, J. H., Kadouri, D. E., O'Toole, G. A. (2005): Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol*., Chapter 1:Unit 1B.1
21. Oosthuizen, M., Steyn, B., Theron, J., Cosette, P., Lindsay, D., Von Holy, A., Brözel, V. S. (2002): Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*., 68:2770-2780
22. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., Davies, D. G. (2002): *Pseudomonas aeruginosa* dislays multiple phenotypes during development as a biofilm, *J Bacteriol*., 1:1140-1154
23. Singh, P., Singh, V. K., Singh, R., Borthakur, A., Kumar, A., Tiwary, Mishra, P. K. (2018): Biological degradation of toluene by indigenous bacteria *Acinetobacter junii* CH005 isolated from petroleum contaminated sites in India. *Energ Ecol Environ*., 4:170-179

24. Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., Edelmann, R. E., Actis L. A. (2003) Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiol*., 149:3473-3484
25. Traglia, G. M., Almuzara, M., Vilacoba, E., Tuduri, A., Neumann, G., Pallone, E., Centrón, D., Soledad Ramírez, M. (2014): Bacteremia caused by an *Acinetobacter junii* strain harboring class 1 integron and diverse DNA mobile elements. *J Infect Dev Ctries*., 8:666-669
26. Vraneš, J., Leskovar, V. (2009): Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Med Glas*., 6:147-165
27. 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. *Appl Environ Microbiol*., 73:1481-1488
28. Zhang, Y., Marrs, C. F., Simon, C., Xi C. (2009) Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter spp*. *Sci Total Environ*., 407:3702-3706

7. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Katarina Rotim

Datum i mjesto rođenja: 03. 01. 1994., Split, Hrvatska

E-mail adresa: katarinarotim25@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2012. – 2018. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija

2008. – 2012. VII. gimnazija, Zagreb

VJEŠTINE:

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

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

Vozačka dozvola: B kategorija