

# Krivulje rasta bakterija *Bacillus subtilis* i *Acinetobacter baumannii* u ovisnosti o temperaturi

---

Ćelić, Branimira

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:046598>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Branimira Čelić

**Krivulje rasta bakterija *Bacillus subtilis* i  
*Acinetobacter baumannii* u ovisnosti o  
temperaturi**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Branimira Čelić

**Temperature dependent growth curves of  
bacteria *Bacillus subtilis* and *Acinetobacter  
baumannii***

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Krivulje rasta bakterija *Bacillus subtilis* i *Acinetobacter baumannii* u ovisnosti o temperaturi

Branimira Čelić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Bacillus subtilis* je Gram-pozitivna bakterija štapićastog oblika koja stvara spore otporne na visoku temperaturu. Nalazi se u tlu i nepatogena je. Bakterija *Acinetobacter baumannii* je Gram-negativni kokobacil koji se najčešće pojavljuje u bolničkom okruženju. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi krivulje rasta, preživljavanje i eventualno umnažanje bakterija *B. subtilis* i *A. baumannii*, kao i koncentraciju endospora *B. subtilis* u ovisnosti o različitim temperaturama inkubacije (4, 22, 35, 44 i 50 °C) kroz 52 h u hranjivom mediju. Obje bakterije su preživjele sve istraživane temperaturne vrijednosti. Uočen je izostanak umnažanja obje bakterije pri temperaturi od 4 °C. Što je temperatura inkubacije bila bliža temperaturnom optimumu bakterijskih vrsta, to je i umnažanje bilo značajnije. Udio endospora u kulturi *B. subtilis* se izrazito povećao nakon 5 h inkubacije pri 50 °C kao način prilagodbe na nepovoljne uvjete okoliša.

Ključne riječi: bakterije, endospore, preživljavanje, temperatura, umnažanje.

(37 stranica, 20 slika, 33 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Renata Šoštarić

Prof. dr. sc. Biljana Balen

Izv. prof. dr. sc. Petar Kružić

Rad prihvaćen: 08.09.2022

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

### Temperature dependent growth curves of bacteria *Bacillus subtilis* and *Acinetobacter baumannii*

Branimira Ćelić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

*Bacillus subtilis* is a Gram-positive, rod-shaped bacterium that forms spores resistant to high temperatures. It is found in the soil and is non-pathogenic. The bacterium *Acinetobacter baumannii* is a Gram-negative coccobacillus that occurs most often in the hospital environment. The aim of this research was to determine the growth curves, survival, and eventual reproduction of *B. subtilis* and *A. baumannii*, as well as the concentration of *B. subtilis* endospores depending on different incubation temperatures (4, 22, 35, 44 and 50 °C) over 52 hours. Both bacteria survived all investigated temperature ranges. The absence of multiplication of both bacteria at a temperature of 4 °C was observed. The closer the incubation temperature was to the temperature optimum of the bacterial species, the more significant the multiplication was. The proportion of endospores in the culture of *B. subtilis* increased after 5 hours of incubation at 50 °C as a way of adapting to unfavorable environmental conditions.

Keywords: bacteria, endospores, survival, temperature, reproduction.  
(37 pages, 20 figures, 33 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Jasna Hrenović, PhD

Reviewers:

Assoc. Prof. Renata Šoštarić, PhD

Prof. Biljana Balen, PhD

Assoc. Prof. Petar Kružić PhD

Thesis accepted: 08.09.2022

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 Opća obilježja bakterije <i>Bacillus subtilis</i> .....	1
1.1.1 Sporulacija.....	2
1.1.2 Struktura i otpornost endospore .....	5
1.1.3 Germinacija bakterijskih spora .....	6
1.2 Opća obilježja bakterije <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	7
1.2.1 Prisutnost <i>Acinetobacter baumannii</i> u prirodnom okolišu .....	8
1.3 Krivulje rasta bakterija.....	12
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>15</b>
3.1 Korištene bakterije.....	15
3.2 Priprema tekućeg i čvrstog medija.....	15
3.3 Aparatura i pribor.....	16
3.4 Izvođenje eksperimenta .....	16
3.5 Bojanje po Gramu .....	19
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>20</b>
4.1 Optička gustoća bakterijske suspenzije <i>B. subtilis</i> pri različitim temperaturama	20
4.2 Optička gustoća bakterijske suspenzije <i>A. baumannii</i> pri različitim temperaturama	24
.....	24
4.2 Udio spora bakterije <i>B. subtilis</i> .....	28
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>29</b>
5.1 Preživljavanje i formiranje spora bakterije <i>Bacillus subtilis</i> pri različitim temperaturama .....	29
5.2 Preživljavanje bakterije <i>A. baumannii</i> pri različitim temperaturama .....	30
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>32</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>33</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>37</b>





# 1. UVOD

## 1.1 Opća obilježja bakterije *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis*, poznat i kao bacil sijena ili bacil trave, je Gram-pozitivna bakterija koja se nalazi u tlu i gastrointestinalnom traktu preživača, ljudi i morskih spužvi. Vrste roda *Bacillus* su prepoznatljivog štapićastog oblika te se pokreću peritrihijalnim bičevima (smješteni su na cijeloj površini stanice). Ove bakterije imaju mogućnost stvaranja spora, nepatogene su i katalaza pozitivne.

*B. subtilis* je najbolje proučavana Gram-pozitivna bakterija. Otkrio ju je Christian Gottfried Eherenberg 1835. godine pod imenom *Vibrio subtilis* dok ju je Ferdinand Cohn 1872. godine preimenovala u *Bacillus subtilis* (Kovács 2019). Fakultativni je anaerob koji može koristiti nitrat kao terminalni akceptor elektrona ili izvršiti mješovitu kiselu fermentaciju s laktatom, acetatom i acetoinom kao glavnim krajnjim produktima. *B. subtilis* je mikrob čije se spore vrlo lako mogu ekstrahirati iz različitih vrsta tla. Često se nalazi u svom vegetativnom stanju prilikom suživota s raspadajućom materijom ili u bliskoj povezanosti s korijenjem biljaka.

Genom bakterije *B. subtilis* je u potpunosti sekvenciran 1997. godine i uspješno je identificirano 4100 gena (Ara i sur. 2007). To je ujedno bio prvi u cijelosti sekvencirani genom Gram-pozitivne bakterije. Kompletan slijed genomske DNA sastoji se od 4.2 milijuna baznih parova te udjelom gvanina i citozina od 43% (Kovács 2019).

Koristi se kao modelni organizam zahvaljujući svojoj prirodnoj sposobnosti da unese izvanstaničnu DNA koja omogućuje jednostavnu genetsku modifikaciju. Bakterija *B. subtilis* je predmet proučavanja stanične diobe, izlučivanja proteina, površinske pokretljivosti razvoja biofilma, pričvršćivanja na korijen biljke ili hife gljivica, proizvodnje sekundarnog metabolita i oslobađanje izvanstaničnih vezikula (Kovács 2019).

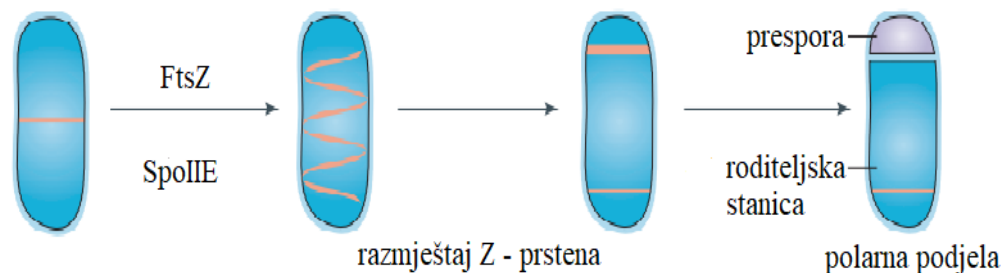
Također se koristi i kao modelni organizam za sintezu proteina zbog svoje sposobnosti proizvodnje i lučenja raznih enzima izvan stanice i visoke sigurnosti (Ara i sur. 2007). Naime, bakterija *B. subtilis* s drugim vrstama roda *Bacillus* pripada GRAS skupini (eng. Generally Regarded As Safe) sigurnih organizama za rad u grani biotehnologije jer se ne smatra ljudskim patogenom. Procjenjuje se da vrste *Bacillus* sp., uključujući *B. subtilis*, proizvode 60% komercijalno dostupnih enzima. Ovi se enzimi koriste u mljekarstvu, pekarstvu, stočarstvu industriji stočne hrane i tekstilu (Ara i sur. 2007).

Mikrobni enzimi se mogu izravno koristiti kao lijekovi. Proteini poput streptokinaze i stafilokinaze koje izlučuju bakterije *Streptococcus haemolyticus* i *Staphylococcus aureus* široko se koriste kao fibrinolitici u liječenju tromboze. Bakterija *B. subtilis* također proizvodi enzime koji imaju terapijsku primjenu. Tako lipaze hidroliziraju masti kod kroničnih gastrointestinalnih bolesti, dok alkalne proteaze djeluju kao transdermalni lijekovi čiji je cilj dostava terapijski učinkovite doze lijeka kroz kožu bolesnika. Nadalje, amilaze hidroliziraju škrob koji se koristi za insuficijenciju gušterače (Danilova i Sharipova 2020).

### **1.1.1 Sporulacija**

Bakterija *B. subtilis* je privukla interes znanstvenika i kao model stanične diferencijacije jer ima ciklus koji se sastoji od vegetativnog rasta stanice kao i procesa sporulacije – prvog proučavanog procesa diferencijacije (Ara i sur. 2007). Temperaturni optimum ove vrste bakterije je 25-35 °C. Uslijed nepovoljnih životnih uvjeta poput visokih temperatura, isušivanja, gladovanja, povećanog UV i  $\gamma$  - zračenja Gam-pozitivni bacili pokreću proces sporulacije te stvaraju dormantne stanice - endospore. Takve stanice u nepovoljnim uvjetima mogu sačuvati genetički materijal i do 100 000 godina (Willey i sur. 2017). Proces traje 7 h pri temperaturi od 37 °C i započinje aktivacijom proteina Spo0A procesom fosforilacije. Tako aktivirana molekula pokreće asimetričnu sporulacijsku diobu i transkripciju gena spoIIA, spoIIIE i spoIIIG koji kodiraju ključne razvojne regulatore. Sporulacijskom diobom se štapićasti *B. subtilis* podijeli na dva genetički istovjetna, ali morfološki različita dijela - manju spora stanicu ili presporu i roditeljsku stanicu (Piggot i Hilbert 2004). Oba odjeljka nakratko ostaju jedan pored drugoga držeći se za staničnu stijenkku. Za proces je potrebna povećana razina proteina FtsZ koji je bakterijski homolog tubulina. On tvori protofilamente te na mjestu dijeljenja stanice nastaje Z – prsten. Uz visoku koncentraciju proteina SpoIIIE, prsten se udvostručuje te se pomiče iz medijalne

ravnine prema polovima stanice. Nastaje septum koji dovodi do podjele stanice na presporu i roditeljsku stanicu (Slika 1) (Errington 2003).



