

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Ana Marija Perić
7047/BT**

**MEHANIZMI BAKTERIJSKE REZISTENCIJE I
TOLERANCIJE NA ANTIBIOTIKE**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Molekularna genetika

Mentor: Prof. dr. sc. Višnja Bačun-Družina

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Mehanizmi bakterijske rezistencije i tolerancije na antibiotike

Ana Marija Perić, 7047/ BT

Sažetak: Bakterije mogu steći rezistenciju na antibiotike novim mutacijama ili horizontalnim prijenosom gena. Mehanizmi koji omogućavaju rezistenciju na antibiotike, a koji se javljaju kao posljedica tih mutacija, mogu se podijeliti u tri glavne skupine: inaktivacija antibiotika, modifikacija mete djelovanja antibiotika i izlučivanje antibiotika iz stanice pomoću transportnih proteina, efluks pumpi. Osim genetičkih mutanata, unutar populacije bakterija kao odgovor na prisustvo antibiotika mogu se pojaviti fenotipske varijante divljeg soja bakterija koje pokazuju značajnu toleranciju na antibiotike, a nazivaju se stanice perzisteri. Osim rezistencije i tolerancije bakterija na razni pojedinačne stanice, tolerancija se može uočiti i na razini populacije. Ulogu u skupnoj toleranciji na antibiotike mogu imati signali detekcije kvoruma (*engl.* quorum sensing), socijalne interakcije među bakterijama, kombinacije različitih mehanizama te antibiotikom posredovana altruistička smrt.

Ključne riječi: *genske mutacije, horizontalni prijenos gena, rezistencija na antibiotike, stanice perzisteri, tolerancija na antibiotike*

Rad sadrži: 22 stranice, 4 slike, 55 literaturna navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Prof. dr. sc. Višnja Bačun-Družina*

Pomoć pri izradi: *Ana Huđek, mag. ing.*

Datum obrane: 18. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in bacteria

Ana Marija Perić/BT

Abstract: Antibiotic resistance in bacteria can be acquired through new gene mutations or horizontal gene transfer. Mechanisms that ensure antibiotic resistance, occurring as a consequence of gene mutations, can be split in three main groups: antibiotic inactivation, target modification and antibiotic secretion from the cell through efflux pumps. Apart from these genetic mutants, within population there are also phenotypic variants of wild type that demonstrate considerable antibiotic tolerance and they are called persister cells. Despite resistance and tolerance at cellular level, tolerance is also seen at population level. The role in collective antibiotic tolerance could be played by quorum sensing signals, social interactions between bacteria, mixed strategies and antibiotic mediated altruistic death.

Keywords: *antibiotic resistance, antibiotic tolerance, gene mutation, horizontal gene transfer, persister cells*

Thesis contains: 22 pages, 4 figures, 55 references, 1 supplement

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *PhDVišnja Bačun-Družina, Full Professor*

Technical support and assistance: *Ana Huđek, mag. ing.*

Defence date: September 18th 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Antibiotička rezistencija i tolerancija na razini pojedinačne bakterijske stanice	2
2.1.1. Antibiotička rezistencija s genetičkog gledišta	2
2.1.1.1. Spontana mutacija	2
2.1.1.2. Horizontalni prijenos gena	3
2.1.2. Mehanizmi bakterijske rezistencije s biokemijskog gledišta	5
2.1.2.1. Inaktivacija antibiotika	6
2.1.2.2. Efluks pumpe i smanjena propusnost stanične stijenke	8
2.1.2.3. Modifikacija mete djelovanja antibiotika	9
2.1.3. Stanice perzisteri	9
2.2.1. Altruistička smrt posredovana antibiotikom	11
2.2.2. Detekcija kvoruma	13
2.2.3. Kombinacija različitih mehanizama	14
2.2.4. Socijalne interakcije u mješovitoj bakterijskoj kulturi	15
3. ZAKLJUČAK	17
4. LITERATURA	18
5. PRILOZI	23
5.1. Popis i objašnjenje kratica	23

1. UVOD

Otkriće antibiotika bilo je prekretnica u ljudskoj povijesti te su njihovim otkrićem spašeni brojni ljudski životi. Nažalost, otkriće ovih čudotvornih lijekova prati pojava rezistentnih sojeva i tako se danas nalazimo u vremenu kada su bakterije razvile rezistenciju na gotovo svaki postojeći antibiotik. Rezistencija se širi brzinom koja je alarmantna ako se uzme u obzir vremenski raspon u kojem se razvijaju novi antibiotici. Također, evolucija rezistentnih bakterija je ubrzana budući da se antibiotici nastavljaju pretjerano koristiti, a posebnu prijetnju predstavljaju bakterije koje su razvile rezistenciju na više antibiotika (*engl.* multidrug resistance, MDR). Uzimajući u obzir sve ovo, jasno je da je velika potreba za otkrićem novih antibiotika te efikasnijim korištenjem postojećih, a isto tako se trebaju razmotriti i nove terapijske strategije. Kako bi se to moglo ostvariti važno je razumjeti načine kojima bakterije preživljavaju tretman antibioticima, odnosno na koji način postaju rezistentne ili toleriraju antibiotike. Rezistencija na antibiotike može se sagledati na staničnoj razini, dok se tolerancija može sagledati i na razini cijele bakterijske populacije. U ovom radu bit će predstavljeni načini stjecanja rezistencije te mehanizmi koji omogućavaju rezistenciju, a isto tako i bakterije koje toleriraju antibiotik bez stjecanja rezistentnih gena. Razmotrit će se i na koje načine bakterijska populacija, međusobnim interakcijama može ostvariti toleranciju na antibiotik.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Antibiotička rezistencija i tolerancija na razini pojedinačne bakterijske stanice

