

# Razvoj dvovrsnog bakterijskog biofilma na granici voda-zrak

---

**Oršolić, Daniela**

**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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:207770>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-09**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Daniela Oršolić

**Razvoj dvovrsnog bakterijskog biofilma na granici voda – zrak**

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

*Ovim putem se zahvaljujem prvenstveno svom mentoru doc. dr. sc. Tomislavu Ivankoviću koji mi je omogućio da napravim rad pod njegovim vodstvom na zavodu za mikrobiologiju.*

*Također, zahvaljujem se na ukazanom povjerenju, pomoći, korisnim savjetima i susretljivosti tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem se i svojoj obitelji koja mi je bila najveća moralna i financijska podrška tijekom cijelog studija. Posebno se zahvaljujem sestri Ireni koja me najviše uputila u nepoznati svijet studiranja i svojoj mami na korisnim savjetima i nesebičnoj potpori.*

*Oni bez kojih možda danas ne bi bila tu gdje jesam su moji prijatelji i kolege. Da nije bilo njih, nedostajalo bi svakodnevne motivacije, ali i zabave. Posebno hvala mojim dragim prijateljima Katarini, Luciji, Hrvoju i Ani!*

*Zahvaljujem se i svom dečku Nenadu koji je od prve do zadnje godine moga studiranja bio velika potpora.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Razvoj dvovrsnog bakterijskog biofilma na granici voda – zrak**

Daniela Oršolić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Bakterijski biofilm je kompleks građen od jedne ili češće više vrsta bakterija koje su ugrađene u matriks izvanstanične polimerne tvari (eng. extracellular polymeric substance EPS) kojeg same proizvode. Takvi bakterijski sustavi rade velike štete kako na medicinskoj opremi, tako i u ljudskim organizmima. Razumijevanje mehanizma formacije viševrsnog biofilma može znatno olakšati razvoj metoda za borbu protiv bakterijskih biofilmova u bolnicama, okolišu ili industrijama. Za istraživanje su korištene bakterije *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Cilj istraživanja bio je napraviti model biofilma kojeg tvore te vrste bakterija, vizualizirati ga, usporediti rast bakterija na granici voda – zrak kod uzoraka u kojima se bakterijama mijenja medij s uzorcima u kojima se medij ne mijenja, te usporediti količine proizvedenog EPS-a. Obzirom da se pratila biomasa bakterija na pojedinim područjima na predmetnom stakalcu (vodeni medij, interfaza i zrak), te da se pratila količina nastalog EPS-a, bakterije su se bojile metodama po Gramu i Alcian blue radi bolje vidljivosti EPS-a i usporedbe uzoraka u navedena dva slučaja. Zaključeno je da se većina biofilma nalazi na interfazi, te da mijenjanje medija više pogoduje bakteriji *P. aeruginosa*, a ne mijenjanje medija više pogoduje bakteriji *S. aureus*. Bakterija *S. aureus* u oba slučaja nakon nekog vremena nadvlada bakteriju *P. aeruginosa*.

(44 stranice, 22 slike, 47 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, interfaza, ekstracelularni matriks

Voditelj: Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

Ocjenitelji:

Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

Rad prihvaćen: 16.04.2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **Development of two-species bacterial biofilm at air – liquid interface**

Daniela Oršolić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Bacterial biofilm is a complex of one or more species of bacteria that are embedded within an extracellular matrix composed of extracellular polymeric substances (EPS) produced by the cells. Such bacterial systems are doing significant damage both on medical equipment and in human organisms. Understanding the mechanism of multiple-species biofilm formation can ease the development of methods for bacterial biofilm prevention in hospitals, environment or industry. In this research, bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were used. The goal was to determine a model of biofilm created by these bacteria, visualize it, compare the growth of bacteria on air–liquid interface in systems in which the medium was continuously being replenished and when it is not, and compare the amount of produced EPS. Given that we monitored bacterial biomass in different areas (liquid medium, interface and air), and the amount of produced EPS, bacteria were Gram-stained, but also stained with Alcian blue to achieve better visibility of EPS and to compare samples in two aforementioned cases. It was concluded that biofilm is mostly located on the interface and that changing the medium was more beneficial to the growth of *P. aeruginosa*, while not changing the medium was more beneficial to the growth of *S. aureus*. Eventually, *S. aureus* outgrew *P. aeruginosa* in both cases.

(44 pages, 22 figures, 47 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, interface, extracellular matrix

Supervisor: Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.

Reviewers:

Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.

Thesis accepted: 16.04.2018.

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Biofilm .....	1
1.2. Dvovrsni biofilm.....	4
1.3. Biofilm na granici voda-zrak .....	6
1.4. Vrsta <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
1.5. Vrsta <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
1.6. Cilj istraživanja .....	9
<b>2. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>10</b>
2.1. Priprema medija .....	10
2.2. Bakterije.....	10
2.3. Priprema bakterijske suspenzije.....	11
2.4. Uzgoj biofilma na predmetnom stakalcu .....	12
2.4.1. Uzgoj bakterija u eksperimentu s mijenjanjem medija i u eksperimentu bez mijenjanja medija.....	13
2.4.2. Bojenje po Gramu .....	16
2.4.3. Bojenje metodom „Alcian blue“ .....	16
<b>3. REZULTATI.....</b>	<b>18</b>
3.1. Praćenje razvoja biofilma u uzorcima u kojima nije mijenjan medij .....	18
3.1.1. Biofilm nakon jednog dana inkubacije .....	18
3.1.2. Biofilm nakon tri dana inkubacije.....	19
3.1.3. Biofilm nakon sedam dana inkubacije .....	20
3.1.4. Biofilm nakon jedanaest dana inkubacije .....	21
3.1.5. Biofilm nakon osamnaest dana inkubacije .....	23
3.2. Praćenje razvoja biofilma u uzorcima u kojima je mijenjan medij .....	24

3.2.1. Biofilm nakon jednog dana inkubacije .....	24
3.2.2. Biofilm nakon tri dana inkubacije.....	25
3.2.3. Biofilm nakon sedam dana inkubacije .....	26
3.2.4. Biofilm nakon jedanaest dana inkubacije .....	27
3.2.5. Biofilm nakon osamnaest dana inkubacije .....	29
3.2.6. Usporedba uzoraka s mijenjanjem medija s uzorcima bez mijenjanja medija (7., 11. i 18. dan) .....	30
3.3. Predloženi model razvoja dvovrsnog bakterijskog biofilma na granici voda-zrak.....	33
<b>4. RASPRAVA.....</b>	<b>35</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>39</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>40</b>
<b>7. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>44</b>



# 1. UVOD

## 1.1. Biofilm

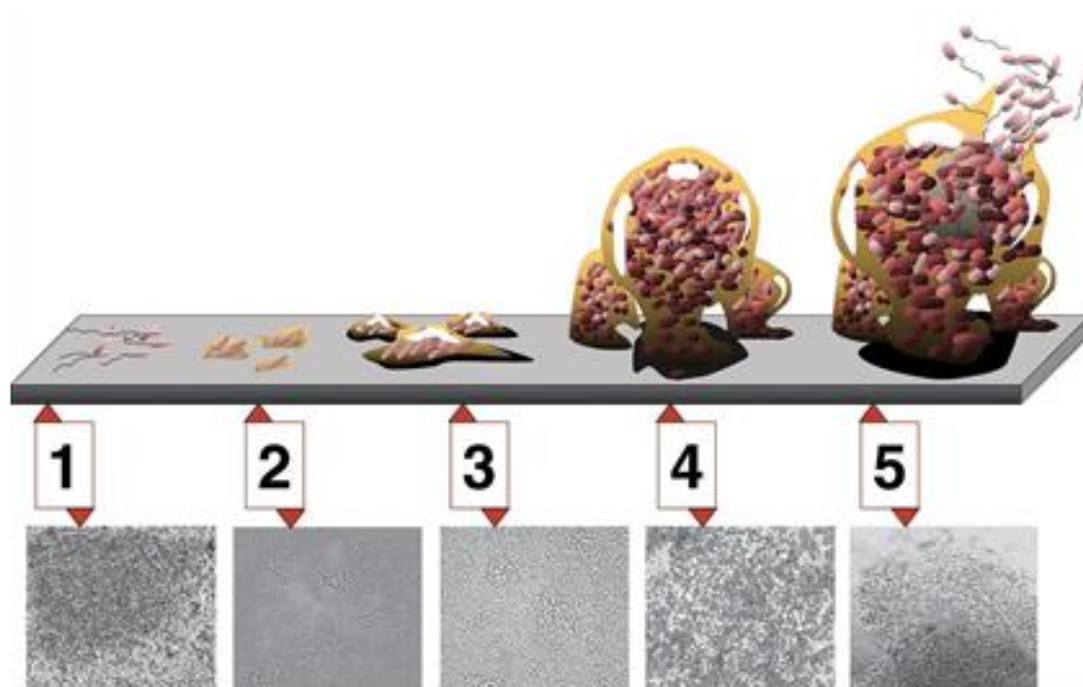
U prirodi bakterije mogu egzistirati na dva načina. Mogu egzistirati kao planktonski organizmi koji obitavaju u tekućem mediju u obliku individualnih stanica koje slobodno plivaju ili kao sesilna zajednica - biofilm (Vraneš i Leskovar 2009). Biofilm podrazumijeva bilo koju skupinu mikroorganizama u kojoj se stanice drže međusobno i pristanjaju na neku površinu. Bakterijski biofilm je kompleks građen od jedne ili češće više vrsta bakterija koje su ugrađene u matriks izvanstanične polimerne tvari (eng. extracellular polymeric substance EPS) kojeg same proizvode. Takav matriks je uglavnom građen od izvanstanične DNA, proteina i polisaharida. Ekstracelularni matriks uspostavlja funkcionalnu i strukturnu cjelovitost biofilma i smatra se temeljnom komponentom koja određuje fizikalno - kemijska svojstva biofilma. Matriks ima više uloga u biofilmu. On predstavlja vanjski sustav u kojem se nalaze ekstracelularni enzimi koje drži u neposrednoj blizini stanica. Na taj način omogućuje i prehranu, ali i komunikaciju među stanicama. Ekstracelularni matriks štiti stanice od isušivanja i djeluje kao zaštita od nepovoljnih vanjskih utjecaja kao što su razni kemijski, biološki ili mehanički utjecaji. Štiti bakterije od antibiotskih tvari, UV zračenja i predatora kao što su praživotinje. U prirodi je bakterijski biofilm dominantan fenotip nad slobodnom planktonskom formom bakterija (Yang i sur. 2011). Schlafer i Meyer (2016) su opisali biofilm kao mikrobiološki grad u kojem je matriks njegova infrastruktura.

Kako su biofilmovi bakterija uzročnici teških infekcija kod ljudi, proučavanje planktonskih fenotipova bakterija postaje manje zanimljivo i važno od proučavanja biofilma koje tvore te iste bakterije. Proučavanje biofilma kojeg tvore isti sojevi bakterija ili pak različite vrste bakterija, ključ je u otkrivanju načina funkcioniranja takvih fenotipova, pa tako i načinu liječenja infekcija koje uzrokuju. Biofilm kao takav predstavlja kompleksan sustav kojeg tvore organizmi koji međusobno komuniciraju i imaju visok stupanj stanične specijalizacije. Ovakav oblik pojavljivanja bakterija u ljudskom organizmu, ali i u prirodi, industriji ili biotehnologiji, mijenja percepciju položaja bakterija u hijerarhiji živih bića s obzirom da su do sada bakterije uglavnom proučavane kao planktonski organizmi. Zajednice koje tvore u obliku biofilma su kompleksni

sustavi koji funkcioniraju na puno višoj razini i njihovo proučavanje može dovesti do velikih otkrića u medicini ili industriji (Stoodley i sur. 2002).

Nastanak biofilma odvija se u pet razvojnih stadija, kao što se može vidjeti na Slici 1 i taj proces naziva se maturacija biofilma. Prvi stadij u razvoju biofilma je reverzibilno povezivanje planktonske stanice sa supstratom (1). Taj stadij se naziva reverzibilna adsorpcija zato što se neke stanice vežu za površinu samo na kratko vrijeme i nakon toga se odvajaju. U drugoj fazi dolazi do ireverzibilnog vezanja u kojoj stanice gube svojstvo pokretljivosti i čvrsto se vežu za podlogu (2). Treći stadij je maturacija I u kojem nastaje ekstracelularni matriks. Taj stadij se obično pojavljuje nakon tri dana, ovisno o vrsti bakterija. Također, nastaje više bakterijskih slojeva koji postaju sve deblji (3). U slijedećoj fazi, maturaciji II, slojevi bakterija postaju još deblji i dosežu svoju maksimalnu veličinu. Prilikom usporedbe planktonskih stanica i stanica iz ove faze, dokazano je da postoje velike razlike u strukturi proteina što ukazuje na bitno različita svojstva planktonskih stanica i onih u biofilmu (4). Zadnja faza u formiranju biofilma bakterija je disperzija (5). U zadnjem stadiju stanice se mogu odvojiti iz biofilma pasivnim načinom (struganjem, erozijom, promjenama u dostupnosti nutrijenata) ili mehanizmima za koje su odgovorne stanice biofilma (Wijman i sur. 2007). U tom procesu se stvaraju vodeni kanalići (Marić i Vraneš 2007) te mikrokolonije mijenjaju svoj oblik jer se odvajaju stanice iz središta mikrokolonije u potrazi za novim i boljim izvorom hrane. Pretpostavlja se da gladovanje može dovesti do odstranjivanja pomoću nepoznatog mehanizma koji omogućuje bakterijama da traže staništa bogatija hranjivim tvarima (Stoodley i sur. 2002).

Postoji više mehanizama pomoću kojih može doći do formiranja biofilma. Ipak, tri mehanizma su najpoznatija. Jedan od tih mehanizama je preraspodjela prilijepljenih stanica površinskom pokretljivošću. Drugi je pomoću binarne diobe prilijepljenih stanica, tako što se stanice kćeri koje nastaju šire prema van i prema gore i tvore nakupine stanica. Treći mehanizam je regrutacija stanica iz rasutog fluida u biofilm u razvoju. Mehanizmi ovise o više stvari, kao što su vrste organizama koje tvore biofilm, prirodi površine na kojoj nastaje biofilm, ali i o fizičkim i kemijskim svojstvima okoline.



**Slika 1.** Model razvoja bakterijskog biofilma na krutoj podlozi koji uključuje pet stadija: 1) reverzibilno povezivanje planktonske stanice sa supstratom, 2) ireverzibilno vezanje, 3) maturacija I, 4) maturacija II, 5) disperzija. Shematski prikaz stadija razvoja bakterijskog biofilma na krutoj podlozi povezan je s mikroskopskim prikazima stadija razvoja biofilma bakterije *P. aeruginosa*. Svi mikroskopski prikazi su istog povećanja (preuzeto iz: Monroe 2007).

Bakterije u biofilmovima imaju i određene načine komunikacije jer je to ključ za održavanje višestanične zajednice. Način komunikacije ovisi i o samom tipu bakterija koje tvore biofilm. Međustaničnu komunikaciju provode ekstracelularne signalne molekule, autoinduktori. Nakupljanje signalnih molekula omogućuje svakoj stanici procjenu stanične gustoće, a ta pojava se naziva detekcija kvoruma (engl. *quorum sensing*) (Hentzer i Givskov 2013). Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije se između ostalog razlikuju i po načinu komunikacije među stanicama. Signalne molekule kod gram-negativnih bakterija su neesencijalne aminokiseline pod nazivom N-acil-homoserinski laktoni (AHL), a kod gram-pozitivnih bakterija su to oligopeptidi (Bassler 1999). Pronađeno je da neki biofilmovi sadrže i vodene kanale koji pomažu distribuirati hranjive tvari i signalne molekule (Hall-Stoodley i sur. 2004). Bakterije koje žive u biofilmu imaju drugačija svojstva od samostalnih „plutajućih“ bakterija iste vrste. Budući da su u biofilmu bakterije okružene izvanstaničnom polimernom tvari, ona im omogućuje da međusobno surađuju i djeluju na različite načine (Stewart i Costerton 2001). Biofilmovi mogu imati pozitivan utjecaj u biotehnologiji, ali češće imaju negativne utjecaje kao što je šteta koju stvaraju u industriji ili u medicini (Dankert i sur. 1986). Bakterije tvore biofilme na različitim površinama kao što su živa

tkiva, medicinska oprema ili implantati. Imaju veliku ulogu u ljudskom zdravlju s obzirom da uzrokuju česte kronične infekcije kod ljudi. Kako je biofilm osim bakterijskih stanica građen i od ekstracelularnog matriksa koji ga štiti, infekcije uzrokovane biofilmom bakterija se puno teže liječe. Bolje razumijevanje biofilmova i istraživanje može omogućiti njihovo brže i bolje suzbijanje što bi rezultiralo i učinkovitijim liječenjem bolesti koju uzrokuju (Donlan 2002).

