

# Novootkriveni oblik bakterijske pokretljivosti putem biofilma

---

**Percela, Marko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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:217:769807>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Marko Percela

**Novootkriveni oblik bakterijske pokretljivosti putem biofilma**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2019.



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 magistra edukacije biologije i kemije.

## ZAHVALA

*Prvenstveno se zahvaljujem svome mentoru doc. dr. sc. Tomislavu Ivankoviću koji mi je omogućio izradu diplomskog rada pod svojim vodstvom na Zavodu za mikrobiologiju.*

*Također, zahvaljujem se na ukazanom povjerenju, uljudnosti i profesionalnosti.*

*Beskrajno se zahvaljujem svojim divnim roditeljima, Vesni i Dragutinu koji su mi bili velika podrška tijekom cijelog mog obrazovanja, a naročito tijekom studija. Hvala Vam što ste mi dali usmjerenje u životu i što ste vjerovali u mene.*

*Hvala i mom bratu Danielu koji mi je svojim ponašanjem oduvijek bio uzor.*

*Neizmjereno se zahvaljujem svojim najboljim prijateljima Marku i Domagoju koji su mi puno pomogli i uljepšali mi sve godine mog studiranja. Velika hvala i ostalim prijateljima i kolegama uz čiju sam suradnju dospio tu gdje jesam.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj prekrasnoj djevojci Franki koja mi je također bila velika potpora.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Novootkriveni oblik bakterijske pokretljivosti putem biofilma**

Marko Percela

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Biofilm se najčešće opisuje kao zajednica mikroorganizama pričvršćenih na podlogu i uklopljenih u matriks izvanstanične polimerne tvari (engl. *extracellular polymeric substance*, *EPS*). Pokretljivost je ključna za razne oblike bakterijskog ponašanja kao što je virulencija, kolonizacija novih staništa pa tako i stvaranje biofilma. S obzirom da se infekcije uzrokovane biofilmom puno teže liječe zbog veće rezistencije na antimikrobnu terapiju, istraživanja na području biofilma i bakterijske pokretljivosti mogu dati vrlo korisne informacije za formiranje strategija kontrole bakterijskih infekcija. Za istraživanje su korištene bakterije *Acinetobacter baumannii* i *Bacillus cereus*. Cilj istraživanja bio je pobliže istražiti oblik bakterijske pokretljivosti, pri kojoj bakterijske stanice migriraju iz biofilma formiranog na sučelju zraka i tekućine vertikalno gore po čvrstoj, inertnoj staklenoj površini koja nije bila u doticaju s hranjivim medijem. Za vizualizaciju bakterija, preparati su se bojili Alcian blue metodom. Zaključeno je da viša koncentracija bakterija pogoduje bržem i snažnijem formiranju biofilma te da biofilm prethodi i posreduje u napredovanju bakterija. Također, zaključeno je da napredovanje bakterija putem biofilma omogućuju kapilarne sile i aktivni oblici bakterijske pokretljivosti.

(53 stranice, 26 slika, 37 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: biofilm, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, pokretljivost, interfaza, koncentracija

Voditelj: dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Jasna Hrenović, doc. dr. sc. Marina Sertić Perić, izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Rad prihvaćen: 5.9.2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **Biofilm advance as a newly described form of bacterial mobility**

Marko Percela

Rooseveltovej trg, 6, 10000 Zagreb, Croatia

Biofilm is most commonly described as a consortium of microorganisms attached to a solid surface and incorporated into an extracellular polymeric substance. Mobility is crucial for various forms of bacterial behavior such as virulence, colonization of new habitats and thus biofilm formation. Given that biofilm infections are much more difficult to treat because of their higher resistance to antimicrobial therapy, research on biofilm and bacterial motility can provide very useful information for developing bacterial infection control strategies. In this research, bacteria *Acinetobacter baumannii* and *Bacillus cereus* were used. The goal of the study was to investigate more closely the form of bacterial motility, in which bacterial cells migrate from the biofilm formed at the air-liquid interface vertically upwards over a solid, inert glass surface that was not covered with nutrient medium. For the visualization of bacteria, the preparations were stained using alcian blue method. It was concluded that higher bacterial concentration favors faster and stronger biofilm formation and that biofilm precedes and mediates bacterial progress. Also, it was concluded that bacterial mobility was facilitated by capillary forces and active forms of bacterial motility.

(53 pages, 26 figures, 37 references, original in: Croatian )

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: biofilm, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, motility, air-liquid interface, concentration

Supervisor: dr. sc. Tomislav Ivanković

Reviewers: prof. dr. sc. Jasna Hrenović, doc. dr. sc. Marina Sertić Perić, izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Thesis accepted: 5.9.2019.

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Biofilm.....	1
1.2. Bakterijska pokretljivost.....	4
1.3. Kapilarnost.....	8
1.4. Bakterijska vrsta <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	9
1.5. Bakterijska vrsta <i>Bacillus cereus</i> .....	11
1.6. Cilj istraživanja.....	12
2. MATERIJALI I METODE.....	13
2.1. Priprava bakterijske suspenzije.....	13
2.2. Priprava bakterijske suspenzije različitih koncentracija.....	13
2.3. Priprava otopine za kontrolne uzorke.....	14
2.4. Priprava staklenih predmetnih stakalaca.....	14
2.5. Početak eksperimenta.....	15
3. REZULTATI.....	18
3.1. Kontrola.....	18
3.2. Praćenje biofilma bakterije <i>Acinetobacter baumannii</i> i napredovanje bakterija pri koncentraciji $10^3$ bakterija po mL.....	20
3.3. Praćenje biofilma bakterije <i>Acinetobacter baumannii</i> i napredovanje bakterija pri koncentraciji $10^7$ bakterija po mL.....	23
3.4. Praćenje biofilma bakterije <i>Bacillus cereus</i> i napredovanje bakterija pri koncentraciji $10^3$ bakterija po mL.....	26
3.5. Praćenje biofilma bakterije <i>Bacillus cereus</i> i napredovanje bakterija pri koncentraciji $10^7$ bakterija po mL.....	29
3.6. Usporedba biofilma bakterija <i>Acinetobacter baumannii</i> i <i>Bacillus cereus</i> te napredovanja bakterija pri koncentraciji $10^3$ bakterija po mL u sterilnoj vodi.....	31



3.7. Usporedba biofilma bakterija <i>Acinetobacter baumannii</i> i <i>Bacillus cereus</i> te napredovanja bakterija pri koncentraciji $10^7$ bakterija po mL u sterilnoj vodi.....	35
3.8. Predloženi model napredovanja bakterija i boje po staklenom predmetnom stakalcu.....	38
4. RASPRAVA.....	42
5. ZAKLJUČAK.....	48
6. POPIS LITERATURE.....	49
7. ŽIVOTOPIS.....	53

# 1. UVOD

## 1.1. Biofilm

Mikroorganizmi u prirodi mogu egzistirati kao planktonski organizmi koji slobodno plivaju u tekućem mediju u obliku individualnih stanica ili u obliku sesilne zajednice - biofilma (Vraneš i Leskovar 2009). Biofilm je izrazito rasprostranjen način života bakterija i najčešće nastaje na granici između dva agregatna stanja (čvrsto i tekuće, čvrsto i plinovito, tekuće i plinovito). Biofilm se najčešće opisuje kao zajednica mikroorganizama pričvršćenih na podlogu i uklopljenih u matriks izvanstanične polimerne tvari (engl. *extracellular polymeric substance, EPS*) kojega sami proizvode. Stanice biofilma ispoljavaju izmijenjen fenotip uslijed promjene brzine razmnožavanja i transkripcije gena što se ne uočava u planktonskim bakterijama. Vanstanični matriks temeljna je komponenta biofilma, a ujedno određuje i njegova fizikalno-kemijska svojstva. Izvanstanična polimerna tvar pretežno se sastoji od polisaharida, proteina, nukleinskih kiselina i lipida. Život u obliku biofilma ima mnoge prednosti za mikroorganizme, a upravo se matriks smatra jednim od najvažnijih elemenata biofilma koji im osigurava te prednosti. Matriks ima više uloga u biofilmu. Osim što posreduje u prijanjanju bakterija za površinu, štiti mikroorganizme od raznih stresnih uvjeta poput nedostatka vode i hrane te nepovoljnih vanjskih utjecaja koji mogu biti kemijski, biološki i mehanički. Primjeri takvih utjecaja su promjene pH vrijednosti, promjene temperature, UV zračenje, promjene koncentracije kisika, antibiotici, antiseptici, imunološka obrana domaćina ili napadi protozoa koji se hrane bakterijama (Vatansever i Turetgen 2018). Matriks pruža mehaničku stabilnost biofilmu, primjerice tako da štiti uklopljene stanice biofilma od kidanja uzrokovanim protjecanjem vode. Matriks biofilma djeluje i kao vanjski probavni sustav jer se u njemu nalaze ekstracelularni enzimi koji se nalaze u neposrednoj blizini stanica omogućavajući im metaboliziranje hranjivih tvari (Flemming i Wingender 2010).

Stanice biofilma mogu međusobno komunicirati što je važno za održavanje ovakve višestanične zajednice. Međustanična komunikacija posredovana je malim signalnim molekulama koje difundiraju u izvanstanični okoliš. Nakupljanje signalnih molekula u

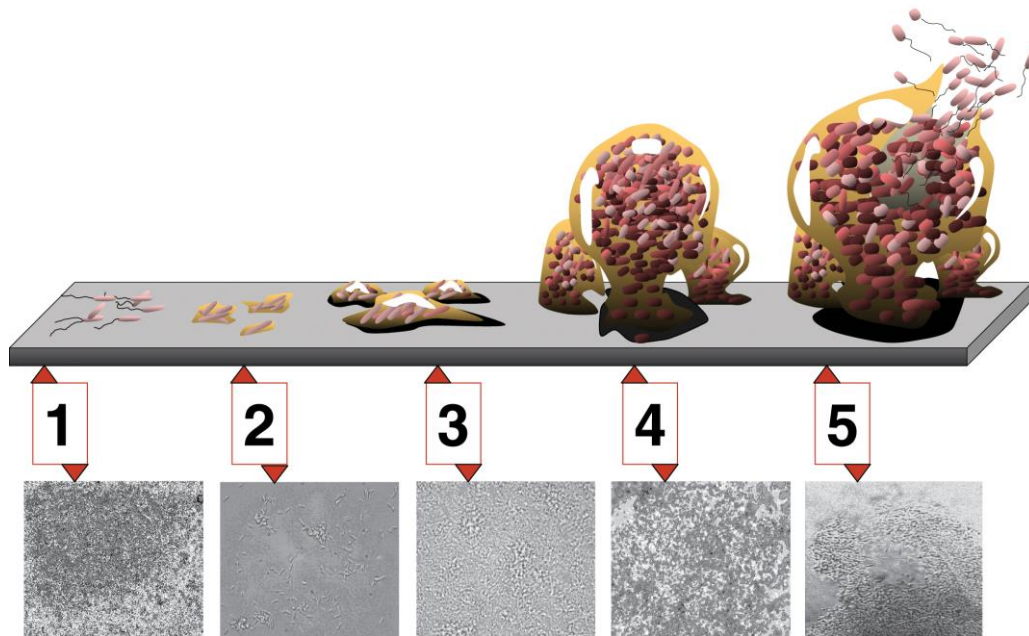
okolišu omogućuje pojedinim bakterijskim stanicama procjenu stanične gustoće, odnosno ukupni broj bakterija, a ta se pojava naziva detekcija kvoruma (engl. *Quorum sensing*). Signalne molekule kod gram-negativnih bakterija su N-acil-homoserinski laktoni (AHL), a kod gram-pozitivnih bakterija su to mali ili modificirani peptidi. Postojanje međustanične komunikacije važno je za održavanje ovakve višestanične zajednice (Vraneš i Leskovar 2009).

Biofilm može formirati i samo jedna vrsta bakterija, no češće se sastoji od više vrsta bakterija ili bakterija i gljiva. Lako se formira na raznim površinama, živućim i neživućim, primjerice metalu, plastici, kamenu, česticama zemlje, medicinskim implantatima te tkivu. Iz tog razloga, biofilm uzrokuje probleme u industrijskim postrojenjima i zdravstvenoj skrbi. U industrijskim postrojenjima biofilm može uzrokovati probleme poput smanjenja kapaciteta izmjene topline, razne gubitke učinkovitosti, smanjenje kvalitete vode, biokoroziju (deterioraciju metalnih materijala u prisutnosti biofilma) vodenih sustava u industriji, naftnih cjevovoda te razne ostale opreme (Vatansever i Turetgen 2018; Vraneš i Leskovar 2009). U medicini se biofilm povezuje s brojnim kroničnim infekcijama te različitim infekcijama biomaterijala poput katetera, proteza, implantata te raznih medicinskih naprava poput stentova, sonda i slično. Mogućnost disperzije stanica ili agregata iz biofilma može rezultirati nastankom embolusa ili pak infekcijama mokraćnog ili krvožilnog sustava. Prema procjenama, biofilm se povezuje s gotovo dvije trećine bolničkih bakterijskih infekcija. Bez obzira radi li se o kroničnoj infekciji ili infekciji biomaterijala, biofilm-infekcije imaju iste kliničke karakteristike, a to su spor nastanak na jednom ili više mjesta u organizmu te kasna pojava simptoma bolesti (Vraneš i Leskovar 2009).

S obzirom da su bakterijske stanice zaštićene ekstracelularnim polimernim matriksom, infekcije uzrokovane biofilmom puno se teže liječe zbog veće rezistencije na antimikrobnu terapiju. Razvijeni biofilm može podnijeti 10 do 1000 puta višu koncentraciju antimikrobnih lijekova od one koja je potrebna da ubije planktonske bakterije. Iz tog razloga često se ne uspijeva uništiti sesilna zajednica mikroorganizama te simptomi bolesti nestaju tek nakon uklanjanja biofilma kirurškim zahvatom ili odstranjenjem inficiranog biomaterijala. Također, u biofilmu se bakterijama višestruko povećava otpornost na dezinficijense. Zbog toga je otežano pranje takvih površina, a

oprane i vizualno čiste površine mogu i dalje sadržavati biofilm u kojem se nalaze mikroorganizmi koji nanovo omogućavaju njegovo formiranje (Kentache i sur. 2017). Iz ovih razloga, biofilm-infekcije jedne su od najvećih izazova medicine 21. stoljeća. Biofilmovi mogu imati i pozitivne učinke. Poznato je da sudjeluju u razgradnji brojnih onečišćivača okoliša, da razgrađuju i stvaraju organske tvari te da sudjeluju u kruženju dušika, sumpora i drugih elemenata u prirodi. Nažalost, negativna djelovanja biofilma daleko su brojnija od onih pozitivnih.

Formiranje biofilma odvija se u više razvojnih stadija (Slika 1). Prvi stadij u formiranju biofilma naziva se reverzibilno povezivanje. U ovom stadiju planktonske stanice dolaze u kontakt s površinom supstrata, no neke se bakterije vežu samo trenutno, nakon čega se odvajaju. (1) U drugom stadiju dolazi do ireverzibilnog vezanja stanica za površinu supstrata. Stanice gube sposobnost pokretljivosti te nastaje stabilna veza između stanica i površine supstrata koja je posredovana adhezinima na staničnoj stijenci bakterija. (2) Slijedi treći stadij - maturacija I, u kojem dolazi do proliferacije i nakupljanja bakterijskih stanica u višeslojne stanične nakupine te stvaranja izvanstaničnog polisaharidnog matriksa. (3) Četvrti stadij - maturacija II, podrazumijeva dostizanje maksimalne veličine slojeva bakterija. Kada su se usporedile stanice iz stadija maturacije s planktonskim stanicama, dokazalo se da postoje velike razlike u strukturi proteina, a to ukazuje na bitnu razliku u svojstvima planktonskih bakterija i bakterija biofilma. Posljednji stadij u formiranju biofilma je disperzija. (5) U ovom se stadiju bakterije odvajaju iz biofilma i ponovno dobivaju sposobnost pokretljivosti koja im omogućuje da formiraju kolonije na drugim mjestima. Do odvajanja stanica može doći pasivnim putem, primjerice struganjem i erozijom. Postoje i razni mehanizmi odvajanja za koje su odgovorne stanice biofilma, a razlog tome može biti potraga za novim i boljim izvorom hranjivih tvari. (Sauer i sur. 2002; Vraneš i Leskovar 2009).

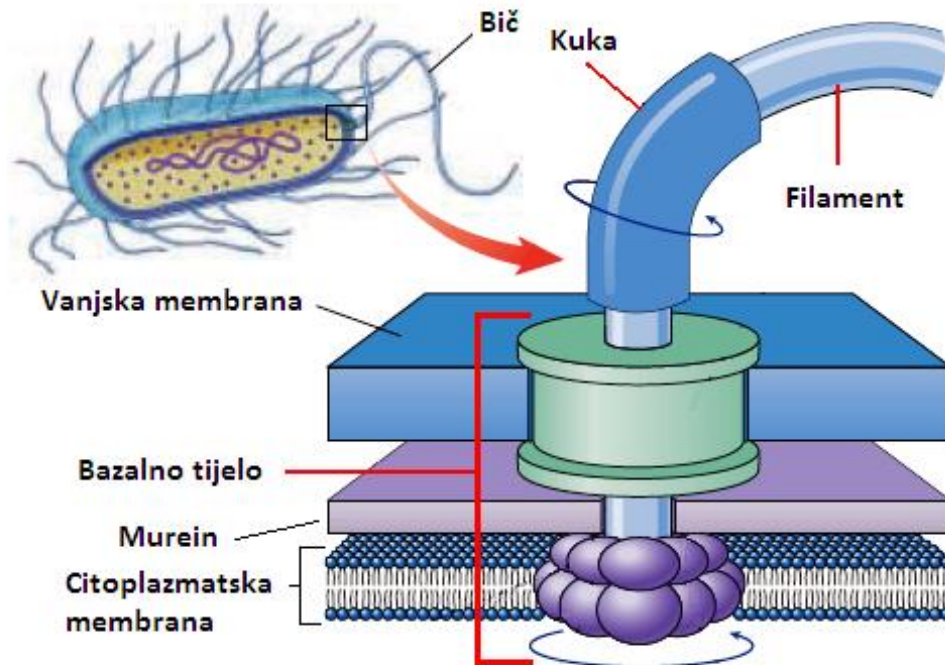


Slika 1. Shematski prikaz modela razvoja bakterijskog biofilma koji se sastoji od 5 stadija: 1) reverzibilno povezivanje, 2) ireverzibilno povezivanje, 3) maturacija I, 4) maturacija II i 5) disperzija. Svaki stadij razvoja biofilma je uparen s mikroskopskom slikom razvoja biofilma bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. (Monroe 2007; preuzeto s <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0050307>)

## 1.2. Bakterijska pokretljivost

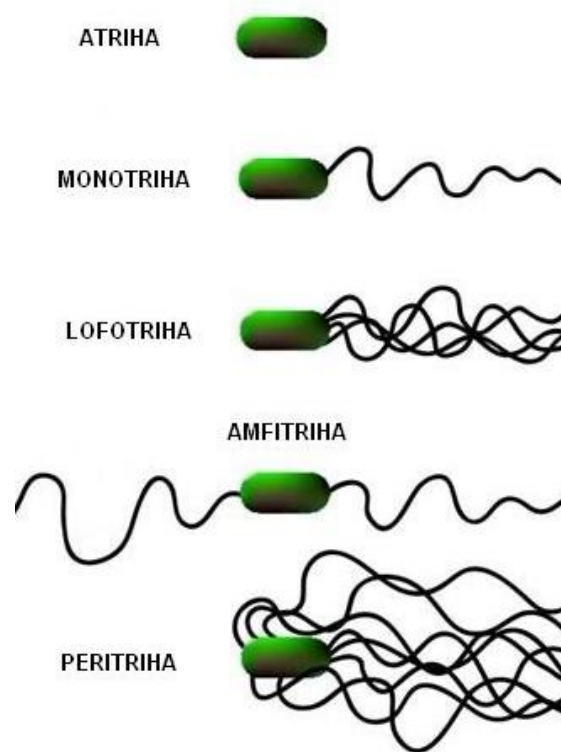
Antonie van Leeuwenhoek prvi je otkrio bakterije i protiste te je zbog toga priznat kao otac mikrobiologije. Osim toga, on je prvi pisao o pokretljivosti bakterija (Lane 2015). Od tada su provedena mnoga istraživanja koja detaljno opisuju različite načine kretanja bakterija. Pokretljivost je ključna za razne oblike bakterijskog ponašanja kao što je stvaranje biofilma, virulencija i kolonizacija raznih staništa (Pollitt i Diggle 2017). Sposobnost kretanja bakterija ključna je i za njihov opstanak u raznim staništima. U tekućim medijima bakterije se konstantno kreću; mogu se kretati aktivno koristeći flagele ili pasivno Brownim kretanjem ili strujanjem fluida (Mitchell i Kogure 2006; Pollitt i Diggle 2017). Prilikom aktivnog kretanja, neke bakterije plivaju pomoću struktura koje se

nazivaju bičevi ili flagele. Bičevi su tanke i duge strukture (12-25  $\mu\text{m}$ ) čija duljina može biti i nekoliko puta veća od duljine same stanice.