Pojam antibiotičke rezistencije podrazumijeva da se bakterijska stanica nastavlja replicirati u danoj koncentraciji antibiotika. Antibiotička rezistencija je, dakle, izričito povezana s koncentracijom antibiotika (Jemila, 2017), a može se promatrati s genetičkog i biokemijskog gledišta (Džidić i sur., 2007). S genetičkog gledišta, rezistencija se može steći novim mutacijama ili horizontalnim prijenosom gena (Davies i Davies, 2010), a ekspresija rezistentnih gena može omogućiti pojedinačnim stanicama da prežive tretman antibiotikom inaktivacijom antibiotika, modifikacijom mete djelovanja antibiotika ili sprječavanjem unutarstaničnog nakupljanja antibiotika (Levy i Marshall, 2004; Davies i Davies, 2010). Ovo unutarstanično nakupljanje antibiotika može se spriječiti efluks pumpama kojima se smanjuje koncentracija antibiotika bez modifikacije tog antibiotika (Kumar i Schweizer, 2005). Također, unutar bakterijske populacije pojavljuju se male skupine, subpopulacije, bakterija koje ulaze u stanje mirovanja. Takve stanice nazivaju se perzisteri i tolerantne su prema svim antibioticima koji su trenutno u upotrebi bez ekspresije rezistentnog mehanizma. Perzisteri nisu mutanti nego fenotipske varijante divljeg tipa bakterijskog soja, a pojavljuju se među populacijom genetički jednakih stanica (Lewis, 2010).

2.1.1. Antibiotička rezistencija s genetičkog gledišta

Bakterije mogu biti urođeno rezistentne na neke antibiotike, ali mogu i steći rezistenciju kroz mutacije u genima i horizontalnim prijenosom gena (Blair i sur., 2015).

2.1.1.1. Spontana mutacija

Jedan od načina kojima bakterije mogu steći rezistenciju na antibiotike su mutacije u genima. Ove mutacije javljaju se kao greške u replikaciji DNK ili kao rezultat neispravnog popravka oštećene molekule DNK. To su spontane mutacije ili mutacije ovisne o rastu (*engl.growth dependent mutations*) i važan su način razvoja rezistencije na antibiotike (Woodford

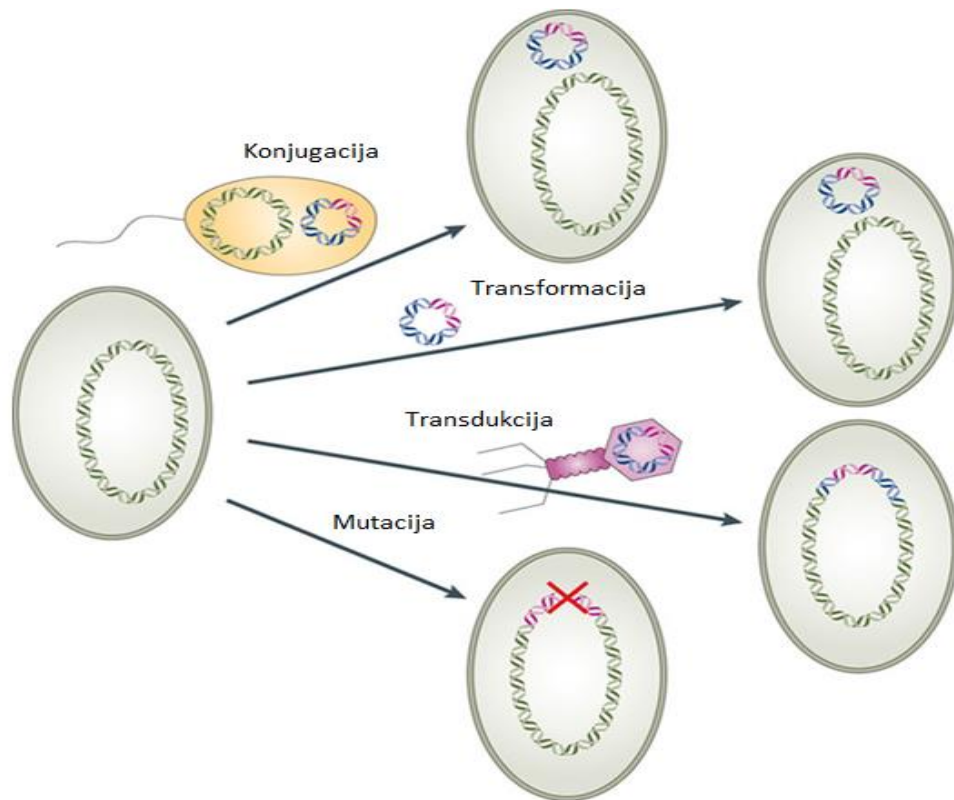
i Ellington, 2007). Neki biokemijski mehanizmi rezistencije kao što su efluks pumpe, rezultat su upravo takvih mutacija. Mutacijske promjene koje omogućavaju rezistenciju su nepovoljne za staničnu homeostazu i stječu se jedino ako su potrebne u prisutnosti antibiotika (Munita, 2016). Kada se pojavi rezistentni mutant bakterije, antibiotik eliminira osjetljivu populaciju, a rezistentna bakterija prevladava i nastavlja se dijeliti. Treba nadodati i da jednom kada se rezistentni geni steknu, prenose se direktno svim bakterijskim potomcima tijekom DNK replikacije, a taj je proces poznat kao vertikalni prijenos gena.