## 1.2. Dvovrsni biofilm

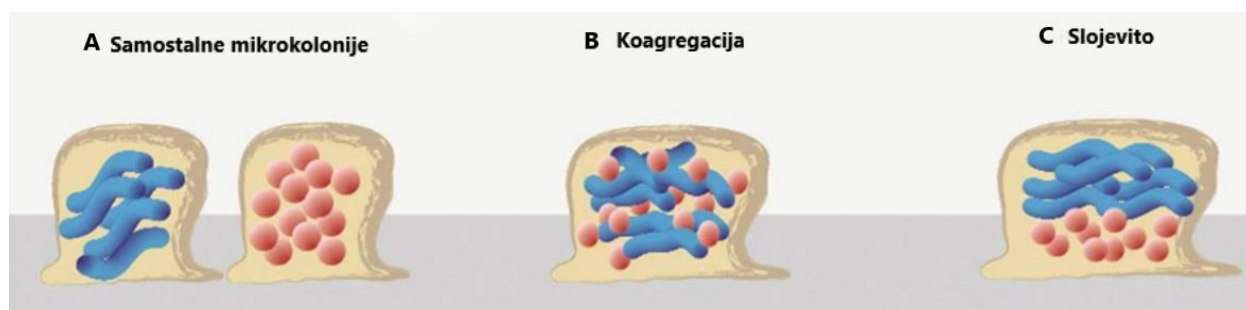
Većina biofilmova u prirodi je građena od više vrsta bakterija. Mikroorganizmi se u dvovrsnom biofilmu natječu, surađuju i komuniciraju međusobno. Razumijevanje mehanizma nastajanja dvovrsnih, odnosno viševrsnih biofilmova može uvelike pomoći u borbi protiv istih u medicini, okolišu, industriji ili poljoprivrednim područjima. U zadnja dva desetljeća biofilmovi su se počeli intenzivno proučavati, ali do sada su većinom poznati mehanizmi nastajanja jednovrsnih biofilmova. Vrste u viševrsnim biofilmovima mogu biti brojne i vrlo različite. S obzirom da je u prirodi većina biofilmova građena od više vrsta bakterija, za istraživanje je ključno kako prepoznati pojedine vrste i kako djelovati na njihove mehanizme. Bakterije u biofilmu djeluju jedna na drugu i te interakcije određuju strukturu bakterijskog biofilma. Smatra se da koagregacijske interakcije među bakterijama omogućuju razvoj viševrsnih biofilmova u različitim uvjetima u okolišu. Ranih sedamdesetih, koagregacija među bakterijama je već opisana kod zubnog plaka (Gibbons i Nygaard 1970). Dokazana je među stotinama oralnih bakterija i ključ je nastanka biofilma dentalnog plaka. Kao i kod jednovrsnih biofilmova, i u viševrsnim biofilmovima je EPS glavna poveznica među bakterijama pomoću koje bakterije surađuju i komuniciraju, ali isto tako i štete jedne drugima (Rickard i sur. 2003). Strukturalna i funkcionalna dinamika viševrsnih biofilmova uvelike ovisi o interakcijama među različitim vrstama bakterija koje čine biofilm. Takve interakcije mijenjaju fiziologiju vrste, pa tako utječu i na funkcioniranje cijele zajednice (Yang i sur. 2011).

Kao što je već opisano u poglavlju 1.1. čest način komunikacije kako u jednovrsnim, tako i u viševrsnim biofilmovima je detekcija kvoruma. Dokazano je da detekcija kvoruma igra važnu ulogu u nastajanju biofilma, ali i u funkcioniranju zajednice. Na primjer, dva patogena, bakterija *Pseudomonas aeruginosa* i bakterija *Burkholderia cepacia*, koje se ponekad mogu naći zajedno u plućima kod bolesnika oboljelih od cistične fibroze, mogu tvoriti dvovrsni biofilm. Obje bakterije

posjeduju mehanizme detekcije kvoruma pomoću AHL signalnih molekula i na taj način kontroliraju ekspresiju virulentnih faktora i formiranje biofilma (Delden i sur. 1998).

Najčešća interakcija u viševrsnim biofilmovima je kompeticija. Mikroorganizmi se natječu za hranjive tvari i pokušavaju inhibirati rast vrste koja ih ugrožava u biofilmu. Mnoge vrste otpuštaju otrovne tvari kao produkt svog metabolizma koje inhibiraju rast druge vrste i naposljetku ju ubijaju. Na primjer, dokazano je da vrsta *P. aeruginosa* ubija stanice roda *Candida* u dvovrsnom biofilmu koristeći virulentne faktore koji su dobro opisani kod ljudskih infekcija (Bandara i sur. 2010). Osim kompeticije, kooperativne interakcije su također zastupljene u viševrsnim biofilmovima i važne su za funkcioniranje biofilma kao zajednice. Mnogo kooperativnih interakcija je opisano u viševrsnim biofilmovima uključenim u biodegradacijske i bioremedijacijske procese kao što je denitrifikacija (vrste iz roda *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*) (Schramm i sur. 1996).

Zanimljiv zaključak proizlazi i iz proučavanja samih struktura viševrsnih biofilмова. Temeljem istraživanja, zaključeno je da postoje tri različita načina prostornog rasporeda bakterija u biofilmu (Slika 2). Prvi način je formacija mikrokolonija koje tvori jedna vrsta bakterija gdje svaka vrsta tvori svoju mikrokoloniju, jednu pored druge. Druga struktura koja se pojavljuje uključuje koagregaciju bakterija, gdje su vrste pomiješane, a treća forma biofilma je takva da se različite vrste bakterija nalaze u različitim slojevima biofilma jedne ispod drugih, odnosno iznad drugih (Christensen i sur. 2002).



**Slika 2.** Shematski prikazi različitih načina prostornog rasporeda bakterija u viševrsnom biofilmu na krutoj podlozi. Vrste se u biofilmu mogu organizirati na tri načina: A) samostalne mikrokolonije, B) koagregacija, C) slojevito (preuzeto i prilagođeno prema Elias i Banin 2012).

Istraživanjem viševrsnih biofilмова počinje se otkrivati kompleksnost interakcija među mikroorganizmima i njihov utjecaj na okoliš. Jasno je da život mikroorganizama na zemlji u najvećoj mjeri djeluje upravo u formi viševrsnih biofilмова. Mnogo godina znanstvenici su bili

fokusirani na samostalne bakterije i bakterije u jednovrsnim biofilmovima. U zadnje vrijeme se fokus stavlja na viševrsne biofilme i njihovu uključenost u razne infekcije kako bi na taj način, poznavanjem mehanizma nastanka biofilma mogli liječiti takve infekcije.

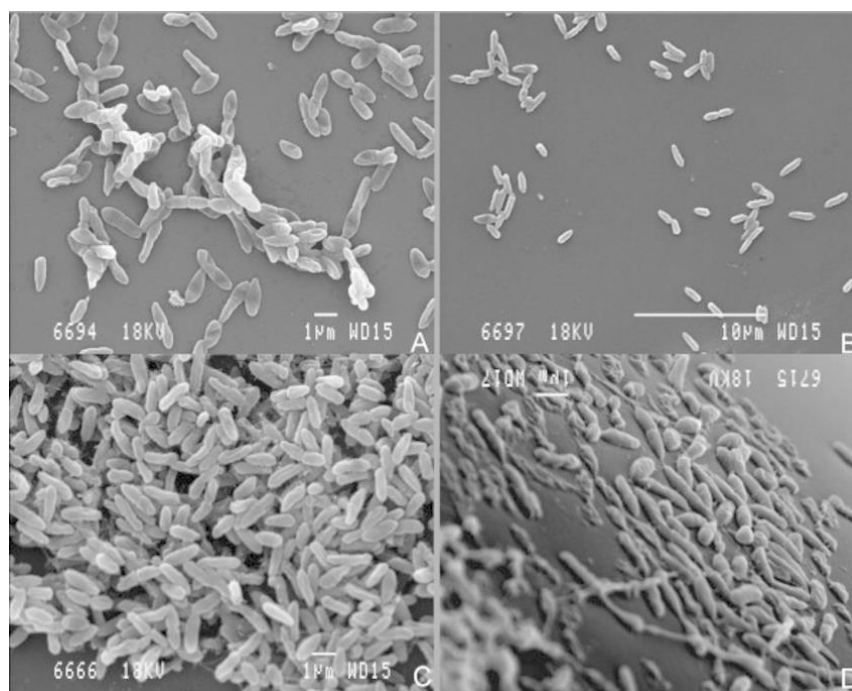
### 1.3. Biofilm na granici voda-zrak

Istraživanja su do danas uglavnom usmjerena na biofilme koji nastaju na čvrstim površinama, na interfazi između krutine i tekućine ili pak krutine i plinovite faze. Kolonizacija površine koja se nalazi na granici tekuće i plinovite faze još uvijek nije dovoljno istražena, a vrlo je bitna i često se pojavljuje u prirodnom okolišu. Takvi sustavi mogu pogodovati rastu fakultativnih anaeroba ili obvezatnih aeroba. Razvoj biofilma na granici voda-zrak omogućuje bakterijama pristup dvjema fazama: tekućoj u kojoj se nalaze hranjive tvari i plinovitoj u kojoj se nalazi kisik. U ovom istraživanju bit će opisan model razvoja dvovrsnog biofilma na granici voda-zrak.

### 1.4. Vrsta *Pseudomonas aeruginosa*

Vrsta *Pseudomonas aeruginosa* je Gram-negativna bakterija, štapićastog oblika (Slika 3). Fakultativni je anaerob, što znači da može rasti u područjima potpunog ili djelomičnog nedostatka kisika. Kada su kisik, nitrati i nitriti odsutni, može provoditi fermentaciju arginina i piruvata fosforilacijom na razini supstrata (Chobert i Jahn 2010). Bakterija *P. aeruginosa* posjeduje jedan polarni bič i nekoliko kraćih fimbrija također lokaliziranih na polovima bakterije. Ti nastavci funkcioniraju kao adhezini te omogućuju pokretanje bakterije. Flagela i pili također mogu inicirati upalni odgovor. Pili su vrlo vjerojatno najvažniji adhezini koje vrsta *P. aeruginosa* posjeduje te su također važni za pokretljivost i formiranje biofilma. Pili dovode do agregacije (udruživanja) bakterija i formiranja mikrokolonija na ciljnim tkivima te koncentriranja bakterija na jednom mjestu, čime se štite od imunološkog sustava domaćina i djelovanja antibiotika (Craig i sur. 2004). Bakterija *P. aeruginosa* može uzrokovati bolesti kod biljaka, životinja, pa tako i ljudi. Poznata je kao bakterija koja je otporna na većinu lijekova, koja je razvila napredne mehanizme za otpornost na antibiotike i može uzrokovati teške bolesti. Pojavljuje se u plućima, urinarnom traktu i bubrezima, a može uzrokovati i infekcije koje su posljedice raznih bolesti kao što je cistična fibroza (Balcht i Smith 1994). Često uzrokuje infekcije nakon jačih opekline i nastanjuje medicinsku opremu kao što su kateteri ili razni implantati. Vrsta *P. aeruginosa* se najčešće pojavljuje u

biofilmovima i u tim slučajevima se još teže liječi. Biofilmovi bakterije *P. aeruginosa* uzrokuju oportunističke infekcije koje su veliki medicinski problem u društvu, pogotovo za osobe slabijeg imuniteta i starije osobe. Takvi slučajevi se često ne mogu učinkovito liječiti klasičnom antibiotskom terapijom. S obzirom da uzrokuje teške infekcije, dugi niz godina se smatra modelom bakterije koja je rezistentna na antibiotike. Važno je zato istražiti i proučiti mehanizme koji uzrokuju prebacivanje te bakterije iz planktonskog fenotipa na onaj u biofilmu. Kako organizmi u zajednici moraju surađivati kako bi mogli funkcionirati, oni imaju posebne oblike komunikacije. Bakterija *P. aeruginosa* je bakterija koja može uspostaviti određen način komunikacije s drugim stanicama iste vrste pomoću detekcije kvoruma (engl. *quorum sensing*). Putem detekcije kvoruma, odnosno komunikacije među stanicama, čiji je mehanizam ukratko objašnjen u poglavlju 1.1. , može doći do regulacije ekspresije gena. Ta komunikacija se odvija pomoću malih signalnih molekula čije nakupljanje u ekstracelularnom okolišu signalizira stanicama da mijenjaju ekspresiju gena i svoje ponašanje (Allesen-Holm 2006). Upravo se dokazivanjem tih malih signalnih molekula ustanovilo da bakterija *P. aeruginosa* stvara biofilme u plućima pacijenata sa cističnom fibrozom (Winstanley i Fothergill 2009).

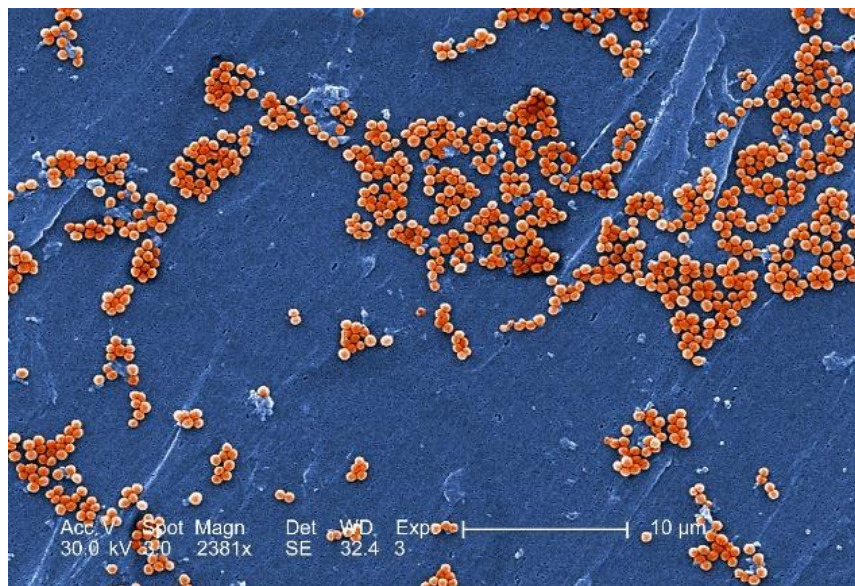


**Slika 3.** Biofilm bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na staklenoj podlozi sniman skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). Prikazi B i D odnose se na slabo pričvršćene bakterije koje tvore biofilm u jednom sloju, a A i C čvrsto pričvršćene bakterije koje tvore slojeviti biofilm. Povećanje A: 6694x; povećanje B: 6697x; povećanje C: 6666x; povećanje D: 6715x (preuzeto od Deligianni i sur. 2010).

### 1.5. Vrsta *Staphylococcus aureus*

Bakterija *Staphylococcus aureus* (Slika 4), poznatija kao „zlatni stafilokok“ je Gram-pozitivna bakterija, okruglog oblika. Fakultativni je anaerob jer je prilagođena na uvijete rasta bez kisika (Masalha i sur. 2001). Vrsta *S. aureus* se povijesno smatra nepokretnim organizmom. Nedavno se pokazalo da se bakterija *S. aureus* može pasivno kretati po površini agara u procesu koji se naziva širenje. Otkriveno je da se bakterija *S. aureus* može širiti po površini medija u strukturama koje se nazivaju „kometi“. Takvi kometi se pružaju prema van i prethode stvaranju dendrita. Kretanje pomoću kometa ne dijeli mnoge sličnosti s poznatim aktivnim kretanjem bakterija. Zaključeno je da je vrsta *S. aureus* pokretna samo u određenim uvjetima (Pollit i sur. 2015). Bakterija *S. aureus* je član normalne flore ljudskog tijela i može se pronaći na koži, u nosu i dišnom sustavu. Iako nije uvijek patogena bakterija, može izazvati različite infekcije već spomenutih sustava. Može uzrokovati infekcije kože, bolesti dišnog sustava, sinusitis. Pojavili su se i sojevi bakterije *S. aureus* koji su otporni na antibiotike. Primjer takve bakterije je bakterija *S. aureus* otporna na meticilin, poznatija kao MRSA. Uzrok je velikih problema u kliničkoj medicini (Tong i sur. 2015). Vrsta *S. aureus* je odgovorna i za trovanje hranom te može generirati enzime koji su odgovorni za trovanje u ljudskom tijelu. Ova bakterija se često može pronaći i u formi biofilma, te je nađena u biofilmovima na medicinskim implantatima i na taj način uzrokuje teške infekcije prilikom neodgovorne uporabe ne-sterilnih implantata. U biofilmu se obično nalazi s još jednim patogenom, a najčešće je to gljivica *Candida albicans*. Zajedno s njom formira dvovrsne biofilme. Pretpostavlja se da vrsta *C. albicans* pomaže bakteriji *S. aureus* penetrirati u ljudsko tkivo (Schlecht i sur. 2015). S viševrsnim biofilmovima je povezana i veća otpornost na antibiotike, a s time i veća smrtnost kod ljudi (Zago i sur. 2015).





**Slika 4.** Bakterije *Staphylococcus aureus* snimane na krutoj podlozi elektronskim mikroskopom pod povećanjem od 2381x (preuzeto sa <http://www.sci-news.com/medicine/new-way-attack-staphylococcus-aureus-04109.html>).

## 1.6. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada bio je istražiti nastajanje biofilma bakterija *P. aeruginosa* i *S. aureus* na granici voda-zrak kroz vrijeme i s obzirom na uvjete uzgoja (uz kontinuirano dodavanje svježeg hranjivog medija ili bez dodavanja istog) te predložiti model biofilma kojeg tvore ove dvije bakterije kada rastu zajedno.