Slika 2. Građa biča bakterija. (Preuzeto s <https://www.pmf.unizg.hr/biol/predmet/biv>)

Bič bakterija sastoji se od tri dijela, a to su bazalno tijelo koje učvršćuje cijelu strukturu u stanici, filament koji se pokreće poput propelera i kuka koja povezuje bazalno tijelo i filament (Jarell i McBride 2008). Bičevi su građeni od bjelančevine flagelina. Izbijaju iz bazalnih tjelešaca koja su smještena na unutarnjoj strani citoplazmatske membrane i dijelom na staničnoj stijenci. Pokretačka snaga većine bičeva potječe od protonske pumpe. Broj i položaj bičeva mogu biti različiti i često služe u identifikaciji pojedinih vrsta bakterija. S obzirom na broj i položaj bičeva razlikujemo atrihne (nemaju flagele), monotrihne (bič je smješten na jednom od polova stanice), lofotrihne (više bičeva na jednom polu stanice), amfitrihne (jedan ili više bičeva na oba pola stanice) te peritrihne bakterije (mnogo bičeva po cijeloj površini stanice).



Slika 3. Raspored bičeva na bakterijskoj stanici. (Preuzeto s <https://www.pmf.unizg.hr/biol/predmet/biv>)

Bakterije mogu živjeti i kao sesilni organizmi u biofilmovima, no zapaženo je da bakterije na čvrstim površinama nisu u potpunosti sesilne. Uz mogućnost formiranja biofilma mogući su i različiti oblici pokretljivosti. Naime, opisano je nekoliko aktivnih oblika bakterijske pokretljivosti po čvrstoj inertoj površini koji mogu biti svrstani u tri kategorije: kretanje u roju, trzanje i klizanje (engl. *swarming*, *twitching and gliding*), a posredovane su bičevima, pilima tipa IV ili ostalim organima za pokretanje koji još nisu dovoljno istraženi (Kearns 2010; Jarell i McBride 2008).

Kretanje u roju (engl. *swarming*) je oblik pokretljivosti koji se definira kao brza višestanična bakterijska pokretljivost po supstratu pomoću rotirajućih bičeva (Kearns 2010). Razlikuje se od plivanja po tome što se plivanje pomoću rotacije bičeva kod individualnih stanica odvija u tekućem mediju. Za ovaj oblik pokretljivosti generalno je potreban energetski bogat hranjivi medij. Ovaj oblik pokretljivosti je potaknut visokim

stopama rasta, što ujedno može biti i razlog zašto je potreban medij koji je energetski bogat. Iako se neke bakterije mogu na taj način kretati na skoro svim vrstama agarских površina, za većinu bakterija potreban je meki agar usko određene koncentracije. Hranjivi mediji koji su očvršnuti koncentracijom agara iznad 0,3 % isključuju plivanje, čime su bakterije prisiljene na kretanje u roju. Koncentracije agara iznad 1 % onemogućuje kretanje u roju. Voda je također ključan faktor za ovakav oblik pokretljivosti. Premalo vode otežava kretanje u roju te daje loše rezultate, dok previše vode može potaknuti bakterije na plivanje. Većina bakterija koja se kreće na ovaj način pripada peritrihnom obliku bakterija, dakle posjeduju mnogo bičeva koji su raspoređeni nasumično po cijeloj površini stanice. Iako je kod nekih vrsta bakterija moguće pokretati se ovim oblikom pokretljivosti uz pomoć samo jednog biča, broj bičeva generalno poraste kod prelaska iz plivanja u oblik kretanja u roju (engl. *swarming*). Razlog tome još nije dokazan, no pretpostavlja se da je stvaranje većeg broja bičeva prilagodba kojom se omogućava lakše kretanje po površini zbog manje potrebe za energijom. Mnoge bakterije luče razne surfaktante koji olakšavaju takvo kretanje. Ovaj oblik pokretljivosti karakteristika je bakterija kao što su *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* i *Proteus mirabilis* (Kearns 2010.)

Trzanje (engl. *twitching*) je također oblik kretanja bakterija po čvrstoj površini pomoću pokretnih organela pili tipa 4. Ovaj oblik kretanja uključuje izduživanje, pričvršćivanje i povlačenje tog organela što rezultira trzajnim oblikom kretanja (Jarell i McBride 2008). Neke bakterijske vrste kod kojih je opisan ovaj oblik pokretanja su *Neisseria gonorrhoeae*, *P. aeruginosa*, *Clostridium perfringens* i *Acinetobacter baumannii* (Jarell i McBride 2008; Antunes i sur. 2011).

Klizanje (engl. *gliding*) je oblik pokretljivosti bakterija po čvrstoj površini koji ne uključuje aktivno pokretanje pomoću organela kao što su bičevi ili pili. Spoznaje o ovom načinu kretanja su ograničene, no postoje neki od predloženih mehanizama koji opisuju ovakav oblik kretanja. To su primjerice rotiranje stanica, deformacija vanjske membrane i sekrecija sluzi po kojoj se bakterije kreću. Te mehanizme potkrepljuje trag sluzi koji ostaje iza bakterija. Bakterijske vrste prema kojima su opisani modeli gibanja pomoću rotacije i sluzi su *Myxococcus xanthus* te *Flavobacterium johnsoniae* (Jarell i McBride 2008).



Jedan od aktivnih oblika bakterijske pokretljivosti je i (engl. *surfing*). Tim terminom opisana je vrlo ubrzana pokretljivost *P. aeruginosa* na površini mekog agara uz prisutnost mucina. Predloženo je da glikoprotein mucin služi kao lubrikant koji potpomaže ovom obliku površinske pokretljivosti. (Yeung i sur. 2012)

Dodatni oblik bakterijske pokretljivosti je (engl. *sliding*) i spada u pasivan oblik pokretljivosti. U ovom slučaju bakterije se pokreću potisnom silom stanica koje se dijele te uz pomoć raznih faktora koji potpomažu u širenju stanica po površini. To mogu biti surfaktanti koji smanjuju trenje između stanica i supstrata, ali i drugi spojevi poput egzopolisaharida, hidrofobnih proteina ili glikopeptidolipida koji također potpomažu ovom obliku kretanja. Primjeri bakterija koje se tako pokreću su *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* i *P. aeruginosa* (Holscher i Kovacs 2017).

Istraživanja na području bakterijske pokretljivosti općenito, pokretljivosti po čvrstim površinama te struktura i mehanizama koji omogućuju bakterijsku pokretljivost mogu dati vrlo korisne informacije za formiranje strategija kontrole bakterijskih infekcija.

### **1.3. Kapilarnost**

Kapilarnost je pojava podizanja ili spuštanja tekućine uz rub uskih cijevi. Ova pojava tumači se međumolekularnim silama koje djeluju na molekule u tekućinama, a to su adhezija i kohezija. Adhezijske sile su sile između različitih molekula, npr. vode i stakla posude u kojoj se voda nalazi, a kohezijske sile su sile koje djeluju između istovrsnih molekula. Ako su adhezijske sile između tekućine i stijenke posude jače od kohezijskih sila, tada se tekućina penje uz stijenku posude. Kada su kohezijske sile jače, tada se tekućina spušta niz stijenku posude. Primjer može biti voda koja se penje i živa koja se spušta uz stijenku posude. Kapilarne pojave mogu se objasniti i površinskom napetošću tekućine. U cijevi u kojoj tekućina moči stijenku, sila površinske napetosti koja djeluje na molekule na površini ima rezultantu prema gore pa se tekućina diže uz stijenke. Kod tekućina koje ne moče stijenke cijevi, sila površinske napetosti daje rezultantu prema dolje i tekućina se spušta niz stijenke. Mikrobiološka i histološka istraživanja su pokazala kako su kapilarne sile potencijalno važan mehanizam patogenosti u infekcijama posredovanim

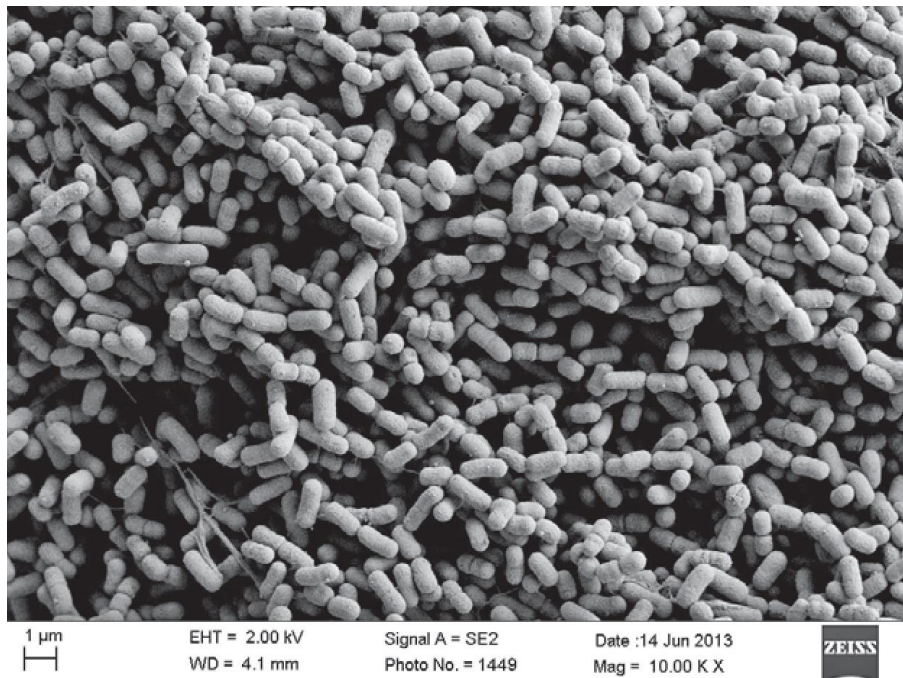
kateterima. Mikroorganizmi koji su suspendirani u tekućem mediju mogu biti pasivno preneseni po čvrstoj površini plastične cijevi (kanile) (Cooper i sur. 1998).

## **1.4. Bakterijska vrsta *Acinetobacter baumannii***

Bakterijska vrsta *Acinetobacter baumannii* je kokobacil, gram-negativna bakterija iz roda *Acinetobacter*. Bakterije iz roda *Acinetobacter* klasificirane su kao striktno aerobne bakterije koje ne formiraju spore (Hartzell i sur. 2007). Bakterija *A. baumannii* je sveprisutna bakterija koju se može pronaći na različitim mjestima poput zemlje i vode, u prehrambenim proizvodima, na biljkama, životinjama i ljudima. Ove bakterije često su izolirane u bolničkim okruženjima s raznih medicinskih naprava i uređaja. (Pour i sur. 2011; Atrouni i sur. 2016). S obzirom da su evoluirale kao oportunistički patogen u ljudi, predstavljaju veliki problem u zdravstvenoj skrbi osobito kod imunokomprimiranih bolesnika. Bakterija *A. baumannii* je jedna od ESKAPE grupe patogenih bakterija (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, i *Enterobacter sp.*) koje su odgovorne za većinu bolničkih infekcija (Kentache i sur. 2017). Uzročnici su brojnih infekcija poput upale pluća, infekcija krvožilnog sustava, mokraćnih puteva i rana. Mogu uzrokovati sepsu i meningitis. Najčešće infekcije su one povezane uz prisutnost invazivnih pomagala, primjerice endotrahealnog tubusa, urinarnog katetera, centralnog venskog katetera, zatim uz neki invazivni dijagnostički postupak poput bronhoskopije i slično (Vijayakumar i sur. 2016). Ova bakterijska vrsta je dugoročni problem u bolnicama koji traje već desetljećima, poglavito zbog svoje iznimne otpornosti. Može preživjeti isušivanje, oksidativni stres, tretiranje dezinfekcijskim sredstvima i ograničavajuće količine nutrijenata. Također, ove su bakterije puno otpornije na većinu komercijalno dostupnih antibiotika. Otpornost *A. baumannii* bakterije uvelike se pripisuje dobroj mogućnosti pričvršćivanja za žive i nežive površine, a zatim i formiranju biofilma. U biofilmu matriks izvanstanične polimerne tvari ima zaštitnu ulogu i bakterije koje su uklopljene u matriksu nalaze se u optimalnom okolišu za izmjenu genetičkog materijala. Bakterija *A. baumannii* nema bičeve te je stoga karakterizirana kao nepokretna. Također, genomsko sekvenciranje je

potvrdilo nedostatak gena za bičeve pa je prava pokretljivost u roju (engl. *swarming*) za koju su bičevi neophodni također isključena. Međutim, novija istraživanja su pokazala kako se *A. baumannii* bakterije mogu pokretati trzajnim (engl. *twitching*) oblikom pokretljivosti po polukrutim i nekim krutim neživućim površinama (Vijayakumar i sur. 2016).

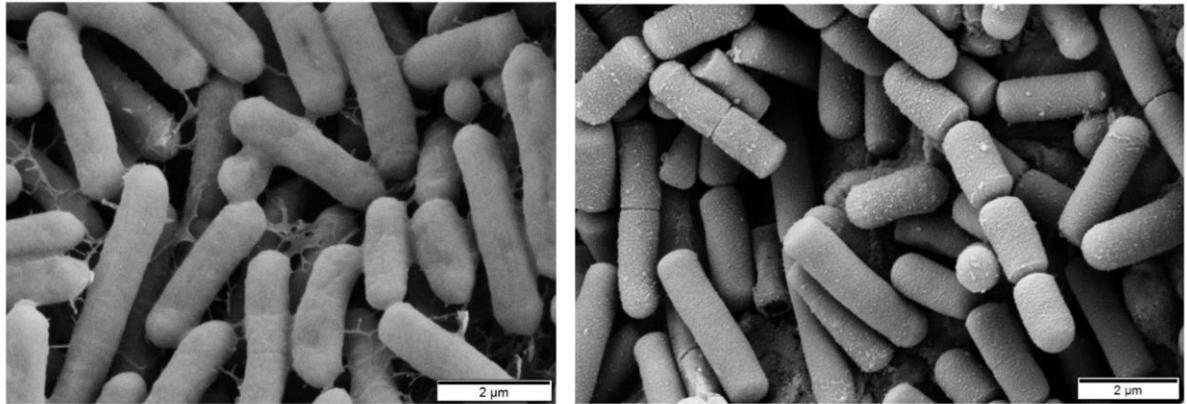
Zbog velikih izazova u kontroliranju infekcija ovog patogena i tereta za zdravstvo s ekonomske strane, nove metode za suzbijanje ovog patogena su prijeko potrebne (Vijayakumar i sur. 2016).



Slika 4. Biofilm bakterije *A. baumannii* in vitro, formiran na staklenoj površini nakon 24 sata inkubacije na 37° C u Luria-Bertani hranjivom mediju. Snimano FESEM mikroskopom (Field-emission scanning electron microscope) pod povećanjem 5000 x (preuzeto s: <https://www.semanticscholar.org/paper/Biofilm-formation-in-Acinetobacter-baumannii.-Longo-Vuotto/b01f8e7f95fdf16e0fa8b8294c830b5103e533d2/figure/0> ).

## 1.5. Bakterijska vrsta *Bacillus cereus*

Bakterijska vrsta *Bacillus cereus* je štapićasta, gram-pozitivna bakterija iz roda *Bacillus*. Pokretljiva je bakterija koja posjeduje bičeve. Može biti aerobna ili fakultativno anaerobna te formira endospore. Endospore su bakterije u stanju dormancije koje imaju inaktivan metabolizam, a mogu preživjeti izrazito nepovoljne uvjete i puno su otpornije od vegetativnih stanica na stresne faktore, pretežno zahvaljujući zaštitnim slojevima koji okružuju stanicu. Široko je rasprostranjena u prirodi i oportunistički je patogen koji se često prenosi hranom (Bottone 2010). Iz tog razloga bakterija *B. cereus* je uzročnik trovanja hranom koje je najčešće povezano s konzumacijom jela na bazi riže. Simptomi su najčešće povraćanje i dijareja, a kod zdravih ljudi se uglavnom sami povuku. Kod imunokomprimiranih bolesnika uzrokuje ozbiljne i potencijalno fatalne infekcije koje su primarno povezane s gastrointestinalnim traktom. Patogenost ove bakterije usko je vezana s produkcijom degradacijskih enzima i ekstracelularnih toksina koji se produciraju pri ulasku bakterije u stacionarnu fazu (Houry i sur. 2010). Osim što uzrokuje trovanje hranom, poznato je da uzrokuje infekcije oka, upalu pluća, sepsu, infekcije središnjeg živčanog sustava, a rizične skupine su imunokomprimirani pojedinci, ovisnici o drogama (intravenozni) i novorođenčad. U opasnosti od infekcije ovom bakterijom su i pacijenti kojima su umetnute intravaskularne medicinske naprave poput katetera te pacijenti koji su u postoperativnoj fazi (Bottone 2010). Osim u bolnicama, ova bakterija predstavlja probleme i u industriji hrane. Može kontaminirati razne površine, naprave i uređaje tako što formira spore ili biofilm. Istraživanja su pokazala da bakterija *B. cereus* formira snažno izraženi biofilm na sučelju tekućine i zraka, no moguće je i slabije formiranje biofilma na uronjenim površinama, primjerice staklenim ili metalnim u statičnim medijima (Houry i sur. 2010).



(a)

(b)

Slika 5. Bakterijska vrsta *B. cereus* snimana skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). Preuzeto s:

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5c/Bacillus\\_cereus\\_SEM.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5c/Bacillus_cereus_SEM.jpg)

## 1.6. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je pobliže istražiti oblik bakterijske pokretljivosti kroz vrijeme, pri kojoj bakterijske stanice migriraju iz biofilma formiranog na sučelju zraka i tekućine vertikalno gore po čvrstoj, inertnoj staklenoj površini koja niti u jednom trenutku nije bila uronjena u hranjivi medij. U istraživanju ovog fenomena poslužile su dvije bakterijske vrste: *Bacillus cereus* i *Acinetobacter baumannii*.

Provedeni pokusi poslužili su u ispitivanju dinamike pokretljivosti posredovane biofilmom.

## 2. MATERIJALI I METODE

Pokusi u ovom eksperimentu provedeni su s nižom i višom koncentracijom bakterija, sa staklenim predmetnim stakalcima steriliziranim na dva načina (autoklaviranje i suhi sterilizator), s Lysogeny broth hranjivim medijem te sterilnom vodom. Pokretljivost bakterija po staklenom predmetnom stakalcu u pokusima praćena je kroz vremenski period od deset dana, osim u pokusu sa sterilnom vodom koji je trajao sedam dana. Promjene su se dokumentirale nakon prvog, trećeg, sedmog i desetog dana inkubacije. Fokus proučavanja stavljen je na područje interfaze (granica tekućine i zraka) i područje iznad interfaze.