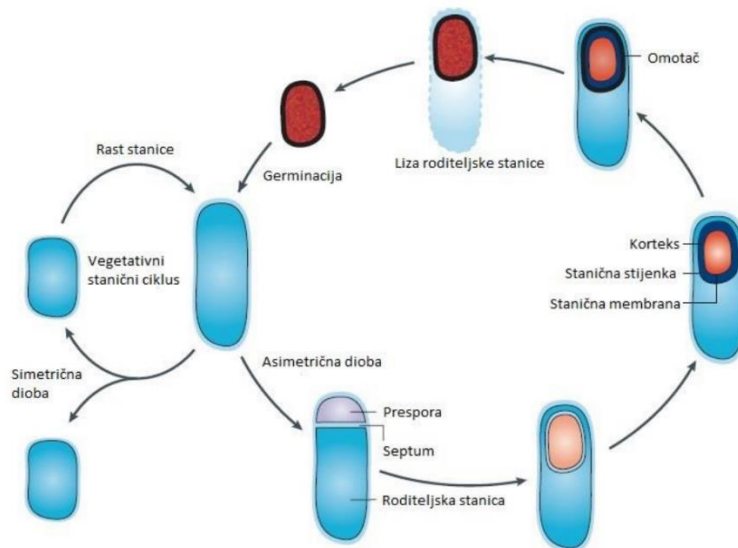
**Slika 1.** Podjela stanice tijekom sporulacije.

Preuzeto i prilagođeno prema: Willey i sur. (2017)

S obzirom na to da se kromosom ne nalazi polarno, u stanici dolazi do zanimljive segregacije kako bi se mogao smjestiti u stanicu presporu. Proces započinje tvorbom kompleksa kromosoma koji se nalazi u blizini *oriC* regije i *Spo0J* proteina te se približi polovima stanice. Kombiniranim djelovanjem proteina *Soj* i *Rac A* *oriC* regija veže se za protein *DivIVA* preko kojega se usidri na polu stanice. Formiranjem sporulacijskog septuma trećina se kromosoma zarobi u regiji prespore. Drugi dio kromosoma koji je udaljen od *oriC* regije se uz pomoć DNA transportera *spOIIIIE* preonsi kroz septum. *SpoIIIIE* je visoko konzervirani protein kojeg koristi većina bakterija za zaštitu od štete koja bi nastala ako bi dio kromosoma ostao zarobljen u septumu prilikom zatvaranja (Errington 2003).

Asimetrična podjela stanice se nastavlja razgradnjom stanične stijenke unutar septuma. Zatim stanična membrana obavija presporu i ona postaje slobodni protoplast obavijen s dvije obrnute membrane. Proteini niske molekularne težine sintetiziraju se u velikim količinama unutar prespore i vežu se za DNA kako bi je zaštitili od oštećenja. Nadalje, dolazi do smanjenja volumena prespore i količine vode te snižavanja pH vrijednosti unutar protoplasta što dovodi do sinteze peptidoglikanskog korteksa između unutarnje i vanjske membrane. Velika količina piridin-2,6-dikarboksilne kiseline (dipicolinic acid, DPA) sintetizira se u roditeljskoj stanici te se prenosi u presporu s dvovalentnim kationima (najčešće  $\text{Ca}^{2+}$ ), što dovodi do dehidracije i mineralizacije spore. Također, dolazi i do formiranja modificirane stanične stijenke izvan

unutarnje stanične membrane prespore. U posljednjem koraku procesa sporulacije oko korteksa se formira proteinski omotač nastao uz pomoć proteina sintetiziranih unutar roditeljske stanice. Dolazi do lize roditeljske stanice i endospora se otpušta u okoliš (Errington 2003). Proces nastanka spore je slikovito opisan na Slici 2.

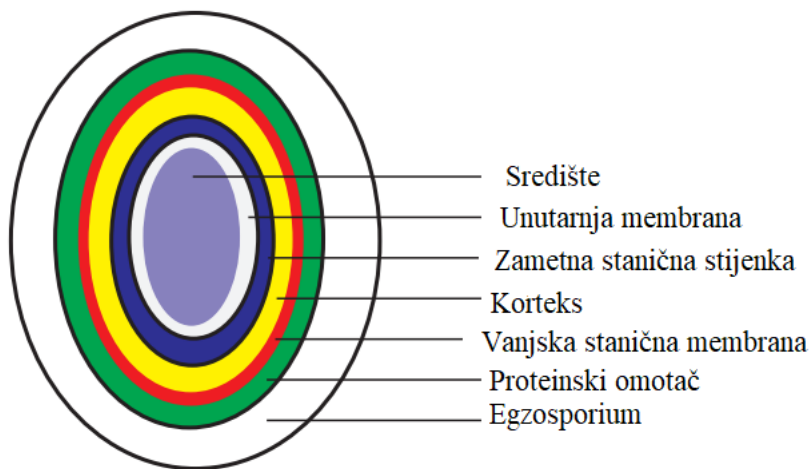


**Slika 2.** Proces nastanka spora vrste *Bacillus subtilis*.

Preuzeto i prilagođeno prema: Errington (2003)

### 1.1.2 Struktura i otpornost endospore

Elektronska mikroskopija je dokazala da se endospora morfološki sastoji od središta stanice s kromosomskom DNA obavijenom proteinima sličnim kromatinu poznatim kao SASP (mali proteini topivi u kiselinu), koji štite DNA spore od UV zračenja i topline. Također, sadrži normalne stanične strukture, poput ribosoma i drugih enzima, ali nije metabolički aktivna. Nadalje, središte endospore je obavijeno s nekoliko slojeva koji se bitno razlikuju po sastavu (Slika 3).



**Slika 3.** Shematski prikaz slojeva endospore.

Preuzeto i prilagođeno prema: Willey i sur. (2017)

Niski sadržaj vode kao i pH vrijednost, visoka razina DPA (eng. *dipicolinic acid*) i iona  $\text{Ca}^{2+}$  te vezanje malih, u kiselinu topljivih,  $\alpha/\beta$  proteina (eng. *small, acid-soluble spore proteins*, SASP) na molekulu DNA najviše doprinose otpornim svojstvima spore. Središte endospore je okruženo unutarnjom staničnom membranom na koju naliježe zametna stanična stijenka koja ima sličnu fosfolipidnu strukturu kao i membrana rastuće bakterijske stanice, ali s vrlo niskom propusnošću za male molekule. To sprječava ulazak molekula koje bi mogle oštetiti molekulu DNA. Zametna stanična stijenka okružuje unutarnju staničnu membranu i u procesu germinacije

će postati stanična stijenka rastuće bakterijske stanice. Na zametnu staničnu stijenkicu naliježe sloj peptidoglikana nazvan korteks. Važan je zbog očuvanja integriteta stanice. Korteks je okružen vanjskom staničnom membranom. Proteinski omotač koji obavija vanjsku staničnu membranu je izgrađen od više od 40 proteina, od kojih su gotovo svi specifični za sporu. Omotač zaštićuje sporu od predatorskih eukariotskih mikroorganizama te od različitih reaktivnih spojeva poput lizozima. Posljednji sloj imaju sve bakterije koje stvaraju endospore i naziva se egzosporium. Sastoji se od proteina i ugljikohidrata (Willey i sur. 2017).

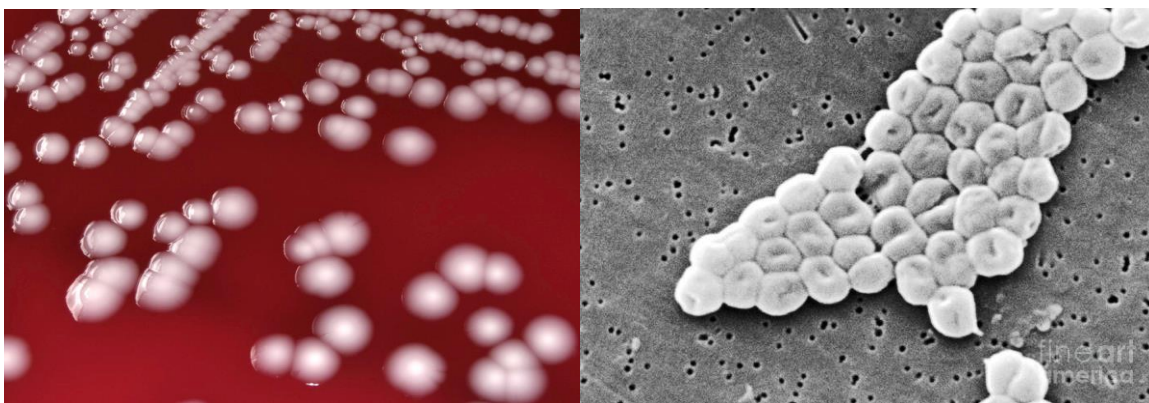
### **1.1.3 Germinacija bakterijskih spora**

Ako je bakterijska stanica izložena dužem razdoblju povoljnih uvjeta ona prolazi kroz fazu germinacije. Za klijanje spora potrebna je ponajprije prisutnost vode i kisika, a karakterizirano je brzim bubrenjem kao rezultatom hidratacije. Tvari koje potiču sporu na germinaciju jednim imenom nazivaju se germinanti, a to su najčešće L-aminokiseline, D-šećeri i purinski nukleotidi. Također, germinanti mogu biti i ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , soli ili visok tlak u stanici (Setlow 2003)

Transformacija endospora u aktivne vegetativne stanice jednako je složen proces kao i sporulacija. Odvija se u tri faze; aktivacija, germinacija (klijanje) i izrastanje. Aktivacija je proces koji priprema stanicu za klijanje. Započinje kada proteini germinantnih receptora, smješteni u unutarnjoj membrani i korteksu, otkriju male molekule poput šećera i aminokiselina. Aktivirani receptor potiču otpuštanje kompleksa Ca-DPA, razgradnju peptidoglikana u korteksu i unos vode. Razina vode unutar endospore dosegne onu kao i kod vegetativne stanice što dovodi do aktivacije enzima (Willey i sur. 2017).

## 1.2 Opća obilježja bakterije *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* je Gram-negativna, oportunističko-patogena bakterija. Pripada tipu kokobacila (Slika 4) i nepokretna je. Za razliku od prethodno opisane bakterije *B. subtilis*, *A. baumannii* ne proizvodi spore. Bakterija je katalaza pozitivna dok je udio gvanina i citozina u molekuli DNA 39-47%. Zahvaljujući brzom stjecanju rezistencije na antibiotike, *A. baumannii* je jedna od vodećih uzročnika bolničkih epidemija u svijetu kod imunokompromitiranih bolesnika. U Hrvatskoj se prvi put pojavila 2002. godine. Za razliku od drugih vrsta roda *Acinetobacter* koje su najčešće izolirane iz tla, vode i životinja i široko rasprostranjene, *A. baumannii* se nalazi gotovo isključivo u bolničkom okruženju, posebno u jedinicama intenzivne njege (Antunes i sur. 2014). Rod *Acinetobacter* je tijekom godina doživio mnoge taksonomske promjene. Prvi put ga je izolirao nizozemski znanstvenik Beijerinck na mediju obogaćenom kalcijevim acetatom, ali su vrstu službeno imenovali Brisou i Prevot tek 1986. godine. Pripada porodici Moraxellaceae koja se sastoji od osam rodova uključujući vrstu *Acinetobacter*. Današnji naziv je dobila po grčkoj riječi 'akinetos' što znači nepokretan (Antunes i sur. 2014). Bakterija *A. baumannii* se uspješno umnaža na čvrstim podlogama kao što su krvni i MacConkey agar nakon inkubacije na 37 °C/48 h. Formiraju glatke, ponekad mukozne, sivo-bijele kolonije (Slika 4) (Peleg i sur. 2008).