Prilikom proučavanja nastajanja biofilma, fokus je stavljen na samu inferfazu (granicu voda-zrak) i na količinu EPS-a kojeg stvaraju bakterije. Kako su sojevi bakterija koji su korišteni u ovom istraživanju fakultativni anaerobi, pretpostavka je da će im pogodovati granica između vode i zraka na kojoj imaju pristup i plinovitoj fazi koja je izvor kisika ali i tekućoj fazi koja je izvor hranjivih tvari.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Priprema medija

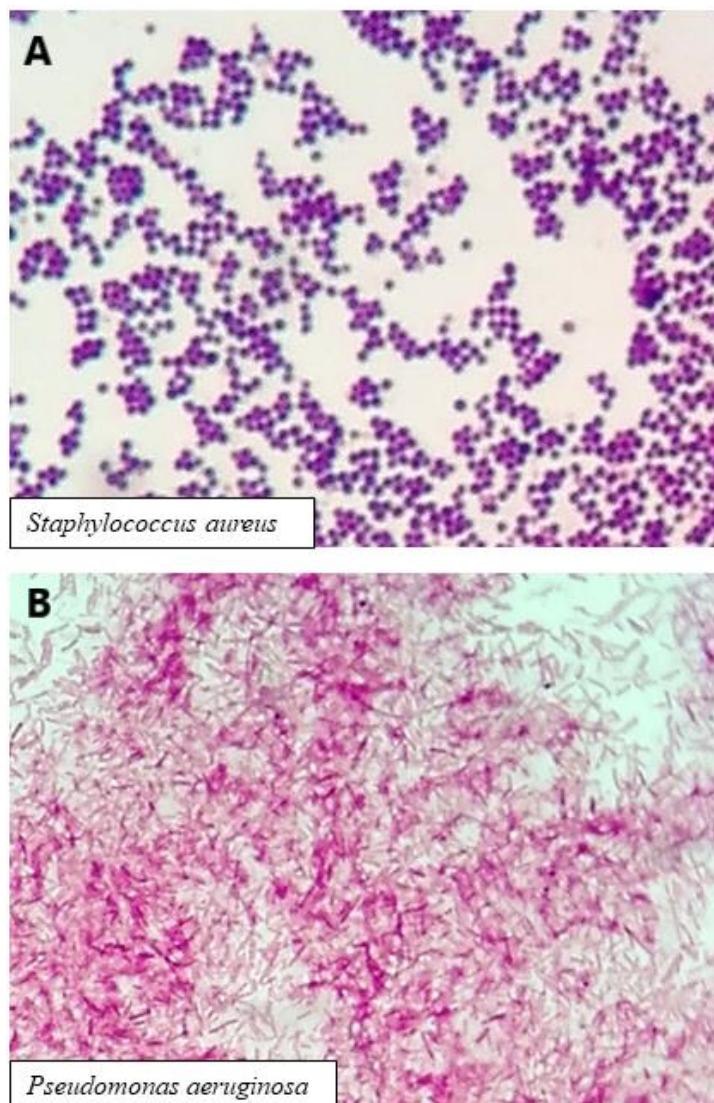
Za ovaj eksperiment korišten je tekući Luria-Bertani (LB) hranjivi medij. Sastav tekućeg medija (po 1000 mL destilirane vode): 5 g kvašćevog ekstrakta (engl. yeast extract), 5 g natrijevog klorida i 10 g triptona (engl. *Tryptone*) ( $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$ ). Pripremljeno je 50 velikih plastičnih epruveta (tip Falcon, 50 mL), te je u svaku stavljeno 20 mL tekućeg medija pomoću pipete (LLG Labware, Njemačka). Pripremljene epruvete s hranjivim medijem su prošle proces autoklaviranja, kao i ostala oprema koja se koristila u eksperimentu (hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama, predmetna stakalca i epruvete sa sterilnom vodom). Autoklaviranje je postupak sterilizacije i provodi se u trajanju od 20 minuta na temperaturi od  $121^\circ \text{C}$ .

U eksperimentu je korištena i kruta podloga LB hranjivog medija. Sastav krutog medija (po 1000 mL deionizirane vode): 5 g kvašćevog ekstrakta, 5 g natrijevog klorida, 10 g triptona i 20 g agara.

### 2.2. Bakterije

Za eksperimentalni dio rada uzgojeni su sojevi bakterija *S. aureus* i *P. aeruginosa* koji su se prethodno čuvali pomoću sustava Microbank™ na  $-80^\circ \text{C}$ . Bakterije su u „Microbanku“ pohranjene u malim spremnicima u kojima se nalaze plastične kuglice. Pomoću sterilizirane eze (bakteriološka ušica) prihvati se jedna kuglica iz spremnika i razmaže po agaru u Petrijevoj zdjelici. Važno je cijeli proces izvoditi u neposrednoj blizini plamena kako ne bi došlo do zagađenja. Na jednak način se nasade obje vrste, svaka u svojoj kulturi, na već pripremljene krute podloge LB hranjivog agara. Bakterije se potom inkubiraju na  $37^\circ \text{C}$  / 24 h. Nakon inkubacije pregledavaju se bakterije koje su se razvile na hranjivim podlogama kako bi se provjerilo jesu li čiste kulture. Prvo se pripreme dva predmetna stakalca tako što se provuku kroz plamen na Bunsenovom plameniku kako bi se uklonile masne naslage sa predmetnog stakalca. Na njih se zatim pomoću sterilizirane eze stavi kap vodovodne vode. Eza se ponovno zažari i ohladi na agaru te se pomoću nje uzme mala količina bakterijske biomase i razmuti u kapi vode na predmetnom stakalcu. Kada se stakalca osuše na zraku, tri puta se provuku kroz plamen kako bi se bakterije fiksirale. Nakon fiksacije bakterija, one se boje po Gramu i pregledavaju pomoću mikroskopa.

Praćenjem morfologije bakterija te obojenja, provjerava se je li kultura bakterije čista (jedna vrsta), ili je došlo do zagađenja (Slika 5).



**Slika 5.** A) Kultura bakterije *S. aureus* i B) kultura bakterije *P. aeruginosa* koja je korištena u istraživanju. Metoda bojenja po Gramu, povećanje 1000 X.

### 2.3. Priprema bakterijske suspenzije

Za pripremu suspenzije potrebna je sterilna voda. To je destilirana voda koja sadrži 0,3 % natrijeva klorida i koja je prethodno pripremljena u staklenim epruветama s čepom i sterilizirana u autoklavu. U male plastične sterilne epruветe (tip Falcon, 15 mL) pipetira se 9 mL sterilne vode. S agara se steriliziranom ezom uzima toliko bakterijske biomase da prekrije ušicu eze i unese se u sterilnu vodu u sterilnoj epruветi. Proces se ponovi dva puta. Epruвета se zatvori i vorteksira

(Vortex technoKartell TK3S, Italija) dok sadržaj ne postane homogen. Isti je postupak za pripravljanje suspenzija obiju vrsta bakterija.

#### **2.4. Uzgoj biofilma na predmetnom stakalcu**

Pripremljene bakterijske suspenzije se prenose u već pripremljene epruvete s tekućim hranjivim medijem tako da se pipetira po 1 mL suspenzije bakterije *S. aureus* i 1 mL suspenzije bakterije *P. aeruginosa* u svaku epruvetu (bakterijske kulture se pomiješaju). U epruvete s medijem i suspenzijom urone se sterilizirana predmetna stakalca do pola tako da dio stakalca bude uronjen u medij, dio se nalazi na interfazi (voda-zrak), a dio stakalca bude na zraku. Epruvete se ne zatvore do kraja zbog lakšeg protoka kisika. S obzirom da je stakalce do pola uronjeno u tekući medij, ono služi kao podloga za razvitak bakterijskog biofilma i omogućava promatranje tri faze (vodena faza, interfaza i plinovita faza). S obzirom da je eksperiment podijeljen u dva dijela, potrebno je na taj način i označiti epruvete. Potrebno je za svaki dan praćenja rasta biofilma prirediti dvije epruvete kako bi se rezultati eksperimenta mogli uspoređivati obzirom na vizualizaciju bakterija bojenjem po Gramu ili Alcian blue metodom bojenja.

Velike plastične epruvete s medijem i bakterijskom suspenzijom u kojima su uronjena predmetna stakalca stave se potom u miješalicu (Orbital Shaker, Biosan OS-10, Latvia) koja je namještena na lagano miješanje na 50 RPM (revolutions per minute) te se sve zajedno stavi u inkubator (Memmert IPP 400, GmbH + Co. KG, Njemačka) na 37 °C.

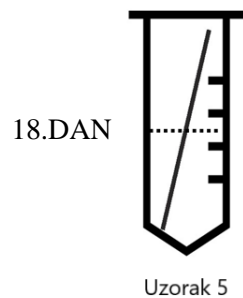
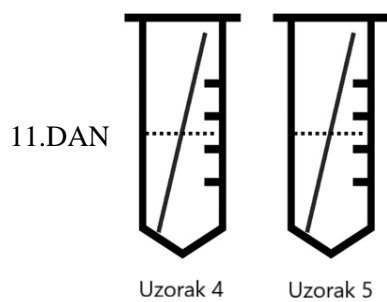
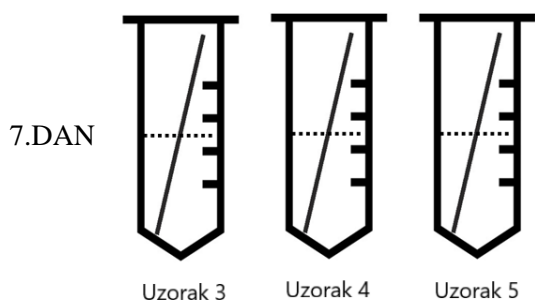
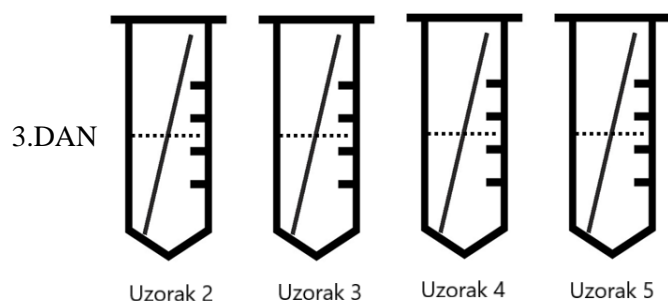
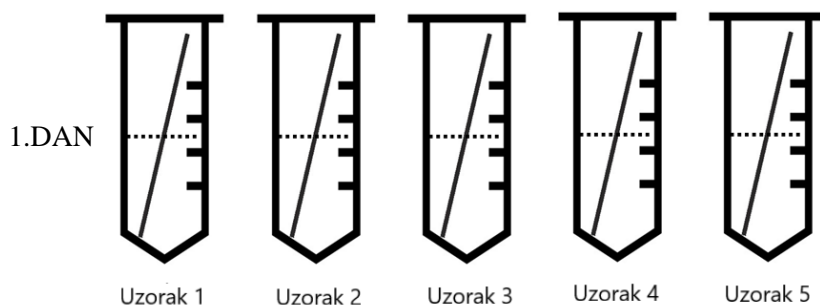
Nakon jednog dana započinje se pratiti razvoj biofilma na predmetnom stakalcu. Postupak je takav da se prvo upali plamenik kako ne bi došlo do zagađenja uzoraka. Izvadi se predmetno stakalce iz epruvete i steriliziranom deioniziranom vodom se opere strana na kojoj će se promatrati bakterije, a druga strana se obriše sa 70% etanolom. Stakalce se ostavi da se osuši na zraku. Kada je suho, potrebno je fiksirati bakterije provlačenjem stakalca kroz plamen 3x. Nakon fiksacije bakterija slijedi bojenje po Gramu i bojenje metodom Alcian blue. Rast biofilma se vizualno prati, uspoređuje i fotografira (mobilni uređaj Huawei p8lite, 13 MP, f/2.0, 27 mm). Obzirom da se prati biomasa bakterija na pojedinim dijelovima stakalca (voda, interfaza i zrak), te da se prati količina nastalog EPS-a, bakterije će se bojiti po Gramu ali i metodom „Alcian blue“ radi bolje vidljivosti i usporedbe. Bojenjem po Gramu se mogu dobro razlikovati dvije vrste korištene u pokusu, a bojenjem metodom „Alcian blue“ je vidljiv EPS koji se ne vidi prilikom bojenja po Gramu.

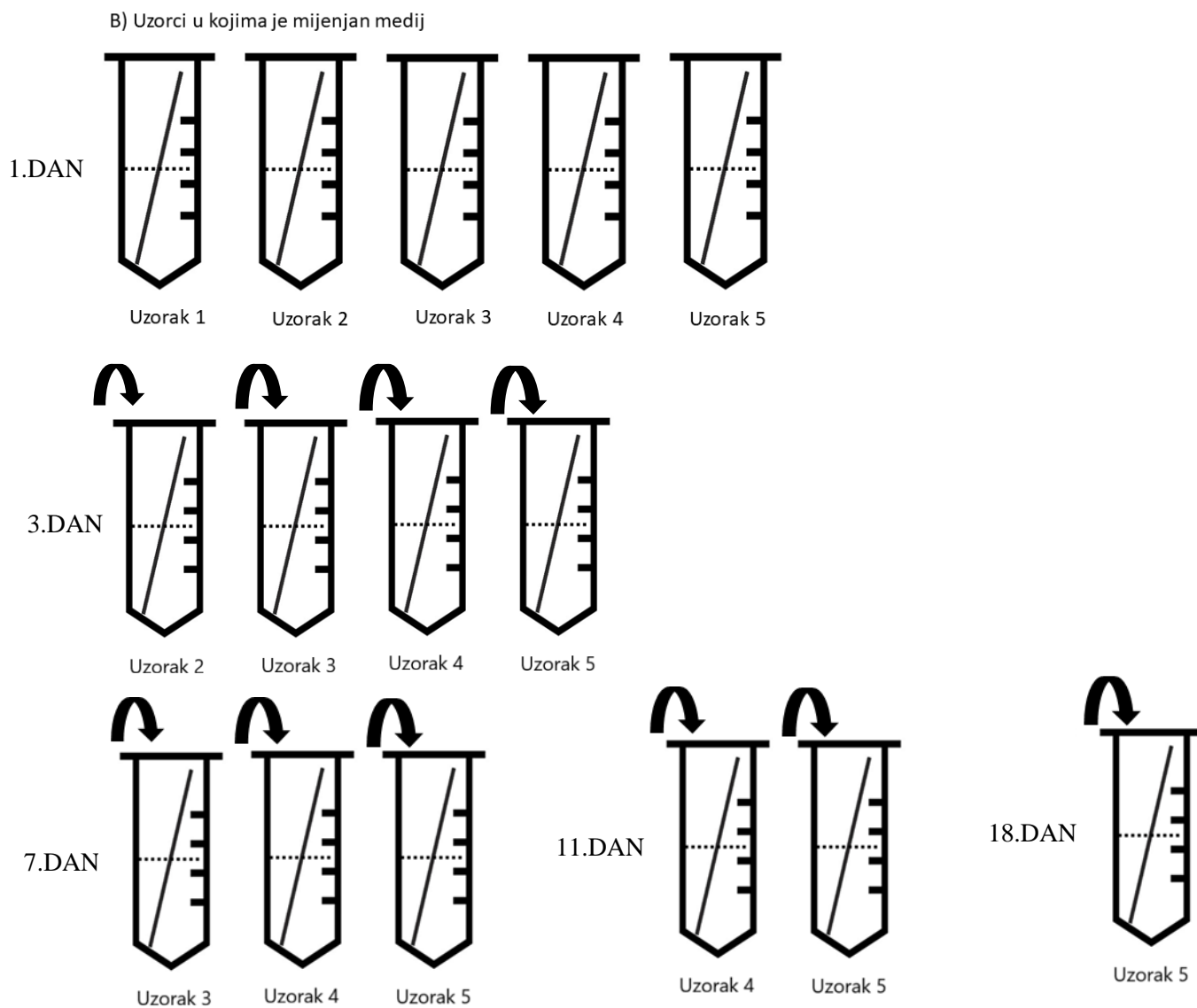
### **2.4.1. Uzgoj bakterija u eksperimentu s mijenjanjem medija i u eksperimentu bez mijenjanja medija**

Istraživanje je podijeljeno u dva dijela (Slika 6). Prati se razvoj dvovrsnog bakterijskog filma na čvrstoj podlozi u dva slučaja. Prvi slučaj je taj da se uzorcima ne dodaje novi medij, nego su uzorci praćeni kroz dane bez dotoka novih nutrijenata. Pripremi se deset uzoraka kako je opisano u poglavlju 2.4., te se nakon prvog dana pregledava i dokumentira prvi uzorak. Nakon trećeg dana drugi uzorak, nakon sedmog dana treći uzorak, nakon jedanaestog dana četvrti uzorak, te nakon osamnaestog dana peti uzorak. Bitno je pripremiti za svako dokumentiranje dva uzorka kako bi se bakterije mogle bojiti po Gramu i metodom „Alcian blue“. Nakon pregledavanja svakog uzorka, predmetno stakalce se zajedno s epruvetom i medijem baca u za to predviđen spremnik za otpad.