Kod nekih bakterija javljaju se i višestruke mutacije koje im omogućavaju visoku razinu rezistencije. Te bakterije nazivaju se superbakterije (*engl.* superbugs) i taj se pojam odnosi na bakterije s niskom stopom smrtnosti zbog višestrukih mutacija koje im omogućavaju visoku razinu rezistencije prema antibioticima namijenjenim njihovu tretiranju. Posljedično tome, terapijske opcije su smanjene, a produžuje se i vrijeme terapije kao i troškovi (Davies i Davies, 2010). Također, većina bakterija u kojima se javljaju višestruke mutacije rezistentna je na više različitih antibiotika (*engl.* multidrug resistance, MDR) i one predstavljaju globalnu prijetnju za ljudsko zdravlje.

2.1.1.2. Horizontalni prijenos gena

Stjecanje stranog DNK materijala pomoću horizontalnog prijenosa gena jedan je od najbitnijih pokretača bakterijske evolucije i često je odgovoran za razvoj bakterijske rezistencije (Munita i Arias, 2016). Stokes i Gillings (2011) u svom radu definiraju horizontalni prijenos gena kao proces u kojem je DNK fizički prenesena iz jedne stanice u drugu, bez potrebe za dijeljenjem stanice te ugradnje takve DNK u genom domaćina kako bi mogla biti stabilno naslijeđena. Mehanizmi horizontalnog prijenosa gena, kojima bakterije mogu steći rezistenciju su konjugacija, transformacija i transdukcija, a najčešći mobilni genetički elementi koji nose rezistentne gene, a koji se mogu prenositi mehanizmima horizontalnog prijenosa gena su plazmidi, transpozoni i integroni. Mehanizmi horizontalnog prijenosa gena prikazani su na slici 1. DNK iz okoline koja sadrži gen odgovoran za rezistenciju na antibiotike (na slici obojan rozo) može se prenijeti horizontalnim prijenosom gena u bakterijsku stanicu recipijenta na nekoliko načina: konjugacijom, transformacijom gole DNK (na plazmidima ili kao linearna DNK) koja je

oslobođena iz mrtvih stanica i transdukcijom posredovanom bakteriofagom. Rezistencija se također može pojaviti novom mutacijom (na slici označena crvenim znakom X). Od tri navedena mehanizma horizontalnog prijenosa gena, konjugacija se smatrala najutjecajnijom na širenje gena rezistencije za određeni antibiotik dok su transformacija i transdukcija smatrane manje važnima. No, novija istraživanja sugeriraju da bi njihova uloga mogla biti veća nego što se prethodno smatralo (von Wintersdorff i sur., 2016).



Slika 1. Mehanizmi horizontalnog prijenosa gena i stjecanja rezistencije u bakterija (preuzeto i prilagođeno prema Andersson i Hughes, 2010)

Konjugacija je prijenos DNK višestupanjskim procesom koji zahtijeva direktni kontakt između dvije bakterijske stanice preko pilusa i od svih mehanizama koji su uključeni u horizontalni prijenos gena ona je daleko najviše proučena (Guglielmini i sur., 2013). Također, od svih mehanizama konjugacija se smatra najčešćim mehanizmom kojim se prenose mobilni

genetički elementi koji nose generezistencije za određeni antibiotik, a razlog tome je što omogućava bolju zaštitu odvijanja mehanizma od utjecaja okoline i djelotvornije načine unošenja DNK u stanicu recipijenta od transformacije, dok često ima i širi raspon stanica koje konjugiraju nego transdukcija bakteriofagom (Norman i sur., 2009).

Transformacija je prijenos bakterijske DNK iz okoline u stanicu recipijenta, a događa se uz prisutnost plazmida ili kromosomskih fragmenata DNK koji su često oslobođeni iz stanice staničnom smrću ili aktivnim transportom (Chen i Dubnau 2004). Da bi transformacija bila moguća treba biti zadovoljeno nekoliko uvjeta: DNK mora biti prisutna u izvanstaničnom prostoru, bakterija recipijent mora biti kompetentna i DNK koja se prenosi mora biti stabilizirana ili integracijom u genom recipijenta ili ponovnom cirkulacijom, u slučaju plazmidne DNK (Thomas i Nielsen, 2005). Ovaj proces pojavljuje se i u Gram-negativnih i u Gram-pozitivnih bakterija.

Transdukcija je prijenos DNK iz stanice donora u stanicu recipijenta pomoću bakterijskog virusa, bakteriofaga. Transdukcija ne zahtijeva fizički kontakt između stanice donora DNK i stanice recipijenta, ali ovaj mehanizam zahtijeva da se bakteriofag replicira unutar stanice donora. Kada bakteriofag zarazi bakterijsku stanicu, koristi mehanizme reprodukcije stanice domaćina i na taj način proizvodi dijelove virusne čestice. Nakon formiranja cjelovitih faga, dolazi do lize bakterije domaćina, a oni se oslobađaju u okoliš u kojem mogu zaraziti novu stanicu domaćina (Norman i sur., 2009).