### 2.1 Priprava bakterijske suspenzije

Za eksperimentalni dio rada korištene su čiste kulture bakterija *Acinetobacter baumannii* i *Bacillus cereus*. Prilikom priprave bakterijske suspenzije ovih dviju vrsta bakterija korištena je sterilna voda. To je destilirana voda koja sadrži 0,3 % natrijeva klorida, prethodno je pripremljena u staklenim epruветama s čepom te sterilizirana u autoklavu. 9 mL sterilne vode prelilo se u sterilnu plastičnu epruветu. Sterilnom ezom (bakteriološka ušica) uzeo se mali dio bakterijske biomase iz Petrijeve zdjelice i stavio u sterilnu plastičnu epruветu s 9 mL sterilne vode. Ovi postupci provodili su se ispod plamena Bunsenovog plamenika kako ne bi došlo do kontaminacije drugim bakterijskim vrstama. Epruвета se začepila čepom i komadić bakterijske biomase se resuspendirao u epruветi pomoću Vortex uređaja (Vortex technoKartell TK3S, Italija). Koncentracija takve bakterijske suspenzije iznosi otprilike  $10^8$  bakterija po mililitru.

### 2.2 Priprava bakterijske suspenzije različitih koncentracija

Pokusi u ovom eksperimentu provedeni su tako da su se priredile viša ( $10^7$ ) i niža ( $10^3$ ) koncentracija bakterijske suspenzije objiju vrsta bakterija, kako bi se ispitalo ima li koncentracija bakterija utjecaj na pokretljivost bakterija po staklenom predmetnom stakalcu. U svakom pokus korištene su plastične epruветe (tip Falcon, 50 mL). Za višu i

nižu koncentraciju priredile su se po četiri epruvete te četiri epruvete za kontrolne uzorke. Dakle, korišteno je sveukupno dvanaest epruveta za pokuse koji su se provodili u trajanju od deset dana. Sterilne plastične epruvete su se prvo adekvatno označile markerom te se potom pomoću pipete (LLG Labware, Njemačka) otpipetiralo 10 mL tekućeg Lysogeny broth hranjivog medija (LB medij). LB medij bio je prethodno priređen na način da se u 1 L destilirane vode otopilo 5 g kvašćevog ekstrakta (engl. *yeast extract*), 5 g natrijevog klorida i 10 g triptona (engl. *tryptone*).

Prilikom pripreme bakterijske suspenzije čija koncentracija iznosi  $10^7$  bakterija po mililitru, 1 mL početne bakterijske suspenzije (koncentracije  $10^8$ ) otpipetirao se u četiri plastične epruvete s 10 mL LB medija za prvi, treći, sedmi i deseti dan eksperimenta.

Bakterijska suspenzija koncentracije  $10^3$  bakterija po mililitru pripravila se na način da se otpipetirao 1 mL početne bakterijske suspenzije u epruvetu s 9 mL sterilne vode te se potom iz te epruvete otpipetirao 1 mL bakterijske suspenzije u novu epruvetu s 9 mL sterilne vode. Ovim postupkom bakterijska suspenzija razrijedila se do koncentracije  $10^5$  bakterija po mililitru. Zatim se otpipetirao 0,1 mL bakterijske suspenzije u četiri epruvete s 10 mL LB hranjivog medija također za prvi, treći, sedmi i deseti dan eksperimenta.

## **2.3 Priprava otopine za kontrolne uzorke**

Prilikom pripreme otopine za kontrolne uzorke, otpipetiralo se 10 mL LB hranjivog medija u četiri epruvete. Nakon toga se u svaku epruvetu otpipetiralo 1 mL boje. U pokusima su korištene boje Gencijana violet i Karbol-fuksin. U prvom pokusu korištena je boja Gancijan violet, a u ostalim pokusima korišten je Karbol-fuksin.

## **2.4 Priprema staklenih predmetnih stakalaca**

U pokusima su korištena staklena predmetna stakalca koja su se prvo par puta provukla s jedne i s druge strane kroz šišteći plamen Bunsenovog plamenika kako bi se uklonile masne naslage. Stakalca su se zatim sterilizirala na dva načina. Jedan set stakalaca sterilizirao se pomoću autoklava, a drugi set stakalaca pomoću suhog sterilizatora. Razlog

tome je bio da se provjeri hoće li biti razlike u rezultatima zbog drugačijeg načina sterilizacije. Stakalca koja su bila namijenjena za autoklaviranje, nakon “odmašćivanja” zamotala su se u aluminijsku foliju i smjestila u autoklav.

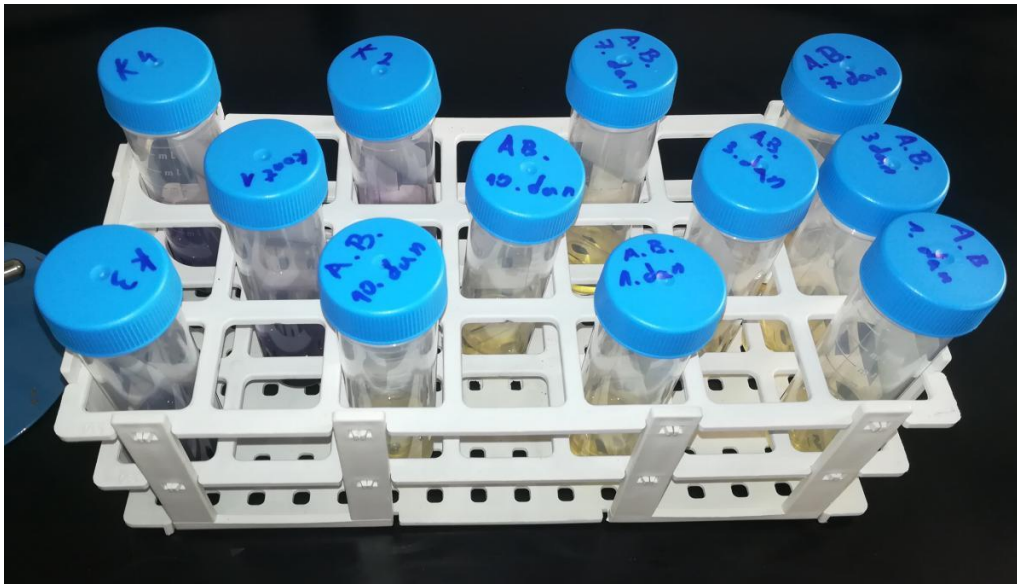
Autoklaviranje je postupak sterilizacije na 121 °C uz primjenu tlaka od 103 421 Pa i provodi se u trajanju od 15 do 45 min. Druga stakalca su se nakon “odmašćivanja” stavila u Petrijevu zdjelicu koja se potom stavila u suhi sterilizator. Sterilizacija se u ovom slučaju provodila na 115 °C u trajanju od sat vremena.

## 2.5 Početak eksperimenta

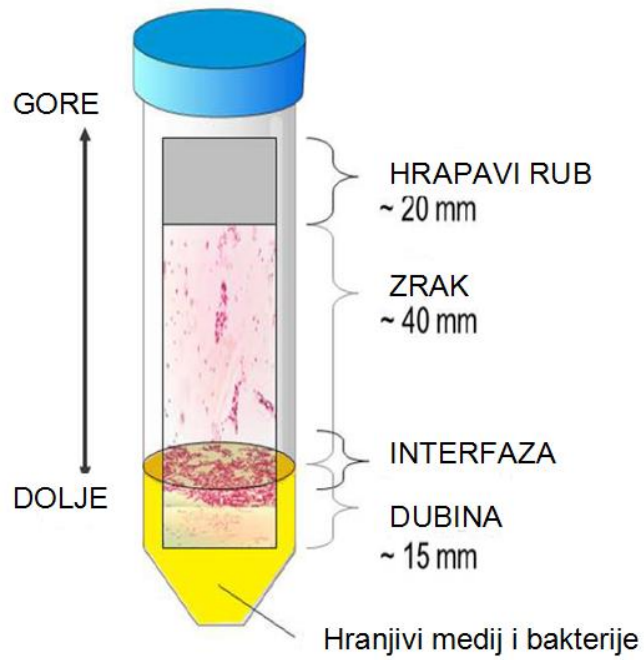
Nakon pripreve željene koncentracije bakterija u LB hranjivom mediju ili sterilnoj vodi, u plastične epruvete su pažljivo položena staklena predmetna stakalca u vertikalni položaj te utisnuta do najnižeg mogućeg položaja u epruveti. Ovaj postupak se također provodio ispod plamena Bunsenovog plamenika kako ne bi došlo do kontaminacije. Stakalca su se položila na isti način i u epruvete gdje je bila samo boja u hranjivome mediju, dakle u otopine za kontrolne uzorke. Epruvete su se lagano začepile kako bi se omogućio protok zraka te su se potom stavile u inkubator na 37 °C. Ovim načinom uzgojili su se biofilmovi na granici između zraka i tekućine na staklenim predmetnim stakalcima za mikroskopiranje. Budući da se u ovom eksperimentu pratilo napredovanje bakterija putem biofilma u vremenu, stakalca su se vadila nakon prvog (nakon 24 h), trećeg, sedmog i desetog dana inkubacije kako bi se evidentirale promjene. Prilikom vađenja stakalaca iz plastičnih epruveta, stakalca su se prvo lagano isprala deioniziranom vodom kako bi se isprale nepričvršćene ili labavo pričvršćene stanice te su se zatim obrisala s jedne strane papirnatim ubrusom namočenim u 70% -tni alkohol. Kada su se stakalca osušila na zraku, par puta su se provukla kroz plamen Bunsenovog plamenika kako bi se bakterije fiksirale na stakalcu. Stakalca su se zatim bojila Alcian blue metodom u trajanju od 3 minute te su se potom isprala vodovodnom vodom. Alcian blue metodom boje se određeni mukopolisaharidi i glikokaliks, a u ovom eksperimentu ova metoda bojanja je poslužila kako bi se omogućila vidljivost izvanstanične polimerne tvari (EPS). Nakon toga, stakalca su se bojila i Karbol-fuksinom koji boji stanice, na način da su se stakalca položila u



plastičnu kadicu te se zatim na njih kapalicom nakapao Karbol-fuksin. Nakon 20 sekundi stakalca su se isprala vodovodnom vodom. Kada su se vadila kontrolna stakalca iz epruveta u kojoj je bila samo boja i hranjivi medij, stakalca se nisu ispirala deioniziranom vodom kako se boja ne bi isprala. Ta su se stakalca također obrisala s jedne strane papirnatim ubrusom namočenim u 70% -tni alkohol i nakon što su se osušila na zraku, par puta su provučena kroz plamen Bunsenovog plamenika kako bi se boja fiksirala. Pripremljeni preparati su se zatim promatrali svjetlosnim mikroskopom (Olympus CX21, Japan) pod povećanjem od 40x, 100x i 1000x uz pomoć imerzijskog ulja. Stakalce se podijelilo u tri područja, odnosno zone koje su se promatrala. Prva zona je dio predmetnog stakalca koji je uronjen u hranjivi medij - “dubina”, druga zona se nalazi na granici između tekućine i zraka - “interfaza”, a treća zona se nalazi iznad interfaze te niti u jednom trenutku nije bila uronjena u hranjivi medij - “zrak”. Naročito se promatralo područje interfaze i područje iznad interfaze zbog toga što je bit ovog eksperimenta upravo praćenje migracije bakterija iz područja interfaze u područje iznad interfaze. Dobiveni rezultati su se dokumentirali fotografiranjem preparata kroz objektiv mikroskopa pomoću mobitela (Huawei p10 lite).



Slika 6. Epruvete s nasadenim stakalcima spremne za inkubaciju.



Slika 7. Eksperimentalna postavka za uzgoj bakterijskog biofilma na granici vode i zraka.



Slika 8. Prikaz zona fotografiranja i proučavanja bakterijske biomase.

## 3. REZULTATI

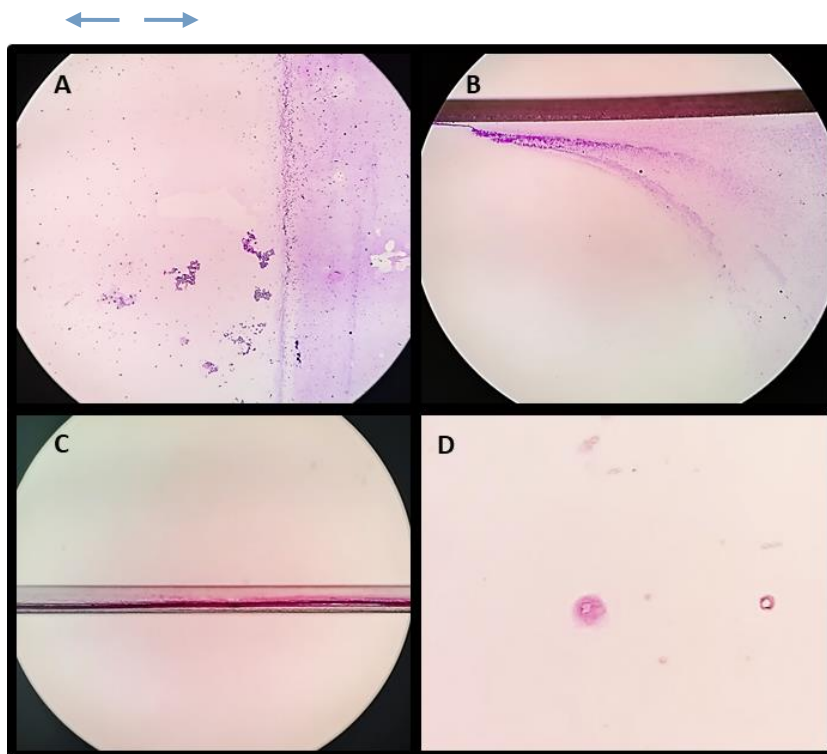
### 3.1. Kontrola

Promatranjem kontrolnih stakalaca makroskopski i mikroskopski, uočeno je da u svim pokusima nema značajnih razlika u širenju boje, (a ni u vrsti boje) te su stoga ovdje rezultati opisani zajedno po danima inkubacije. Prvog dana, makroskopski je vidljivo da je površina stakalca koja je bila uronjena u medij s bojom svijetlo crveno obojena. Može se jasno vidjeti ravno područje interfaze po sredini stakalca te zavijena područja uz rubove gdje se boja penjala zajedno s vodom. Promatranjem pod mikroskopom vidljive su mrlje boje do 5 mm iznad interfaze, a uz rubove do oko 15 mm od interfaze.

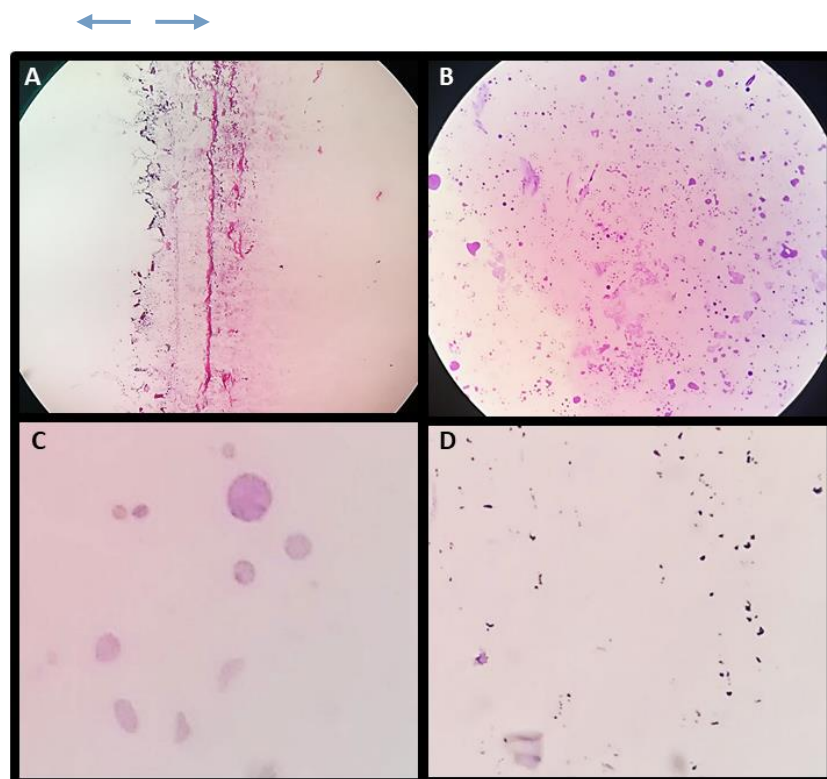
Trećega dana granica boje makroskopski izgleda slično kao i prvoga dana osim što su svijetle mrlje boje vidljivije u blizini područja odmah iznad interfaze (oko 2-3 mm). Boja se uzdigla po postraničnom rubu (iznos debljine stakalca 1 mm) još više nego uz sam rub stakalca. Mikroskopiranjem se vide mrlje boje do 30 mm, a uz rub do 35 mm.

Sedmoga dana mrlje boje se vide makroskopski još izraženije blizu interfaze. Rubovi stakalca su također obojeni i pod mikroskopom je vidljivo da boja doseže do 30 mm iznad interfaze po sredini stakalca. Blizu ruba stakalca fragmenti boje vidljivi su na 40 mm od interfaze.

Desetoga dana interfaza je makroskopski manje izražena kao jasna granica, već boja postepeno postaje sve svjetlija do trenutka kada se golim okom više ne može vidjeti. U blizini područja iznad interfaze vide se blijede mrlje boje. Pod mikroskopom, mrlje boje po sredini stakalca vidljive su do 32 mm iznad interfaze, a blizu ruba oko 41 mm.



Slika 9. Rezultati napredovanja boje na kontrolom stakalcu nakon 3. dana inkubacije. A) područje interfaze pri povećanju 100x, B) područje interfaze uz rub stakalca pri povećanju 40x, C) postranični rub stakalca pri povećanju 40x, D) mrlja boje 35 mm od interfaze.  
 \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.



Slika 10. Rezultati napredovanja boje na kontrolom stakalcu nakon 7. dana inkubacije. A) područje interfaze pri povećanju 40x, B) područje interfaze uz rub stakalca pri povećanju 1000x, C) mrlje boje 15 mm od interfaze, D) mrlje boje 40 mm od interfaze.  
 \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.