U drugom slučaju se pripremi također deset uzoraka, ali se tim uzorcima mijenja medij svaka tri dana i bakterije konstantno imaju dotok novih nutrijenata (eng. *continuous culture*). Prilikom dodavanja novog medija se u blizini otvorenog plamena najprije izvadi predmetno stakalce iz starog medija, te se stavlja u novu epruvetu sa svježim medijem. Bakterije se i u ovom slučaju boje po Gramu i metodom „Alcian blue“. Medij se prvi puta mijenja nakon trećeg dana, a uzorci se pregledavaju nakon trećeg, sedmog, jedanaestog i osamnaestog dana. Uzorci se nakon svakog dokumentiranja bacaju u za to predviđen spremnik za otpad isto kao i epruveta sa starim medijem nakon procesa mijenjanja medija. Svi eksperimenti su rađeni u duplikatu.

A) Uzorci u kojima nije mijenjan medij





**Slika 6** Shematski prikaz uzgoja bakterija u eksperimentu bez mijenjanja medija (A) i u eksperimentu s mijenjanjem medija (B). Strelica u prikazu B označava prijenos predmetnog stakalca u novi, svježi medij.

### 2.4.2. Bojenje po Gramu

Metoda bojenja bakterija po Gramu je empirijska metoda razlikovanja Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Razlika između te dvije skupine bakterija temelji se na različitim morfološkim svojstvima stanične stjenke.

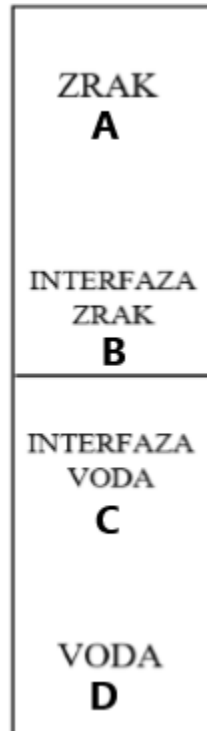
Dodatkom Kristal violet boje (1 min), sve bakterije se boje ljubičasto. Nakon toga se na stakalce s bakterijama dodaje i Lugolova otopina (1 min) koja fiksira boju unutar stanične stjenke. Slijedi ispiranje etanolom koji ispire primarno bojilo. Ako je mreža peptidoglikana u staničnoj stjenci dovoljno gusta, primarno bojilo se i nakon ispiranja etanolom zadržava unutar stanične stjenke, što znači da će bakterije koje imaju više slojeva peptidoglikana u staničnoj stjenci ostati obojene ljubičasto, a one koje to nemaju ponovno će biti neobojene. Bakterije koje ostaju obojene nazivaju se gram-pozitivne bakterije. Nakon ispiranja alkoholom, stakalce je potrebno isprati i vodom, nakon čega se dodaje kontrastna boja Karbol fuksin (0,5 min) koja gram-negativne bakterije boji u ružičasto. Postupak se završava ispiranjem vodom, nakon čega je preparat spreman za vizualizaciju.

### 2.4.3. Bojenje metodom „Alcian blue“

Boja Alcian blue veže se za polisaharide koji se nalaze u ekstracelularnom matriksu te se na ovaj način može vizualizirati EPS. Za bojenje EPS-a predmetno stakalce se uroni u boju Alcian blue (3 min), te se potom ispire vodovodnom vodom. Zatim se na stakalce nakapa Karbol fuksin (0,5 min) te se ponovno ispire vodovodnom vodom i stakalce se obriše papirom.



Pripremljeni preparati se zatim promatraju svjetlosnim mikroskopom (Olympus CX21, Japan) na povećanju x1000 uz pomoć imerzijskog ulja. Svi preparati se potom fotografiraju pomoću mobitela (mobilni uređaj Huawei p8lite, 13 MP, f/2.0, 27 mm).



**Slika 7.** Prikaz zona fotografiranja i proučavanja bakterijskog biofilma poraslog na mikroskopskom predmetnom stakalcu. A) Dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak), B) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza zrak), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza voda), D) dio stakalca koji se nalazi u hranjivom mediju (voda).

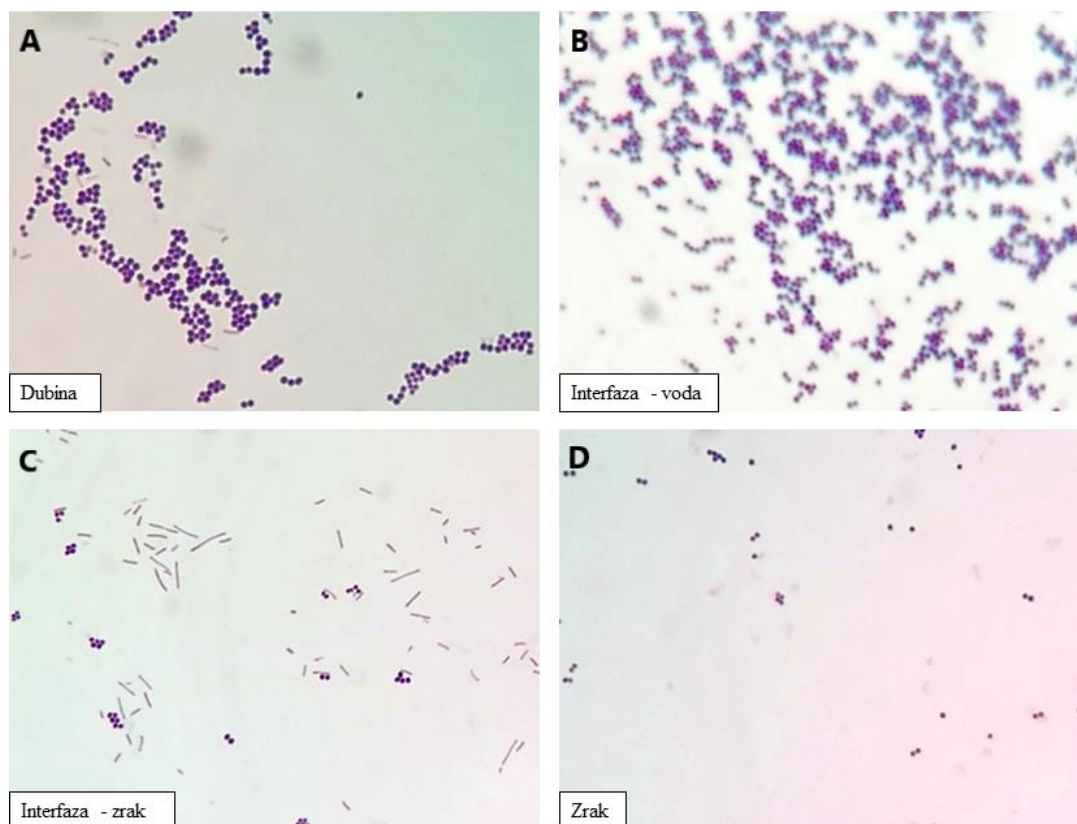
## 3. REZULTATI

### 3.1. Praćenje razvoja biofilma u uzorcima u kojima nije mijenjan medij

U ovim uzorcima medij nije mijenjan od prvog do zadnjeg dana, te su uzorci promatrani prvog, trećeg, sedmog, jedanaestog i osamnaestog dana. Prikazane su slike u kojima je preparat bojen ili metodom bojenja po Gramu ili metodom bojenja „Alcijan blue“. Štapičaste stanice su stanice bakterija *P. aeruginosa*, a okrugle stanice su stanice bakterija *S. aureus*. Ekstracelularni matrix (EPS) je vidljiv kao ljubičasto/plavo obojenje oko stanica.

#### 3.1.1. Biofilm nakon jednog dana inkubacije

Prvog dana u dubini, odnosno u tekućoj fazi, uočene su veće nakupine bakterije *S. aureus*, dok bakterije *P. aeruginosa* nisu uočene u većim nakupinama nego tek dvije do tri stanice zajedno (Slika 8). Najveća količina bakterijske biomase u ovom stadiju se nalazi upravo u tekućoj fazi. EPS se u ovom stadiju još uvijek ne vidi. Pomicanjem prema interfazi, količina stanica *S. aureus* se ne mijenja, a stanice *P. aeruginosa* se i dalje ne pojavljuju. Odmah iznad interfaze - na zraku, nalazi se bakterija *P. aeruginosa* u nakupinama, ali i pojedinačno. Vrsta *S. aureus* je u ovom dijelu puno rjeđa i u jako malim nakupinama. Iako se u zraku odmah iznad interfaze nalazi veća količina bakterija *P. aeruginosa*, ta bakterija se više ne pojavljuje na dijelu stakalca koji se nalazi na zraku nego ostaju samo pojedinačne ili u paru bakterije *S. aureus*.

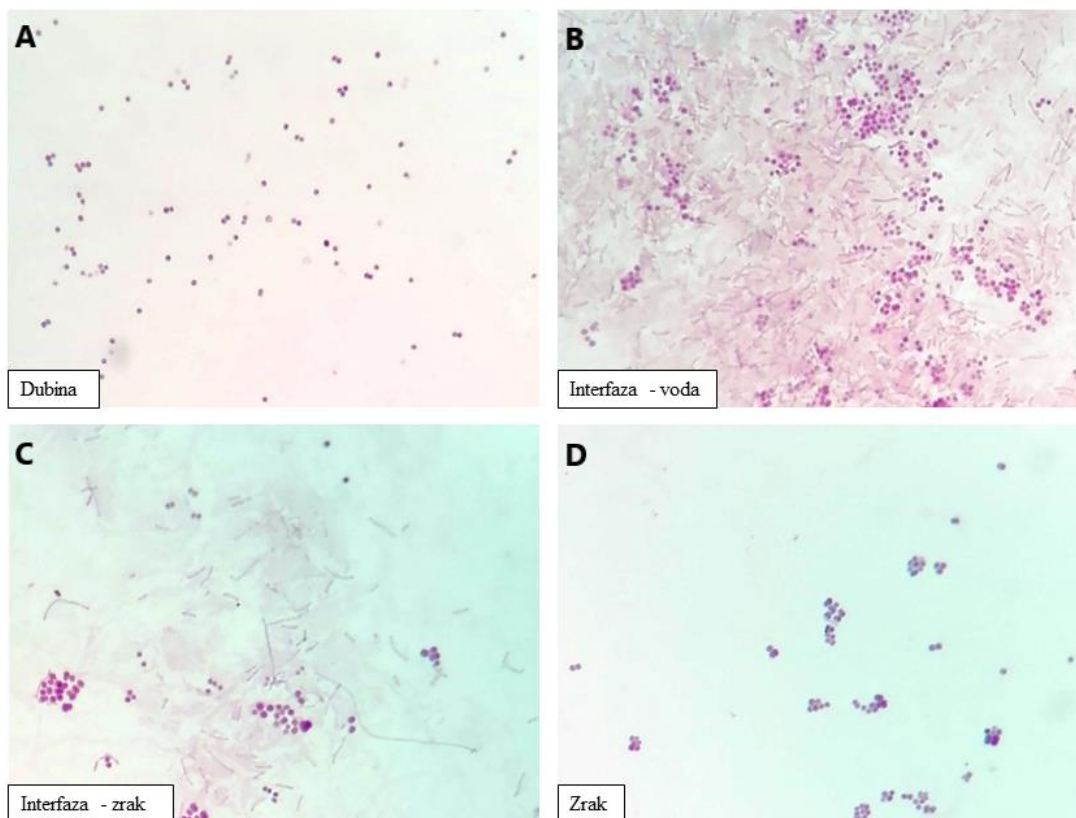


**Slika 8.** Biofilm bakterija formiran na krutoj podlozi nakon jednog dana inkubacije u uzorcima u kojima nije mijenjan medij. A) Dio stakalca koji se nalazi uronjen u medij (dubina), B) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza-voda), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza-zrak), D) dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak).

### 3.1.2. Biofilm nakon tri dana inkubacije

Trećeg dana eksperimenta u dubini se pojavljuje pojedinačno ili eventualno u paru bakterija *S. aureus*, a bakterija *P. aeruginosa* se niti trećeg dana u dubini ne vidi (Slika 9). Za razliku od prvog dana, u dubini se nalazi znatno manji broj bakterija koje više nisu u nakupinama. U ovoj fazi se na središtu interfaze dobro vidi pojava EPS-a kao plavo obojenje. Velike količine bakterije *P. aeruginosa* i nešto manje nakupine bakterija *S. aureus* nalaze se na ekstracelularnom matriksu. Najveća količina EPS-a je vidljiva s donje strane interfaze u vodi. Na tom području je uočena i najveća bakterijska biomasa. Isto kao i prvog dana odmah iznad interfaze, na zraku, nalaze se velike količine bakterije *P. aeruginosa* i svega nekoliko nakupina bakterija *S. aureus*. Udaljevanjem od interfaze, prema zraku, vrsta *P. aeruginosa* nestaje i ponovno se pojavljuju male nakupine vrste *S. aureus*.

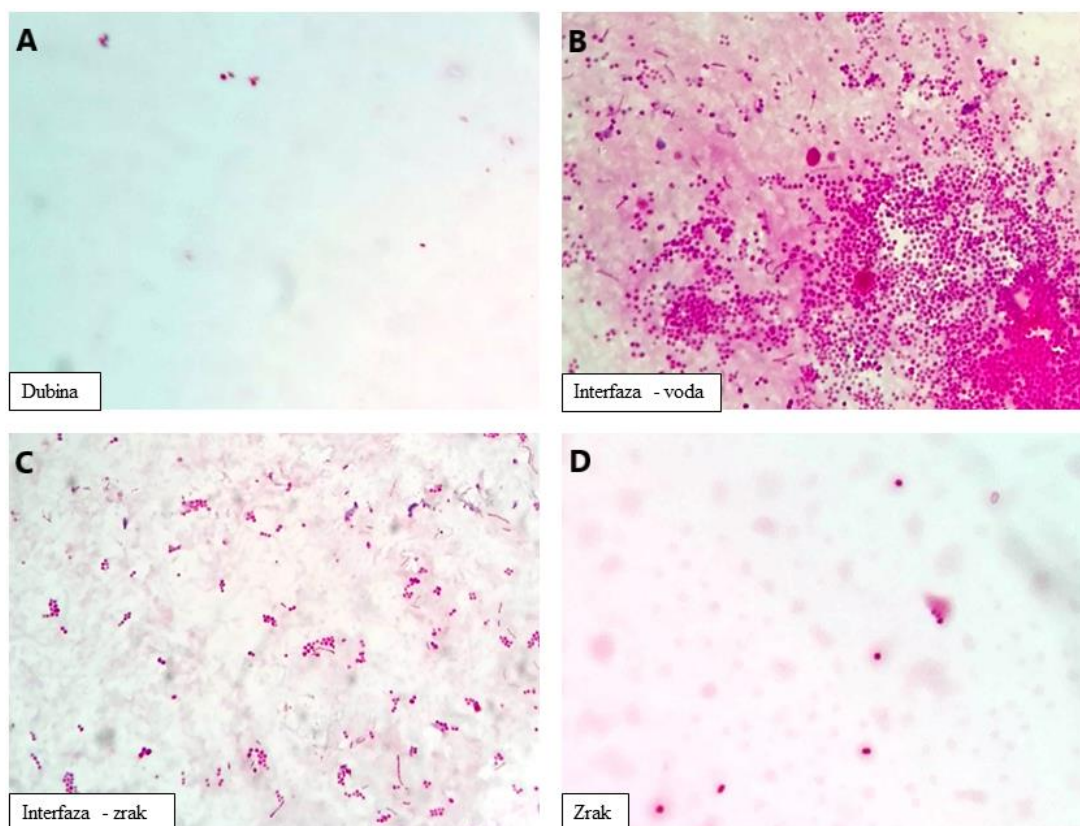
Obje vrste bakterija se trećeg dana koncentriraju najviše na području interfaze, dok se količina bakterija u vodi i na zraku smanjuje. Ekstracelularni matriks nije vidljiv u dubini i na zraku, nego samo u području interfaze, posebice s donje strane interfaze.



**Slika 9.** Biofilm bakterija formiran na krutoj podlozi nakon tri dana inkubacije u uzorcima u kojima nije mijenjan medij. A) Dio stakalca koji se nalazi uronjen u medij (dubina), B) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza-voda), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza-zrak), D) dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak).