**Slika 4.** Na slici lijevo su prikazane porasle kolonije bakterije *A. baumannii* na krvnom agaru. Desno je prikazana kolonija bakterija *A. baumannii* fotografirana elektronskim skenirajućim mikroskopom.

Izvor: <https://phil.cdc.gov/>

Bakterija *A. baumannii* je jedna od šest patogena s najvećom virulencijom i višestrukom rezistencijom na antibiotike. Pripada grupi ESKAPE uključujući bakterije *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. Mehanizmi koji bakteriji *A. baumannii* omogućuju rezistenciju su (1) posjedovanje  $\beta$ -laktamaze koje inaktiviraju različite antibiotike, (2) stvaranje promjena u proteinima koji vežu penicilin i sprječavaju njegovo djelovanje i (3) razvijanje promjena u broju i strukturi proteina porina koje rezultiraju smanjenom propusnosti za antibiotike kroz vanjsku membranu bakterijske stanice (Perez i sur. 2007).

### 1.2.1 Prisutnost *Acinetobacter baumannii* u prirodnom okolišu

Bakterija *A. baumannii* se općenito smatra dijelom normalne flore kože i sluznice ždrijela, ljudskih respiratornih sekreta, urina, rektuma i drugih kliničkih uzoraka. Pripada jedinoj skupini Gram-negativnih bakterija koje mogu biti prirodni stanovnici ljudske kože pronađene kod 42,5 % zdravih pojedinaca i čak 75 % hospitaliziranih pacijenata. Asimptomatska kolonizacija joj omogućuje rasprostranjivanje unutar i između bolnica (Gallego 2016).

U bolničkom okruženju izolirana je iz ventilacijskih cijevi, uređaja za praćenje arterijskog tlaka, ovlaživača zraka, umivaonika, kao i s kože zdravstvenog osoblja, madraca, jastuka, ventilatora i sa svih vlažnih područja poput umivaonika i vode iz slavine.

Uspjeh preživljavanja bakterije *A. baumannii* kao ljudskog patogena može se objasniti kroz nekoliko činjenica:

- Uspješna prilagodba nepovoljnim uvjetima okoline
- Duga postojanost na suhim površinama
- Otpornost na antibiotike, isušivanje i dezinfekciju
- Plastičnost genoma
- Porast broja imunokompromitiranih pacijenata.



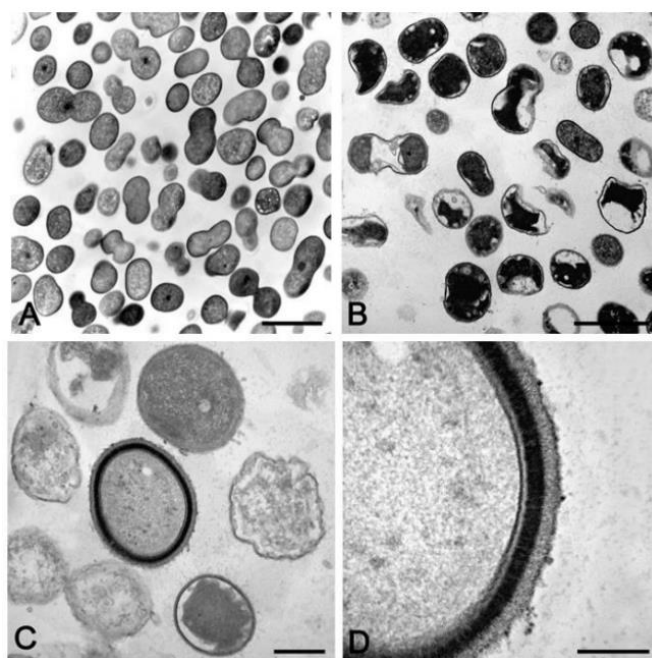
Pojava bolničkih infekcija uzrokovanih bakterijom *A. baumannii* uglavnom je rezultat visoke prilagodljivosti nepovoljnim uvjetima iz okoline kao i sposobnosti opstanka u suhim i surovim okruženjima. Bakterije mogu preživjeti i izloženost često korištenim dezinficijensima kao što su klorheksidin, glukonat i fenoli.

Također, otpornost na isušivanje je olakšala bakteriji širenje bolničkom infrastrukturom, uređajima kao i osobljem. Suhe sredine karakteriziraju niske aktivnosti vode, što se također može postići dodatkom osmotski aktivnih tvari kao što su soli ili šećeri. S obzirom na to da su bakterijske membrane propusne za vodu, u takvim područjima će voda izlaziti iz stanice, osušiti se i nastupit će stanična smrt. Bakterija *A. baumannii* kako bi nadoknadila gubitak vode, iz okoliša uzima kompatibilne otopljene tvari (Zeidler i sur. 2017).

Iako se većina istraživanja fokusira na umnažanje bakterije u optimalnim laboratorijskim uvjetima, područja u kojima se nalazi bakterija *A. baumannii* mogu oskudijevati osnovnim zahtjevima organizma za umnažanje. U nastavku su opisane glavne strategije uz pomoć kojih će bakterija uspješno premostiti takva stanja okoliša:

- **„Bust and boom“ strategija** gdje se manji broj preživjelih stanica nastavlja umnažati na račun uginulih.
- **Stanično mirovanje** odnosi se na sposobnost mase bakterijske populacije da uspori ili zaustavi umnažanje. Bakterija tim procesom i dalje održava metaboličke funkcije i membranski potencijal no bez morfološke diferencijacije.
- **Pravo mirovanje** u obliku dormantnih stanica koje je vrlo slično procesu sporulacije, no još uvijek nije dovoljno istraženo (Larsson i Flach 2022).

Na Slici 5. je prikazana fotografija bakterijskih stanica *A. baumannii* dobivena analizom uz pomoć transmisijskog elektronskog mikroskopa (TEM). Nakon izlaganja aerobnim uvjetima utvrđena je normalna struktura bakterijske stanice (Slika 5A), dok se na Slici 5B nakon izlaganja stanica anaerobnim uvjetima uočavaju oštećene stanice kao i sferoplast (stanica bez stanične stijenke). Također, među stanicama se lako raspoznaju stanice s debelom ovojnicom (Slika 5C i D). To su dormantne stanice bakterije *A. baumannii*. One nisu značajno veće od normalnih, neoštećenih stanica no ustanovljena je razlika u debljini vanjske ovojnice. Naime, dormantne stanice imaju čak do 3,3x deblje vanjske ovojnice i smatra se da je razlog zadebljanje peptidoglikanskog sloja u staničnoj stijenci (Dekić i sur. 2019).



**Slika 5.** TEM analiza bakterijskih stanica *A. baumannii*.

Izvor: Dekić i sur. 2019

Formiranje biofilma na abiotičkim površinama povećava šanse bakteriji *A. baumannii* za preživljavanjem u okolišu (na vršcima prstiju i neživim predmetima kao što su staklo, plastika i druge površine iz okoliša) čak i nakon izlaganja suhim uvjetima i nedostatku hranjivih tvari tijekom duljeg vremenskog razdoblja (Espinal i sur. 2012).

Također, *A. baumannii* posjeduje sustav očitavanja kvoruma (engl. *quorum sensing*, QS) nazvan AbaR-AbaI povezan sa stvaranjem biofilma za koji je poznato da je jedan od glavnih čimbenika koji daje sposobnost ovoj vrsti da preživi na biotičkim i abiotičkim površinama u bolničkom okruženju. QS je bakterijska komunikacijska metoda za prepoznavanje gustoće stanične populacije sa signalnim molekulama. Kada koncentracija signalnih molekula kvoruma dosegne prag, fiziološka svojstva i ekspresija različitih gena se mijenjaju, što često rezultira višestaničnim fenotipom jednostaničnih vrsta. QS regulira virulenciju, pokretljivost, proizvodnju antibiotika, biofilm i ekspresiju mnogih drugih gena kao što su tip IV pilus sustav, obrana od oksidativnog stresa i efluks rezistencije na više lijekova (Upmanyu i sur. 2022).

Istraživanja su pokazala da bakterija *A. baumannii* koegzistira s bakterijom *Pseudomonas aeruginosa*. Dokazane su međuvrsne interakcije koje mogu utjecati na virulenciju i osjetljivost na antibiotike kod oba patogena. Nekoliko procesa pokazuje jedinstvenu izvanstaničnu signalizaciju između bakterija *A. baumannii* i *P. aeruginosa* koji vjerojatno služe za kontrolu mikrobnog sastava u nišama koji sadrže oba organizma i modulaciju virulencije zajednice mješovitih vrsta. Takve antagonističke interakcije također sugeriraju potencijal novih terapijskih sredstava za borbu protiv bolesti koje je teško liječiti zbog otpornosti na antibiotike (Bhargava i sur. 2014).

Putem bolničkih otpadnih voda *A. baumannii* dolazi do uređaja za pročišćavanje istih gdje preživljava tretman te dolazi u prirodne vode. U prirodnim vodama može dugo preživjeti i umnažati se u slučaju postojanja lako razgradive organske tvari (Dekić i sur. 2018).

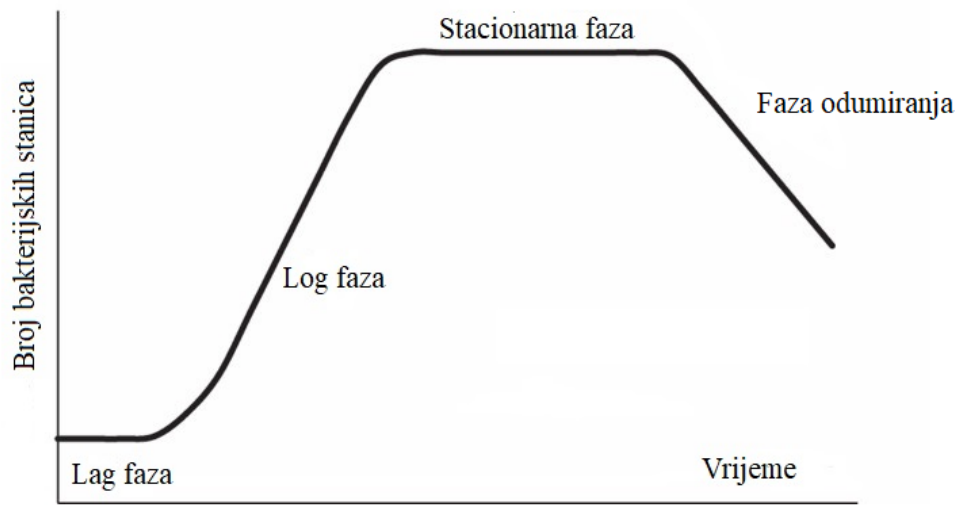
Također, bakterija *A. baumannii* je pronađena i u paleotlu kamenoloma Tri jezerca u Istri. Taj izolat je pokazao 87% stličnosti s kliničkim izolatom iz bolnice u Puli. Pretpostavlja se da je u tlo dospio s ilegalno odbačenim otpadom i protokom oborina dospio u tlo (Hrenović i sur. 2014)