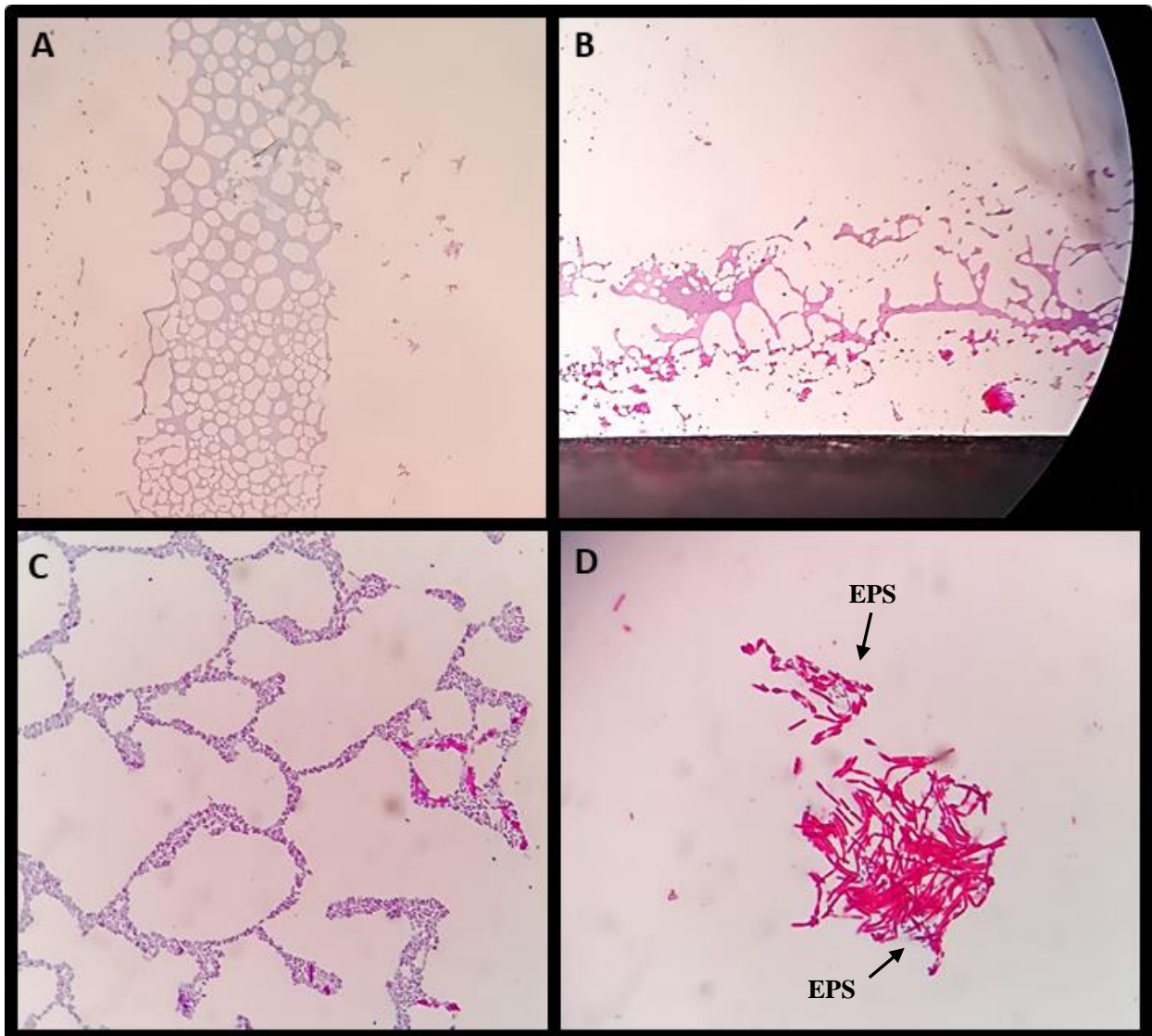
### **3.2. Praćenje biofilma bakterije *Acinetobacter baumannii* i napredovanje bakterija pri koncentraciji $10^3$ bakterija po mL**

Nakon prvoga dana inkubacije, promatranjem pod mikroskopom vidljive su mikrokolonije koje su se formirale u području interfaze na staklenom predmetnom stakalcu. Oblici mikrokolonija bili su kružni te razni izduženi i nepravilni. Uz rubove je vidljivo da se bakterije penju zajedno s vodom.

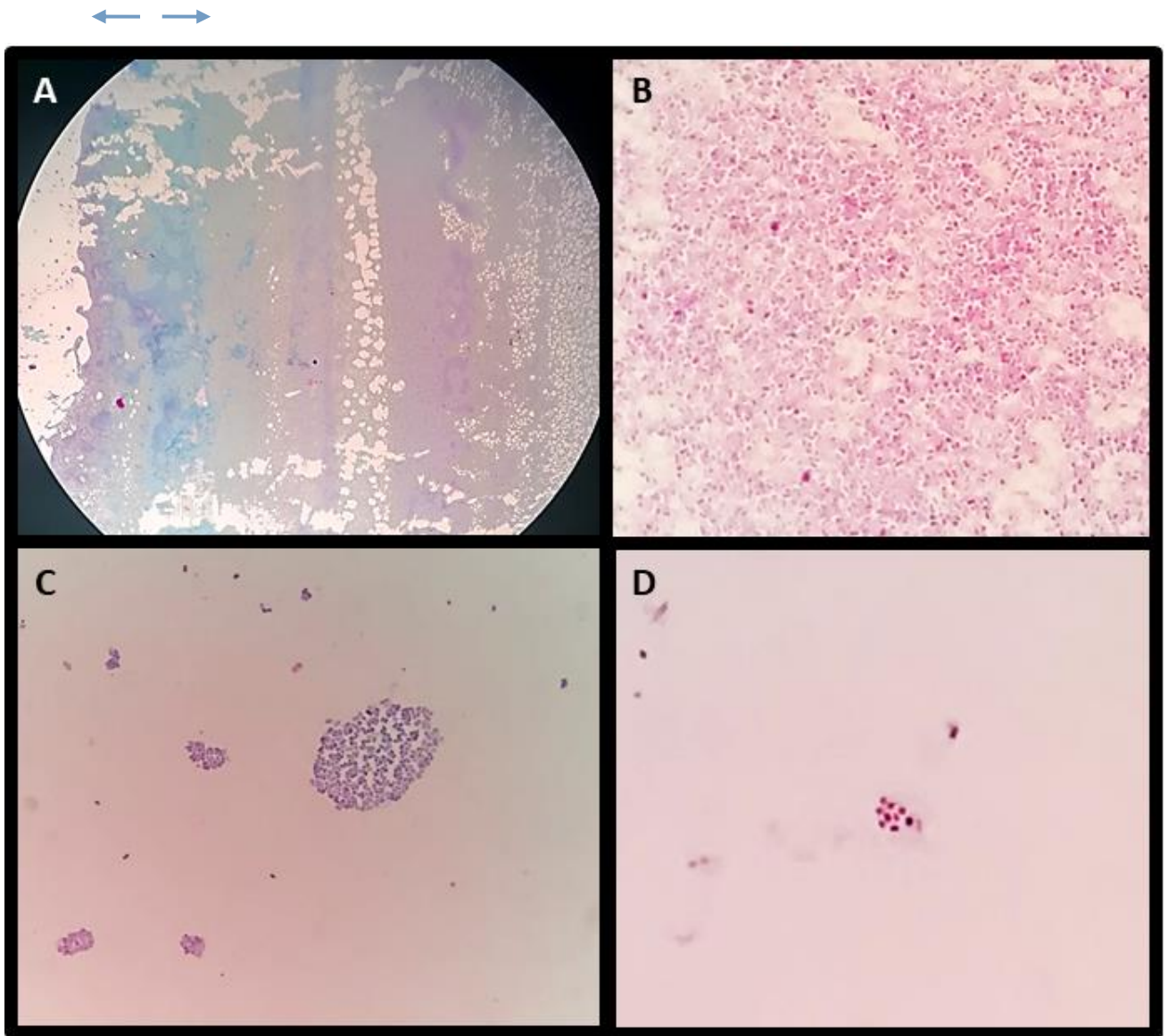
Trećega dana moguće je i makroskopski vidjeti biofilm na stakalcu kao blijedo bijelu naslagu. Pri najmanjem povećanju od 40x vidljivo je da se biofilm proteže cijelom dužinom interfaze. Daljnjim promatranjem pod povećanjem od 1000x, u području interfaze vidljivo je mnoštvo bakterija, a par milimetara iznad interfaze vidljive su mikrokolonije. EPS je u području zone zraka na stakalcima moguće vidjeti kao svijetlo plavo obojenje između bakterija u mikrokoloniji te je ovdje nakon trećeg dana inkubacije vidljiv prvi put. Uz rubove stakalca vidljivo je da se bakterije penju zajedno s vodom. U tom području stakalca koncentracija bakterija je dosta velika. Najviša pozicija gdje su bakterije zapažene je 5 mm iznad interfaze.

Sedmog dana uočljiv je biofilm u području interfaze koji je jače izražen od biofilma koji se formirao 3. dana. Uz rubove stakalca također je vidljivo da se bakterije penju zajedno s vodom. Iznad interfaze su vidljive mikrokolonije, no njihova brojnost nije velika i nisu mnogo udaljene od interfaze, najviše 5 mm. Pojedinačne bakterije su uočene najviše na 10 mm iznad interfaze.

Desetoga dana također je vidljiv postojan i jače izraženi biofilm u području interfaze te se iznad nje moglo uočiti puno manjih nakupina bakterija. Te su se nakupine koje su bile kružnih i nepravilnih oblika u najvećem broju nalazile do 18 mm iznad interfaze. Uz rub stakalca nakupine bakterija uočene su najviše na 15 mm iznad interfaze. Pojedinačne bakterije, ali i manje nakupine bakterija bile su vidljive po sredini stakalca na raznim visinama, dok je najviša pozicija na kojoj su bakterije uočene iznosila 36 mm iznad interfaze.



Slika 11. Biofilm bakterije *A. baumannii* na staklenom predmetnom stakalcu trećeg dana inkubacije pri koncentraciji  $10^3$  bakterija po mL. A) područje interfaze pri povećanju 40x, B) postranični rub stakalca blizu područja interfaze pri povećanju 100x, C) područje interfaze pri povećanju 1000x, D) bakterije na udaljenosti 5 mm od interfaze i EPS koji je vidljiv kao svijetlo plavo obojenje. \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.



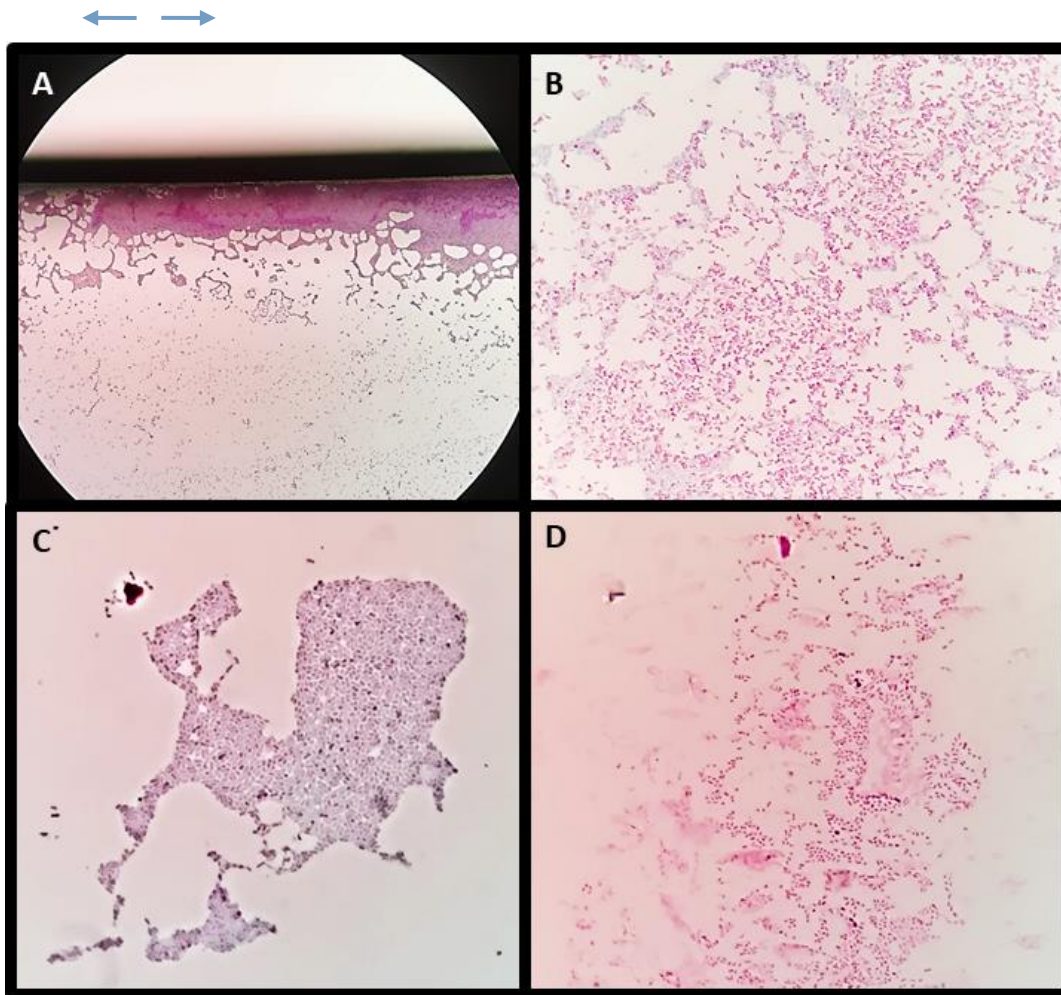
Slika 12. Biofilm bakterije *A. baumannii* na staklenom predmetnom stakalcu, sedmog dana inkubacije pri koncentraciji  $10^3$  bakterija po mL. A) područje interfaze pri povećanju 100x, B) područje interfaze pri povećanju 1000x, C) bakterije na udaljenosti 5 mm od interfaze, D) bakterije na udaljenosti 10 mm od interfaze. \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.

### **3.3. Praćenje biofilma bakterije *Acinetobacter baumannii* i napredovanje bakterija pri koncentraciji $10^7$ bakterija po mL na autoklaviranim stakalcima i stakalcima iz suhog sterilizatora**

Na autoklaviranom stakalcu već je prvoga dana makroskopski bio vidljiv jasno formirani biofilm u području interfaze. Promatranjem pod mikroskopom na povećanju 40x moglo se vidjeti da je formirani biofilm u ranoj fazi razvoja. Uz rubove stakalca nalaze se veće nakupine bakterija koje prate vodu koja se penjala uz rubove stakalca. Odmah iznad interfaze vidljive su veće nakupine bakterija koje su nepravilno kružnih oblika. U rasponu od 10 do 25 mm od interfaze vidljive su mnoge mikrokolonije i pojedinačne bakterije. Na 38 mm od interfaze, na sredini stakalca vidljiva je velika kolonija bakterija tik uz granicu hrapavijeg dijela stakalca (engl. *frosted edge*). Blizu ruba stakalca vidljiva je kolonija na 35 mm iznad interfaze. Na stakalcu iz suhog sterilizatora rezultati su slični te je najviša zamijećena pozicija do kuda su bakterije migrirale 36 mm iznad interfaze. Također, kao i kod autoklaviranog stakalca, nakupina bakterija bila je velika i nalazila se uz rub hrapavijeg dijela stakalca.

Trećega dana se na autoklaviranom stakalcu mogao vidjeti jače izraženi biofilm. U usporedbi s prvim danom, biofilm je zahvatio veću površinu u području interfaze te su nakupine bakterija bile puno veće. Uz rubove stakalca, u području interfaze, nakupine bakterija bile su gušće i veće u usporedbi sa sredinom. Iznad interfaze vidljive su brojne mikrokolonije koje su frekventnije u prvih 10 mm od interfaze, no nalaze se i po cijeloj površini stakalca. Na 43 mm od interfaze u hrapavijem dijelu stakalca zapažena je velika kolonija bakterija. Najviša pozicija na kojoj su uočene bakterije (mala kolonija od desetak stanica) je 45 mm od interfaze, također u području hrapavijeg dijela stakalca. Promatranjem stakalca blizu rubova, također su uočene veće kolonije bakterija, ali na nešto nižoj poziciji. Najudaljenija je zapažena na 40 mm od interfaze. Rezultati na stakalcu iz suhog sterilizatora su slični i nemaju značajnih razlika.



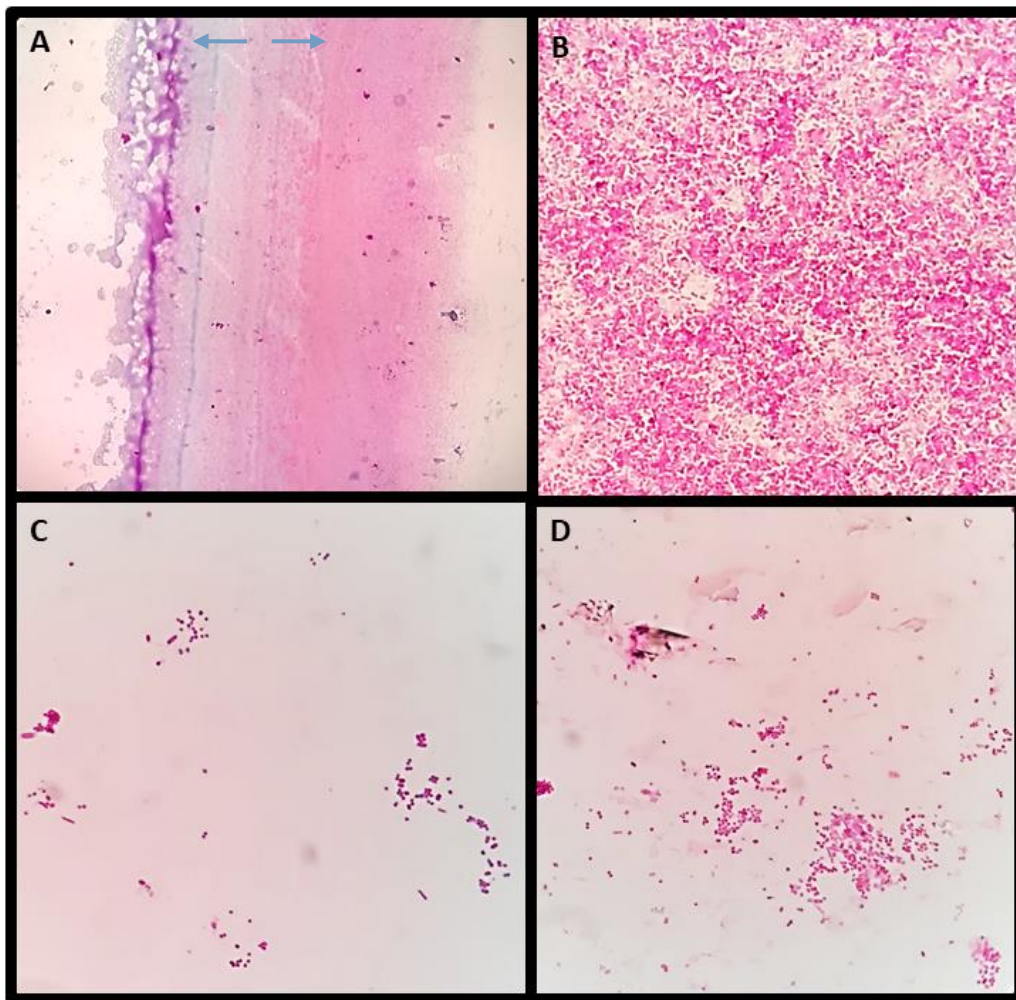


Slika 13. Biofilm bakterije *A. baumannii* na staklenom predmetnom stakalcu, trećeg dana inkubacije pri koncentraciji  $10^7$  bakterija po mL. A) područje interfaze uz rub stakalca pri povećanju 100x, B) područje interfaze u sredini stakalca pri povećanju 1000x, C) bakterije na udaljenosti 25 mm od interfaze, D) bakterije na udaljenosti 43 mm od interfaze. \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.

Sedmoga dana, na autoklaviranom stakalcu u području interfaze, vidljiv je još izraženiji i deblji biofilm. Nakupine bakterija su obilne cijelom dužinom interfaze u jednakom intenzitetu i uz rubove se penju s vodom. Iznad interfaze nalazi se veliki broj mikrokolonija i pojedinačnih bakterija po cijeloj površini stakalca. Veličine kolonija variraju te su zamijećene velike i male kolonije na raznim udaljenostima od interfaze. Bakterije su i u ovom slučaju migrirale skroz u hrapavije područje stakalca, no zapažene su na još većoj udaljenosti od interfaze. Najveća udaljenost je 58 mm uz sam kraj stakalca. Uz rub su

najviše migrirale do 54 mm. Na stakalcu iz suhog sterilizatora rezultati su također slični i nema značajnih razlika.