### 3.1.3. Biofilm nakon sedam dana inkubacije

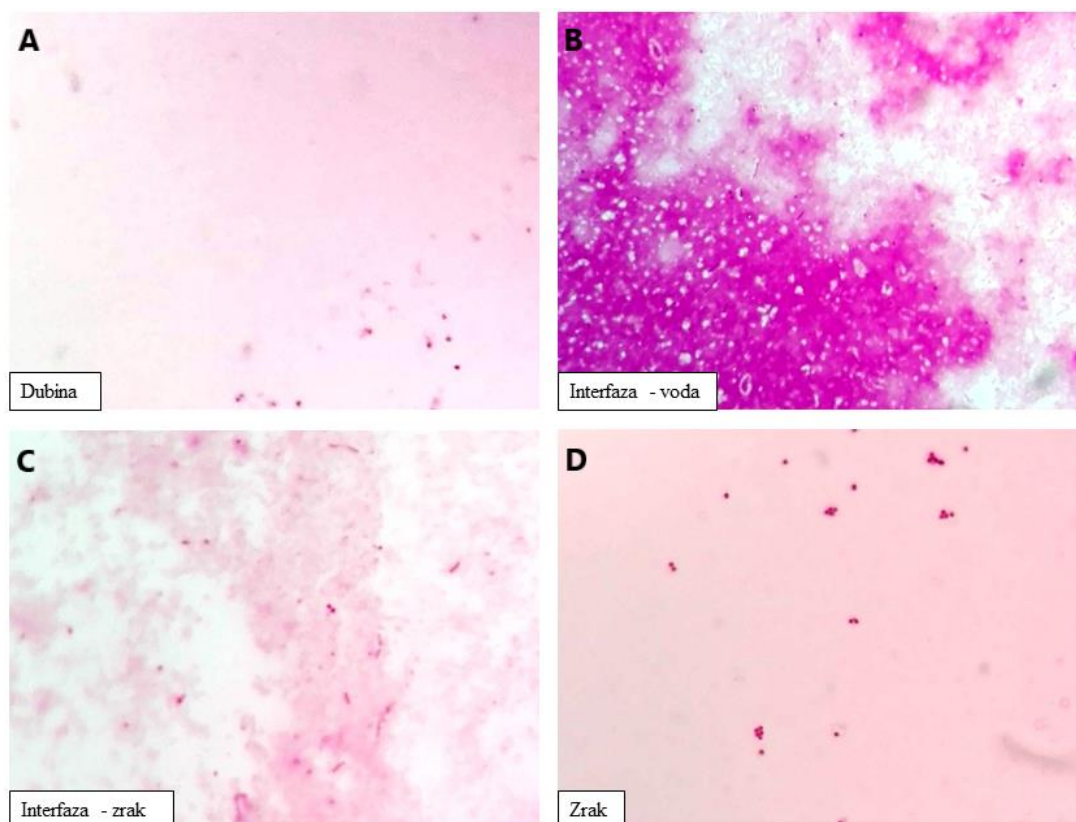
Sedmi dan je makroskopski vidljivo povećanje bakterijske biomase, posebice u području interfaze na granici sa vodom (Slika 10). U dubini je pronađeno jako malo bakterija. U tom području se nalazi nekoliko pojedinačnih bakterija *S. aureus*, te nekoliko malih nakupina bakterije *P. aeruginosa*. Iako se obje vrste ovdje mogu vidjeti u vodenoj fazi, jasno je vidljiva granica između područja gdje se pojavljuju. Na donjoj granici faza voda-zrak nalazi se najveća količina bakterija. Na interfazi vidi se vrsta *P. aeruginosa* koja je skoro potpuno prekrivena EPS-om. Preko EPS-a su položene velike količine vrste *S. aureus*. Iznad interfaze, u plinovitoj fazi nalazi se tek nekoliko bakterija *S. aureus* pojedinačno ili u paru.



**Slika 10.** Biofilm bakterija formiran na krutoj podlozi nakon sedam dana inkubacije u uzorcima u kojima nije mijenjan medij. A) Dio stakalca koji se nalazi uronjen u medij (dubina), B) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza-voda), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza-zrak), D) dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak).

### 3.1.4. Biofilm nakon jedanaest dana inkubacije

U dubini su vidljive male nakupine bakterije *P. aeruginosa* i pojedinačne stanice *S. aureus*. U tom području bakterija ima manje u odnosu na prethodne dane (Slika 11). Na interfazi se nalazi jako velika količina EPS-a koji prekriva bakterije te su pojedinačne stanice zbog toga slabije vidljive. Vidljiva su područja gdje se nalaze bakterije *S. aureus* i područja s vrstom *P. aeruginosa*, ali se te dvije vrste na interfazi nalaze i jedne preko drugih. Za razliku od sedmog dana, bakterijska biomasa je puno veća i teško je razlučiti bakterije te su se one još više spustile na donju granicu faze voda-zrak. Na gornjoj granici sa zrakom prevladava vrsta *P. aeruginosa* uz koju je također vidljiv EPS, ali u puno manjim količinama. U ovom stadiju se na gornjoj granici interfaze znatno smanjio broj bakterija, iako je EPS i dalje dobro vidljiv na tom području. Na djelu stakalca koji se nalazi u zraku vidljive su male nakupine, ali i pojedinačne stanice *S. aureus*.

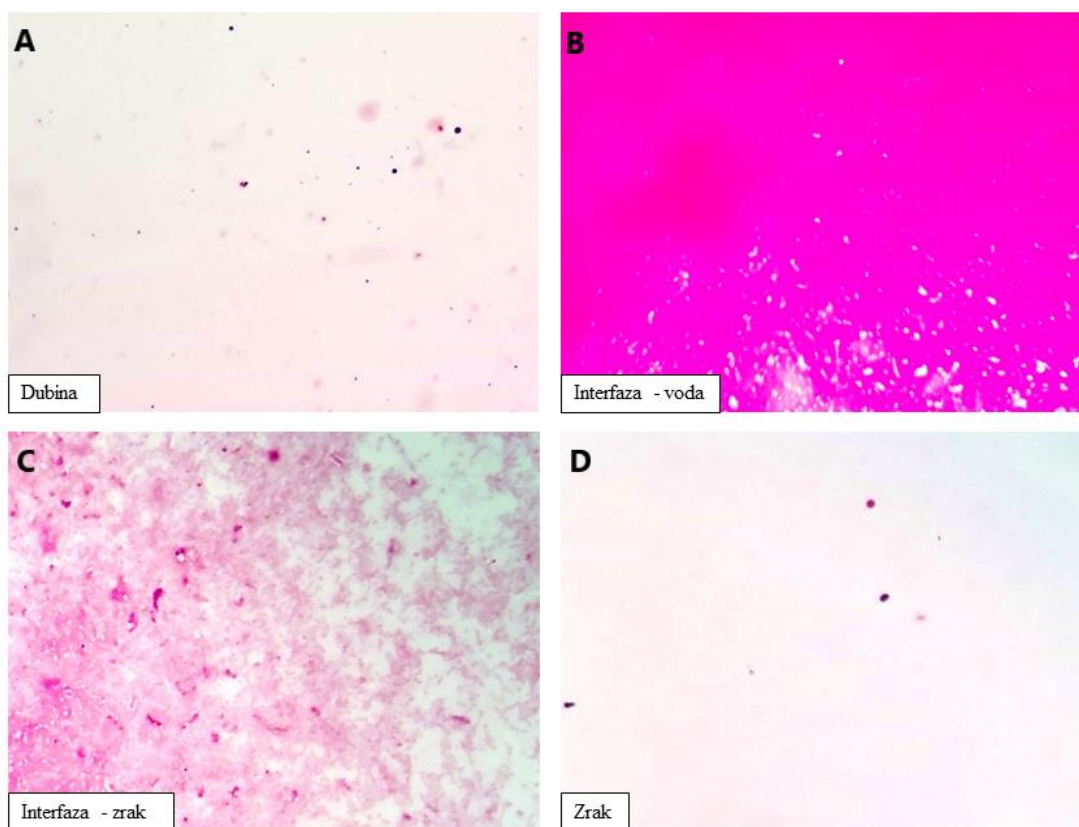


**Slika 11.** Biofilm bakterija formiran na krutoj podlozi nakon jedanaest dana inkubacije u uzorcima u kojima nije mijenjan medij. A) Dio stakalca koji se nalazi uronjen u medij (dubina), B) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza-voda), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza-zrak), D) dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak).



### 3.1.5. Biofilm nakon osamnaest dana inkubacije

Osamnaestog dana se u dubini nalazi tek nekoliko bakterija i to isključivo vrsta *S. aureus*. Vrsta *P. aeruginosa* se uopće ne pojavljuje (Slika 12). Na interfazi se nalazi još veća količina EPS-a nego jedanaestog dana koji prekriva stanice i zbog toga se ne mogu razlučiti bakterije nego je sve spojeno u jednu veliku biomasu. Iako je teško razlučivo, na donjoj strani interfaze i dalje prevladava bakterija *S. aureus*, a bakterija *P. aeruginosa* se pojavljuje na gornjoj granici interfaze. U plinovitoj fazi mogu se naći pojedinačne stanice *S. aureus*, iako vrlo rijetko i u malim nakupinama. Vrsta *P. aeruginosa* se uopće ne pojavljuje na zraku.



**Slika 12.** Biofilm bakterija formiran na krutoj podlozi nakon osamnaest dana inkubacije u uzorcima u kojima nije mijenjan medij. A) Dio stakalca koji se nalazi uronjen u medij (dubina), B) Dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza-voda), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza-zrak), D) dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak).

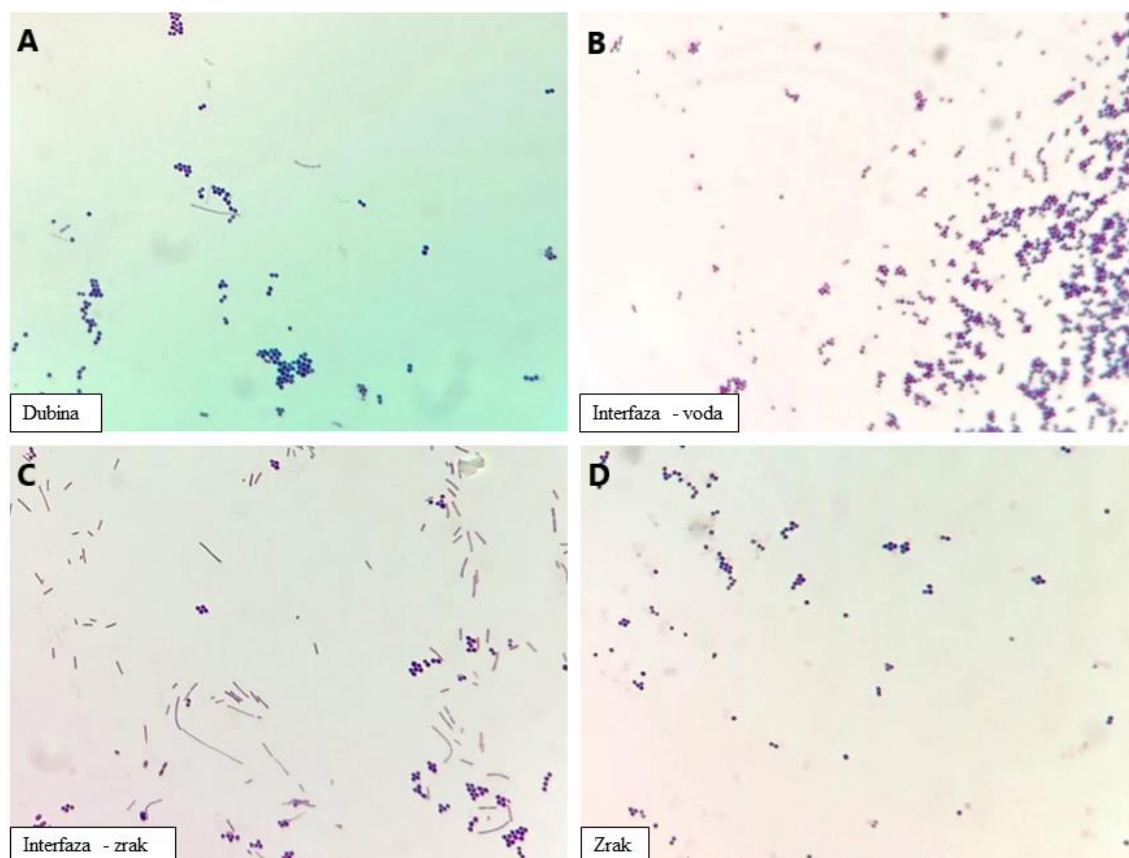
### 3.2. Praćenje razvoja biofilma u uzorcima u kojima je mijenjan medij

U ovim uzorcima medij je prvi puta promijenjen treći dan, te je nakon toga mijenjan svaka tri dana.

#### 3.2.1. Biofilm nakon jednog dana inkubacije

Obzirom da se uzorcima medij mijenja tek nakon trećeg dana, pregledani i dokumentirani uzorci od prvog i trećeg dana se ne razlikuju bitno od onih opisanih u poglavlju 3.1.1. Kako je već i opisano u poglavlju 3.1.1., u dubini se prvog dana nalaze velike količine bakterije *S. aureus*, a bakterija *P. aeruginosa* se pojavljuje u zanemarivo malom broju (Slika 13). Vrsta *S. aureus* se pojavljuje u nakupinama, ali i pojedinačno. Na donjoj strani interfaze, povećava se broj bakterija, ali i dalje prevladava vrsta *S. aureus*. Na gornjoj strani interfaze se uz stanice *S. aureus* pojavljuju i stanice *P. aeruginosa* i to uglavnom pojedinačno, ali i u rjeđim nakupinama. Na dijelu stakalca koji nema doticaj s tekućom fazom se nalazi bakterija *S. aureus* u parovima ili samostalno, te rijetko u malim nakupinama. Brojnost bakterija koje se nalaze na zraku je vrlo mala. Metodom bojenja s Alcian blue bojilom, ustanovilo se da se prvog dana ne pojavljuje EPS.

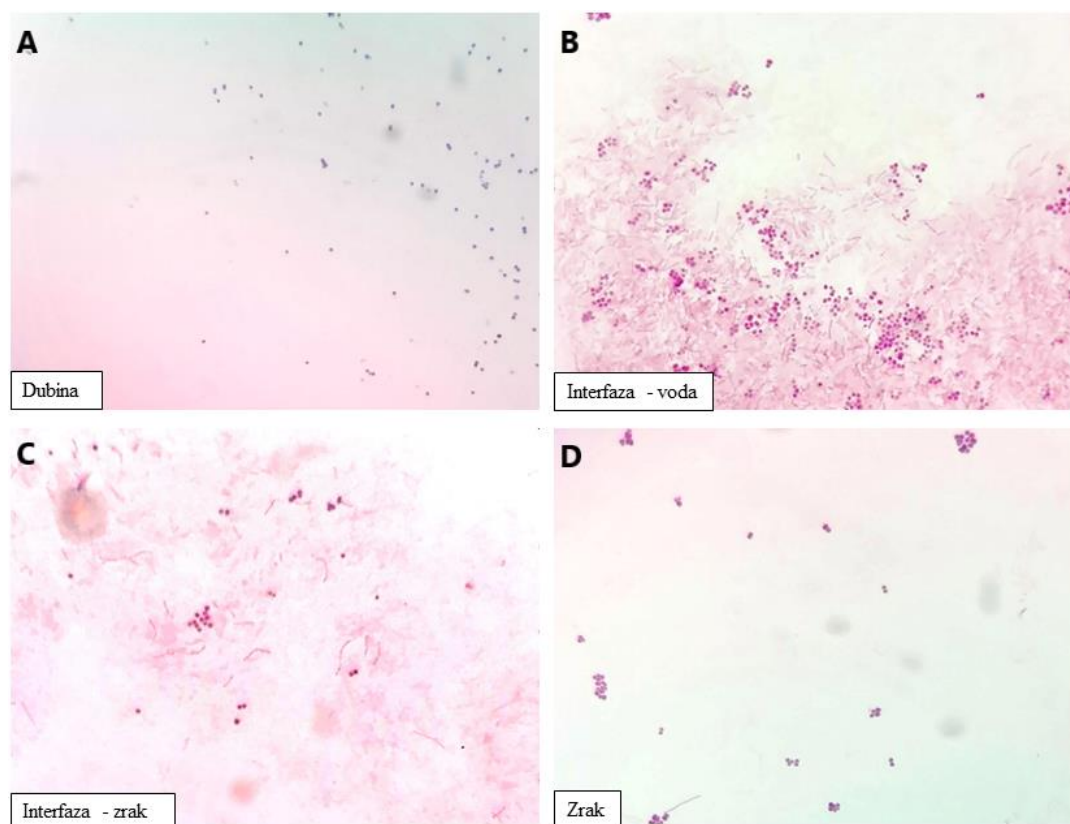




**Slika 13.** Biofilm bakterija formiran na krutoj podlozi nakon jednog dana inkubacije u uzorcima u kojima je mijenjan medij. A) Dio stakalca koji se nalazi uronjen u medij (dubina), B) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza-voda), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza-zrak), D) dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak).