### 1.3 Krivulje rasta bakterija

Rast bakterijske kulture definira se kao porast u broju bakterija, a ne rast u veličini pojedinačnih stanica. Porast se događa eksponencijalno, odnosno od jedne bakterije nastaju dvije, zatim četiri, osam itd. Kada se bakterijske stanice nalaze u zatvorenom sustavu bez dodavanja hranjivih tvari i uklanjanja otpadnih produkata, u povoljnim uvjetima, populacija pokazuje četiri faze rasta koje predstavljaju karakterističnu krivulju rasta bakterija. U laboratoriju se bakterije mogu uzgojiti u čistoj kulturi što podrazumijeva da se u nekoj tekućoj ili čvrstoj podlozi nalaze samo jedinke iste vrste. Kada istražujemo rast i umnažanje bakterija, istražujemo populaciju u čistoj kulturi (Kalenić i sur. 2019)

Na krivulji (Slika 6) razlikujemo:

- Lag faza (eng. *lag* - zaostajanje) predstavlja adaptacijski period za inokuliran mikroorganizam u kojem se on prilagođava novim životnim uvjetima. Duljina lag faze može značajno varirati, ovisno o tome koliko se novonastali razlikuju od uvjeta iz kojih su bakterije došle, kao i o stanju samih bakterijskih stanica. Aktivno rastuće stanice prebačene iz jedne vrste podloge u istu vrstu podloge, s istim uvjetima okoliša, imat će najkraću lag fazu.
- Log faza ili eksponencijalna upućuje na intenzivno umnažanje stanica kao i ubrzanje rasta. Stanice se dijele geometrijskom progresijom. Ovdje puno veći broj stanica nastaje nego nestaje.
- Stacionarna faza označava fazu tijekom koje nastaje i ugiba jednak broj stanica. S obzirom na veliki porast bakterijskih stanica u log fazi, potrošena je velika količina hranjivih tvari koja dovodi do nakupljanja produkata metabolizma i smanjene brzine umnažanja mikroorganizama. Dolazi do sinteze sekundarnih metabolita poput enzima i antibiotika.
- Logaritamska faza odumiranja je posljednja faza u kojoj dolazi do ugibanja mikroorganizama. Povećava se koncentracija toksičnih produkata i sada se broj stanica geometrijski smanjuje. U ovoj fazi sporogene bakterije razvijaju spore (Duraković 2002).



**Slika 6.** Faze krivulje rasta bakterija.

Izvor: Duraković (2002)

Drugi, kontinuirani sustav uzgoja bakterijskih stanica je sustav s konstantnim stanjem okoliša koji se održava kontinuiranom opskrbom hranjivim tvarima i uklanjanjem otpada. Volumen i koncentracija stanica se održavaju dodavanjem svježeg, sterilnog medija. Posuda koja se koristi kao spremnik za umnažanje bakterijskih stanica u kontinuiranoj kulturi naziva se bioreaktor ili kemostat. U kemostatu se može kontrolirati protok i održavati konstantnu koncentraciju supstrata, kao i kontinuiranu kontrolu pH, temperature i razine kisika. To omogućuje kontrolu stope umnažanja koja pomaže pri optimizaciji proizvodnje specifičnih mikrobnih proizvoda. Brzina kojom se proizvode nove stanice u posudi za kulturu uravnotežena je brzinom kojom se stanice uklanjaju (Maier i Pepper 2015).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi krivulje rasta, preživljavanje i eventualno umnažanje bakterija *B. subtilis* i *A. baumannii*, kao i koncentraciju spora *B. subtilis* u ovisnosti o različitim temperaturama inkubacije. Tijekom vremena inkubacije mjerena je koncentracija bakterija kao optička gustoća uzorka stanične kulture na valnoj duljini od 600 nm kako bi se utvrdile krivulje rasta svake bakterije na različitim temperaturama. Koncentracija spora bakterije *B. subtilis* određena je kao broj kolonija u pasteriziranom (80 °C/15 min) i nepasteriziranom uzorku. Na osnovu ovih podataka cilj je predvidjeti ponašanje navedenih bakterija u različitim okolišnim uvjetima, što je važno za okolišnu bakteriju *B. subtilis*, kao i za patogenu bakteriju *A. baumannii*.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1 Korištene bakterije

U svrhu istraživanja koristila sam dvije vrste bakterijskih kultura – *B. subtilis* i *A. baumannii*. Izolat bakterije *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSMZ br. 10 kupljen je iz banke mikroorganizama *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (Obhodaš i sur. 2021). Izolat *A. baumannii* pod nazivom IN-31 izdvojen je iz sirove neobrađene komunalne otpadne vode u Zagrebu. Osjetljiv je na sve antibiotike i nije klonski povezan s patogenim izolatima ove vrste (Higgins i sur. 2018).

### 3.2 Priprema tekućeg i čvrstog medija

Za uzgoj bakterija koristila sam tekući medij *Nutrient Broth* talijanskog proizvođača Biolife sljedećeg sastava po 1 L medija (pH  $6,8 \pm 0,2$ ):

- Pepton 5 g
- Mesni ekstrakt 3 g

Mesni ekstrakt (eng. *beef extract*) i pepton (eng. *peptone*) su izvori svih biogenih elemenata potrebnih za umnažanje heterotrofnih bakterija. Medij sam pripremlila suspendirajući 8 g dehidrata *Nutrient Broth* u 1 L hladne destilirane vode te potom autoklavirala 20 minuta pri 121 °C.

Za nasađivanje i ispitivanje stope preživjelih spora bakterija vrste *B. subtilis* koristila sam čvrstu hranjivu podlogu *Nutrient agar* (Biolife, Italija) sljedećeg sastava po 1 L medija (pH  $7,0 \pm 0,2$ ):

- Pepton 5 g
- Mesni ekstrakt 3 g
- Agar 15 g

Čvrsti medij sam pripremila suspendirajući 23 g dehidrata *Nutrient agar* u 1 L destilirane vode. Suspenziju sam zagrijavala do vrenja te potom autoklavirala 20 minuta pri 121 °C. Nakon hlađenja na 80 °C medij sam izlila u sterilne Petrijeve zdjelice i ostavila da se ohlade na sobnu temperaturu.

### 3.3 Aparatura i pribor

- Stalci za epruvete
- Staklene epruvete s čepom
- Kivete
- Petrijeve zdjelice
- Četiri inkubatora podešena na različite temperature (22, 35, 44, 50 °C)
- Spektrofotometar Hach DR/2500
- Vodena kupelj
- Mikropipeta (100 i 1000 µL)
- Hladnjak podešen na temperaturu od 4 °C
- Mikrobiološka ušica
- Čaša s 96%-tnim etanolom
- Plamenik i upaljač
- Brojač bakterijskih kolonija

### 3.4 Izvođenje eksperimenta

Obje bakterijske kulture, *B. subtilis* i *A. baumannii*, su prvo uzgojene na hranjivom agaru (16 h/35 °C). Zatim sam biomasu (po jednu bakteriološku ušicu od 10 µL) svake bakterijske kulture zasebno suspendirala u 10 mL tekuće hranjive podloge *Nutrient broth* te vorteksirala na 45 Hz /3 min. Iz svake suspenzije sam uzela po 1 mL i prenijela u 100 mL nove tekuće hranjive podloge *Nutrient broth*. Suspenzije sam potom razdijelila po 15 mL poduzorka u pet kiveta i inkubirala na temperaturama od 4, 22, 35, 44 te 50 °C tijekom 52 h. Objе suspenzije sam mjerila u principu tehničkog duplikata odnosno ponovljenih analiza na istom uzorku. Svaki uzorak



predstavlja neovisnu mjeru i može pomoći u otkrivanju pogreške u protokolu ili aparatu. Tijekom inkubacije kao i na kraju, uz pomoć spektrofotometra (Slika 7), mjerila sam optičku gustoća oba uzorka staničnih kultura na valnoj duljini od 600 nm (OD 600) u odnosu na slijepu probu (sterilni *Nutrient broth*) na temelju čega sam izradila krivulje rasta stanica.



**Slika 7.** Prikaz mjerenja optičke gustoće bakterijske suspenzije.

Izvor: Branimira Čelić

Bakterija *B. subtilis* stvara spore u nepovoljnim okolišnim uvjetima kao što je povišena temperatura. Zato sam odredila broj vegetativnih stanica i spora u kulturi koja je inkubirana na 50 °C. Suspenziju *B. subtilis* u podlozi *Nutrient broth* potom sam razdijelila u četiri epruvete po 10 mL te inkubirala različitom duljinom trajanja (0, 3, 5 i 24 h) na temperaturi od 50 °C.

Nakon perioda inkubacije napravila sam seriju decimalnog razrjeđenja uzorka tako da sam 1 mL suspenzije *B. subtilis* prenijela u epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Uzorak u prvoj epruveti je razrijeđen 10 puta, a u svakoj sljedećoj za 10 puta više (1:10 ili  $10^{-1}$  u drugoj 1:100 ili  $10^{-2}$  itd.). Uzorke iz serije decimalnog razrjeđenja sam inokulirala na hranjivi agar mikropipetom po 0,1 mL i inkubirala na 35 °C/24 h. Na ukupno 18 ploča porasle su bakterijske kolonije koje su bile u vegetativnom obliku kao i spora stanice. Seriju decimalnih razrjeđenja potom sam pasterizirala na 80 °C /15 min u vodenoj kupelji (Slika 8).



**Slika 8.** Pasterizacija serije decimalnih razrjeđenja na 80 °C.

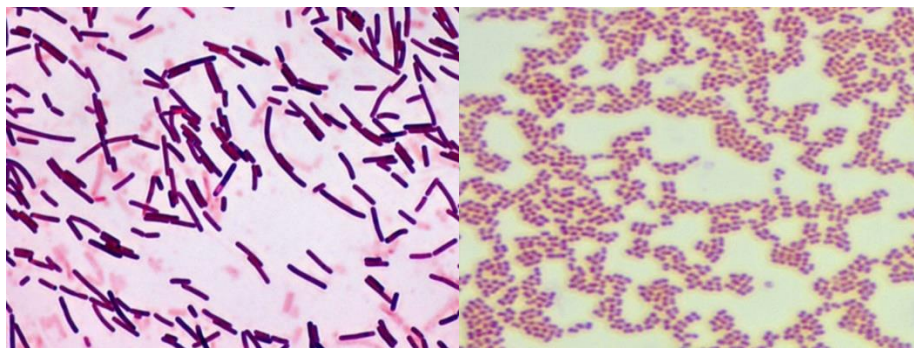
Izvor: Branimira Ćelić

Nakon toga sam napravila ponovnu inokulaciju na hranjivi agar kako je gore opisano. Na ukupno 15 ploča su porasle samo bakterijske kolonije koje su bile u obliku spora, dok su vegetativni oblici uništeni visokom temperaturom. Broj bakterijskih kolonija je izbrojen pomoću brojača kolonija bakterija. Brojač ima zvučni signal koji se aktivira prilikom pritiska markera i označava bakterijsku koloniju.