Desetoga dana izgled biofilma na autoklaviranom stakalcu vrlo je sličan kao i sedmoga dana. U području interfaze također su prisutne obilne nakupine bakterija cijelom dužinom koje se uz rubove penju zajedno s vodom. Iznad interfaze ima puno pojedinačnih bakterija i mikrokolonija različitih veličina, s time da su neki dijelovi površine stakalca više napučeniji bakterijama, a neki manje. Bakterije koje su najviše migrirale fotografirane su na 55 mm od interfaze. Ta nakupina bakterija nije formirana na jednom mjestu, već je razbacana po većoj površini stakalca. Najviša zapažena udaljenost bakterija od interfaze uz rub stakalca je 45 mm. Rezultati na stakalcu iz suhog sterilizatora su i u ovom slučaju vrlo slični i nema značajnih razlika.



Slika 14. Biofilm bakterije *A. baumannii* na staklenom predmetnom stakalcu, sedmog dana inkubacije pri koncentraciji  $10^7$  bakterija po mL. A) područje interfaze pri povećanju 40x, B) područje interfaze u sredini stakalca pri povećanju 1000x, C) bakterije na udaljenosti 30 mm od interfaze, D) bakterije na udaljenosti 58 mm od interfaze. \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.

### **3.4. Praćenje biofilma bakterije *Bacillus cereus* i napredovanje bakterija pri koncentraciji $10^3$ bakterija po mL**

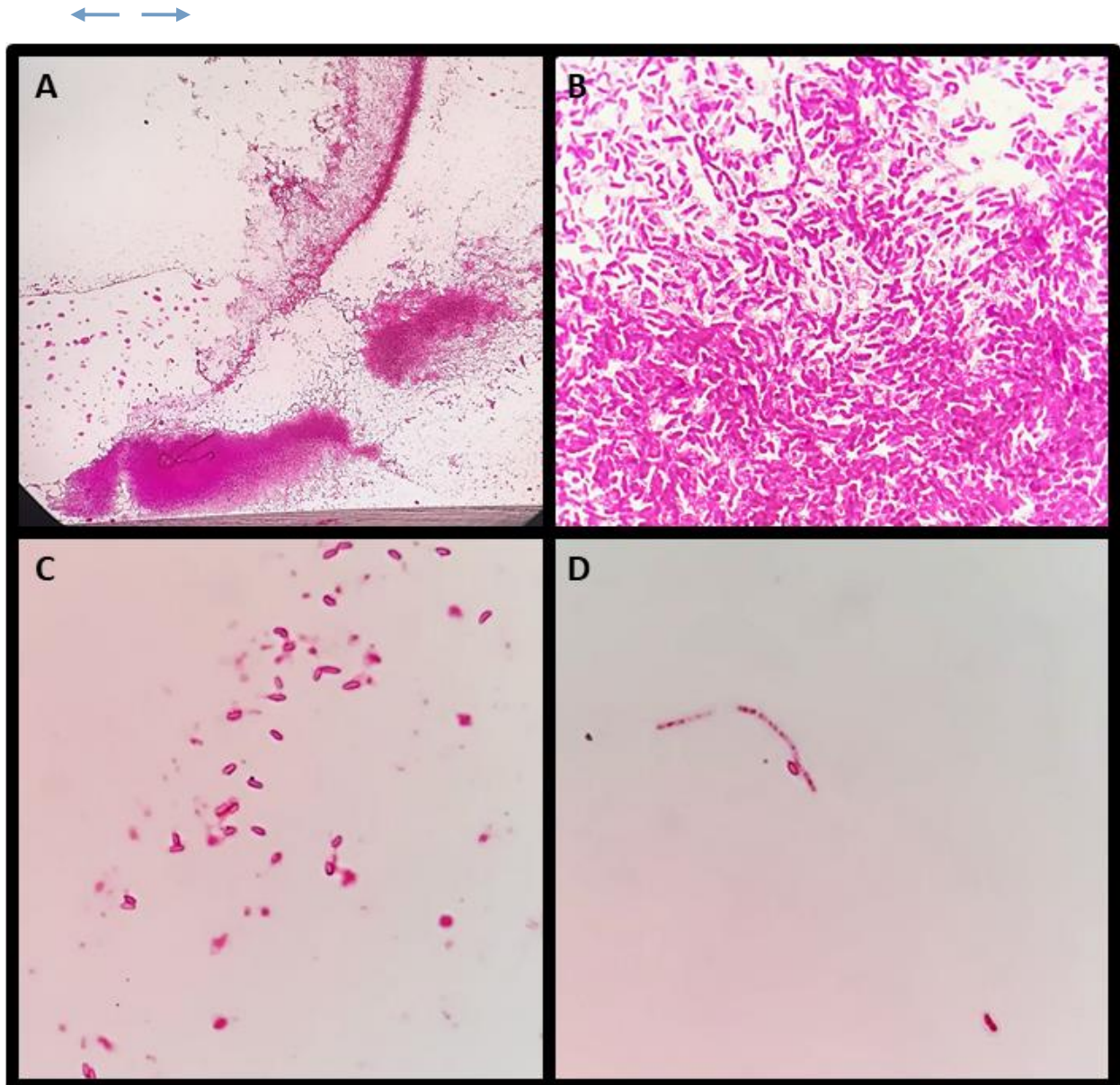
Već nakon prvoga dana inkubacije, makroskopski se mogao zamijetiti biofilm na staklenom predmetnom stakalcu u području interfaze. Formirani biofilm puno je izraženiji u usporedbi s rezultatima nakon prvog dana inkubacije *A. baumannii*. Nakupine bakterija se protežu cijelom dužinom interfaze koja je dosta široka. U području interfaze koja je bliža zraku, ima puno nakupina bakterija koje su najčešće nepravilno kružnih oblika te koncentriranije bakterijama, a stoga i intenzivnije crveno obojene. Uz oba ruba stakalca, linija interfaze je blago uvijena. Dakle, vidljivo je da su se bakterije penjale zajedno s vodom. Mikrokolonije, pojedinačne bakterije i nešto endospora vidljivo je oko 3-4 mm od interfaze po sredini stakalca, ali i uz rub stakalca. Bakterija koja je naviše migrirala, zapažena je na 5 mm od interfaze.

Trećega dana vidljiv je jače izraženi biofilm koji je također širok, no promatranjem pod mikroskopom može se primijetiti da su nakupine bakterija gušće u području interfaze koja je bliže zraku. Nakupine bakterija protežu se cijelom dužinom interfaze te se penju zajedno s vodom uz rubove stakalca. Uz rubove su nakupine bakterija gušće, što se može vidjeti kao intenzivnije crveno obojenje. Broj endospora je puno veći nego prvoga dana, a one su prisutne u području interfaze i iznad nje. Iznad interfaze, u zoni zraka, stakalce je izrazito slabo napučeno bakterijama. Na udaljenosti do 5 mm od interfaze moglo se frekventnije zamijetiti bakterije, no usprkos tome, zapažena je dosta visoka pozicija od interfaze - 40 mm, gdje je par bakterija migriralo. Uz rub su bakterije zapažene na najviše 10 mm od interfaze.

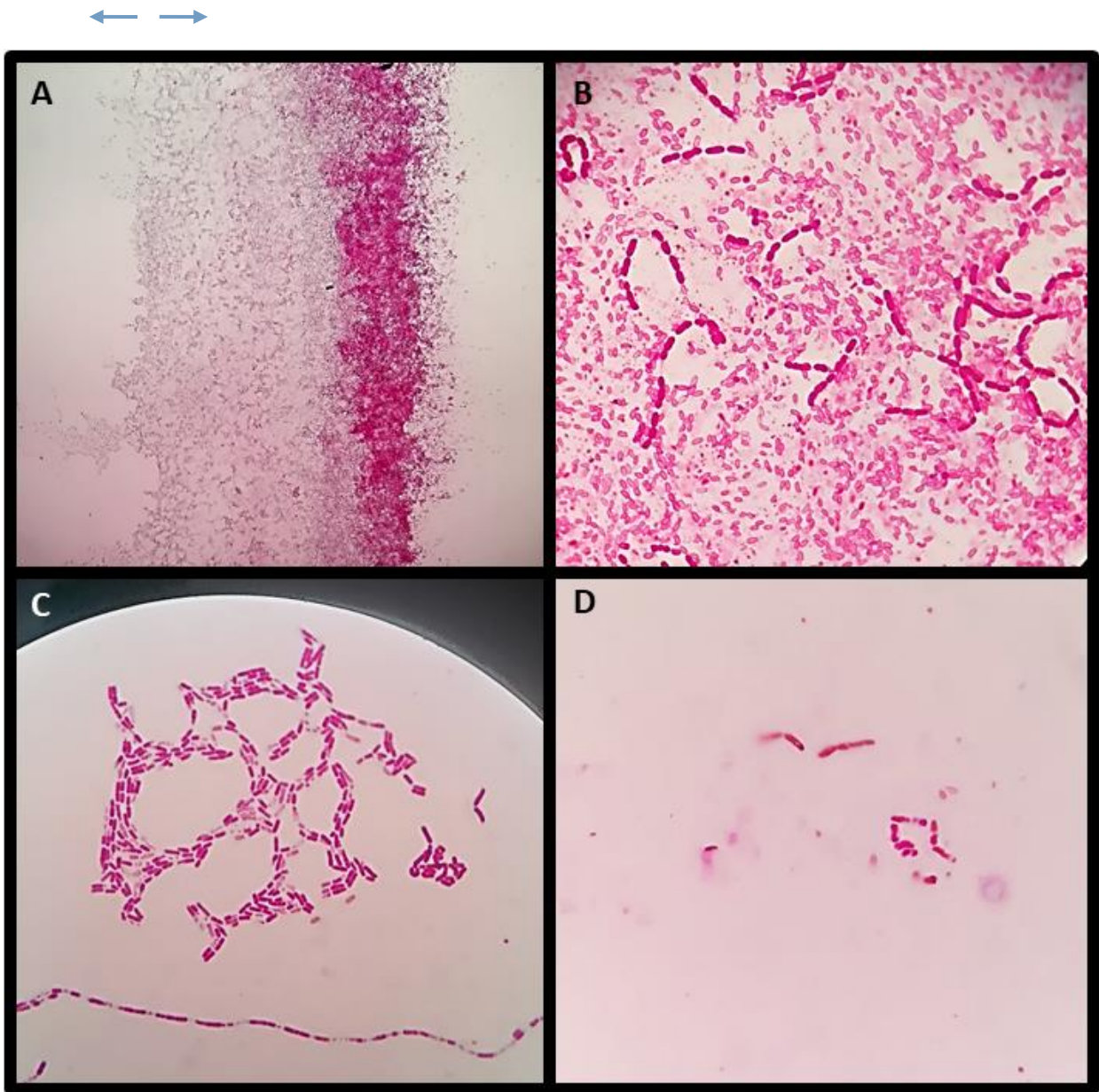
Sedmoga dana vidljiv je izraženi biofilm, formiran u području interfaze. U usporedbi s trećim danom nije toliko širok te nakupine bakterija i endospora izgledaju koncentriranije cijelom dužinom interfaze. Također, uz rubove, nakupine bakterija penju se zajedno s vodom. 10 mm iznad interfaze mogu se primijetiti nakupine bakterija koje su gusto raspršene po većoj površini stakalca. Bakterije su visoko migrirale i mogu se zamijetiti na raznim pozicijama, no stakalce je slabo napučeno bakterijama. Najviša udaljenost od

interfaze po sredini stakalca gdje su uočene bakterije je 39 mm, a endospore 40 mm. Uz rub stakalca, bakterije su migrirale nešto više te su zadnje zapažene na 42 mm od interfaze.

Desetoga dana biofilm je također jako izražen na stakalcu. U području interfaze, nakupine bakterija i spora su koncentrirane cijelom dužinom. Napredak bakterija se bitno ne razlikuje od sedmoga dana, najudaljenija pozicija od interfaze je 40 mm.



Slika 15. Biofilm bakterije *B. cereus* na staklenom predmetnom stakalcu, trećeg dana inkubacije pri koncentraciji  $10^3$  bakterija po mL. A) područje interfaze uz rub stakalca pri povećanju 40x, B) područje interfaze u sredini stakalca pri povećanju 1000x, C) bakterije na udaljenosti 3 mm od interfaze, D) bakterije na udaljenosti 40 mm od interfaze. \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.



Slika 16. Biofilm bakterije *B. cereus* na staklenom predmetnom stakalcu, sedmog dana inkubacije pri koncentraciji  $10^3$  bakterija po mL. A) područje interfaze pri povećanju 40x, B) područje interfaze u sredini stakalca pri povećanju 1000x, C) bakterije na udaljenosti 10 mm od interfaze, D) bakterije uz rub stakalca na udaljenosti 42 mm od interfaze. \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.

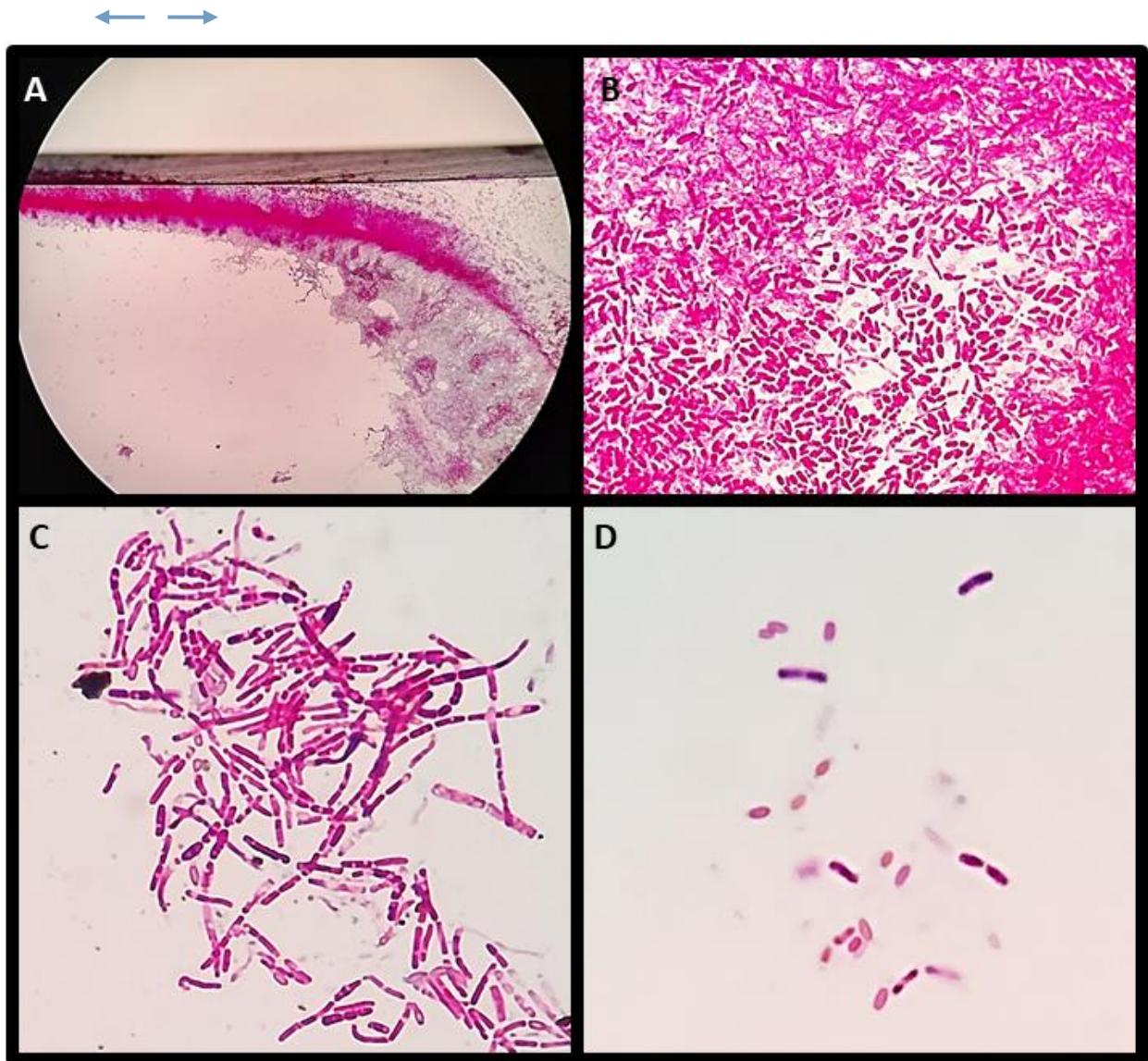
### **3.5. Praćenje biofilma bakterije *Bacillus cereus* i napredovanje bakterija pri koncentraciji $10^7$ bakterija po mL**

Kao i pri nižoj koncentraciji bakterija, već prvoga dana mogao se makroskopski zamijetiti biofilm na stakalcu u području interfaze. Promatranjem pod mikroskopom odmah je bilo uočljivo da je biofilm jače izražen pri višoj koncentraciji bakterija. Područje interfaze bilo je široko, a nakupine bakterija protezale su se cijelom dužinom interfaze, s time da su na pojedinim mjestima bile gušće te su se, osim toga, penjale uz rubove stakalca zajedno s vodom. Područje interfaze prema vodi je rjeđe napučeno bakterijama, a područje bliže zraku je gušće napučeno. Do 15 mm iznad interfaze vidljive su veće mikrokolonije najčešće kružnih oblika. Formiranje kolonija takvih dimenzija i oblika nije bilo vidljivo pri nižoj koncentraciji. Po sredini stakalca, bakterije su zapažene najviše na 20 mm, a uz rub najviše na 5 mm od interfaze.