### 3.2.2. Biofilm nakon tri dana inkubacije

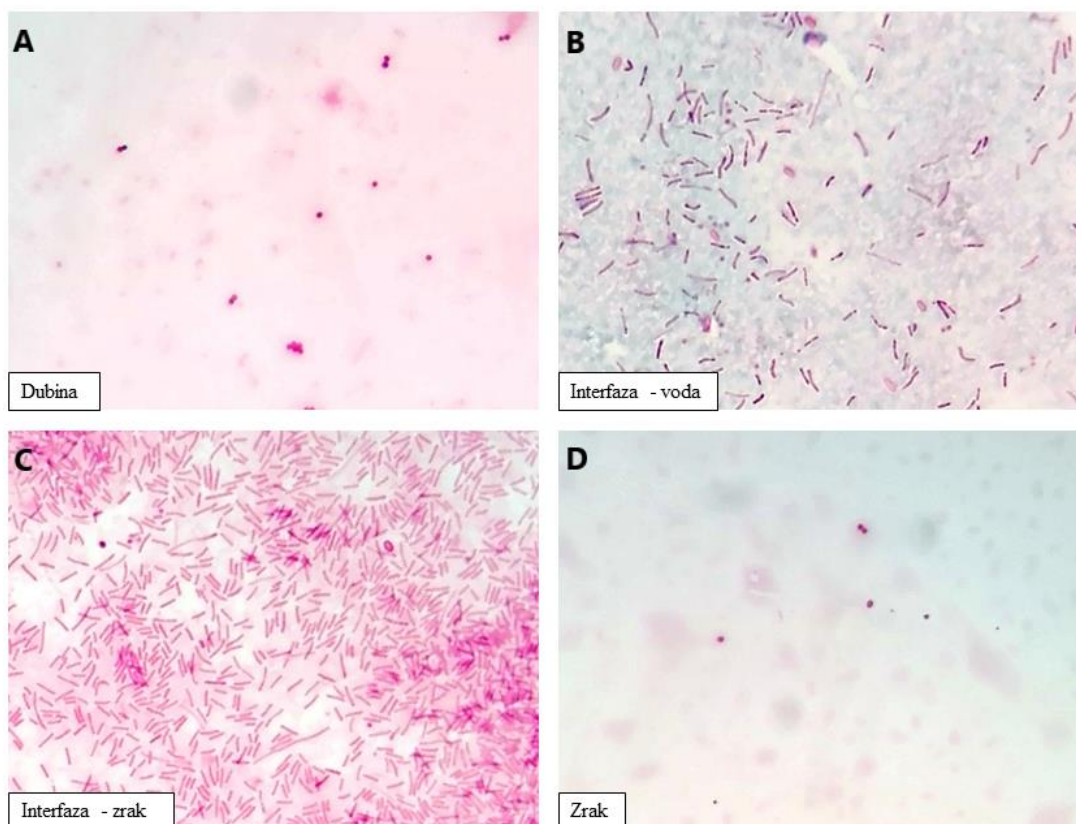
Treći dan se također ne razlikuje bitno u uzorcima u kojima je mijenjan medij od onih u kojima nije mijenjan medij, obzirom da su bakterije imale iste uvijete za rast. Kako je već opisano u poglavlju 3.1.2., trećeg dana se općenito povećava biomasa obje vrste bakterija te se one koncentriraju oko interfaze (Slika 14).



**Slika 14.** Biofilm bakterija formiran na krutoj podlozi nakon tri dana inkubacije u uzorcima u kojima je mijenjan medij. A) Dio stakalca koji se nalazi uronjen u medij (dubina), B) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza-voda), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza-zrak), D) dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak)

### 3.2.3. Biofilm nakon sedam dana inkubacije

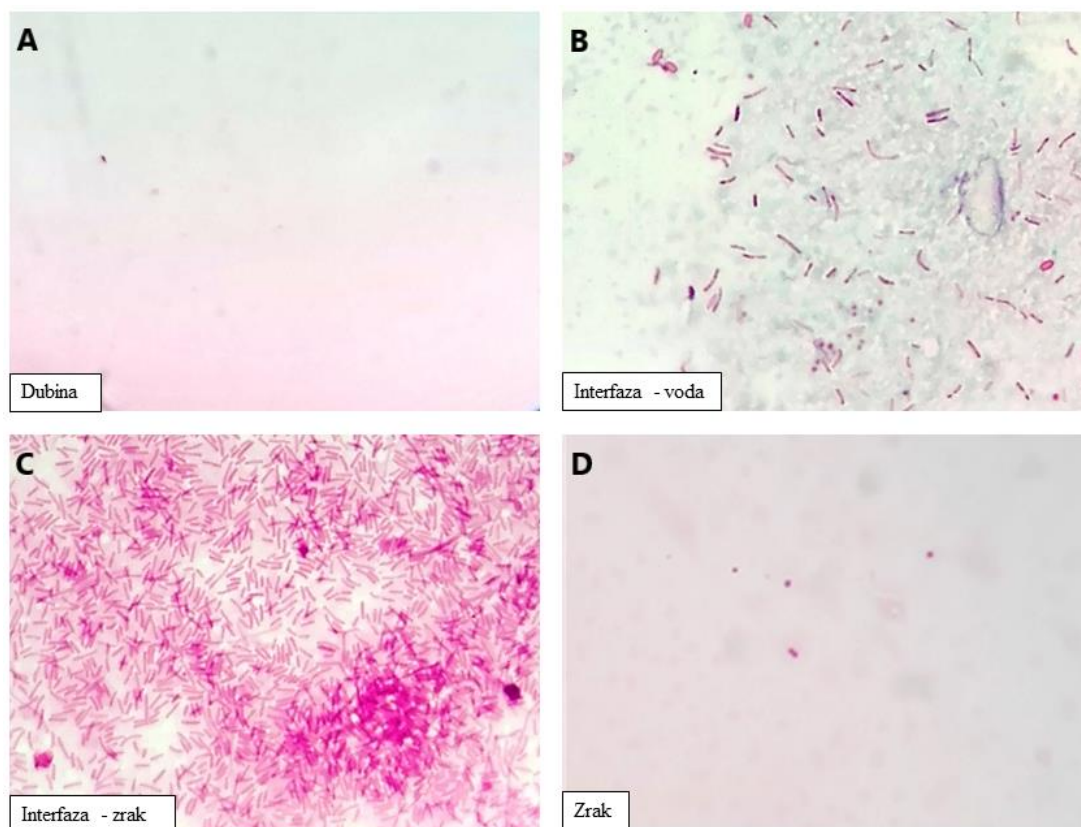
U dubini se nalaze stanice *S. aureus* pojedinačno ili u malim nakupinama (Slika 15). Pojavljuju se u puno manjim količinama nego trećeg dana. Na interfazi prevladava bakterija *P. aeruginosa*, dok se bakterija *S. aureus* pojavljuje rijetko, u malim nakupinama ili pojedinačno. Veća je koncentracija bakterija na gornjoj granici interfaze, a EPS je bolje vidljiv s donje strane interfaze, iako je brojnost bakterija manja na toj strani. Količina EPS-a se znatno povećala u odnosu na treći dan.



**Slika 15.** Biofilm bakterija formiran na krutoj podlozi nakon sedam dana inkubacije u uzorcima u kojima je mijenjan medij. A) Dio stakalca koji se nalazi uronjen u medij (dubina), B) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza-voda), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza-zrak), D) dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak).

### 3.2.4. Biofilm nakon jedanaest dana inkubacije

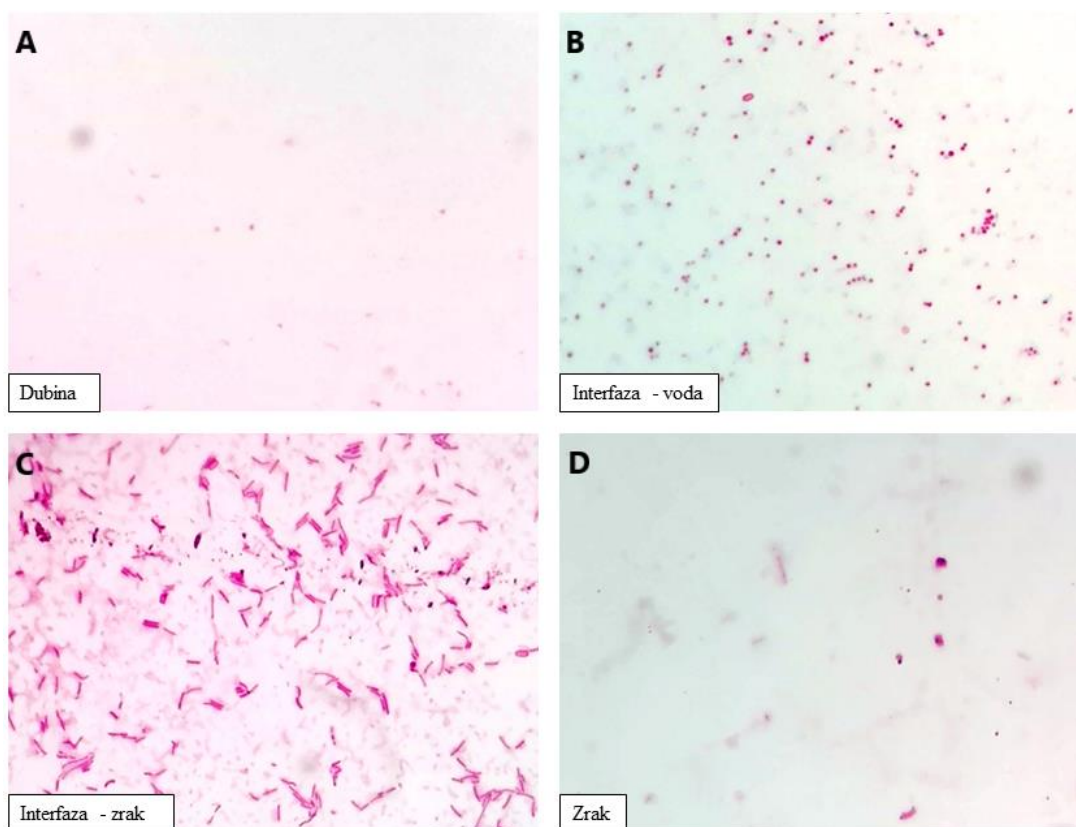
U dubini se nalazi sve manje bakterija u odnosu na prethodne dane, te se i dalje pojavljuje bakterija *S. aureus* pojedinačno ili u paru (Slika 16). Dobro su odijeljena područja na kojima se nalaze stanice *S. aureus* i stanice *P. aeruginosa*. Na interfazi se nalaze obje vrste bakterija, ali bakterija *P. aeruginosa* dominira i dobro je vidljiv EPS. I sedmog i jedanaestog dana se u uzorcima u kojima se mijenja medij najveća količina bakterija nalazi na gornjoj strani interfaze (prema zraku) i to je uglavnom bakterija *P. aeruginosa*. Na donjoj granici se nalazi sve manje bakterija i bakterije su rjeđe, dok se na gornjoj granici nalaze velike količine bakterije *P. aeruginosa* koje su položene na nekim dijelovima jedne preko drugih. U plinovitoj fazi nema promjena, i dalje se vide samo stanice *S. aureus* pojedinačno.



**Slika 16.** Biofilm bakterija formiran na krutoj podlozi nakon jedanaest dana inkubacije u uzorcima u kojima je mijenjan medij. A) Dio stakalca koji se nalazi uronjen u medij (dubina), B) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza-voda), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza-zrak), D) dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak).

### 3.2.5. Biofilm nakon osamnaest dana inkubacije

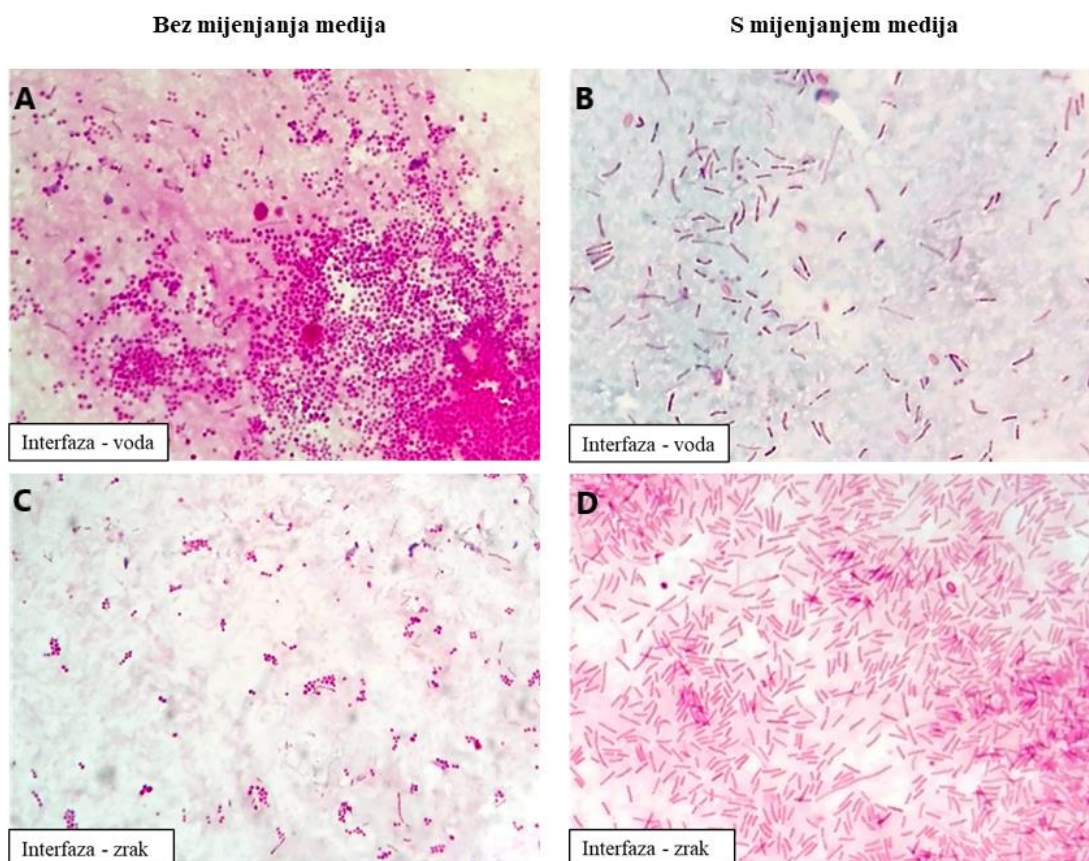
Osamnaestog dana se smanjila količina bakterija u odnosu na jedanaesti dan (Slika 17). Bakterija *S. aureus* se pojavljuje u dubini jako rijetko, ali se pojavljuje u većoj količini na donjoj strani interfaze. Za razliku od prethodnih dana, na ovom dijelu se ne nalazi vrsta *P. aeruginosa*. Na gornjoj strani interfaze- prema zraku, i dalje se nalazi samo vrsta *P. aeruginosa*, iako u puno manjim količinama nego jedanaestog dana. Na zraku se nalazi isključivo bakterija *S. aureus* i to u malim količinama.



**Slika 17.** Biofilm bakterija formiran na krutoj podlozi nakon osamnaest dana inkubacije u uzorcima u kojima je mijenjan medij. A) Dio stakalca koji se nalazi uronjen u medij (dubina), B) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza-voda), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza-zrak), D) dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak).



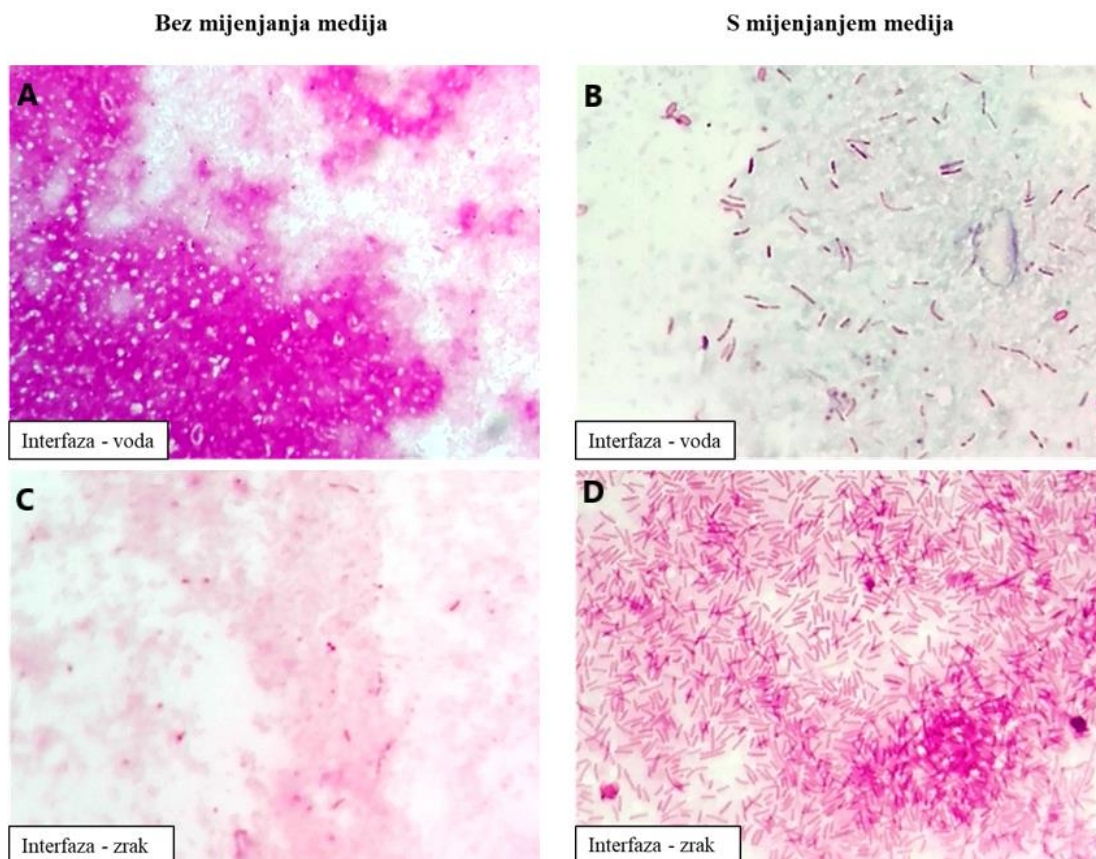
### 3.2.6. Usporedba uzoraka s mijenjanjem medija s uzorcima bez mijenjanja medija (7., 11. i 18. dan)



**Slika 18.** A i C Biofilm bakterija nakon sedam dana na krutoj podlozi dokumentiran na interfaci u uzorcima u kojima nije mijenjan medij; B i D Biofilm bakterija na krutoj podlozi dokumentiran na interfaci u uzorcima u kojima je mijenjan medij (prilagođeno iz Slike 9 i Slike 14 iz ovog rada).