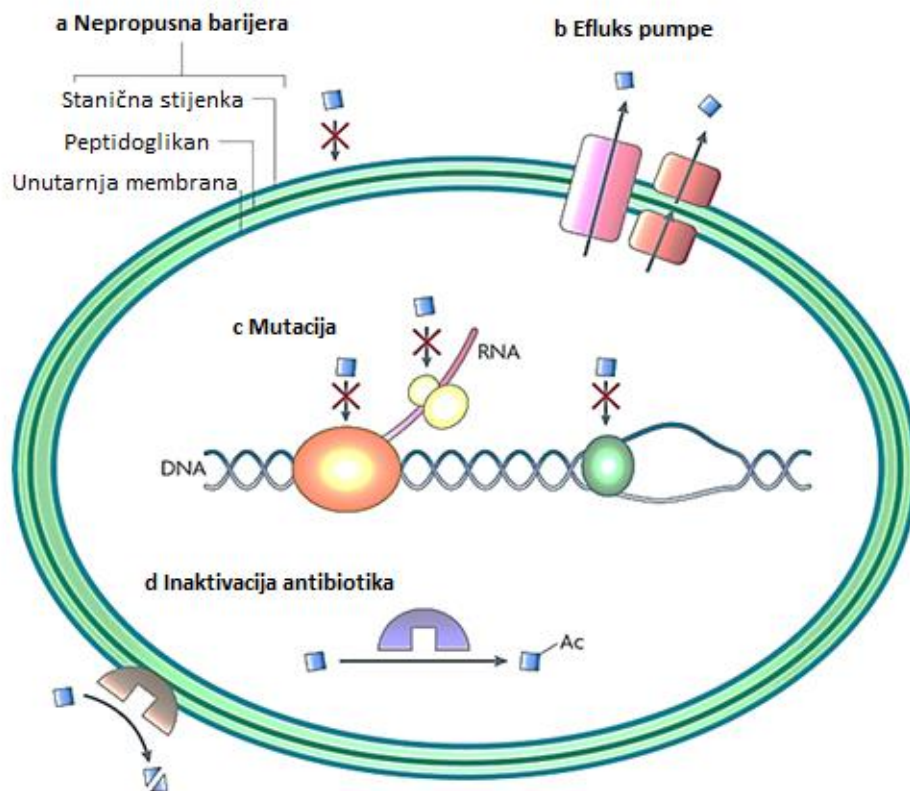
Najvažniji mobilni genetički elementi za prijenos rezistentnih gena su plazmidi i transpozoni koji imaju važnu ulogu u širenju antibakterijske rezistencije među klinički relevantnim organizmima, a transfer bakterijskih plazmida konjugacijom smatra se najučinkovitijim načinom horizontalnog transfera gena (Grohmann, 2003).

2.1.2. Mehanizmi bakterijske rezistencije s biokemijskog gledišta

Mehanizmi koji omogućavaju rezistenciju na antibiotike, a javljaju se kao posljedica mutacija gena su inaktivacija antibiotika, modifikacija mete djelovanja antibiotika i izlučivanje antibiotika iz stanice pomoću efluks pumpe.

2.1.2.1. Inaktivacija antibiotika

Bakterije mogu inaktivirati antibiotik njegovom razgradnjom ili modifikacijom, a mehanizmi inaktivacije antibiotika su inaktivacija hidrolizom, prijenosom grupe te redoks procesom (Džidić i sur., 2007). Detaljan prikaz tih mehanizama nalazi se na slici 2. Neke su bakterije urođeno rezistentne na određene antibiotike (plavi kvadrati) jednostavno zato što imaju nepropusnu staničnu stijenku ili nemaju metu za antibiotik (slika 2a). Efluks pumpe koje omogućavaju rezistenciju na više antibiotika (*engl.* multidrug resistance, MDR) izlučuju antibiotik iz stanice, a neki transporteri mogu izlučiti antibiotik direktno iz stanice (ružičasto), dok ih drugi izlučuju u periplazmatski prostor (crveno; slika 2b). Također prikazane su i mutacije koje omogućavaju rezistenciju (slika 2c) te inaktivacija antibiotika koja se može postići kovalentnom modifikacijom antibiotika ili razgradnjom antibiotika (slika 2d).



Slika 2. Mehanizmi rezistencije na antibiotike u Gram-negativnim bakterijama (preuzeto i prilagođeno prema Allen i sur., 2010)

1) Inaktivacija hidrolizom

Tipičan primjer hidrolitičkih enzima su β -laktamaze. β -laktamaze inaktiviraju antibiotik hidrolizom β -laktamskog prstena koji je neophodan za antibiotsku aktivnost (Brem i sur, 2014). Prve β -laktamaze koje su djelovale na prve generacije antibiotika bile su β -laktamaze proširenog spektra djelovanja, a one imaju aktivnost protiv oksimino-cefalosporina (Johnson, 2013). β -laktamaze širokog spektra kodirane su genima na plazmidu i osiguravaju rezistenciju na djelovanje cefalosporina i monobaktama, ali ne i na djelovanje cefamicina (Paterson i Bonomo, 2005).

2) Inaktivacija prijenosom grupe

Mehanizmi inaktivacije antibiotika prijenosom grupe su raznovrsni mehanizmi i uključuju šest najvažnijih: modifikacija transacetilacijom, fosforilacijom, glikolizacijom, nukleotidilacijom, ribosilacijom i prijenosom tiola (Wright, 2005). Također, podrazumijevaju vezanje kemijske grupe na osjetljiva mjesta molekule antibiotika pomoću bakterijskih enzima što sprječava vezanje antibiotika za ciljani protein zbog prostornog međudjelovanja, steričkih smetnji. Različiti enzimi omogućuju ovaj način inaktivacije antibiotika, a jedan od najbolje proučenih primjera rezistencije koji djeluje ovim načinom su enzimi koji modificiraju aminoglikozide tako što kovalentno modificiraju hidroksilnu ili amino skupinu molekule aminoglikozida (Blair, 2014).

3) Inaktivacija redoks procesom

Za razliku od inaktivacije antibiotika hidrolizom i prijenosom grupe ovaj mehanizam nije čest među bakterijama te je svega nekoliko primjera u literaturi. Primjer ovog mehanizma je oksidacija tetraciklinskog antibiotika enzimom TetX. Protein TetX katalizira monohidroksilaciju tetraciklinskih antibiotika na poziciji 11a što mijenja Mg^{2+} mjesto vezanja antibiotika koje je potrebno za antimikrobnu aktivnost (Yang, 2004).