Za izračun sam koristila samo brojive ploče tj. one koje imaju između 10 i 300 bakterijskih kolonija. Udio spora bakterija u kulturi u promilima je izračunat prema formuli  $((CFU_s / CFU_t) \times 1000)$ , gdje  $CFU_s$  predstavlja koncentraciju spora u mjerenom vremenu, a  $CFU_t$  ukupnu koncentraciju bakterija. Rezultate srednje vrijednosti broja ukupnih stanica i spora stanica sam logaritmirala i izrazila kao log CFU/mL.

### 3.5 Bojanje po Gramu

Bojanje po Gramu (Hans Christian Gram 1883.) najčešće je upotrebljavana metoda složenih bojenja bakterija u svim granama bakteriologije. Mehanizam bojenja po Gramu objašnjava se građom stanične stijenke, prije svega debljinom mureinskog sloja u Gram-pozitivnih bakterija. Gram-pozitivne bakterije sadrže deblje stanične stijenke s mureinom i teže se ispiru kompleks kristal violet i lugola, dok Gram-negativne bakterije imaju tanki peptidoglikanski sloj i kompleks se lako ispiru 96%-tnim alkoholom (Stilinović i Hrenović 2009). Na kraju provođenja pokusa uzorke sam obojala po Gramu kako bi vizualizirala bakterije. Bakterijski razmaz na predmetnom stakalcu sam oprezno nekoliko puta provukla kroz plamen Bunsenova plamenika kako bi se bakterije fiksirale. Preko razmaza sam prolila kristal violet boju te nakon 3 min odlila. Zatim sam na Kristal violet boju dodala Lugolovu otopinu. Lugol služi kao sredstvo koje će s kristal violetom stvoriti netopljivi kompleks. Taj će se kompleks vezati s komponentom magnezij-ribonukleinska kiselina u staničnoj stijenci. Nakon 1 min odlila sam i Lugol i preparat isprala vodovodnom vodom. Predmetno stakalce sam uronila u 96%-tni alkohol i tako isprala ljubičastu boju. Preparat sam potom isprala pod mlazom vodovodne vode i tretirala safraninom 30 sec. Ponovno sam ga isprala te osušila na zraku. Na preparat sam dodala kap imerzionog ulja i uspješno mikroskopirala stanice pod imerzijskim objektivom svjetlosnog mikroskopa. Metodom bojenja po Gramu Gram-pozitivne bakterije oboje se plavo, a Gram-negativne bakterije crveno (Slika 9).



**Slika 9.** Gram-pozitivne bakterije *B. subtilis* obojene u plavo (lijevo), Gram-negativne bakterije *A. baumannii* obojene u crveno (desno).

Izvori: <https://phil.cdc.gov/>, <https://www.tgw1916.net/>

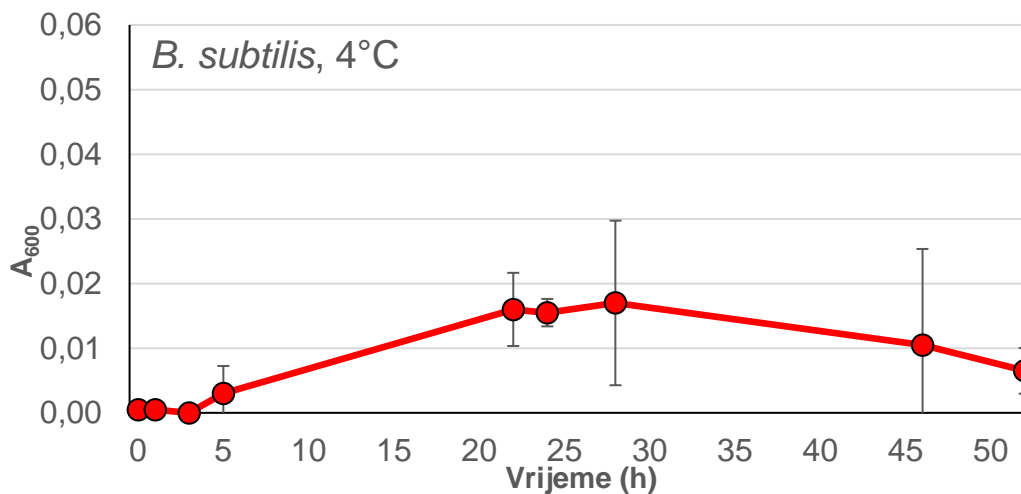
## 4. REZULTATI

### 4.1 Optička gustoća bakterijske suspenzije *B. subtilis* pri različitim temperaturama

Svi grafovi su napravljeni na temelju mjerenja dvaju uzorka iste bakterijske vrste odnosno po principu tehničkog duplikata.

#### Krivulja rasta pri 4 °C

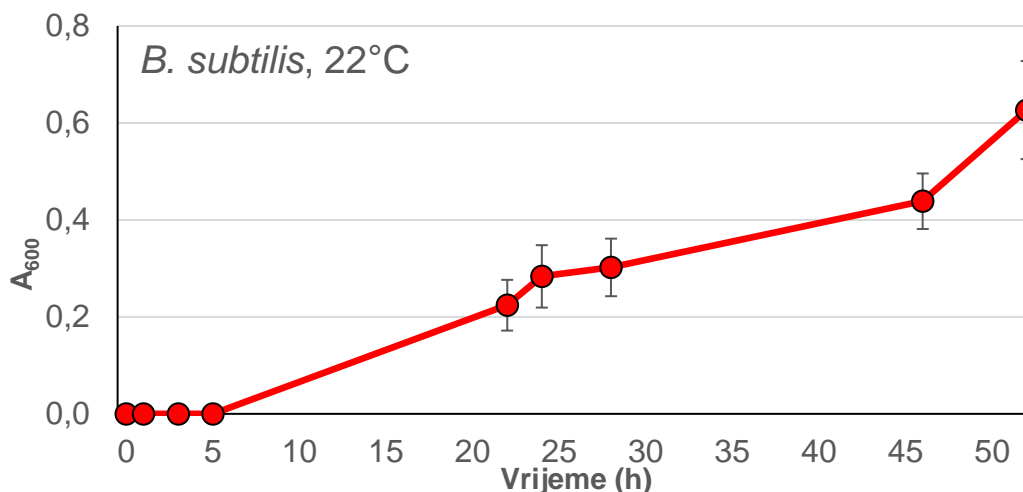
Pri temperaturi inkubacije od 4 °C bakterija *B. subtilis* pokazuje neznatno umnažanje tijekom 52 h što je vidljivo iz mjerenja absorbancije (Slika 10).



**Slika 10.** Krivulja rasta bakterije *B. subtilis* dobivena spektrofotometrijskim mjerenjem absorbancije na 600 nm ( $A_{600}$ ). Graf prikazuje srednju vrijednost i standardnu devijaciju umnažanja bakterijskih stanica pri temperaturi od 4 °C tijekom 52 h.

#### Krivulja rasta pri 22 °C

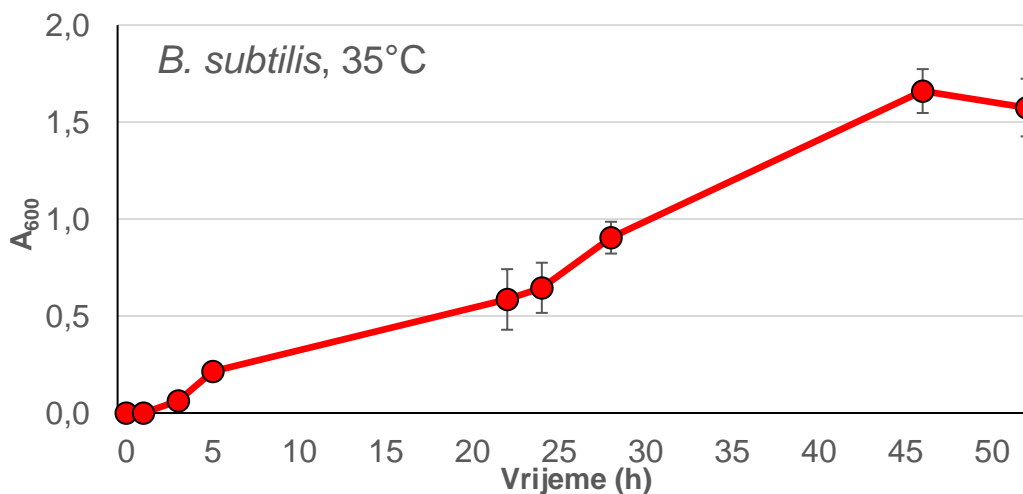
Spektrofotometrijsko mjerenje je pokazalo da se bakterija *B. subtilis* umnaža prilikom inkubacije pri 22 °C (Slika 11). U početku nisu zabilježene promjene i prvih 5 h inkubacije je trajala lag faza, no u 5 h mjerenja je započela eksponencijalna faza rasta i trajala je sve do 52 h. Najveće zabilježeno umnažanje bakterije pri 22 °C je zabilježeno na kraju mjerenja pri 52 h.



**Slika 11.** Krivulja rasta bakterije *B. subtilis* dobivena spektrofotometrijskim mjerenjem absorbancije na 600 nm ( $A_{600}$ ). Graf prikazuje srednju vrijednost i standardnu devijaciju umnažanja bakterijskih stanica pri temperaturi od 22 °C tijekom 52 h.

### Krivulja rasta pri 35 °C

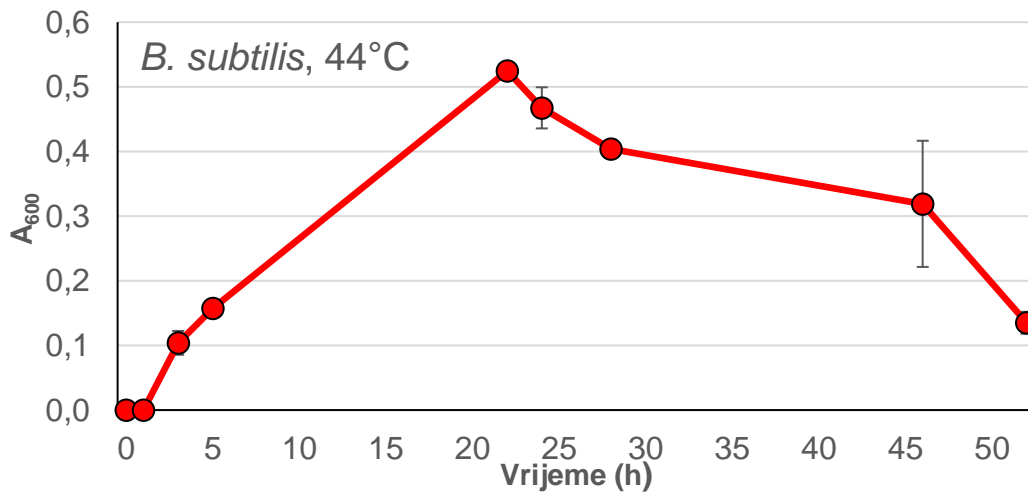
Najveće umnažanje bakterije *B. subtilis* bilo je pri 35 °C i to u trenutku inkubacije od 46 h (Slika 12). Već protekom 3 h inkubacije započela je logaritamska faza eksponencijalnog rasta koja je trajala sve do 46 h inkubacije. Uslijedila je faza odumiranja nakon 46 h mjerenja. Pri kraju mjerenja kada je inkubacija trajala 46 h odnosno 52 h ustanovljen je veći broj bakterijskih stanica nego prilikom inkubacije pri 44 °C ili 50 °C (Slike 13 i 14).