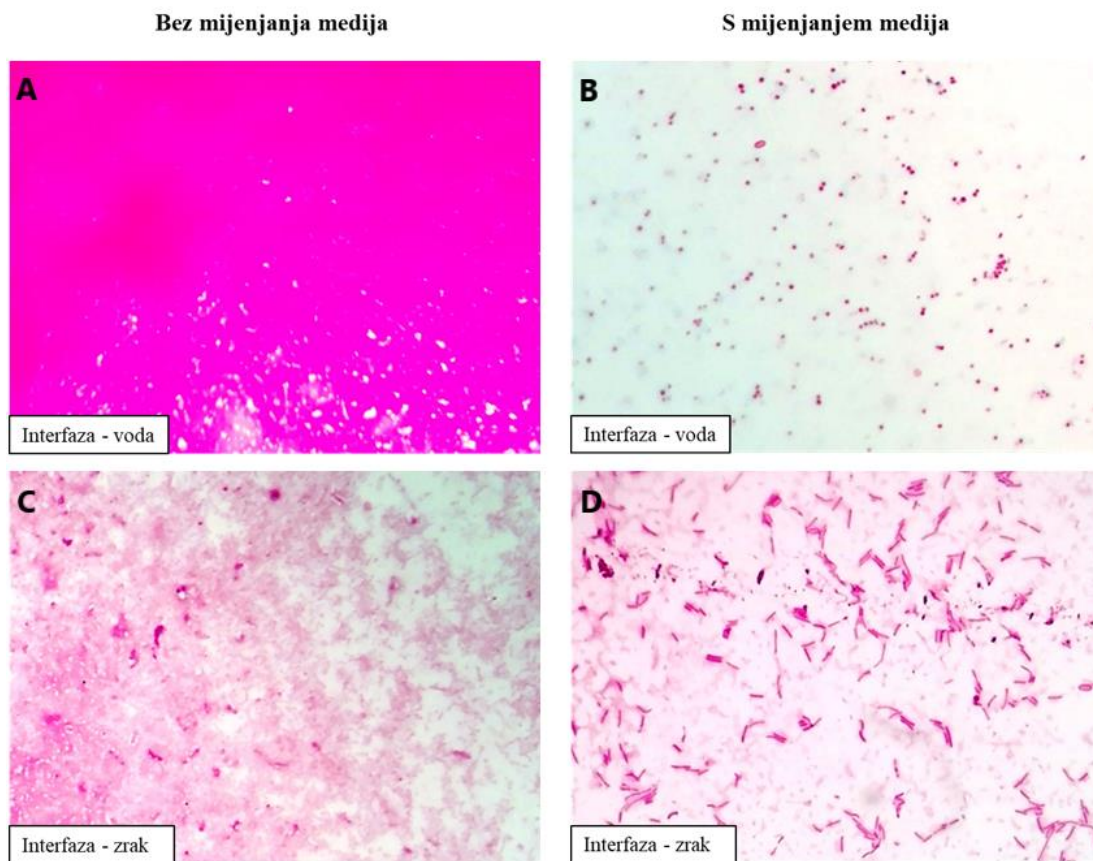
Sedmog dana se na interfaci bitno razlikuje zastupljenost pojedinih bakterija među uzorcima u kojima se medij nije mijenjao i onima u kojima se mijenjao (Slika 18). Na donjoj granici interfaci u uzorcima u kojima nije mijenjan medij nalazi se velika količina bakterija, a prvenstveno je to bakterija *S. aureus* okružena velikom količinom EPS-a. U uzorcima u kojima je mijenjan medij se nalazi manje bakterija nego u uzorcima u kojima nije mijenjan medij i prevladava vrsta *P. aeruginosa*. U uzorcima u kojima nije mijenjan medij je također vidljiv EPS u obliku plavog obojenja, ali u manjim količinama nego u uzorcima u kojima je mijenjan medij. Na gornjoj strani interfaci se u uzorcima u kojima nije mijenjan medij nalazi puno manje bakterija nego na istom mjestu u uzorcima u kojima je mijenjan medij te prevladava bakterija *S. aureus* dok

u uzorcima s mijenjanjem medija prevladava bakterija *P. aeruginosa*. U oba uzorka je na granici interfaza-zrak puno manje EPS-a nego na granici interfaza-voda.



**Slika 19.** A i C) Biofilm bakterija nakon jedanaest dana na krutoj podlozi dokumentiran na interfazi u uzorcima u kojima nije mijenjan medij; B i D Biofilm bakterija na krutoj podlozi dokumentiran na interfazi u uzorcima u kojima je mijenjan medij (prilagođeno iz Slike 10 i Slike 15 iz ovog rada).

Jedanaestog dana se na području interfaza-voda razlikuje zastupljenost i brojnost bakterija u dvije uspoređene vrste uzoraka; u uzorcima bez mijenjanja medija se vidi velika količina stanica *S. aureus* dok u uzorcima s mijenjanjem medija prevladava *P. aeruginosa* (Slika 19). Slično je uočeno i na području interfaza-zrak, s naglaskom da je količina stanica *P. aeruginosa* znatno veća u uzorcima s mijenjanjem medija.



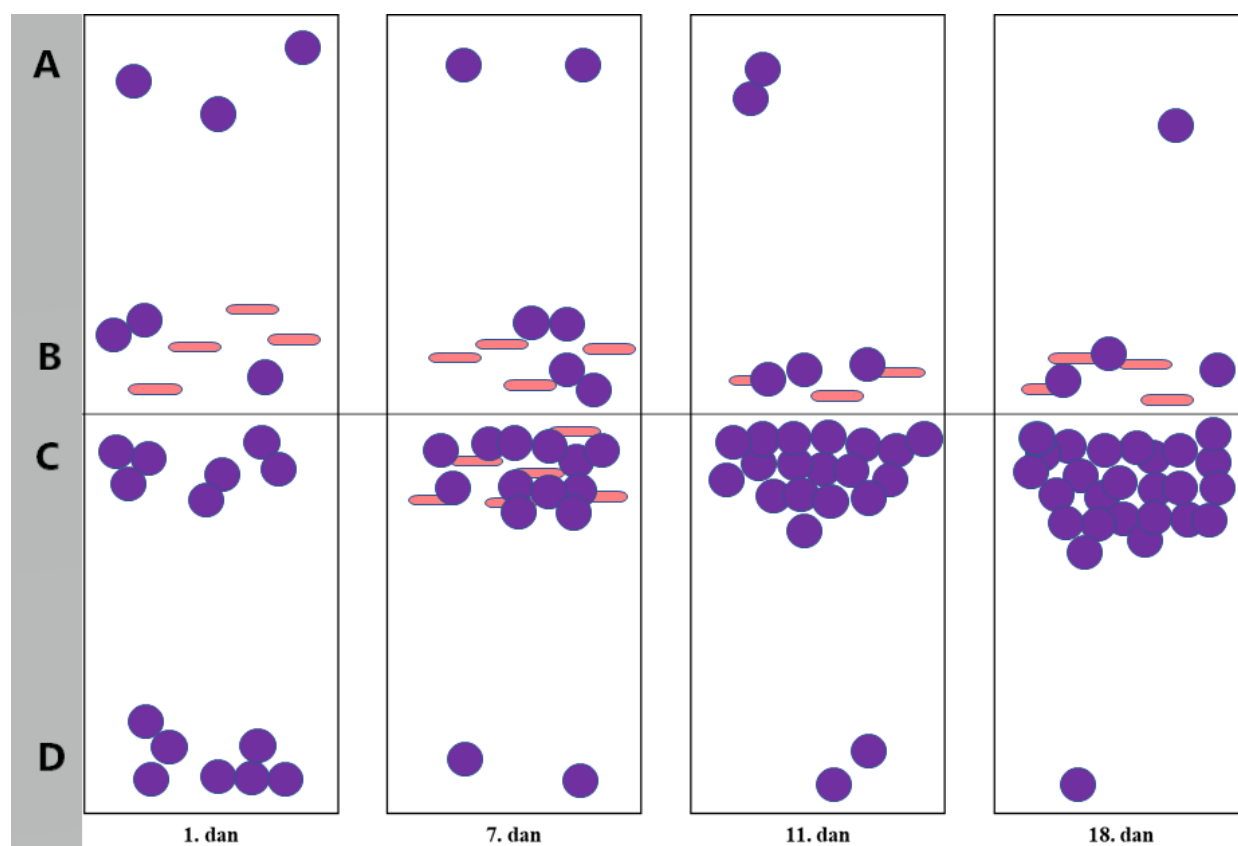
**Slika 20.** A i C Biofilm bakterija nakon osamnaest dana na krutoj podlozi dokumentiran na interfazi u uzorcima u kojima nije mijenjan medij; B i D Biofilm bakterija na krutoj podlozi dokumentiran na interfazi u uzorcima u kojima je mijenjan medij (prilagođeno iz Slike 11 i Slike 16 iz ovog rada).

Usporedbom područja interfaze koje je uronjeno u medij kod uzoraka kojima je medij mijenjan i kod onih kojima medij nije mijenjan, vidljivo je da je biomasa puno veća u uzorcima kojima nije mijenjan medij, te da se na tom području nalaze puno veće količine EPS-a, nego na istom području u uzorcima kojima je medij mijenjan (Slika 20). Jednako je uočeno i za područje interfaza-zrak.

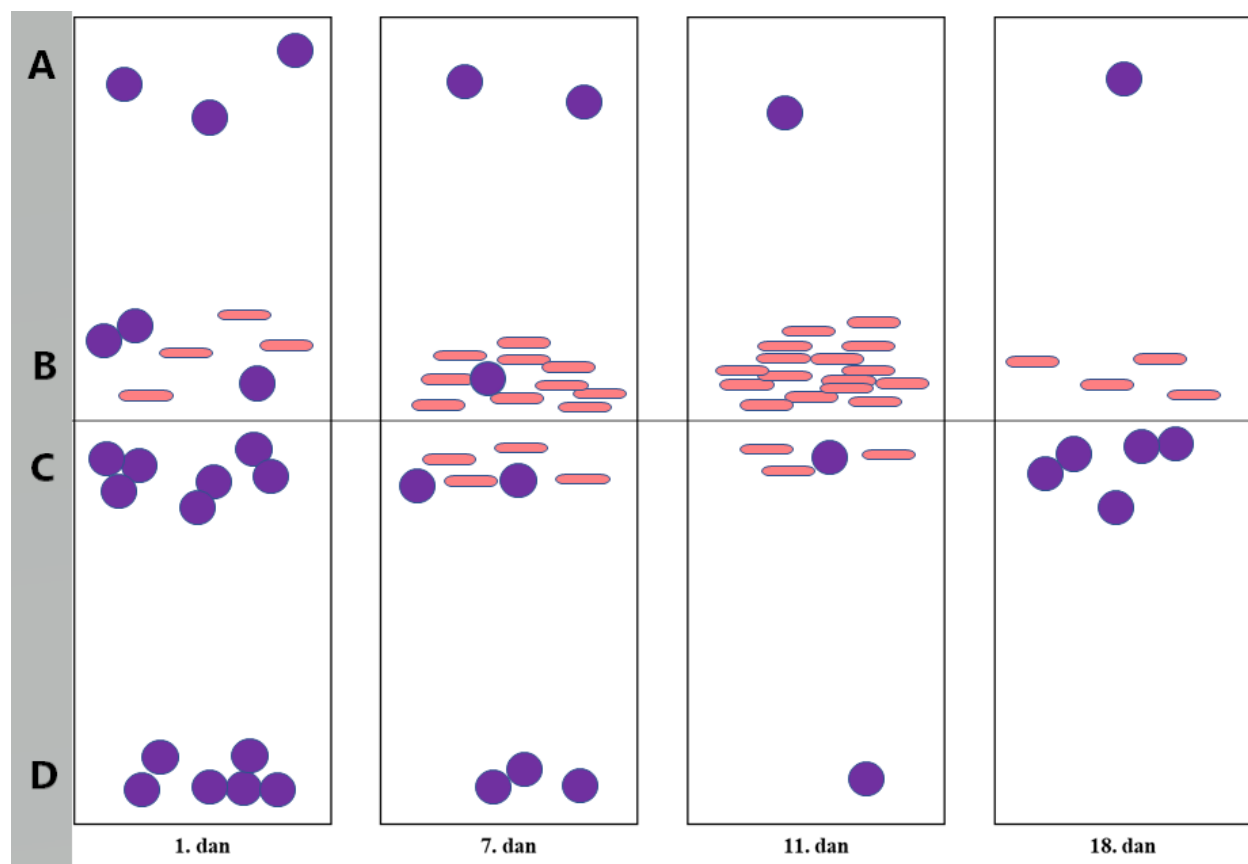


### 3.3. Predloženi model razvoja dvovrsnog bakterijskog biofilma na granici voda-zrak

Pomoću podataka dobivenih iz eksperimenata, predložen je model stvaranja viševrsnog biofilma bakterija *S. aureus* i *P. aeruginosa* na predmetnom stakalcu. Eksperiment je praćen po danima kao što je prikazano na slikama 21 i 22.



**Slika 21.** Predloženi model razvoja dvovrsnog biofilma bakterija *S. aureus* (kuglice) i bakterija *P. aeruginosa* (štapići) na predmetnom stakalcu u uvjetima bez stalnog dotoka nutrijenata (bez mijenjanja medija). A) dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak), B) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza-zrak), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza-voda) te D) dio stakalca koji se nalazi uronjen u medij (dubina). Relativna veličina stanica i brojnost nije stvarna, nego samo shematski prikaz.



**Slika 22.** Predloženi model razvoja dvovrsnog biofilma bakterija *S. aureus* (kuglice) i bakterija *P. aeruginosa* (štapići) na predmetnom stakalcu u uvjetima stalnog dotoka nutrijenata (s mijenjanjem medija). A) dio stakalca koji se nalazi u plinovitoj fazi (zrak), B) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i nije uronjen u medij (interfaza-zrak), C) dio stakalca koji se nalazi na interfazi i uronjen je u medij (interfaza-voda) te D) dio stakalca koji se nalazi uronjen u medij (dubina). Relativna veličina stanica i brojnost nije stvarna, nego samo shematski prikaz.

## 4. RASPRAVA

Obzirom na rezultate opisane u istraživanju te predloženi model stvaranja biofilma bakterija *P. aeruginosa* i *S. aureus* (poglavlje 3.3.) može se pretpostaviti da se dvovrsni biofilm stvara gotovo isključivo na granici voda/zrak, odnosno na mjestu doticaja tekućeg hranjivog medija (voda) i okolne atmosfere (zrak). Glavni razlog za to je povećana koncentracija kisika kojoj teže obje bakterije. Naime obje bakterije su fakultativni anaerobi. Fakultativni anaerobi se skupljaju na granici voda-zrak zato što aerobnim disanjem stvaraju puno više ATP-a nego anaerobnim disanjem, odnosno fermentacijom (Hogg 2005), te je aerobno disanje uvijek preferirani način stvaranja energije. Zato pretpostavljam da im rast na granici tekuće i plinovite faze odgovara, što je i opisano u radu Constantin (2009), a iste rezultate pokazuje i ovo istraživanje. Kako se u mom istraživanju vrsta *S. aureus* pojavljuje u manjim ili većim nakupinama i duboko u tekućem mediju i na interfazi, može se zaključiti da se vrsta *S. aureus* može bolje prilagoditi različitim uvjetima rasta od vrste *P. aeruginosa* koja se kroz cijeli eksperiment pruža uglavnom samo na interfazi. Obzirom da su obje vrste fakultativni anaerobi, potrebno je istražiti pretpostavku da je vrsta *S. aureus* otpornija. Moguće je da ta vrsta nema drugu opciju s obzirom da bakterija *S. aureus* nije pokretna i mora se prilagoditi uvjetima u kojima se nalazi kako bi preživjela.

Vrste iz roda *Pseudomonas* su poznate po kolonizaciji područja koja se nalaze na interfazi voda-zrak, kako pokazuju i rezultati ovog istraživanja. Slično je rađeno i u radu Wijman i sur. (2006) samo s vrstom *Bacillus cereus*. Bakterija *B. cereus* također najviše nastanjuje područje interfaze obzirom da na tom području ima i hranjive tvari, ali i kisik potreban za rast. Nedavna istraživanja prikazana u istom radu su pokazala da mutirane stanice sa smanjenom pokretljivošću ne nastanjuju u istoj mjeri područja koja se nalaze na interfazi voda-zrak. To istraživanje potvrđuje i rezultate našeg istraživanja koji ukazuju na to da se *P. aeruginosa* uglavnom nalazi na interfazi zbog mogućnosti aktivnog pokretanja, za razliku od *S. aureus* koja nema tu mogućnost. Također je dokazano da biosurfaktanti, kao što je surfaktin, potiču formaciju biofilma bakterije *B. cereus* i mogu utjecati na formaciju biofilma isključivo na određenom dijelu krute podloge, kao što je interfaza. Trebalo bi svakako istražiti kako biosurfaktanti utječu na stvaranje biofilma bakterija *S. aureus* i *P. aeruginosa*, te kako različiti uvjeti kao što su pH, temperatura ili kemijski agensi mogu utjecati na sam razvoj biofilma. Veza fizičkih i kemijskih uvjeta s napredovanjem i rastom biofilma je bitna u medicini i biotehnologiji kako bi se mogao spriječiti nastanak biofilma, ili u suprotnome potaknuti njegov razvoj.