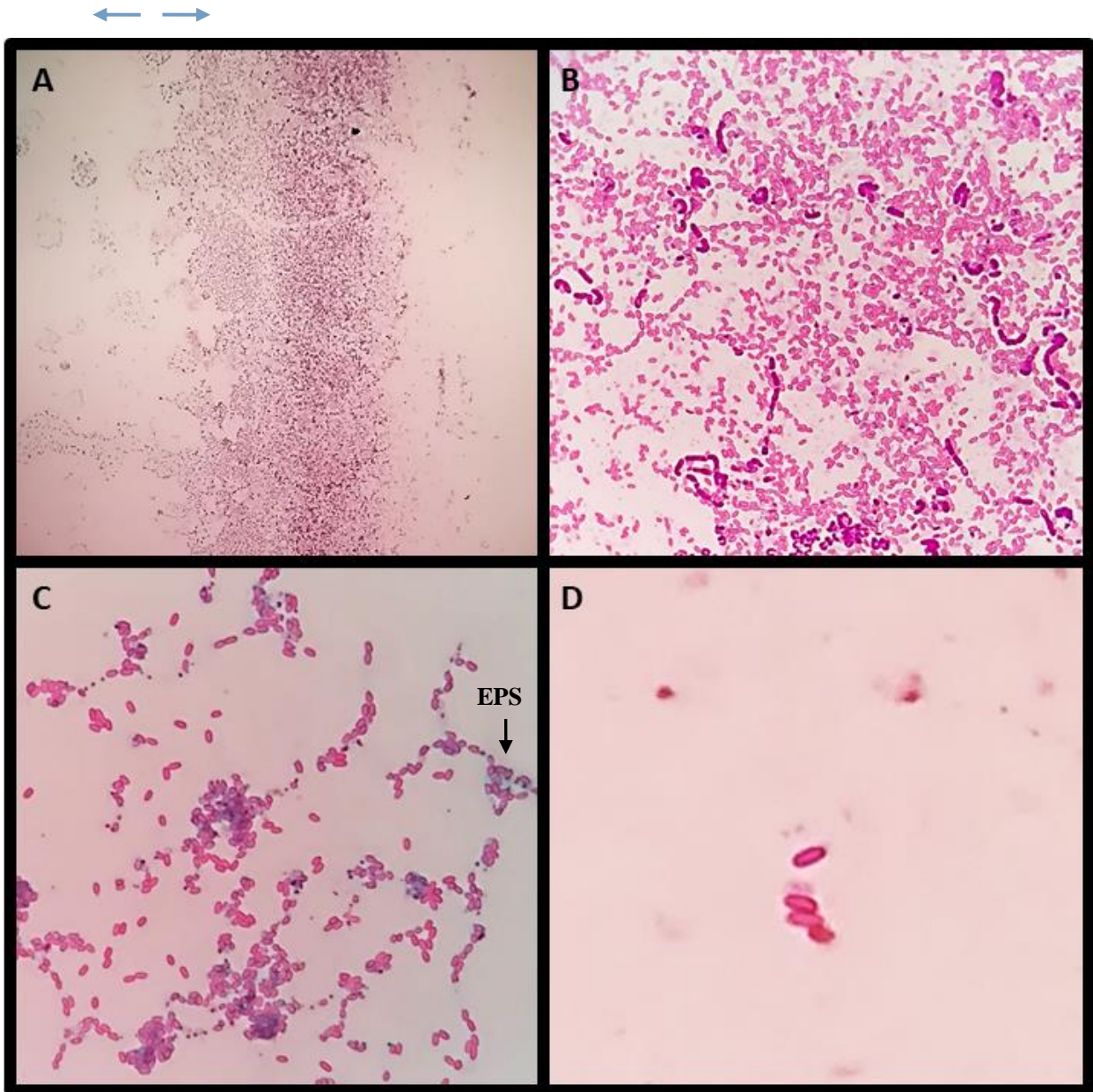
Trećega dana može se zamijetiti vrlo izraženi biofilm cijelom dužinom interfaze u kojoj se povećala gustoća bakterija u području interfaze bliže zraku. Također, nakupine bakterija su najgušće uz rubove stakalca. Nakupine bakterija ispunjene su vegetativnim stanicama i endosporama. Iznad interfaze, u najvećem broju do 20 mm, vidljive su mikrokolonije bakterija koje su najčešće kružnih oblika. Iznad 20 mm od interfaze bakterije se mogu zapaziti na raznim pozicijama, no stakalce je slabije napučeno vegetativnim stanicama i endosporama. Po sredini stakalca, na najvišoj poziciji su zapažene na 40 mm iznad interfaze uz sam kraj glatkog dijela stakalca. Uz rub su također najviše migrirale do 40 mm.

Sedmoga dana biofilm je izrazito makroskopski vidljiv kao bijela naslaga. Područje interfaze je izrazito napučeno endosporama. Mikrokolonije koje se nalaze iznad interfaze također su pretežno nakupine endospora. Najudaljenije endospore zapažene su na 50 mm od interfaze u hrapavijem dijelu stakalca, a uz rub na 37 mm.

Desetoga dana izgled biofilma je kao i sedmoga dana. Interfaza je pretežno ispunjena endosporama kao i mikrokolonije iznad nje. Najudaljenije bakterije po sredini stakalca su zapažene na 47 mm, a uz rub na 35 mm od interfaze.



Slika 17. Biofilm bakterije *B. cereus* na staklenom predmetnom stakalcu, trećeg dana inkubacije pri koncentraciji  $10^7$  bakterija po mL. A) područje interfaze uz rub stakalca pri povećanju 40x, B) područje interfaze u sredini stakalca pri povećanju 1000x, C) bakterije na udaljenosti 15 mm od interfaze, D) bakterije na udaljenosti 40 mm od interfaze. \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.



Slika 18. Biofilm bakterije *B. cereus* na staklenom predmetnom stakalcu, sedmog dana inkubacije pri koncentraciji  $10^7$  bakterija po mL. A) područje interfaze pri povećanju 40x, B) područje interfaze u sredini stakalca pri povećanju 1000x i EPS obojen svijetlo plavo, C) bakterije na udaljenosti 20 mm od interfaze D) bakterije uz rub stakalca na udaljenosti 50 mm od interfaze. \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.

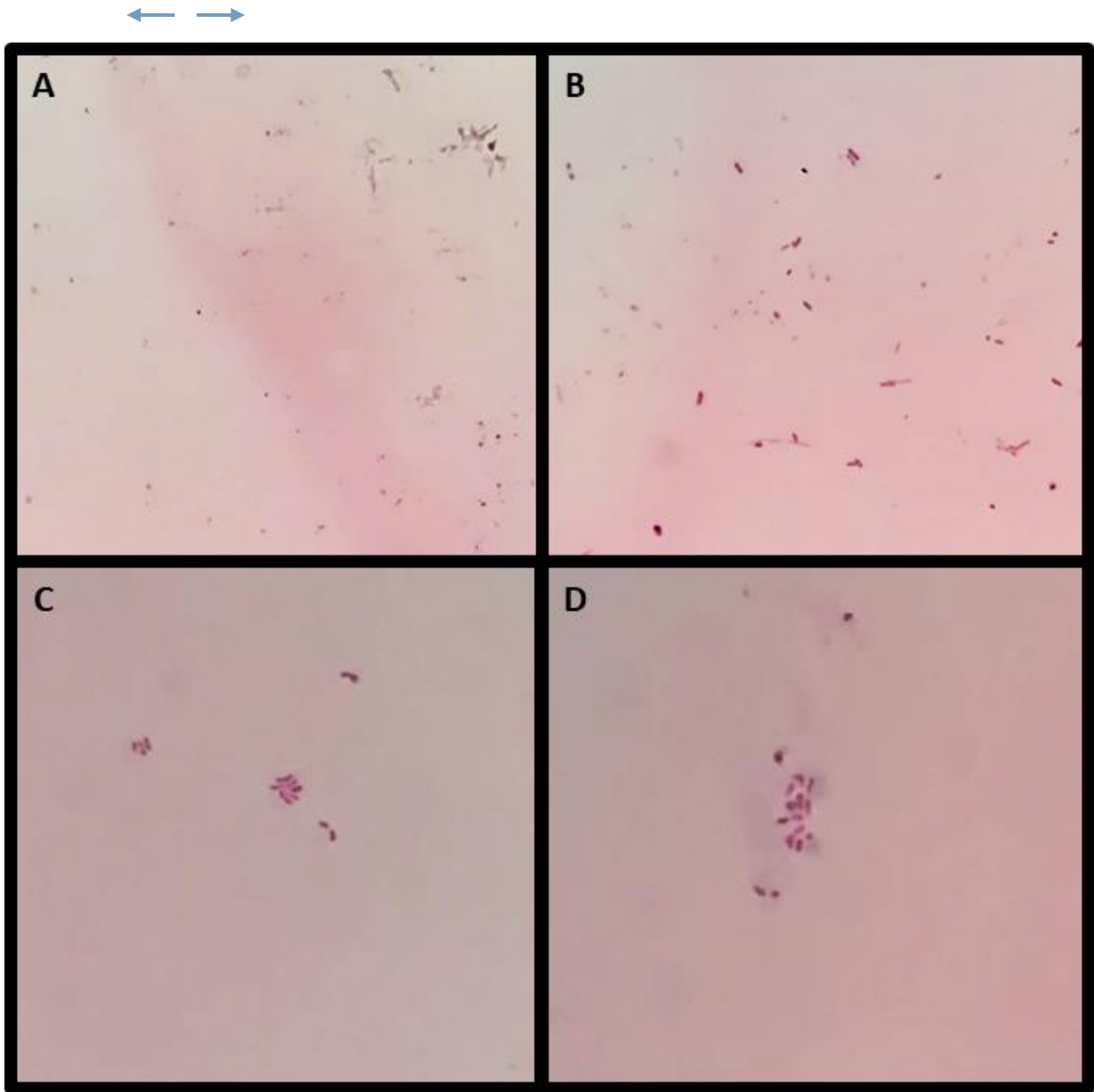


### **3.6. Usporedba biofilma bakterija *Acinetobacter baumannii* i *Bacillus cereus* te napredovanja bakterija pri koncentraciji $10^3$ bakterija po mL u sterilnoj vodi**

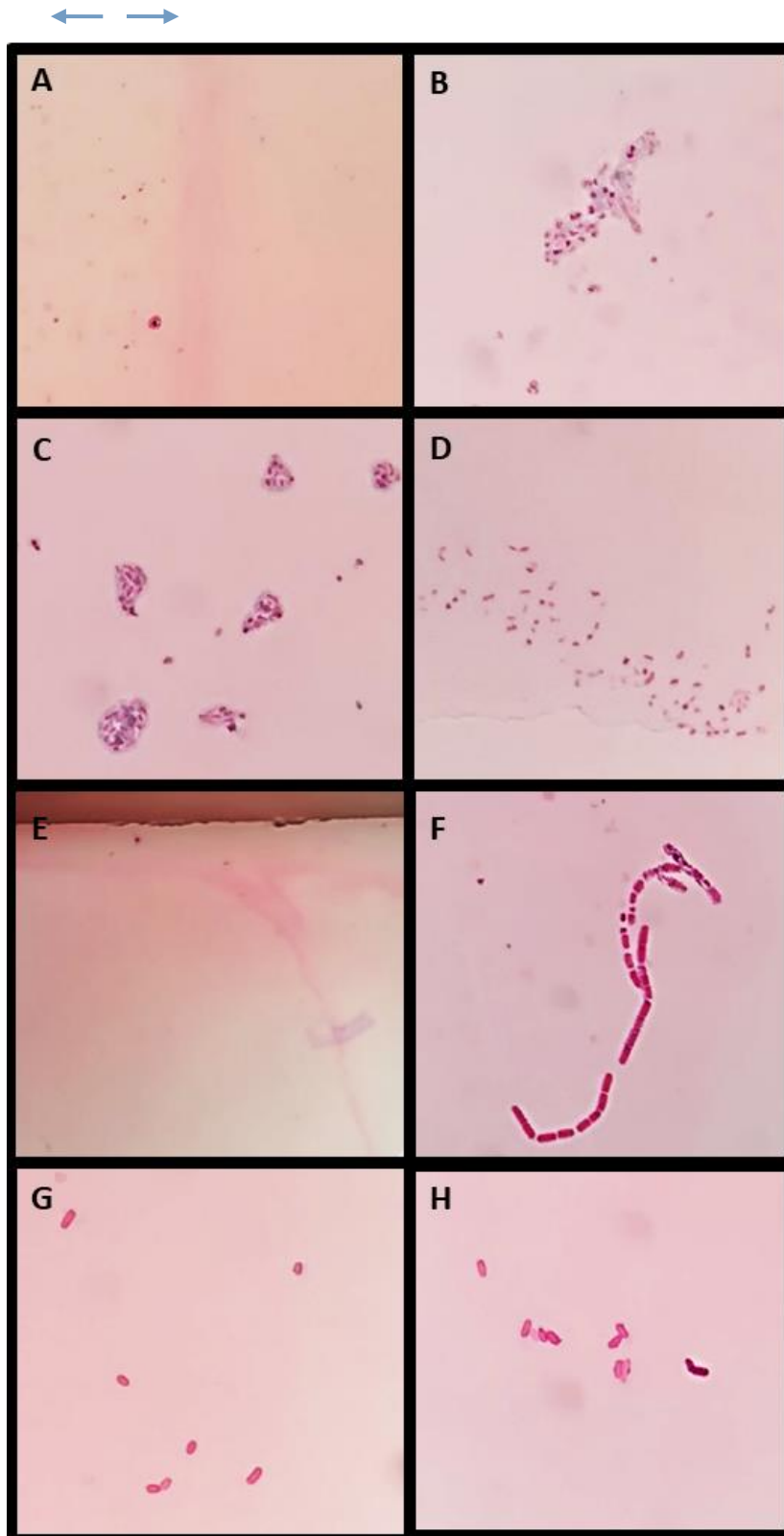
Prvog dana biofilm obiju vrsta bakterija *B. cereus* i *A. baumannii* nije vidljiv na stakalcima makroskopski ni mikroskopski pri najnižem povećanju od 40x. Pri najvećem povećanju od 1000x zapažena je samo jedna bakterija *B. cereus* na stakalcu u području interfaze. Na drugome stakalcu pri povećanju 1000x vide se pojedinačne bakterije, nakupine od par bakterija i veće mikrokolonije *A. baumannii* koje se nalaze na području interfaze. Nije vidljiva jasna kontinuirana interfaza zato što nakupine bakterija nisu prisutne dužinom cijele interfaze, već su prisutne fragmentirano s dosta širokim nenapučenim površinama između. 15 mm iznad interfaze uočena je mikrokolonija. Bakterije su zapažene najviše na 35 mm od interfaze. Stakalce je vrlo slabo napučeno bakterijama.

Trećega dana na prvome stakalcu nisu zapažene bakterije *B. cereus*. Na drugome stakalcu bakterije *A. baumannii* prisutne su u manjim nakupinama i pojedinačno, također fragmentirano duž područja interfaze kao i prvoga dana. 10 mm iznad interfaze uočene su vrlo sitne bakterije, vidljiva je nakupina bakterija od 9 stanica.

Sedmoga dana biofilm bakterije *B. cereus* također nije makroskopski vidljiv na stakalcu, no mikroskopiranjem pri povećanju 40x i 100x mogu se uočiti područja u interfazi gdje se nalaze bakterije, što se potvrdilo pri najvećem povećanju. Nakupine vegetativnih stanica i endospora bakterija prisutne su fragmentirano po dužini interfaze, međutim, za razliku od prije, nakupine su bile veće i gušće. Uz rubove stakalca vidi se veća i gušća koncentracija bakterija nego na sredini koja prati vodu koja se penjala. Iznad interfaze, bakterije su vidljive samo do 3 mm. Na drugome stakalcu biofilm *A. baumannii* također je slabo formiran, bakterije su prisutne samo na nekim mjestima u području interfaze. Nalaze se u malim nakupinama ili pojedinačno. Po sredini stakalca bakterije su zapažene najviše na 3 mm iznad interfaze. Uz rub su migrirale puno dalje, zadnja nakupina bakterija uočena je na 22 mm od interfaze.



Slika 19. Bakterije *A. baumannii* na staklenom predmetnom stakalcu nakon trećeg dana inkubacije u sterilnoj vodi pri koncentraciji  $10^3$  bakterija po mL. A) područje interfaze blizu ruba stakalca pri povećanju 100x, B) područje interfaze u sredini stakalca pri povećanju 1000x, C) bakterije na udaljenosti 5 mm od interfaze, D) bakterije na udaljenosti 10 mm od interfaze.\*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.



Slika 20. Bakterije *A. baumannii* (od A do D) i *B. cereus* (od E do H) na staklenom predmetnom stakalcu nakon sedmog dana inkubacije u sterilnoj vodi pri koncentraciji  $10^3$  bakterija po mL. A) područje interfaze pri povećanju 40x, B) područje interfaze u sredini stakalca pri povećanju 1000x, C) bakterije na udaljenosti 5 mm od interfaze, D) bakterije blizu ruba na udaljenosti 22 mm od interfaze, E) područje interfaze uz rub stakalca pri povećanju 100x, F) i G) interfaza pri povećanju 1000x, H) bakterije na udaljenosti 5 mm od interfaze. \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.

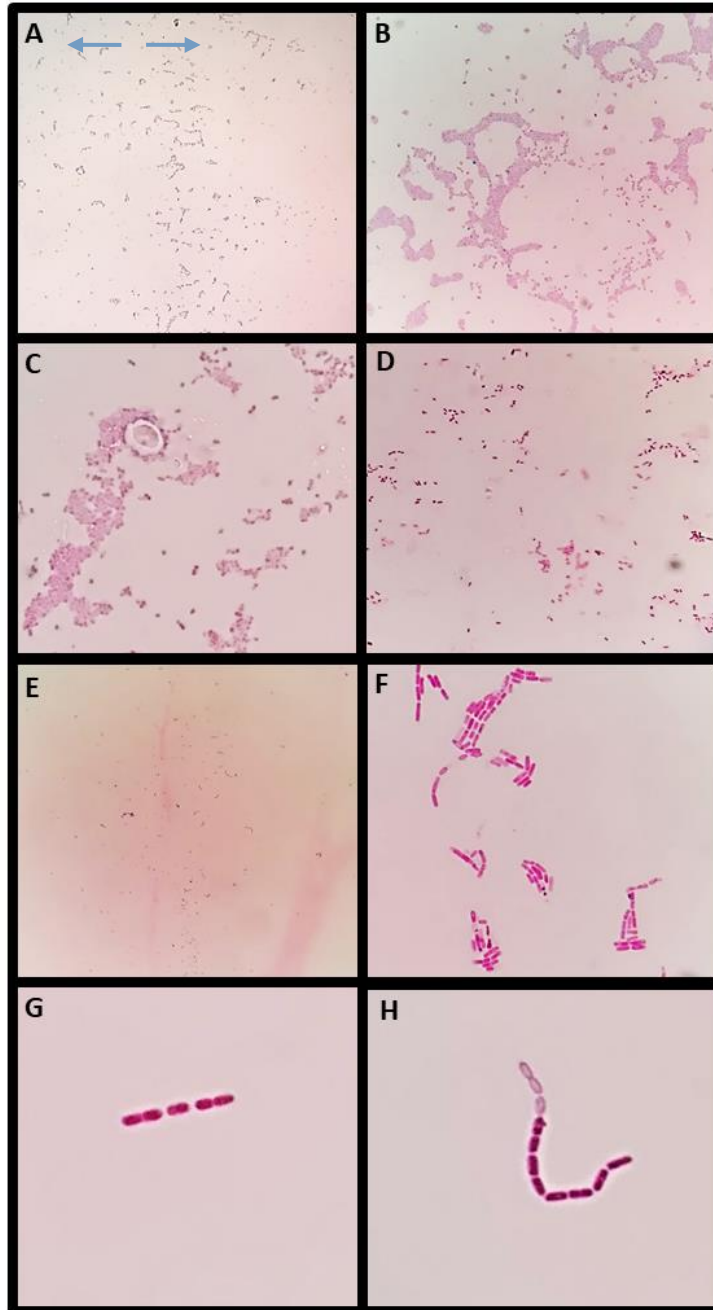
### **3.7. Usporedba biofilma bakterija *Acinetobacter baumannii* i *Bacillus cereus* te napredovanja bakterija pri koncentraciji $10^7$ bakterija po mL u sterilnoj vodi**

Prvog dana biofilm bakterije *B. cereus* nije vidljiv makroskopski kao ni pri nižoj koncentraciji. Mikroskopiranjem je uočljivo da biofilm nije razvijen cijelom dužinom interfeze. Vegetativne stanice bakterija i endospore su u većim i gušćim nakupinama u interfazi pri višoj koncentraciji. Iznad interfeze stakalce je vrlo slabo napučeno bakterijama. Po sredini stakalca jedna endospora zapazila se na 20 mm od interfeze, a uz rub je zapažen nešto veći broj endospora i vegetativnih stanica. Najviša pozicija je 38 mm. Na drugom stakalcu biofilm *A. baumannii* također nije vidljiv makroskopski, no mikroskopiranjem se već pri povećanju od 40x vidjela jasna granica tekućine i zraka. Pri najvećem povećanju moglo se vidjeti mnoštvo mikrokolonija, najčešće kružnih oblika. Iznad interfeze također je vidljivo mnogo mikrokolonija. Po sredini stakalca najviše su migrirale do 38 mm iznad interfeze, a uz rubove stakalca bakterije su vidljive samo malo iznad interfeze.