**Slika 12.** Krivulja rasta bakterije *B. subtilis* dobivena spektrofotometrijskim mjerenjem absorbancije na 600 nm ( $A_{600}$ ). Graf prikazuje srednju vrijednost i standardnu devijaciju umnažanja bakterijskih stanica pri temperaturi od 35 °C tijekom 52 h.

## Krivulja rasta pri 44 °C

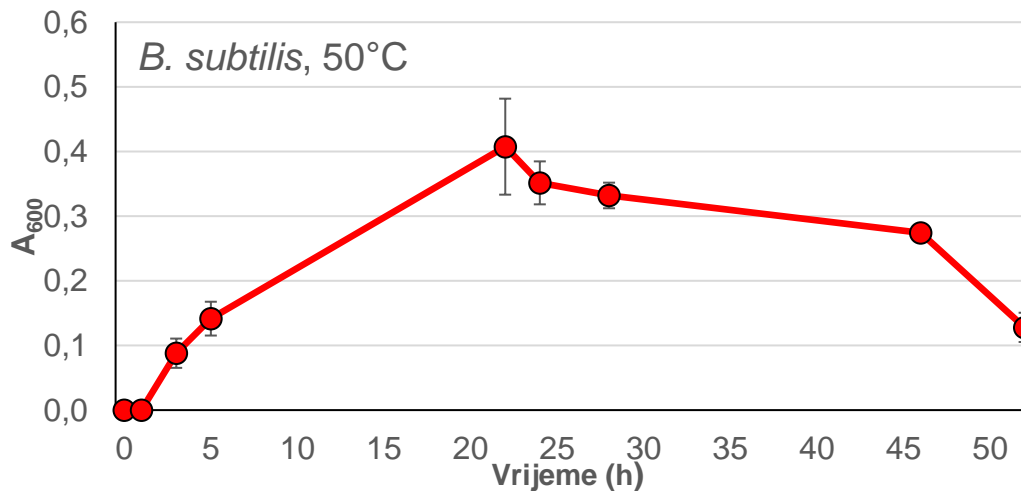
Prilikom inkubacije od 44 °C zabilježeno je najbrže umnažanje odnosno najbrža promjena iz lag faze u fazu eksponencijalnog rasta (Slika 13). Već nakon 1 h inkubacije započelo je bakterijsko umnažanje te je doseglo najveću vrijednost na 44 °C nakon 22 h inkubacije. Zatim je uslijedila faza odumiranja stanica te im se broj smanjio pri mjerenju od 24, 28, 46 i 52 h.



**Slika 13.** Krivulja rasta bakterije *B. subtilis* dobivena spektrofotometrijskim mjerenjem absorbancije na 600 nm ( $A_{600}$ ). Graf prikazuje srednju vrijednost i standardnu devijaciju umnažanja bakterijskih stanica pri temperaturi od 44 °C tijekom 52 h.

## Krivulja rasta pri 50 °C

Umnažanje bakterije bilo je manje nego prilikom inkubacije na 35 °C i zapaženo je smanjenje broja bakterijskih stanica (Slika 14). U 22 h mjerenja došlo je do prijelaza iz faze eksponencijalnog rasta u fazu odumiranja stanica.



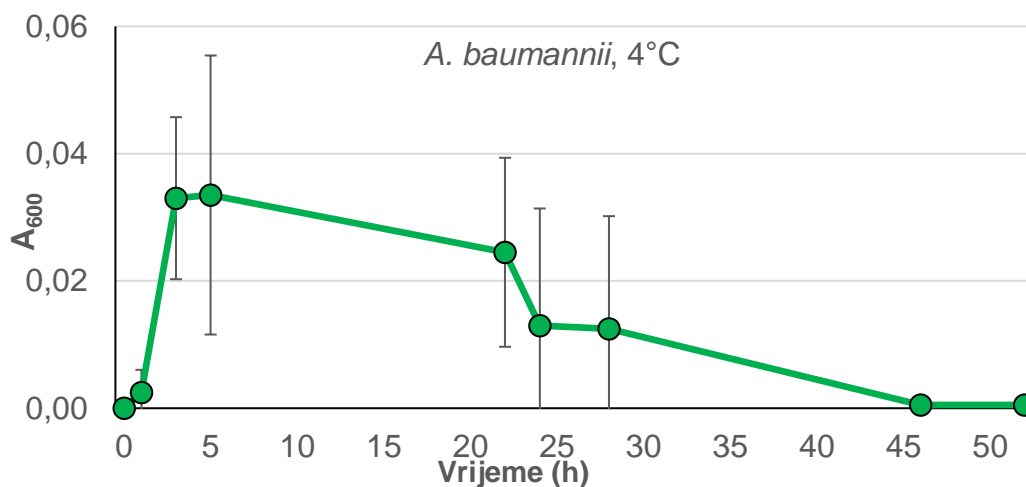
**Slika 14.** Krivulja rasta bakterije *B. subtilis* dobivena spektrofotometrijskim mjerenjem absorbancije na 600 nm (A<sub>600</sub>). Graf prikazuje srednju vrijednost i standardnu devijaciju umnažanja bakterijskih stanica pri temperaturi od 50 °C tijekom 52 h.

## 4.2 Optička gustoća bakterijske suspenzije *A. baumannii* pri različitim temperaturama

Svi grafovi su napravljeni na temelju merenja dva uzorka iste bakterijske vrste odnosno po principu tehničkog duplikata.

### Krivulja rasta pri 4 °C

Pri temperaturi od 4 °C uočeno je neznatno povećanje broja bakterijskih stanica *A. baumannii* (Slika 15).

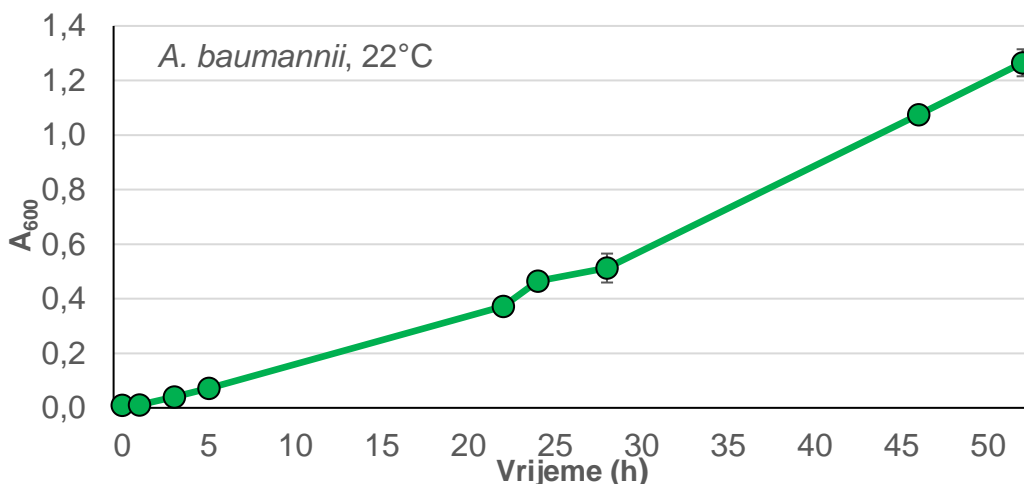


**Slika 15.** Krivulja rasta bakterije *A. baumannii* dobivena spektrofotometrijskim mjerenjem absorbancije na 600 nm ( $A_{600}$ ). Graf prikazuje srednju vrijednost i standardnu devijaciju umnažanja bakterijskih stanica pri temperaturi od 4 °C tijekom 52 h.

### Krivulja rasta pri 22 °C

Umnažanje bakterijskih stanica pri 22 °C bilo je gotovo linearano te u toku mjerenja nije uočeno odumiranje stanica. Lag faza je trajala izrazito kratko te ju je već u 1 h mjerenja zamijenila faza eksponencijalnog rasta koja je trajala sve do kraja mjerenja do 52 h (Slika 16).

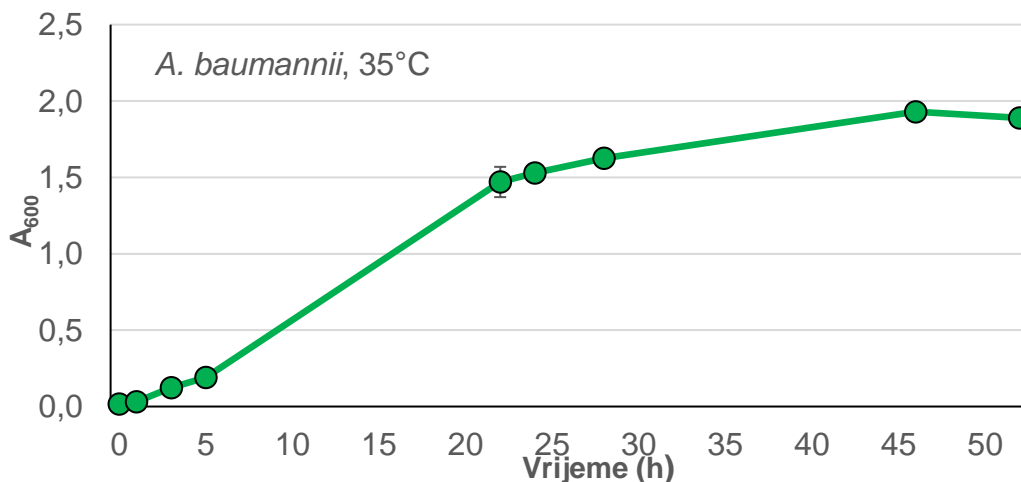




**Slika 16.** Krivulja rasta bakterije *A. baumannii* dobivena spektrofotometrijskim mjerenjem absorbancije na 600 nm (A<sub>600</sub>). Graf prikazuje srednju vrijednost i standardnu devijaciju umnažanja bakterijskih stanica pri temperaturi od 22 °C tijekom 52 h.