Usporedba uvjeta rasta u kojima je medij redovito mijenjan s onima u kojima nije mijenjan ukazuju da bakterija *P. aeruginosa* preferira veću količina kisika i hranjivih tvari nego bakterija *S. aureus* obzirom da se stanice *S. aureus* nalaze većinom u uzorcima u kojima nije mijenjan medij i to na donjoj strani interfaze, u vodenom mediju. Mijenjanje medija podrazumijeva stalan dotok nutrijenata te veću koncentraciju dostupnog otopljenog kisika dok se u uzorcima u kojima medij nije mijenjan koncentracija hranjica i otopljenog kisika smanjivala tijekom trajanja eksperimenta. Takvi rezultati eksperimenta *in vitro* se ne podudaraju s podatkom da se bakterija *P. aeruginosa* na ranama koje inficira u ljudskom tijelu nalazi u dubini rane gdje se pretpostavlja da ima manje kisika, a bakterija *S. aureus* se nalazi na površini (Mulcahy i sur. 2014).

Nakon trećeg dana ovog istraživanja se prvi puta pojavljuje EPS koji je jako dobro vidljiv na interfazi kao plavo obojenje i prekriva veliku količinu bakterija *P. aeruginosa*, dok se bakterije *S. aureus* nalaze položene preko EPS-a. Kako je i opisano u radu Marić i Vraneš (2007), ekstracelularni matriks se stvara uglavnom nakon trećeg dana, iako sve ovisi o vrsti bakterije, podlozi na kojoj se razvija biofilm i mediju u kojem se razvija. U istraživanju opisanom u ovom diplomskom radu ove dvije vrste bakterija ne pokazuju specifični prostorni raspored, ali se u pojedinim fazama nastanka biofilma mogu prepoznati neke od tri vrsta prostornog raspoređivanja bakterija. U prvoj fazi nastanka biofilma stvaraju se odvojene mikrokolonije, dok se u kasnijim fazama bakterije uglavnom nalaze jedne preko drugih u slojevima na interfazi.

Pokretljivost bakterija igra ključnu ulogu u kolonizaciji na podlozi na kojoj se razvija biofilm. Bakterije se mogu podvrgnuti različitim tipovima pokretljivosti, ovisno o vrsti bakterije. Neke Gram-negativne bakterije kao što je bakterija *P. aeruginosa* mogu plivati pomoću biča kroz medij i tako nastanjivati područje koje im je pogodno za život (O'May i sur. 2011). Pili su vrlo vjerojatno najvažniji adhezini koje bakterija *P. aeruginosa* posjeduje, te su također važni za pokretljivost i formiranje biofilma. Pili dovode do agregacije (udruživanja) bakterija i formiranja mikrokolonija na ciljnim tkivima te koncentriranja bakterija na jednom mjestu, čime se štite od imunološkog sustava domaćina i djelovanja antibiotika (Craig i sur. 2004).

U radu Houry i sur. (2009) istraženo je ponašanje u biofilmu bakterije *Bacillus cereus* koja posjeduje flagelarni aparat. Neočekivano je uočeno da prisutnost flagela smanjuje adheziju bakterije na staklenu površinu. Zaključeno je da posjedovanje flagelarnog aparata u ovom slučaju ometa izravnu interakciju između bakterijske stanične stjenke i staklene površine. Nasuprot tome,

u određenim uvjetima pokretljivost potiče stvaranje biofilma. U istom radu se pokretljivost spominje kao prednost bakterija s obzirom da pomoću aparata za pokretanje mogu nastanjivati područja u biofilmu pogodna za rast pa tako bakterije kojima je kisik potreban za rast nastanjuju područja s više kisika kao što je interfaza zrak-voda. Pokretljivost je bitna stavka u širenju bakterijskog biofilma (Klausenet i sur. 2003). Flagele služe za plivanje, dok su pili tip IV odgovorni za pokretanje po podlozi. I flagele i tip IV pili su odgovorni za pričvršćivanje bakterije na krutu podlogu (O'Toole i Kolter 1998). Osim toga, ekspresiju tip IV pila kontrolira represivni katabolički protein, povezujući njegovu ekspresiju s različitim prehrambenim okruženjima. Bakterija *P. aeruginosa* koristi i drugu vrstu pokretljivosti poznatu kao kretanje u roju (eng. *swarming*). Još uvijek nije poznato potiče li takav način kretanja formiranje biofilma. U ovom istraživanju je pokazano da bakterija *P. aeruginosa* aktivno migrira na područje s više kisika.

U eksperimentu opisanom u ovom radu bakterije su koegzistirale tijekom nastajanja biofilma, ali nakon nekog vremena nastanjuju područja koja im odgovaraju te se iz tog razloga razdvajaju. Moguće je da se ovdje radi i komenzalizmu. To je oblik zajedničkog života dva organizma različitih vrsta kod kojih jedan partner (komezal) ima korist od drugog (domaćin), a da pri tome ovaj drugi nema štetu. Više izvora je pokazalo kako produkti metabolizma bakterije *S. aureus* pozitivno utječu na rast bakterije *P. aeruginosa* i iz tog razloga ona može aktivno migrirati na područje koje joj najviše odgovara. Ovo otvara nova pitanja, kao na primjer što bi se dogodilo u zajednici dviju bakterija (*S. aureus* i *P. aeruginosa*) da je eksperiment i dalje proveden kroz određen period vremena. Za razliku od rezultata ovog pokusa, Filkins i sur. (2015) u svom radu pišu kako bakterije *P. aeruginosa* i *S. aureus* određeno vrijeme koegzistiraju, a nakon toga bakterija *P. aeruginosa* ubija bakteriju *S. aureus*. Iz istog izvora pretpostavlja se da produkti bakterije *P. aeruginosa* uzrokuju drugačiji metabolizam kod bakterije *S. aureus*, pa tako ona u prisustvu produkata metabolizma bakterije *P. aeruginosa* može provoditi mliječno kiselo vrenje. U radu Hoffman i sur. (2006) pokazano je kako produkti metabolizma bakterije *P. aeruginosa* u ko-kulturi s bakterijom *S. aureus* omogućuju bakteriji *S. aureus* veću toleranciju na antibiotike, zbog čega se takve infekcije teško liječe.

U radu Alves i sur. (2018) opisano je da u fazi nastajanja biofilma bakterija *S. aureus* dominira nad bakterijom *P. aeruginosa* i ima prednost prilikom prihvaćanja na podlogu i prilikom rasta, ali u isto vrijeme promiče povećanu agregaciju bakterije *P. aeruginosa* nakon određenog perioda, što se podudara s rezultatima ovog istraživanja. U istom izvoru piše i da veliki utjecaj na

samu koagregaciju imaju i okolišni čimbenici, pa tako dvije iste bakterije u različitim uvjetima biofilma mogu bolje ili lošije surađivati, komunicirati i djelovati jedna na drugu. Kod cistične fibroze je slučaj takav da ukoliko se infekciji uzrokovanoj od strane vrste *S. aureus* pridruži i vrsta *P. aeruginosa*, bolest se puno teže liječi i nakon nekog vremena bakterija *P. aeruginosa* čak prevladava (Ahlgren i sur. 2015). Takva koinfekcija sa bakterijama *S. aureus* i *P. aeruginosa* uglavnom ima lošu prognozu za čovjeka kako kod cistične fibroze, tako i kod kroničnih rana. Prema dokazima iz istog izvora, kada je bakterija *S. aureus* prvi kolonizator u nastajanju biofilma, ona potiče prihvaćanje bakterije *P. aeruginosa* u taj biofilm. Međutim, takav efekt nije recipročan. Kada je bakterija *S. aureus* dodana u već postojeći biofilm kojeg tvori bakterija *P. aeruginosa*, ona negativno utječe na bakteriju *P. aeruginosa*. Postoji više mogućih razloga, a neki od njih su ti da utječe negativno zbog same disperzije i zauzimanja prostora i potrošnje hranjivih tvari ili zbog same bakterijske aktivnosti i nusproizvoda. Dokazano je da bakterija *S. aureus* proizvodi nukleaze koje negativno utječu na rast pojedinih patogena u biofilmovima, uključujući i bakteriju *P. aeruginosa* (Pihl i sur. 2010).

U ovom istraživanju se količina bakterija u biofilmu nakon osamnaestog dana znatno smanjila u uvjetima mijenjanja medija. Jedna od mogućnosti je da dominacija bakterija *P. aeruginosa* potiču stadij migracija stanica iz biofilma kao što je pokazano u radu Sauer i sur. (2004) gdje su istraživanja rađena na bakteriji *P. aeruginosa* i *Shewanella oneidensis*, te je dokazano da vrsta *P. aeruginosa* otpušta ramnolipide koji omogućavaju disperziju stanica i selidbu stanica na područja s više hranjivih tvari.

## 5. ZAKLJUČAK

- Iz opisanih rezultata može se zaključiti da se dvovrsni biofilm bakterija *P. aeruginosa* i *S. aureus* dominantno formira na području interfaze voda-zrak, odnosno na doticaju hranjivog medija s zrakom.
- Uvjeti rasta gdje je prisutan stalan dotok hranjivih tvari više odgovara bakteriji *P. aeruginosa*, a uvjeti rasta gdje nema dotoka novih nutrijenata bakteriji *S. aureus*. Kako su stanice *S. aureus* bile prisutne na svim dijelovima podloge za uzgoj biofilma (predmetno stakalce) kako u tekućem mediju tako i na granici medij-zrak, a stanice *P. aeruginosa* gotovo isključivo na granici medij-zrak može pretpostaviti da su bakterije *S. aureus* bolje prilagođene na preživljavanje u biofilmu u nepovoljnim uvjetima (smanjena količina nutrijenata i kisika).
- Najveća masa ekstracelularnog matriksa se nalazi na interfazi i prekriva bakteriju *P. aeruginosa*, dok se bakterija *S. aureus* nalazi položena na matriks te se može zaključiti da se ove dvije bakterije u biofilmu nalaze u slojevima i to na način da stanice *S. aureus* prekrivaju stanice *P. aeruginosa*.
- Bakterije *S. aureus* i *P. aeruginosa* su koegzistirale prilikom stvaranja biofilma, no nakon vremena se ove dvije vrste razdvajaju vjerojatno zbog toga što stanice bakterije *P. aeruginosa* aktivno migrira na područje s više kisika putem aktivnog sustava za pokretanje.

## 6. POPIS LITERATURE

1. Ahlgren, H. G., Benedetti, A., Landry, J. S., Bernier, J., Matouk, E., Radzioch, D., Lands, L. C., Rousseau, S., Nguyen, D. (2015): Clinical outcomes associated with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* airway infections in adult cystic fibrosis patients. *BMC Pulm Med.*, 15:67-73
2. Allesen-Holm, M. (2006): A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol.*, 59:1114-1128
3. Balcht, A., Smith, R. (1994): *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and Treatment. *Informa Health Care*, 7:83-84
4. Bandara, H. M., Yau, J. Y., Watt, R. M, Jin, L. J., Samaranayake, L. P. (2010): *Pseudomonas aeruginosa* inhibits *in-vitro* *Candida* biofilm development. *BMC Microbiol.*, 10:125-134
5. Bassler, B. L. (1999): How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.*, 2:582-587
6. Chobert, M., Jahn, D. (2010): Anaerobic physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol.*, 300 (8): 549-556
7. Christensen, B. B., Haagensen, J. A., Heydorn, A., Molin, S. (2002): Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Appl Environ Microbiol.*, 68:2495-2502
8. Craig, L., Pique, M. E., Tainer, J. A. (2004): Type 4 pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.*, 2:363-378
9. Dankert, J., Hogt, A. H., Feijen, J. (1986): Biomedical polymers, bacterial adhesion, colonisation and infection. *Crit Rev Biocompat.*, 2:219-301
10. Delden, C., Iglewski, B. H. (1998): Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.*, 4:551-560
11. Deligianni, E., Pattison, S., Berrar, D., Ternan, N. G., Haylock, R. W., Moore, J. E., Elborn, S. J., Dooley, J. S. G. (2010): *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability *in vitro*. *BMC Microbiol.*, 10:38-51
12. Donlan, R. M. (2002): Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg infect Dis.*, 9:881-890



13. Elias, S., Banin, E. (2012): Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev.*, 36:990-1004
14. Filkins, L. M., Graber, J. A., Olson, D. G., Dolben, E. L., Lynd, L. R., Bhujju, S., O'Toole, G. A. (2015): Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* drives *S. aureus* towards fermentative metabolism and reduced viability in a cystic fibrosis model. *J Bacteriol.*, 197:2252–2264
15. Gibbons, R. J., Nygaard, M. (1970): Interbacterial aggregation of plaque bacteria. *Arch Oral Biol.*, 15:1397-1400
16. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. (2004): Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.*, 2:95-108
17. Hentzer, M., Givskov, M. (2003): Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.*, 112:1300-1307
18. Hoffman, L.R., Deziel, E., D'Argenio, D.A., Lepine, F., Emerson, J., McNamara, S., Gibson, R.L., Ramsey, B.W., Miller, S.I. (2006): Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci.*, 103:19890-19895
19. Hogg, S. (2005): Essential Microbiology (1st ed.) Wiley. pp. 99–100
20. Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., Gohar, M. (2010): Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiol.*, 4:1009-1018
21. <http://www.sci-news.com/medicine/new-way-attack-staphylococcus-aureus-04109.html> (pristupljeno: 18. veljače 2018.)
22. <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/staphylococcal.html> (pristupljeno: 18. veljače 2018.)
23. [https://www.researchgate.net/figure/Scanning-electron-microscopy-images-of-Pseudomonas-aeruginosa-isolates-attaching-to-glass\\_41416085\\_fig1](https://www.researchgate.net/figure/Scanning-electron-microscopy-images-of-Pseudomonas-aeruginosa-isolates-attaching-to-glass_41416085_fig1) (pristupljeno: 18. veljače 2018.)
24. Klausen, M., Gjermansen, M., Kreft, J. U., Tolker-Nielsen, T. (2006): Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiol Lett.*, 261:1-11
25. Lawrence, R. M., Vincent, M. I., Kim, L. (2014): *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol.*, 68:1-12

26. Marić, S., Vraneš, J. (2007): Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Period Biolog.*, 109:115-121
27. Masalha, M., Borovok, I., Schreiber, R., Aharonowitz, Y., Cohen, G. (2001): Analysis of Transcription of the *Staphylococcus Aureus* Aerobic Class Ib and Anaerobic Class III Ribonucleotide Reductase Genes in Response to Oxygen. *J Bacteriol.*, 183: 7260-7272
28. Monroe, D. (2007): Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol.*, 5:307-311
29. Mulcahy, L. R., Vincent, M., Lewis, I., K. (2014): *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microb Ecol.*, 68:1-12
30. O'May, C., Tufenkji, N. (2011): The Swarming Motility of *Pseudomonas aeruginosa* Is Blocked by Cranberry Proanthocyanidins and Other Tannin-Containing Materials. *Appl Environ Microbiol.*, 77:3061-3067
31. O'Toole, G. A., Kolter, R. (1998): Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.*, 28:449-461
32. Pihl, M., Davies, J. R., Chavez, P., Svensater, G. (2010): Differential effects of *Pseudomonas aeruginosa* on biofilm formation by different strains of *Staphylococcus eidermidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 59:439-446
33. Pollitt, E. J. G., Crusz, S. A., Diggle, S. P. (2015): *Staphylococcus aureus* forms spreading dendrites that have characteristics of active motility. *Sci. Rep.*, 5:327-331
34. Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E., Handley, P. S. (2003): Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.*, 11:94-100
35. Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A. H., Davies, D. G., Gilbert, P. (2004): Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. *J Bacteriol.*, 26:7312-7326
36. Schlafer, S., Meyer, R. L. (2016): Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *Journal Microbiol Methods.*, 138:50-59

37. Schlecht, L. M., Freiberg, J. A., Hänsch, G. M., Peters, B. M., Shirtliff, M. E., Krom, B. P., Filler, S. G. Jabra-Rizk, M. A. (2015): Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology.*, 161:168-181
38. Schramm, A., Larsen, L. H., Revsbech, N. P. (1996): Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Appl Environ Microbiol.*, 62:4641-4647
39. Stewart, P. S., Costerton, J. W. (2001): Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 358:135-138
40. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W. (2002): Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, 56:187-209
41. Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler, V. G. (2015): *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.*, 28:603-661
42. Van Delden, C., Iglewski, B. H. (1998): Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.*, 4:551-555
43. Vraneš, J., Leskovar, V. (2009): Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Med Glas.*, 6:147-164
44. 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
45. Winstanley, C., Fothergill, J. L. (2009): The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol Lett.*, 290:1-9
46. Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Hoiby, N., Molin, S., Song, Z. (2011): Current understanding of multi-species biofilms. *Int J Oral Sci.*, 3:74-81
47. Zago, C. E., Silva, S., Sanitá, P. V., Barbugli, P. A., Dias, C. M. I., Lordello, V. B., Vergani, C. E. (2015): Dynamics of Biofilm Formation and the Interaction between *Candida albicans* and Methicillin-Susceptible (MSSA) and -Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLoS One.*, 10:1-15

## 7. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Daniela Oršolić

Datum i mjesto rođenja: 02. 03. 1994., Slavonski Brod, Hrvatska

E-mail adresa: daniela.orsolic@gmail.com

### OBRAZOVANJE:

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

2008. – 2012. Opća Gimnazija Županja

### VJEŠTINE:

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

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

Vozačka dozvola: B kategorija