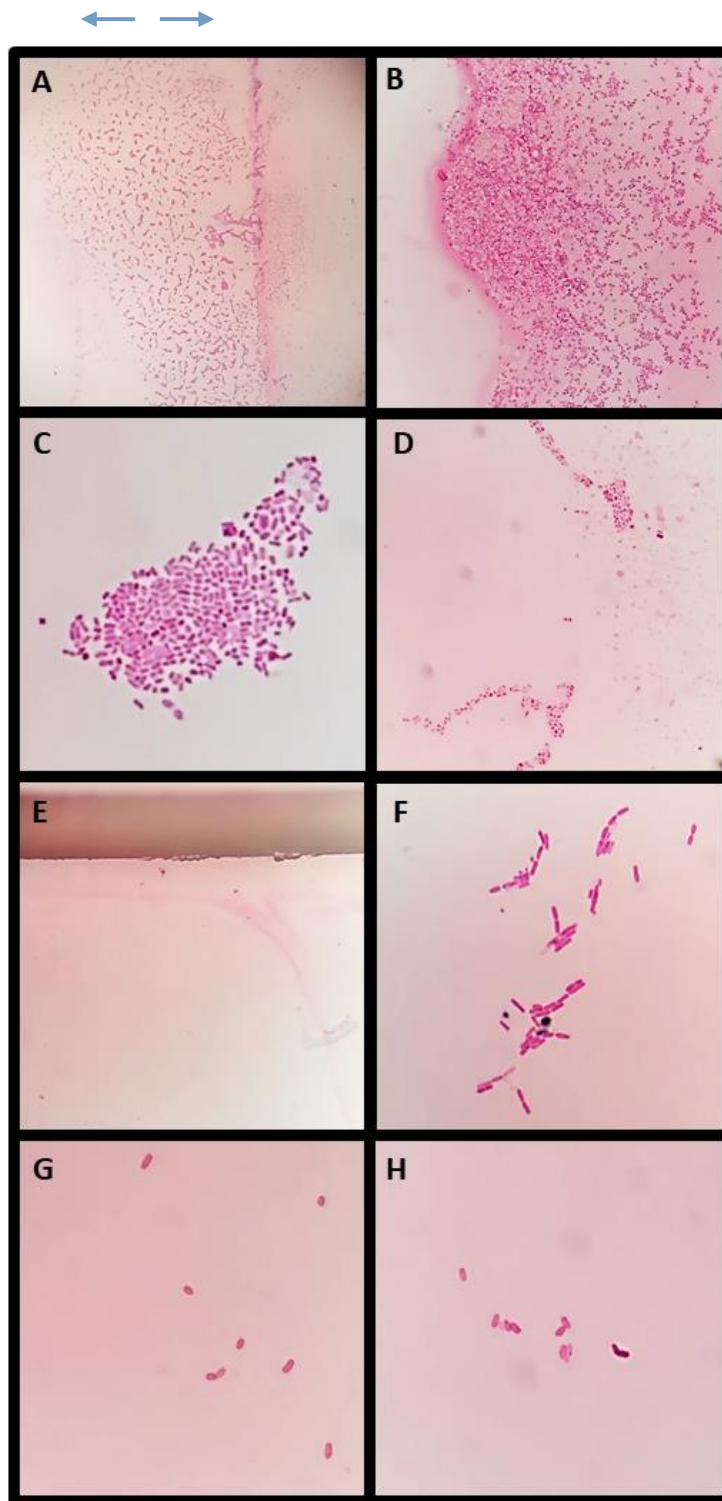
Trećega dana moglo se zamijetiti puno više endospora bakterije *B. cereus* u fragmentiranim nakupinama koje se nalaze u području interfeze. Iznad interfeze vidljive su vegetativne stanice i endospore. Do 10 mm iznad interfeze ih ima više, a nakon toga se prorjeđuju. Najviše su zapažene na 17 mm od interfeze. Uz rubove su također vidljive samo malo iznad interfeze. Na drugome stakalcu, vidljivo je puno kružnih i izduženih oblika mikrokolonija bakterije *A. baumannii* fragmentirano duž interfeze i ispod u uronjenom dijelu. U području interfeze ima puno nakupina bakterija, ali nisu guste i manjih su veličina nego u uronjenome dijelu. Do 7 mm iznad interfeze može se vidjeti veći broj mikrokolonija, a dalje postaju rjeđe. Na 32 mm opet se vide veće kolonije bakterija, a na 37 mm zapažene su najudaljenije bakterije.

Sedmoga dana vidljivo je malo vegetativnih stanica i endospora bakterije *B. cereus* u području interfeze. Iznad interfeze bakterije su zapažene samo do 5 milimetara. Promatranjem drugog stakalca pod mikroskopom, može se jasno vidjeti biofilm bakterije *A. baumannii*. Područje interfeze je gotovo cjelovito cijelom dužinom i ispunjeno brojnim

nakupinama bakterija koje su guste i uz rubove. Kao prvoga i trećega dana, vidljive su kolonije bakterija na uronjenome dijelu stakalca koje su sada još veće. Iznad interfaze nalazi se mnogo bakterija u prvih 5 mm. Posljednje bakterije videne su na 37 mm, a uz rub na 15 mm iznad interfaze.



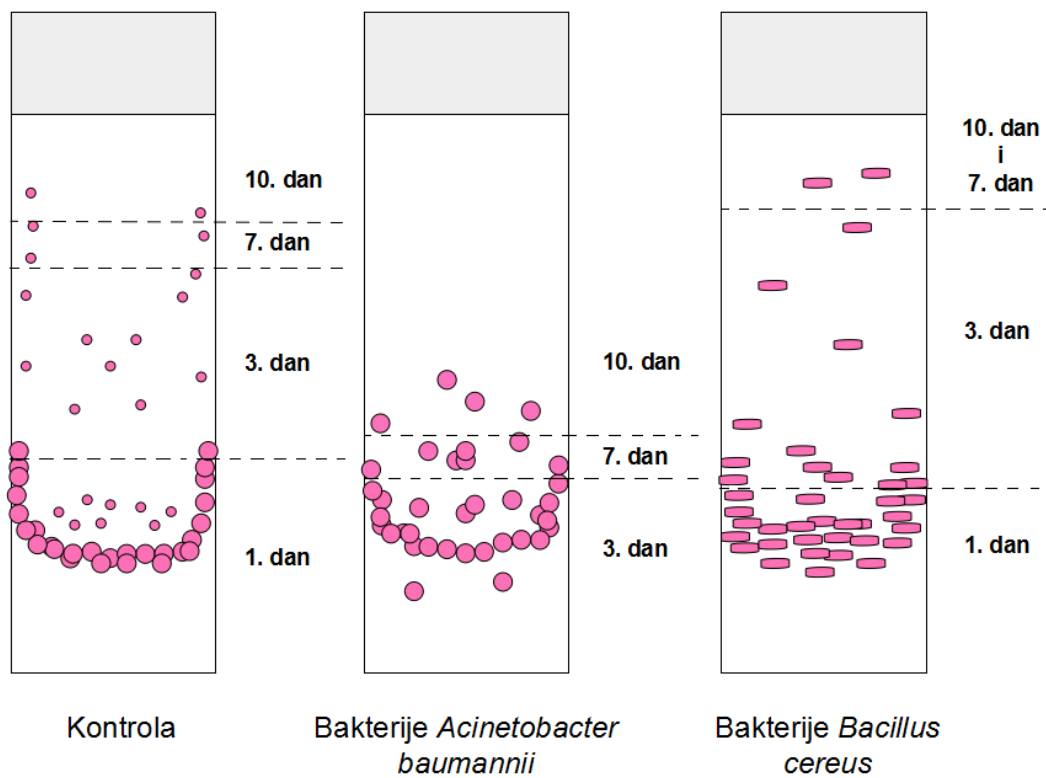
Slika 21. Bakterije *A. baumannii* (od A do D) i *B. cereus* (od E do H) na staklenom predmetnom stakalcu nakon trećeg dana inkubacije u sterilnoj vodi pri koncentraciji  $10^7$  bakterija po mL. A) područje interfaze pri povećanju 100x, B) područje interfaze pri povećanju 1000x, C) bakterije na udaljenosti 7 mm od interfaze, D) bakterije na udaljenosti 37 mm od interfaze, E) područje interfaze pri povećanju 100x, F) područje interfaze pri povećanju 1000x, G) bakterije na udaljenosti 10 mm od interfaze, H) bakterije na udaljenosti 17 mm od interfaze. \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.



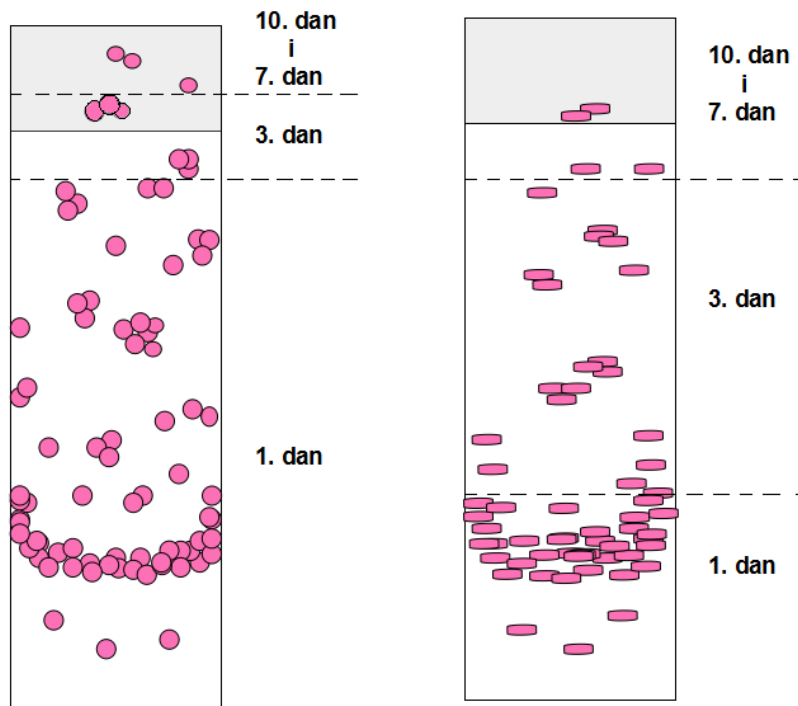
Slika 22. Bakterije *A. baumannii* (od A do D) i *B. cereus* (od E do H) na staklenom predmetnom stakalcu nakon sedmog dana inkubacije u sterilnoj vodi pri koncentraciji  $10^7$  bakterija po mL. A) područje interfaze pri povećanju 40x, B) područje interfaze pri povećanju 1000x, C) bakterije na udaljenosti 5 mm od interfaze, D) bakterije na udaljenosti 37 mm od interfaze, E) područje interfaze uz rub pri povećanju 100x, F) područje interfaze pri povećanju 1000x, G) bakterije na udaljenosti 3 mm od interfaze, H) bakterije na udaljenosti 5 mm od interfaze. \*Strelica ← označava gornji dio stakalca, a strelica → označava donji dio stakalca.

### 3.8. Predloženi model napredovanja bakterija i boje po staklenom predmetnom stakalcu

Pomoću dobivenih podataka iz eksperimenta, predložen je model napredovanja bakterija i boje po inertnoj površini staklenog predmetnog stakalca.



Slika 23. Predloženi model napredovanja boje po danima inkubacije na kontrolnom stakalcu te bakterija *A. baumannii* i *B. cereus* pri koncentraciji  $10^3$  bakterija po mL u hranjivom mediju.

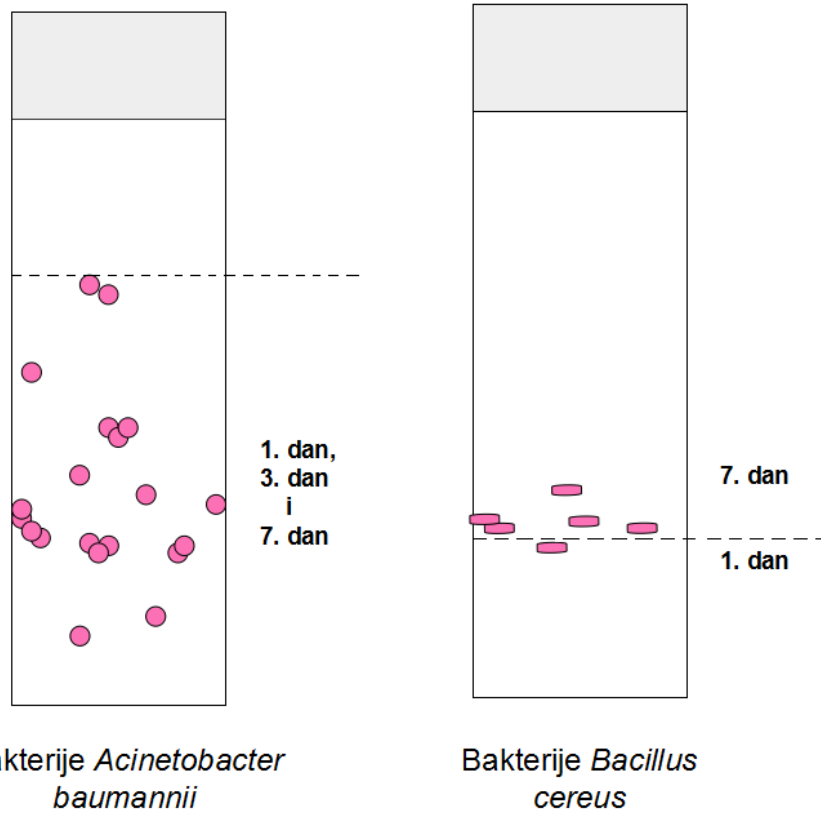


Bakterije *Acinetobacter baumannii*

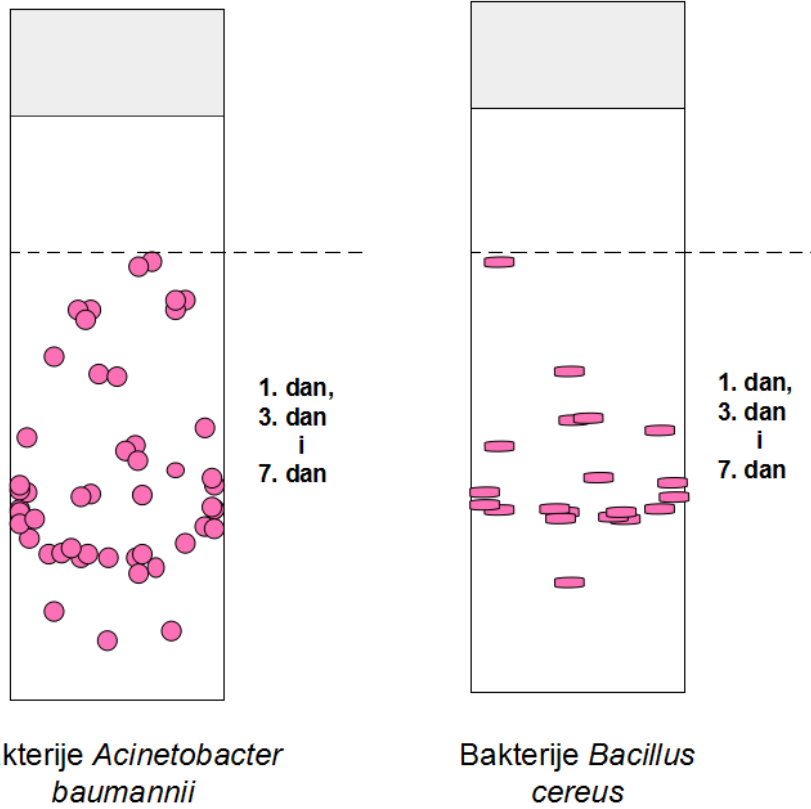
Bakterije *Bacillus cereus*

Slika 24. Predloženi model napredovanja bakterija *A. baumannii* i *B. cereus* po danima inkubacije, pri koncentraciji  $10^7$  bakterija po mL u hranjivom mediju.





Slika 25. Predloženi model napredovanja bakterija *A. baumannii* i *B. cereus* po danima inkubacije, pri koncentraciji  $10^3$  bakterija po mL u sterilnoj vodi.



Slika 26. Predloženi model napredovanja bakterija *A. baumannii* i *B. cereus* po danima inkubacije, pri koncentraciji  $10^7$  bakterija po mL u sterilnoj vodi.

## 4. RASPRAVA

S obzirom na rezultate opisane u ovom istraživanju i predložene modele, može se pretpostaviti sljedeće. Na kontrolnim stakalcima mrlje boje makroskopski su vidljive par milimetara iznad interfaze (granica vode i zraka) i uz rub stakalca gdje su naročito izražene kao zavijene linije prema gore koje se protežu od interfaze prema rubu. Budući da se voda uzdizala po staklenom predmetnom stakalcu zbog kapilarnosti koja je rezultat privlačnih sila adhezije i kohezije, može se sa sigurnošću pretpostaviti da se boja uzdizala zajedno s vodom, zato što ne postoji niti jedan drugi mehanizam kojim bi se objasnila zapažena pojava u ovom eksperimentu. Adhezija, sila koja djeluje između molekula vode i čvrste stijenke jača je od kohezije koja djeluje među molekulama vode pa je uzdizanje boje zajedno s vodom uz rubove stakalca najjače, što je vidljivo i makroskopski. Na svakome stakalcu, golim okom su tragovi boje bili vidljivi uz rub na višoj poziciji od interfaze negoli po sredini stakalca. Također, uz postranični rub stakalca koji je širok oko jedan milimetar, dakle iznos debljine stakalca, boja se uzdigla i preko 30 mm, na još više pozicije od interfaze negoli uz sam rub. S obzirom da je poznato da su kapilarne sile to jače, a uzdizanje vode to više što je cijev kroz koju se uzdiže voda uža, može se zaključiti da će kapilarne sile na ravnim površinama biti također jače što su te ravne površine uže, a to je i dokazano ovim eksperimentom. Promatranjem pod mikroskopom mogli su se uočiti fragmenti boje uz rub ili blizu ruba na višim pozicijama negoli po sredini stakalca, te se stoga može zaključiti da je uzdizanje vode s bojom snažnije u tom području stakalca.

Pri nižoj koncentraciji nakon jednoga dana inkubacije, *A. baumannii* bakterije formirale su mikrokolonije u području interfaze, a *B. cereus* bakterije već su formirale izraženi biofilm. Istraživanjem razloga zašto je tome tako, kao obrazloženje se može uzeti u obzir prisutnost bičeva i pokretljivost. Kod nekoliko bakterijskih vrsta pokazalo se kako prisutnost bičeva služi bakterijama prilikom adhezije za čvrste površine, međutim to nije pravilo i ovo svojstvo ovisi o uvjetima i vrsti površine. Zanimljivo otkriće u radu Houry i sur. (2010) je da prisutnost bičeva smanjuje adheziju bakterija *B. cereus* na staklenu podlogu. Pretpostavlja se da je to zbog toga što flagelarni aparat ometa interakciju stanične stijenke bakterije i površine stakla. Međutim, bez obzira na to što bičevi nisu uključeni u

adheziju na staklenu površinu, pokazalo se kako mogu imati ulogu u adheziji na druge materijale i živo tkivo. Kod *B. cereus* i srodne bakterije *Bacillus thuringiensis*, otkriveno je da bičevi imaju ulogu u adheziji na epitelne stanice. Također, u radu Houry i sur. (2010) došlo se i do drugih otkrića. Naime, zaključeno je da prisutnost bičeva i pokretljivost u stacionarnim uvjetima ima pozitivni učinak u formiranju biofilma na sučelju zraka i tekućine. Kada su bakterije pokretljive, biofilm može rasti ne samo diobom sesilne populacije bakterija na čvrstoj podlozi, već i regrutiranjem (engl. *recruitment*) planktonskih stanica iz tekućeg medija. Kod bakterije *B. cereus* opisano je da se planktonske stanice snažno i brzo regrutiraju u sve dijelove biofilma te da su važna komponenta u formiranju biofilma. Biofilm se u najvećem dijelu stvara na sučelju zraka i tekućeg medija zato što obje bakterije *A. baumannii* i *B. cereus* teže većoj koncentraciji kisika. *A. baumannii* je aerobna, a *B. cereus* je aerobna i fakultativno anaerobna bakterija. Fakultativni anerobi se također skupljaju na granici vode i zraka zato što aerobnim disanjem stvaraju puno više ATP-a nego anaerobnim disanjem, odnosno fermentacijom (Hogg 2005). Zbog toga, aerobno disanje je preferiraniji način stvaranja energije. Imajući to na umu, može se reći da je pokretljivost važno sredstvo u ranoj fazi formiranja biofilma zbog mogućnosti migriranja bakterija na najbolje odgovarajuće mjesto. S obzirom da *A. baumannii* bakterije nemaju bičeve, može se pretpostaviti da je to jedan od mogućih razloga sporijeg formiranja biofilma u toj početnoj fazi.