### Krivulja rasta pri 35 °C

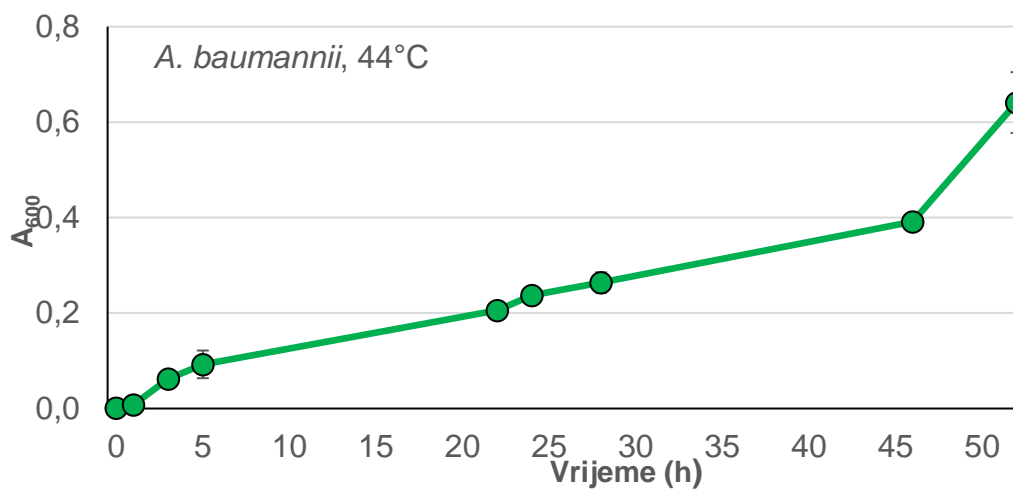
Bakterija *A. baumannii* je pokazala najveće umnažanje pri temperaturi inkubacije od 35 °C (Slika 17). Grafički prikaz umnažanja broja stanica prilikom inkubacije od 35 °C je sličan kao i pri 22 °C (Slika 16). Brza i ustaljena eksponencijalna faza rasta je započela već pri 1 h inkubacije no pri kraju mjerenja od 46 h je došlo do odumiranja stanica.



**Slika 17.** Krivulja rasta bakterije *A. baumannii* dobivena spektrofotometrijskim mjerenjem absorbancije na 600 nm (A<sub>600</sub>). Graf prikazuje srednju vrijednost i standardnu devijaciju umnažanja bakterijskih stanica pri temperaturi od 35 °C tijekom 52 h.

### Krivulja rasta pri 44 °C

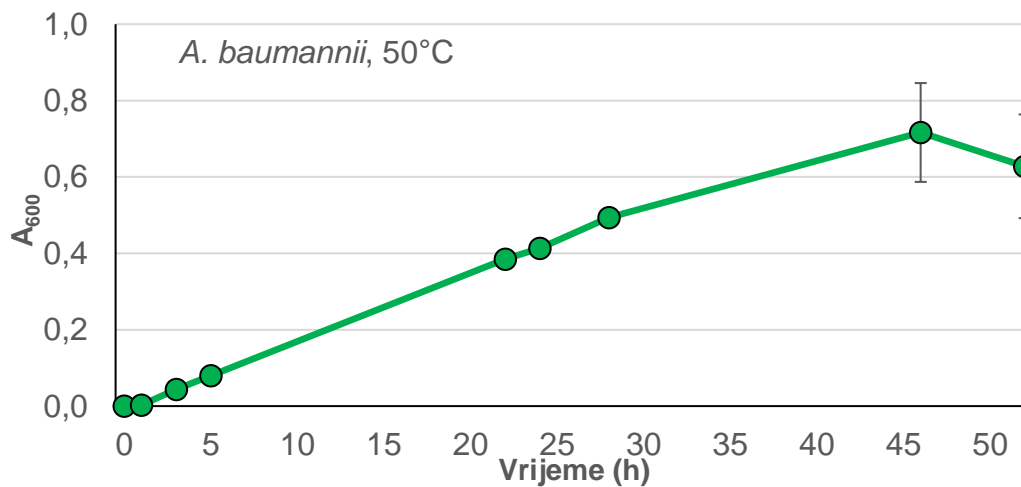
Inkubacija bakterije *A. baumannii* pri 44 °C prikazuje blago, ali ujednačeno umnažanje broja stanica (Slika 18). Umnažanje stanica i izmjena faze u eksponencijalnu je započela već pri 1 h mjerenja te traje do posljednjeg, 52 h mjerenja u kojem je opažen najveći zabilježen broj stanica.



**Slika 18.** Krivulja rasta bakterije *A. baumannii* dobivena spektrofotometrijskim mjerenjem absorbancije na 600 nm ( $A_{600}$ ). Graf prikazuje srednju vrijednost i standardnu devijaciju umnažanja bakterijskih stanica pri temperaturi od 44 °C tijekom 52 h.

## Krivulja rasta pri 50 °C

S obzirom na izrazito visoku temperaturu, bakterijske stanice *A. baumannii* su se dobro umnažale kroz period od 46 h u kojem je izmjerena najveća koncentracija bakterijskih stanica, a nakon čega je uslijedila faza odumiranja (Slika 19).

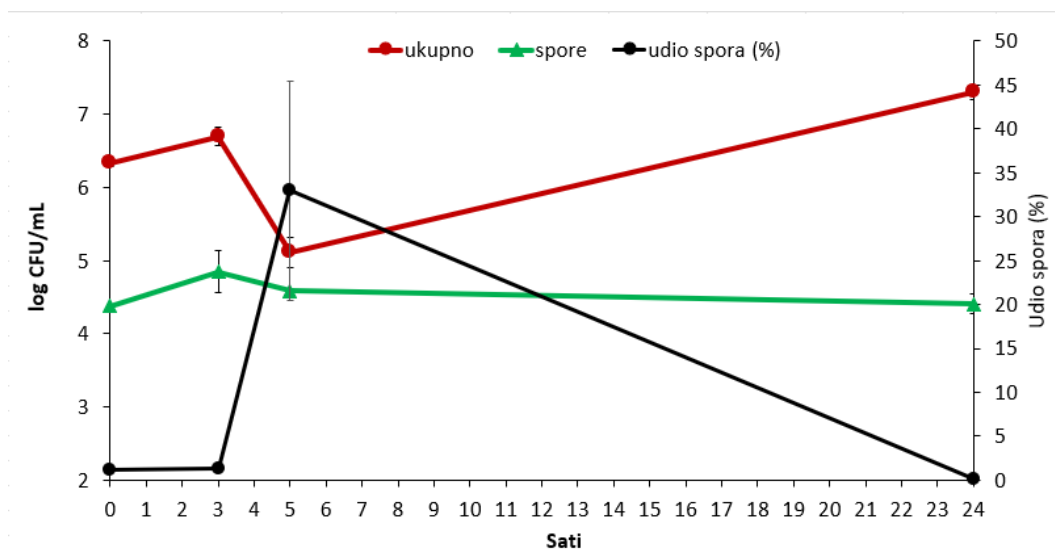


**Slika 19.** Krivulja rasta bakterije *A. baumannii* dobivena spektrofotometrijskim mjerenjem absorbancije na 600 nm ( $A_{600}$ ). Graf prikazuje srednju vrijednost i standardnu devijaciju umnažanja bakterijskih stanica pri temperaturi od 50 °C tijekom 52 h.

## 4.2 Udio spora bakterije *B. subtilis*

Drugi dio eksperimentalnog istraživanja bio je odrediti broj vegetativnih stanica i spora stanica bakterije *B. subtilis* nakon inkubacije pri temperaturi od 50 °C. Mjerenja sam izvršila nakon 0, 3, 5 i 24 h inkubacije.

Protokom vremena inkubacije pri nepovoljnoj temperaturi od 50 °C došlo je do povećanja udjela spora u ukupnom broju stanica. U 5 h mjerenja ustanovljen je nagli rast udjela spora, nakon čega opada do 24 h praćenja (Slika 20). Postotak spora u ukupnoj populaciji iznosio je 0,1-33%, ovisno o vremenu izlaganja visokoj temperaturi. Na grafičkom prikazu se vidi da je broj spora kroz cijelo vrijeme mjerenja bio relativno konstantan. Broj ukupnih stanica nakon 5 h inkubacije je bio u padu, što sugerira da je temperatura najviše oštetila vegetativne stanice upravo nakon 5 h izlaganja.



**Slika 20.** Broj vegetativnih stanica i bakterijskih spora, te udio spora u ukupnoj populaciji bakterije *B. subtilis* uzgajanoj na 50 °C. Prikazane su srednje vrijednosti i standardna devijacija mjerenja. Graf je napravljen na temelju 33 bakterijska razmaza.

## 5. RASPRAVA

### 5.1 Preživljavanje i formiranje spora bakterije *Bacillus subtilis* pri različitim temperaturama

Prethodna istraživanja su pokazala da je optimalna temperatura umnažanja bakterije *B. subtilis* u rasponu od 30-37 °C (Korsten i Cook 1996). Tu činjenicu potvrđuje i ovo istraživanje s obzirom na to da je bakterija *B. subtilis* pokazala najveću upravo pri temperaturi inkubacije od 35 °C.

Većina Zemljine biosfere je hladna i veliki broj bakterija je trebao prilagoditi način funkcioniranja, genetski aparat kao i cjelokupnu fiziologiju za život u takvim uvjetima. S obzirom na to da bakteriju *B. subtilis* svrstavamo u mezofilne bakterije koje se mogu umnožavati samo pri umjerenim temperaturama, umnažanje pri 4 °C nije bilo očekivano. Najniža temperatura koja bakteriji omogućava uspješno umnažanje je pri 18 °C (Korsten i Cook 1996). Jedna od prilagodbi bakterije *B. subtilis* na niske temperature je nakupljane kompatibilnih osmolita poput glicin betaina. To su organski spojevi koji se nakupljaju u stanicama, ali ne ometaju funkciju proteina i drugih staničnih aktivnosti. Bakterije ih mogu sintetizirati de novo ili nakupiti osmotski reguliranim unosom. U dosadašnjim istraživanjima, dodatkom glicin betaina u bakterijske kulture koje su uzgajane pri temperaturi od 15 °C se udvostručila kroz period mjerenja. Također, pri temperaturi inkubacije od 13 °C i OD<sub>578</sub> koncentracija bakterija je iznosila 0.5, no dodatkom 1 mM glicin betaina pri OD<sub>578</sub> i period mjerenja od 32 h iznosila je 5 (Hoffmann i Bremer 2011).

Optimalna temperatura inkubacije za dugoročno umnažanje i čuvanje bakterije *B. subtilis* je 22 °C (Korsten i Cook 1996). To smo potvrdili i ovim pokusom s obzirom na to da jedino pri toj temperaturi nema odumiranja stanica u grafičkom prikazu. Istraživanje je temeljeno kroz 52 h mjerenja.

Prepoznatljivo svojstvo bakterijskih spora je njihova otpornost na visoke temperature vlažnih okruženja (eng. wet heat). Setlow (2006) je dokazao da su spora stanice otpornije na otprilike 35 °C više temperature od vegetativnih stanica istog bakterijskog soja. To se objašnjava izrazito niskim sadržajem vode od 25-55% u stanici koja je u obliku spore. Činjenica je

potvrđena i ovim istraživanjem s obzirom na to da su spore uspješno opstale na temperaturi od 50 °C/24 h, a vegetativne su odumirale. Također, srodna istraživanja su potvrdila da više temperature inkubacije dovode do proizvodnje više spora stanica (Melly i sur. 2002).

## 5.2 Preživljavanje bakterije *A. baumannii* pri različitim temperaturama

Unatoč velikom porastu učestalosti infekcija uzrokovanih patogenom bakterijom *A. baumannii*, još uvijek postoji nedostatak svijesti o važnosti kontrole ovih mikroorganizama. U ovom istraživanju proučavali smo preživljavanje *A. baumannii* pri različitim temperaturama kako bi lakše mogli predvidjeti njeno ponašanje i opstanak u različitim bolničkim i okolišnim uvjetima.