2.1.2.2. Efluks pumpe i smanjena propusnost stanične stijenke

Na slici 2 prikazana je efluks pumpa koju čine membranski proteini, a uloga im je da izlučuju antibiotike iz bakterijske stanice i zadržavaju njihovu unutarnju koncentraciju na niskoj razini, dok istovremeno smanjena propusnost bakterijske stanične stijenke rezultira smanjenim unosom antibiotika (Džidić i sur., 2007).

Efluks pumpe su proteini koji omogućavaju bakterijskim, a isto tako i eukariotskim stanicama da prepoznaju i izluče toksične tvari iz unutrašnjosti stanice u okoliš. Za taj prijenos potrebna im je energija (Chitsaz i Brown, 2017). Ove pumpe mogu biti supstrat-specifične ili mogu transportirati široki raspon strukturalno različitih proteina. Pumpe koje mogu transportirati više različitih spojeva mogu biti povezane s rezistencijom na više antibiotika (*engl.* multidrug resistance, MDR), a mnoge od ovih pumpi su i od kliničke važnosti (Pidcock, 2006a). Također, hiperprodukcija efluks pumpi može dovesti do rezistencije na više antibiotika te tada bakterijske efluks pumpe pokazuju fenotip rezistentan na više antibiotika, a često kombiniran s drugim mehanizmima rezistencije kao što su ciljana modifikacija i antibiotska inaktivacija (Davín-Regli i sur., 2008; Bolla J. M., 2011). Smatralo se da se efluks pumpe mogu podijeliti u 5 glavnih grupa koje se razlikuju prema strukturalnoj konformaciji, izvoru energije, rasponu supstrata i vrsti bakterijskih organizama u kojima su raspodijeljene (Pidcock, 2006b), a prema novijim istraživanjima dijele se u 7 grupa koje se razlikuju prema homologiji proteinske sekvence, izvoru energije i cjelokupnoj strukturi (Chitsaz i Brown, 2017).

Smanjena propusnost bakterijske stanične stijenke pomaže u sprječavanju antibiotika da dosegne svoju unutarstaničnu ili periplazmatsku metu. Ovaj je mehanizam posebno važan u Gram-negativnih bakterija jer one ne samo da imaju unutarstanične mete već su im mete često locirane u citoplazmatskoj membrani (Munita i Arias, 2016). Što se tiče antibiotika na koje posebno utječe promjena propusnosti stanične stijenke, najveći je utjecaj na β -laktame, tetracikline i neke fluorokinolone, koji su hidrofilne molekule i često koriste proteine porine kako bi difundirali kroz staničnu stijenku (Pagès, 2008).

2.1.2.3. Modifikacija mete djelovanja antibiotika

Bakterije mogu razviti rezistenciju na antibiotike sprječavanjem vezanja antibiotika za njegovu metu djelovanja. Bakterije su razvile različite načine kako bi to postigle što uključuje zaštitu i modifikaciju mete djelovanja antibiotika te rezultira smanjenim afinitetom vezanja molekula antibiotika za metu (Munita i Arias, 2016).

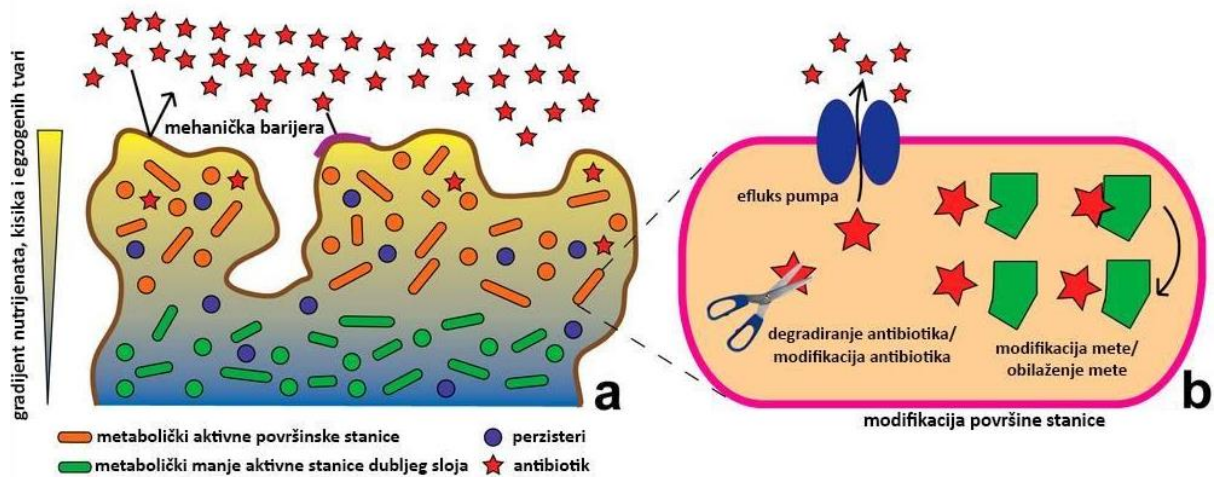
Mehanizam zaštite mete može se uočiti pri rezistenciji na tetraciklin i fluorokinolone. U rezistentima *Streptococcus* spp. i *Campylobacter jejuni* otkriveni su proteini TetM i TetO koji se vezuju na ribosomom i uklanjaju tetraciklin s njegovog mjesta vezanja u ovisnosti o gvanozin-trifosfatu (Munita i Arias, 2016). Kod rezistencije na fluorokinolone za zaštitu ciljne mete u *Klebsiella pneumoniae* zaslužan je protein Qnr koji djeluje kao homolog DNK koji konkurira s veznim mjestom DNK-giraze i DNK-topoizomeraze IV. Budući da molekule fluorokinolona djeluju na bakterijsku DNA girazu i topoizomerazu, vezanje proteina Qnr na te enzime sprječava vezanje antibiotika na njih (Rodríguez-Martínez i sur., 2011).