Nakon provođenja eksperimenata s višom koncentracijom bakterija evidentno je da viša koncentracija pogoduje bržem i jače izraženom formiranju biofilma obiju vrsta bakterija u hranjivom mediju, ali i u sterilnoj vodi. Osim toga, pri višoj koncentraciji bakterija uočeno je puno više bakterija na stakalcu u zoni zraka. Dakle u području iznad interfaze koje nije bilo uronjeno u hranjivi medij, napučenost bakterija na stakalcu je znatno veća u usporedbi s nižom koncentracijom. Prema rezultatima koji su prikupljeni po danima inkubacije, može se reći da su se pri višoj koncentraciji bakterija u većini slučajeva uočile bakterije na višim pozicijama od interfaze po sredini, ali i uz rub stakalca.

Pokus koji se proveo s autoklaviranim stakalcima i stakalcima iz suhog sterilizatora, trebao je poslužiti u razrješenju pitanja ima li razlike u napretku bakterija s obzirom na ova dva načina sterilizacije. Postojala je sumnja da bi vlaga koja ostaje na stakalcu nakon autoklaviranja mogla uzrokovati jače kapilarne sile te time posredovati u većem uzdizanju

bakterija vertikalno gore po površini stakalca. S obzirom na to da su dobiveni rezultati na autoklaviranim stakalcima i stakalcima iz suhog sterilizatora vrlo slični i ne postoje značajne razlike, može se reći da nije vidljiva razlika u napretku bakterija s obzirom na ova dva načina sterilizacije. Razlog tome može biti da eventualna vlaga koja preostaje na stakalcu nakon autoklaviranja nije dostatna kako bi adhezijskim i kohezijskim silama privlačila druge molekule vode te tako uzrokovala uzdizanje vode, a time i uzdizanje bakterija pasivnim putem.

Proučavanjem veličine mikrokolonija, odnosno nakupina bakterija na površini stakalca, došlo se do zaključka da ne vrijedi pravilo da nakupine bakterija postaju progresivno sve manje na višim pozicijama. Naime, u nekom području stakalce može biti rijetko napučeno bakterijama te mogu biti vidljive pojedinačne ili male grupe od par bakterija, a zatim je na višoj poziciji moguće uočiti iznimno velike nakupine bakterija.

U kasnijim danima eksperimenta s bakterijom *B. cereus* u hranjivom mediju i u pokusu sa sterilnom vodom umjesto hranjivog medija, moguće je vidjeti povećani broj endospora na stakalcu u području interfaze i iznad nje. Mikroorganizmi mogu osjetiti nepovoljne uvjete i prilagoditi im se. Na primjer, kada su potrebni nutrijenti iscrpljeni, neke bakterije mogu postati mobilne i krenuti u potragu za nutrijentima, neke mogu proizvesti enzime za korištenje alternativnih resursa, a još ekstremniji primjer strategije preživljavanja nekih bakterija je formiranje endospora. Proces sporulacije je obično iniciran zbog nedostatka nutrijenata. Nakon formiranja endospore, bakterija je u dormantnom stanju i puno je otpornija na razne nepovoljne uvjete. Na taj način bakterija štiti svoj genetički materijal od raznih stresnih faktora poput visoke temperature, snažnog UV zračenja, isušivanja, raznih kemikalija, dezinficijensa i slično. Dakle, endospore mogu preživjeti uvjete koji bi inače ubili vegetativnu stanicu. Budući da je prilikom proučavanja stakalca koje je bilo uronjeno u hranjivi medij uočen veći broj endospora sedmog i desetog dana eksperimenta, može se pretpostaviti da su bakterije koje su se nalazile u području interfaze iscrpile većinu nutrijenata te zatim formirale endospore. Bakterije koje su napredovale vertikalno po stakalcu zbog nedostatka nutrijenata također su formirale endospore. S obzirom da se patogene svojstva bakterija zadržavaju nakon što iz spora isključuju vegetativne stanice, može se zaključiti da se napretkom bakterija po čvrstim

površinama i formiranjem endospora povećava mogućnost kontakta s imunokomprimiranim bolesnicima u bolničkim okruženjima.

Razmatranjem rezultata pri višoj koncentraciji bakterija i po danima inkubacije kako napreduju bakterije *A. baumannii* po površini stakalca, može se vidjeti da su bakterije migrirale na nešto više pozicije od bakterija *B. cereus*. To je zanimljivo opažanje s obzirom na to da su bakterije iz roda *Acinetobacter* karakterizirane kao nepokretne zbog nedostatka bičeva. Međutim, istraživanja u radu Vijayakumar i sur. (2016) pokazala su da bakterije *A. baumannii* imaju mogućnost aktivnog pokretanja pomoću struktura pili tipa 4. Izduživanjem, pričvršćivanjem za podlogu te povlačenjem ovih struktura, moguće je brzo pokretanje po polučvrstim i nekim neživućim čvrstim površinama. Navedeno kretanje poznato je kao trzanje (engl. *twitching*).

Usporedbom rezultata u pokusu sa sterilnom vodom umjesto hranjivim medijem, zapaženo je da su *A. baumannii* bakterije uspješnije u formiranju biofilma od *B. cereus* bakterija u ovakvim uvjetima. Na stakalcu pri višoj i nižoj koncentraciji bakterija, bilo je vidljivo više *A. baumannii* bakterija u području interfaze. Također, uočena je veća napućenost bakterijama *A. baumannii* u području iznad interfaze gdje su bakterije pretežno zapažene na većim udaljenostima. To opažanje najviše dolazi do izražaja u pokusu s nižom koncentracijom bakterija. Dakle, pri nižoj koncentraciji bakterija *B. cereus* nije došlo do formiranja biofilma, a iznad interfaze nisu zapažene bakterije. U slučaju s bakterijama *A. baumannii*, također pri nižoj koncentraciji, mogao se uočiti slabo formirani biofilm kao nakupine bakterija na pojedinim mjestima duž interfaze na stakalcu. U zoni zraka, dakle u području iznad interfaze, uočene su bakterije na raznim udaljenostima, ovisno o danu inkubacije. Iz toga slijedi da snažnije formiranje biofilma pospješuje bolje rezultate u napretku bakterija te se može pretpostaviti da biofilm posreduje u napretku bakterija. Ovu pretpostavku potvrđuju opažanja u pokusu s višom koncentracijom bakterija. Naime, bakterije *B. cereus* su pri višoj koncentraciji formirale slabi biofilm na pojedinim mjestima duž interfaze, a rezultati u napredovanju bakterija su također bili bolji. Već prvoga dana bakterije su po sredini stakalca napredovale 20 mm od interfaze.

Razmatranjem mogućih mehanizama migracije bakterija u nehranjivo područje, zone zraka, može se doći do nekih pretpostavki. S obzirom da su na kontrolnim uzorcima mrlje boje uočene na većim udaljenostima od interfaze u području blizu rubova nego po sredini

stakalca, pretpostavilo se da su kapilarne sile snažnije uz rubove. Ovdje je moguće pretpostaviti da se bakterije uzdižu pasivno, posredovane kapilarnim silama zajedno s vodom te da je uzdizanje bakterija uz rubove snažnije iz razloga što je i uzdizanje vode uz rubove također snažnije. Budući da su u većini slučajeva (naročito kasnijih dana eksperimenta) po sredini stakalca zapažene bakterije na višim pozicijama od interfaze nego uz rub stakalca, može se pretpostaviti da je uz kapilarne sile posrijedi i neki aktivni oblik bakterijske pokretljivosti.

Bakterije *B. cereus* uz *B. subtilis* i *P. aeruginosa* su modelni organizmi u proučavanju pokretljivosti poznatom kao kretanje u roju (engl. *swarming*) (Senesi i sur. 2002; Hsueh i sur. 2007; Salvetti i sur. 2011; Senesi i sur. 2010; Verstraeten i sur. 2008). Ova pokretljivost podrazumijeva više bakterija koje se pokreću po površini pomoću rotirajućih bičeva (Kearns 2010). U radu Kearns i Losick (2003) potvrđena je mogućnost ovog oblika pokretljivosti kod bakterija *B. cereus*. U radu Houry i sur. (2010) navode kako bakterijska pokretljivost snažno doprinosi širenju biofilma i opisuju kako je vrlo vjerojatno da mobilne bakterije unutar biofilma ostaju unutar biofilma, ali da ga proširuju korak po korak na nekolonizirano područje hranjive podloge pokretljivošću sličnom kretanju u roju. Međutim, kretanje u roju većinom je karakteristično za bakterije koje posjeduju bičeve i koje se nalaze na mekim agarским pločama bogatim nutrijentima (do 1 % agara), a to se u potpunosti razlikuje od uvjeta koji su prisutni u ovom eksperimentu.

Već spomenuta pokretljivost trzanjem (engl. *twitching*) koja je moguća u bakterije *A. baumannii* proučavana je na inertnim površinama poput Petrijeve zdjelice (Nolan i sur. 2012) i staklenog predmetnog stakalca (Gloag i sur. 2013), no i ove površine su u eksperimentima bile prekrivene slojem agara bogatim hranjivim tvarima. Međutim, eksperimentima u mikrobiološkom laboratoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, zapaženi su tipični obrasci rasta biofilma bakterija *P. aeruginosa* i *Acinetobacter junii* posredovani trzanjem bakterija i po nehranjivoj površini. Iz tog razloga pretpostavlja se da je pokretljivost trzanjem moguća i po površinama koje nisu prekrivene nutrijentima te se ovaj oblik pokretljivosti može uzeti u obzir kao jedan od mogućih mehanizama napredovanja *A. baumannii* bakterija po stakalcu.

Mehanizmi pokretljivosti kao što su (engl. *gliding*), (engl. *sliding*) i (engl. *surfing*) također su ispitivani na mekim agarским površinama te se opažanja ne mogu usporediti s

pokretljivošću po čvrstoj nehranljivoj površini (Politt i Diggle 2017; Yeung i sur. 2012). Iz tog razloga ostaje upitno imaju li ovi oblici pokretljivosti ulogu u napredovanju bakterija po nehranljivoj podlozi stakalca.

U ovom eksperimentu nameće se pitanje jesu li bakterije samo migrirale iz biofilma ili su se pritom i aktivno dijelile. Prisutnost mikrokolonija na većim udaljenostima od interfeze biofilma ukazuje na mogućnost diobe stanica. Ako se dioba odvijala, mikrokolonije su mogle nastati diobama iz jedne stanice ili iz agregata par bakterijskih stanica koje su migrirale na jedno mjesto te se zatim aktivno dijelile. S obzirom da su za proliferaciju stanica potrebni nutrijenti, morali su nekako dospjeti u zonu zraka na stakalcu. Moguće objašnjenje je transport nutrijenata u zonu zraka posredovan kapilarnim silama. Međutim, imajući u vidu rezultate pokusa koji je proveden sterilnom vodom umjesto hranjivim medijem, gdje su na stakalcu uočene mnoge mikrokolonije bakterija *A. baumannii*, može se pretpostaviti da prisutnost nutrijenata u mediju nije potrebna za formiranje mikrokolonija. Mogućnost diobe stanica još se ne može odbaciti zbog toga što postoji drugo objašnjenje kako bakterije dolaze do hranjivih tvari potrebnih za proliferaciju. “*Bust and boom*” strategija preživljavanja omogućuje živim stanicama da prežive na račun slabijih stanica koje uginu kada se nađu u nepovoljnim uvjetima (Bravo i sur. 2016).



## 5. ZAKLJUČAK

- Razmatranjem opisanih rezultata može se zaključiti da se boja uzdiže zajedno s vodom po staklenom predmetnom stakalcu zbog djelovanja kapilarnih sila te da je uzdizanje boje s vodom snažnije uz rubove stakalca.
- Obje vrste bakterija, *Bacillus cereus* i *Acinetobacter baumannii*, napredovale su u nehranjivo područje zone zraka na staklenom predmetnom stakalcu.
- U hranjivom mediju bakterije *B. cereus* brže su formirale biofilm kad se usporede s *A. baumannii*, a u sterilnoj vodi brže i snažnije se razvio biofilm bakterije *A. baumannii*. Međutim, u oba pokusa uočeno je da su *A. baumannii* bakterije napredovale najviše te se može zaključiti da su uspješnije u formiranju biofilma, a zatim i napredovanju na nekolonizirano područje stakalca.
- Viša koncentracija bakterija pogoduje bržem i snažnijem formiranju biofilma, uzrokuje veću napučenost bakterijama u zoni zraka te daje bolje rezultate u napredovanju bakterija vertikalno gore u nehranjivo područje zone zraka.
- Snažnije formiranje biofilma pospešuje bolje rezultate u napredovanju bakterija te se može zaključiti da biofilm prethodi i posreduje u pokretljivosti, odnosno migraciji bakterija.
- S obzirom na impresivne rezultate napredovanja bakterija po sredini stakalca, uz kapilarne sile vrlo je vjerojatno postojanje i nekog aktivnog oblika bakterijske pokretljivosti koji je omogućio migraciju bakterija u nehranjivo područje zone zraka. Međutim, zbog ograničene postavke ovog eksperimenta, točan mehanizam napredovanja bakterija nije u potpunosti razjašnjen.

## 6. POPIS LITERATURE

1. Antunes, L.C.S., Imperi, F., Carattoli, A., Visca, P. (2011): Deciphering the Multifactorial Nature of *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. *Plos one*, 6:e22674
2. Atrouni, A.A., Guillou, M.L.J., Hamze, M., Kempf, M. (2016): Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species. *Front. Microbiol*, 1;7:49
3. Bottone, E.J., (2010): *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23:382-398
4. Bravo, Z., Orruno, M., Parada, C., Kaberdin, V.R., Barcina, I., Arana, I. (2016): The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state. *Archiv Microbiol*, 198:399:407
5. Cooper, G.L., Schiller, A.L., Hopkins, C.C. (1998): Possible Role of Capillary Action in Pathogenesis of Experimental Catheter-Associated Dermal Tunnel Infections. *Jurnal of Clinical Microbiology*, 26:8-12
6. Flemming, H.C., Wingender, J. (2010): The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology* 8, 623-633
7. Gloag, E.S., Turnbull, L., Huang, A., Vallotton, P., Wang, H., Nolan, L.M. i sur. (2013): Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110:11541-11546
8. Hartzell, J.D., Kim, A.S., Kortepeter, M.G., Moran, K.A. (2007): *Acinetobacter* Pneumonia: A Review. *MedGenMed*, 9:4
9. Hogg, S. (2005.) *Essential Microbiology* (1 st ed.) Wiley. Pp. 99-100
10. Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., Gohar, M. (2010): Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*, 156:1009-1018
11. Hölscher, T., Kovacs, A.T. (2017): Sliding on surface: bacterial spreading without an active motor. *Environmental Microbiology*, 19:2537-2545
12. Hseueh, Y.H., Somers, E.B., Lereclus, D., Ghelardi, E., Wong A.C.L. (2007): Biosurfactant production and surface translocation are regulated by PlcR in *Bacillus cereus* ATCC 14579 under low-nutrient conditions. *Appl Environ Microbiol*, 73:7225-31

13. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Physical\\_Properties\\_of\\_Matter/States\\_of\\_Matter/Properties\\_of\\_Liquids/Capillary\\_Action](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Physical_Properties_of_Matter/States_of_Matter/Properties_of_Liquids/Capillary_Action) (pristupljeno: 16. kolovoza 2019)
14. <https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores/> (pristupljeno: 25. kolovoz 2019.)
15. <https://www.britannica.com/science/capillarity> (pristupljeno: 16. kolovoza 2019)
16. Jarell, K., McBride, M.J. (2008): The surprising diverse ways that prokaryotes move. *Nature Reviews Microbiology*, 8:466-476
17. Kearns, D.B. (2010): A field guide to bacterial swarming mobility. *Nat Rev Microbiol*, 8:634-644
18. Kearns, D.B., Losick R. (2003): Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 49:581-590
19. Kentache, T., Abdelkrim, A.B., Jouenne, T., De, E., Hardouin, J. (2017): Global Dynamic Proteome Study of a Pellicle-forming *Acinetobacter baumannii* Strains. *Molecular & Cellular Proteomics*, 16.1
20. Lane, N. (2015): The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) 'Concerning little animals'. *Philosophical transactions B*, 370:20140344
21. Mitchell, J.G., Kogure, K. (2006): Bacterial motility: links to the environment and a driving force for microbial physics. *FEMS Microbiol Ecol*, 55:3-16
22. Monroe, D. (2007): Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol*, 5(11): e307
23. Nolan, L.M., Beatson, S.A., Croft, L., Jones, P.M., George, A.M., Mattick, J.S. i sur. (2012): Extragenic suppressor mutations that restore twitching motility to fimL mutants of *Pseudomonas aeruginosa* are associated with elevated intracellular cyclic AMP levels. *Microbiology Open*, 1:490-501
24. O' Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000): Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology*, 54:49-79
25. Pollitt, E.J.G., Diggle, S.P. (2017): Defining motility in the *Staphylococci*. *Cellular and Molecular Life Science*, 74:2943-2958

26. Pollitt, E.J.G., Shanika, A.C., Diggle, S.P. (2015): *Staphylococcus aureus* forms spreading dendrites that have characteristics of active motility. *Scientific reports*, 5:17698
27. Pour, N.K., Dusane, D.H., Dhakephalkar, P.K., Zamin, F.R., Zinjarde, S.S, Chopade, B.A. (2011): Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 62:328-338
28. Salvetti, S., Faegri, K., Ghelardi, E., Kolstø A.B., Senesi, S. (2011): Global gene expression profile for swarming *Bacillus cereus* bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 77:5149-5156
29. Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G. (2002): *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*, 184: 1140–1154
30. Sauer, K., Stoodley, P., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002): Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56:187-209
31. Senesi, S., Celandroni F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Wong A.C.L., Ghelardi, E. (2002): Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a *fliY* mutant impaired in swarm cell differentiation. *Microbiology*, 148:1785-1794.
32. Senesi, S., Salvetti, S., Celandroni, F., Ghelardi, E., (2010): Features of *Bacillus cereus* swarm cells. *Res Microbiol*, 161:743-749
33. Vatansever, C., Turetgen, I. (2018): Investigating the effects of different physical and chemical stress factors on microbial biofilm. *Water SA*, 44 n.2
34. Verstreten, N., Breaken, K., Debkumari B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., Michiels J. (2008): Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol*, 16:496-506
35. Vijayakumar, S., Rajenderan, S., Laishram, S., Anandan, S., Balaji, V., Biswas, I. 2016: Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Frontiers in Public Health*, 4:105
36. Vraneš, J., Leskovar, V. (2009): Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Medicinski glasnik*, 6:147-164

37. Yeung, A.T.Y., Parayno, A., Hancock, R.E.W. (2012): Mucin promotes rapid surface motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 3:e00073-12

## 7. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime i prezima: Marko Percela

Datum i mjesto rođenja: 26. 03. 1993., Zagreb, Hrvatska

E-mail adresa: marko.percela1@gmail.com

### OBRAZOVANJE

2012. - 2019. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno - matematički fakultet, Biološki odsjek, integrirani preddipomski i diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija

2008. - 2012. Opća Gimnazija Tituša Brezovačkog

### VJEŠTINE

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

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

Vozačka dozvola: B kategorija