Proučavanjem podataka ustanovljena je optimalna temperatura za najveći bakterije *A. baumannii* od 37 °C (Antunes i sur. 2011), što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja s obzirom na to da je bakterija imala najveću stopu pri temperaturi od 35 °C. U srodnom istraživanju (Antunes i sur. 2011) je stacionarna faza nastupila nakon 10-12 h inkubacije što se ipak razlikuje od podataka dobivenih u ovom pokusu. Naime, stacionarna faza bakterije *A. baumannii* pri temperaturi inkubacije od 35 °C nastupila je oko 46h mjerenja. Međutim, ovo istraživanje je pokazalo da je optimalna temperatura za uspješno i dugotrajno preživljavanje ove bakterije upravo temperatura inkubacije od 22 °C jer u nijednom trenutku mjerenja u trajanju od 52 h nije primijećeno odumiranje stanica.

Premda je ovo istraživanje provedeno na temperaturama od 4, 22, 35, 44 i 50 °C, Dekić i sur. (2018) su utvrdili da bakterija *A. baumannii* može preživjeti raspone temperatura -20, 4, 22, 35 i 44 °C kroz period od 5 mjeseci. Također, isto istraživanje je ustanovilo da pri koncentraciji od 10<sup>5</sup> CFU/mL bakterija može preživjeti i puno više temperature - 50, 63, 72 i 80 °C čak i više od 5 dana.

Povećanjem temperature molekule se kreću brže, enzimi ubrzavaju metabolizam i povećava se broj bakterijskih stanica (Schulte 2015). Samim time, znatno umnažanje kulture *A. baumannii* pri temperaturi od 4 °C nije bio očekivano. Rezultati ovog istraživanja su potvrdili tu hipotezu.

Iako je točno da se bakterija *A. baumannii* može izolirati s tijela pacijenata (Bayuga i sur. 2002) i bolničkih okoliša, ova vrsta nema poznato prirodno stanište izvan bolnice (Peleg i sur. 2008). S obzirom na to, činjenica da dugi period može preživjeti na sobnoj temperaturi od 22 °C nam dodatno govori o opasnosti koju predstavlja za zdravlje imunokompromitiranih pacijenata.

Bakterija *A. baumannii* spada u mezofilne bakterije koje se najbolje umnažaju pri umjerenim temperaturama. Umnažanje bakterije pri visokim temperaturama iznad 37 °C nije bio očekivan. Ovi rezultati pokazuju otpornost bakterije kao i mogućnost prilagođavanja što svakako predstavlja opasnost za zdravlje čovječanstva pogotovo u slučaju kada je izolat rezistentan na većinu poznatih antibiotika.

Različite površine se često opisuju kao izvor bolničkih infekcija. Matešić i sur. (2013) su istražili da bakterija *A. baumannii* može preživjeti 3-5 mjeseci na različitim bolničkim površinama, dok na uniformama zaposlenika čak i do 11 dana. Takva bakterija predstavlja kontinuirani izvor zaraze ako se ne provodi redovita preventivna dezinfekcija. Ivanković i sur. (2017) dokazali su da bakterija *A. baumannii* tvori biofilm kao mjeru zaštite od dezinfekcije. Sposobnost bakterije da proizvodi i mijenja različite fenotipove povećava mogućnost prilagodbe različitim uvjetima okoliša. Jedna od potvrđenih hipoteza je da su bakterije u obliku biofilma na keramici više oporne na dezinficijens od onih u vodenom mediju. To predstavlja određenu zabrinutost s obzirom na to da je keramika čest materijal u bolničkim okruženjima.

## 6. ZAKLJUČAK

S obzirom na to da bakterije *B. subtilis* i *A. baumannii* mogu preživjeti u nepovoljnim okolišnim uvjetima ovim radom ispitana je njihova prilagodljivost i mogući opstanak pri temperaturama različitim od optimalne.

Na osnovi dobivenih rezultata, zaključeno je sljedeće:

- Oba ispitana izolata su preživjela inkubaciju u rasponu temperature od 4-50 °C.
- Temperatura inkubacije od 4 °C je preniska da bi se bakterije *B. subtilis* i *A. baumannii* mogle značajno umnažati.
- Oba bakterijska izolata su se najbolje umnažala pri temperaturi od 35 °C.
- Dokazano je da bakterija *B. subtilis* ima mogućnost sporulacije pri temperaturi od 50 °C. Smanjio se broj vegetativnih stanica, dok se udio spora u populaciji povećao.
- Udio spora u ukupnoj populaciji iznosio je 0,1-33% ovisno o vremenu izlaganja visokoj temperaturi. Najveći udio spora bio je u 5 h mjerenja, što je povezano s odumiranjem vegetativnih stanica.
- *A. baumannii* je vrlo otporna bakterija te pokazuje veće umnažanje pri višim temperaturama od bakterije *B. subtilis*.



## 7. LITERATURA

Antunes, L.C.S., Imperi, F., Carattoli, A., Visca, P. (2011): Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. PloS one. 6(8): 1-10.

Antunes, L.C.S., Visca, P., Towner, K.J. (2014): *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. Pathogens and disease. 71(3): 292–301.

Ara, K., Ozaki, K., Nakamura, K., Yamane, K. Sekiguchi, J., Ogasawara, N. (2007): *Bacillus* minimum genome factory: effective utilization of microbial genome information. Biotechnology and applied biochemistry. 46(3): 169-178.

Bayuga, S., Zeana, C., Sahni, J., Della-Latta, P., El-Sadr, W., Larson, E. (2002): Prevalence and antimicrobial patterns of *Acinetobacter baumannii* on hands and nares of hospital personnel and patients: The iceberg phenomenon again. Heart & lung: the journal of critical care. 31(5): 382–390.

Bhargava, N., Sharma, P., Capalash, N. (2014): Pyocyanin stimulates quorum sensing-mediated tolerance to oxidative stress and increases persister cell populations in *Acinetobacter baumannii*. Infection and immunity. 82(8): 3417–3425.

Danilova, I., Sharipova, M. (2020): The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production. Frontiers in microbiology. 11: 1-7.

Dekić, S., Hrenović, J., Ivanković, T., van Wilpe, E. (2018). Survival of ESKAPE pathogen *Acinetobacter baumannii* in water of different temperatures and pH. Water science and technology. 78(6): 1370–1376.

Dekić, S., Hrenović, J., van Wilpe, E., Venter, C., Goić-Barisić, I. (2019): Survival of emerging pathogen *Acinetobacter baumannii* in water environment exposed to different oxygen conditions. Water science and technology: a journal of the international association on water pollution research. 80(8): 1581–1590.

Duraković S. i Redžepović S. (2002): Uvod u opću mikrobiologiju. Kugler, Zagreb.

Errington, J. (2003): Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature reviews microbiology*. 1(2): 117–126.

Espinal, P., Martí, S., Vila, J. (2012): Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of hospital infection*. 80(1): 56–60.

Gallego, L. (2016): *Acinetobacter Baumannii*: Factors involved in its high adaptability to adverse environmental conditions. *Journal of microbiology & experimentation*. 3(2): 1-5.

Higgins, P.G., Hrenovic, J., Seifert, H., Dekic, S. (2018): Characterization of *Acinetobacter baumannii* from water and sludge line of secondary wastewater treatment plant. *Water research*. 140: 261–267.

Hoffmann, T., Bremer, E. (2011): Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. *Journal of bacteriology*. 193(7): 1552–1562.

Hrenović J., Durn G., Goić-Barišić I., Kovačić A. (2014). Occurrence of an environmental *Acinetobacter baumannii* strain similar to a clinical isolate in paleosol from Croatia. *Applied and environmental microbiology*. 80: 2860–2866.

Ivanković, T., Goić-Barišić, I., Hrenović, J. (2017): Reduced susceptibility to disinfectants of *Acinetobacter baumannii* biofilms on glass and ceramic. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 68(2): 99-107.

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., Orlović, M., Plečko, V., Presečki, A., Presečki, V., Punda-Polić, V., Rukavina, T., Sviben, M., Tabain, I., Tambić Andrašević, A., Tićac, B., Vilibić Čavlek, T., Vraneš, J., Vučković, D., Žmak, L. (2019): *Medicinska mikrobiologija*, drugo izmjenjeno i obnovljeno izdanje. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Udžbenici Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. 97: 1–79.

Korsten, L., Cook, N. (1996): Optimizing culturing conditions for *Bacillus subtilis*. *Journal of biological control*. 19: 54–58.

Kovács, Á.T. (2019): *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology*. 27(8): 724–725.

Larsson, D.G.J., Flach, C.F. (2022): Antibiotic resistance in the environment. *Nature reviews. Microbiology*. 20(5): 257-269.

Maier, R.M., Pepper, I.L. (2015): Bacterial growth. *Environmental microbiology: Third edition*. 3: 37-56.

Matešić, M., Vučković, D., Gobin, I. (2013): Preživljavanje bakterija na suhim površinama u bolničkoj sredini. *Medicina fluminensis*. 50(1): 39-46

Melly, E., Genest, P.C., Gilmore, M.E., Little, S., Popham, D.L., Driks, A., Setlow, P. (2002): Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *Journal of applied microbiology*. 92(6): 1105–1115.

Obhodaš, D., Signaš, J., Valković, V., Kollar, R., Hrenović, J., Nacrossed D Sign, K., Vinković, A., Orlić, A. (2021): The growth and sporulation of *Bacillus subtilis* in nanotesla magnetic fields. *Astrobiology*. 21(3): 323–331.

Peleg, A. Y., Seifert, H., Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 21(3): 538–582. Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Decker, B.K., Rather, P.N. and Bonomo, R.A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 51(10): 3471–3484.

Piggot, P.J., Hilbert, D.W. (2004): Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology*. 7(6): 579–586.

Schulte, P.M. (2015): The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. 218: 1856-1866.

Setlow, P. (2003): Spore germination. *Current opinion in microbiology*. 6(6): 550–556.

Setlow, P. (2006): Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of applied microbiology*. 101(3): 514–525.

Stilinović B., Hrenović J. (2009): *Praktikum iz bakteriologije*. Kugler, Zagreb. 199.

Upmanyu, K., Haq, Q.M.R., Singh, R. (2022): Factors mediating *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. Opportunities for developing therapeutics. Current research in microbial sciences. 3: 1-14.

Willey, J., Sherwood, L., Woolverton, C. (2013): Prescott's Microbiology. Mcgraw Hill higher education, London. 1104.

Zeidler, S., Hubloher, J., Schabacker, K., Lamosa, P., Santos, H. i Müller, V. (2017): Trehalose, a temperature- and salt-induced solute with implications in pathobiology of *Acinetobacter baumannii*. Environmental microbiology. 19(12): 5088–5099.

## **8. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 30.05.1996 godine u Splitu. Nakon završene Osnovne škole Kman-Kocunar, upisujem II. gimnaziju u Splitu. Godine 2016. nastavljam školovanje na preddiplomskom studiju Biologije na Fakultetu prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru. Nakon završetka preddiplomskog studija, 2020. godine upisujem diplomski sveučilišni program Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovno - matematičkom fakultetu u Zagrebu. Tijekom studiranja sudjelovala sam u Festivalu znanosti kao i u Danima biologije koji za svrhu imaju promicanje znanosti među mlađom populacijom i studentima sličnih usmjerenja.