**Kompetitivna ekskluzija *E. coli* 3014**

06.05.2022.

- pripremiti i razliti Rapid agar ploče

09.05.2022.

- precijepiti sojeve MC1, D12 i *E. coli* 3014 iz zamrzivača (-80 °C) – staviti MC1 i D12 (anaerobno) i *E. coli* (aerobno) na 37 °C

10.05.2022.

- precijepiti sojeve MC1 i D12 (u 4 paralele) i *E. coli* 3014 (u 8 paralela) ­– staviti MC1 i D12 (anaerobno) i *E. coli* (aerobno) na 37 °C

11.05.2022.

-kompetitivna ekskluzija *E. coli*

- prebaciti po 4 paralele sojeva MC1 i D12 u Falconice od 15 mL

- po 8 paralela test-mikroorganizma *Escherichia coli* 3014 prebaciti u 1 Falconicu od 50 mL

- centrifugirati (5 min pri 4200 o/min) i talog stanica isprati u 5 mL fiziološke otopine

- centrifugirati (5 min pri 4200 o/min) i talog resuspendirati u 10 mL fiziološke otopine – 100 µL suspenzije svakog soja uzeti za mjerenje optičke gustoće (OD620)

- potrebno je podesiti OD na 1 prema formuli c1 \* V1 = c2 \* V2

- resuspendirati u MEM mediju u izračunatom volumenu

\* prije resuspendiranja u MEM odvojiti po 1 mL *E. coli* u epicu – služi za određivanje broja stanica prije inkubacije i bez dodatka BMK

- prije inkubacije BMK, Caco-2 stanice je potrebno isprati 3 puta u 1 mL PBS-a (pH 7,4)

- zatim se doda 1 mL suspenzije BMK i stanice se inkubiraju 1 h pri 37 °C

- nakon inkubacije s BMK, Caco-2 stanice se ispiru s 1 mL PBS-a (pH 7,4) te se u jažice dodaje 1 mL suspenzije patogene bakterije *E. coli* i nastavlja se inkubacija 1 h pri 37 °C

- nakon inkubacije s patogenim bakterijama jažice se ispiru 3 puta s 1 mL PBS-a (pH 7,4) kako bi se uklonile bakterijske stanice koje se nisu vezale na Caco-2 stanice, a adhezirane stanice se inkubiraju 10 min s 1 mL 0,05% (v/v) otopini Triton X-100

- sadržaj svake jažice se prebaci u epicu i centrifugira (5 min pri 13000 o/min) – talog se resuspendira u 1 mL PBS-a (pH 7,4)

- slijedi određivanje broja stanica indirektnom metodom – na Rapid agar nacijepljivati 2 paralele od -1 do -6 razrjeđenja

- sve ploče staviti na aerobnu inkubaciju na 37 °C te nakon 48 h slijedi brojanje izraslih kolonija – rezultat se izrazi kao CFU/mL

13.05.2022.

- brojanje CFU/mL