Modifikacija ciljnog mjesta djelovanja antibiotika jedan je od najčešćih mehanizama antibiotske rezistencije u patogenih bakterija, a obuhvaća promjene poput točkastih mutacija u genima koji kodiraju za ciljno mjesto, promjene ciljnog mjesta djelovanjem enzimom kao npr. adicija metilne grupe i/ili zamjenom ili obilaženjem originalne mete djelovanja antibiotika. Sve ove promjene za posljedicu imaju smanjeni afinitet antibiotika za ciljanom metom djelovanja (Munita i Arias, 2016).

2.1.3. Stanice perzisteri

Osim stjecanja antibiotske rezistencije novim mutacijama, bakterije također mogu pokazati fenotipsku toleranciju i preživjeti djelovanje antibiotika (Tuomanen i sur., 1986). Bakterijske stanice koje pokazuju tolerantan fenotip nazivaju se perzisteri i njihova tolerancija na antibiotike nije genetičke prirode, a samim time nije niti nasljedna već je rezultat promjene normalnog, na antibiotik osjetljivog fenotipa, u tolerantni, odnosno perzistentni (Van den Bergh i sur., 2017). Temeljna razlika između perzistera i rezistentnih mutanata je što su perzisteri fenotipske varijante koje ne mogu prenijeti toleranciju na potomstvo kao što to mogu genetički mutanti. Ubijanje populacija koje su osjetljive na antibiotik, a sadrže male frakcije perzistera, odvija se u dvije faze. To podrazumijeva da je većina populacije, koja se sastoji od osjetljivih

stanica, brzo ubijena, a preživi samo mali dio kojeg čine perzisteri (Van den Bergh i sur., 2017). Također, tijekom tretmana antibiotikom perzisteri ne ugibaju i ne dijele se, a kada su uvjeti ponovno povoljni ove perzistentne stanice počinju rasti i dijele se, vodeći tako oporavku populacije (Kester i Fortune, 2014). Ranije se smatralo da perzisteri postoje unutar populacije i prije tretmana antibiotikom i da se pojavljuju nasumično, ali novija istraživanja su pokazala da tek dodatak antibiotika inducira formiranje stanica perzistera (Ren i sur., 2015). Nadalje, perzisteri su tolerantni na antibiotike neovisno o koncentraciji antibiotika i vremenskom trajanju tretmana antibiotikom, a antibiotike mogu tolerirati na različite načine. Mogu se pojaviti nasumično kao odgovor na stres ili kao posljedica djelovanja različitih staničnih signalnih mehanizama (Levin 2007; Renbarger i sur., 2017). Treba još dodati da su ove stanice heterogene prirode, odnosno među njima se mogu pronaći stanice koje su potpuno tolerantne na antibiotike zahvaljujući stanju mirovanja, a pronalaze se i aktivne stanice koje su sličnije rezistentnim mutantima (Van den Bergh i sur., 2017). Stanice perzisteri se mogu naći i u biofilmu gdje značajno pridonose toleranciji na antibiotike (slika 3; Renbarger i sur., 2017).



Slika 3. Antibiotička rezistencija na razini populacije (a) i pojedinačne bakterijske stanice (b) (preuzeto i prilagođeno prema Penesyan i sur., 2015)

2.2. Antibiotička tolerancija na razini populacije

Mehanizmi antibiotičke rezistencije na razini pojedinačne bakterijske stanice dobro su poznati i opisani. Međutim, zanimljivo je razmotriti i na koje načine populacije bakterija mogu zajedničkim snagama, odnosno skupnim međudjelovanjem postići toleranciju na antibiotike. Ove strategije mogu osigurati ubrzani oporavak populacije nakon tretmana antibioticima. Ono što je zajedničko većini ovih mehanizama je što ovisi o početnoj gustoći populacije, odnosno mnogi od njih se ni ne aktiviraju ako početna gustoća populacije nije dovoljno velika.

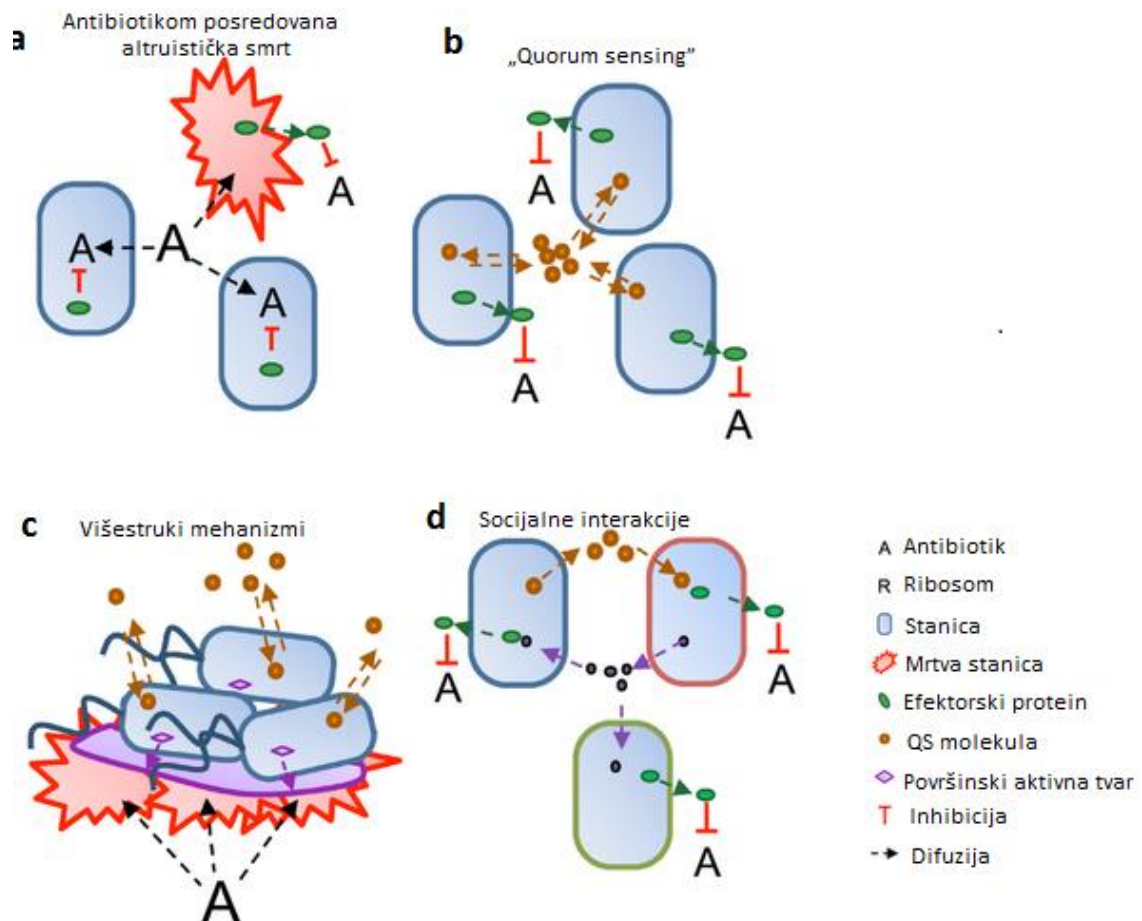
2.2.1. Altruistička smrt posredovana antibiotikom

Poznato je da programirana stanična smrt igra kritičnu ulogu u životnom ciklusu različitih bakterijskih vrsta. To je, očigledno, paradoksalno ponašanje budući da ne doprinosi bakterijama koje podliježu programiranoj staničnoj smrti (*engl.* programmed cell death, PCD). Ipak u porastu su dokazi da PCD može biti altruistična odnosno da mrtve stanice mogu direktno ili indirektno doprinijeti preživjelim stanicama (Tanouchi i sur., 2013).

Kao što je ranije navedeno, jedan od mehanizama koji osiguravaju antibiotičku rezistenciju je degradacija ili modifikacija molekule antibiotika enzimima. Sama ekspresija ovih proteina mogla bi biti nedovoljna za preživljavanje bakterijskih stanica, ovisno o tome kolika je koncentracija antibiotika kojem je bakterija izložena. Sudbina bakterijske populacije zapravo će ovisiti o gustoći populacije (Meredith i sur., 2015). Može se zaključiti da ako je početna gustoća populacije dovoljno velika, osigurat će dovoljno degradirajućih ili modificirajućih enzima koji će inaktivirati antibiotik i omogućiti preživljavanje populacije, a suprotna sudbina zadesit će populacije manje početne gustoće. Ipak, kod nešto manjih gustoća populacije potencijalno preživljavanje može omogućiti altruistička smrt bakterija, a prikaz mehanizma altruističke smrti nalazi se na slici 4. Antibioticima posredovana altruistička smrt uključuje lizu dijela populacije kako bi se oslobodili proteini efektori koji koriste ostatku populacije (slika 4a). Skupna tolerancija na antibiotike (*engl.* collective antibiotic tolerance, CAT) može se pojaviti samo ako je gustoća populacije dovoljno velika da kolektivno generira dovoljnu koncentraciju efektorskih proteina koji će inhibirati antibiotik prije nego usmrti cijelu populaciju. Detekcija kvoruma (*engl.* quorum sensing, QS) često je uključena u regulaciju ekspresije efektorskih proteina ili formiranja biofilma, a obje regulacije mogu dovesti do skupne tolerancija na antibiotike (slika 4b). Populacija klonova može koristiti višestruke mehanizme kako bi preživjela tretman antibiotikom (slika 4c). Socijalne

interakcije mogu omogućiti preživljavanje više različitih subpopulacija (obilježene staničnim stjenkama različite boje; slika 4d). Na primjer dio populacije može proizvoditi signalnu molekulu potrebnu za regulaciju mehanizma rezistencije neke druge subpopulacije i obratno. Također postoje primjeri gdje jedan dio populacije donira signalnu molekulu koja štiti drugi dio populacije, bez dobivanja ikakve koristi zauzvrat. Kako antibiotik ubija bakterijske stanice, iz stanica se oslobađaju degradirajući ili modificirajući enzimi i s tog gledišta se smrt može smatrati altruističkom budući da oslobođeni enzimi mogu pomoći ostatku populacije u degradiranju antibiotika (Tanouchi i sur., 2013)

U navedenom primjeru bakterijska smrt uzrokovana je samim antibakterijskim djelovanjem antibiotika, ali antibiotici također mogu aktivirati sustav programirane stanične smrti (Pandey i Geres, 2005). Postoje brojni eksperimentalni dokazi postojanja mehanizama za PCD u bakterijama. Tako npr. neki antibiotici utječu na bakterijsku smrt međudjelovanjem s toksin – antitoksin sustavima. Jedan od tih sustava je MazEF sustav koji može rezultirati staničnom smrću kada antibiotik inhibira transkripciju i translaciju MazE antitoksina (Engelberg - Kulka i sur., 2004).



Slika 4. Prikaz mehanizma altruističke smrti (preuzeto i prilagođeno prema Meredith i sur., 2015)

2.2.2. Detekcija kvoruma

Ovaj proces oslanja se na proizvodnju signalnih molekula male molekulske mase čija je izvanstanična koncentracija povezana s gustoćom populacije organizma producenta. Stanice mogu osjetiti signalne molekule omogućavajući tako cijeloj populaciji da potakne usklađene radnje kada se dosegne kritična koncentracija koja odgovara određenoj gustoći populacije. Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije koriste različite signalne molekule kako bi procijenile gustoću populacije (Daniels R. i sur., 2004). Dakle, koristeći detekciju kvoruma (*engl.* quorum sensing,

QS) reguliraju ekspresiju gena s obzirom na koncentraciju molekula izlučenu u okoliš među bakterije jednake ili različite vrste.

Također, smatra se da neke bakterije koriste izvanstanične signale QS kako bi se uspostavilo formiranje biofilma, zajednice koja će omogućiti bakterijskim stanicama veću toleranciju na antibiotike (Flemming i Wingender 2010). Bakterijski biofilmovi sastoje se od stanica koje su iz mikroskopskih dimenzija i pojedinačnog rasta prešle u zajednicu formiranu od mnoštva bakterijskih stanica i vidljivi su golim okom. Stanice biofilma okružene su polisaharidnim matriksom koji se sastoji od hidratiziranih izvanstaničnih polimernih tvari proizvedenih od strane samih bakterijskih stanica te je ta cijela zajednica pričvršćena za čvrstu podlogu (Flemming i Wingender, 2010). Ovakve zajednice značajno su manje osjetljive na djelovanje antimikrobnih agensa nego pojedinačne stanice pa su infekcije uzrokovane biofilmom iznimno teške za liječenje (Hall i Mah, 2017). Biofilm se formira tako da se za čvrstu podlogu prvo pričvrste bakterijske stanice pri niskoj gustoći populacije te se tada proizvode male količine signalnih molekula QS. S povećanjem gustoće populacije, povećava se i broj signala QS te dolazi do aktiviranja gena koji su zaslužni za formiranje biofilma (Miller i Bussler, 2001). Primjer korištenja signala QS u svrhu formiranja biofilma, te na taj način povećanja antibiotičke tolerancije, uočava se kod bakterije *Pseudomonas aeruginosa* koja neprestano kolonizira pluća zahvaćena cističnom fibrozom unatoč agresivnim tretmanima antibioticima (Burns i sur., 1993). U iskašljanom sadržaju osobe zaražene cističnom fibrozom uočeno je da *P. aeruginosa* formira strukturu biofilma i da proizvodi dva temeljna signala QS (Singh i sur.,2000).

2.2.3. Kombinacija različitih mehanizama

Uz dosad nabrojane mehanizme postoje i slučajevi u kojima je moguće da bakterijska populacija kombinacijom više mehanizama osigura toleranciju na antibiotik. Tako je na primjer programirana stanična smrt vezana uz ekspresiju gena u *Staphylococcus aureus* ovisno o gustoći populacije (Rice i sur., 2003). Liza stanice je dobro kontrolirana i može rezultirati kolektivnom tolerancijom na antibiotike preko formiranja biofilma (Rice i sur.,2007). Ekspresija CidA i LrgA proteina uključuje i isključuje lizu stanice u specifičnim fazama rasta, a lizom stanice oslobađa se genomska DNK što rezultira pojačanim formiranjem biofilma (Rice i sur.,2003). Zbog mehanizama koji prevladavaju u biofilmu, samim njegovim formiranjem, bakterija povećava mogućnost tolerancije na antibiotik.

Meredith i sur. (2015) kao jednu od strategija za preživljavanje bakterija tijekom tretmana antibiotikom predlažu kombinaciju promjene fenotipa nekih bakterija iz stanja plivanja u stanje rojenja, detekciju kvoruma i altruistične smrti. Rojenje je najbrži poznati način površinske translokacije i definira se kao grupno pokretanje nekih bakterija bičem po površini, kada su promatrane u laboratoriju na čvrstom hranjivom mediju (Verstraeten, 2008). Köhler i sur. (2000) utvrdili su da kruženje signalnih molekula QS utječe na rojenje u *P. aeruginosa*, odnosno da su upravo ramnolipidi površinski aktivne tvari koje imaju utjecaj na prijelaz u stanje rojenja i nužni su za smanjivanje površinske napetosti. Nasuprot tome, u istraživanju koje je provedeno 9 godina kasnije Butler i sur. (2009) nisu pronašli dokaz za mehanizme QS koji kontroliraju rojenje kao mehanizam grupne rezistencije te su zaključili kako se rojenje pojavljuje samo ako su bakterijske stanice direktno izložene djelovanju antibiotika. Također su utvrdili da rojeće bakterije koje se kreću u grupama stječu adaptivnu rezistenciju na mnoge antibiotike, a analiza ovog fenomena je pokazala kako visoka gustoća stanica ima veliku zaštitnu snagu da podnese izloženost koncentracijama antibiotika koje bi inače bile letalne. Navode i da velika gustoća populacije pomaže preživljavanju bakterija čak i kada se ne nalaze u stanju rojenja, ali mogućnost kretanja kao i brzina kretanja daju im dodatnu prednost da prevladaju djelovanje antibiotika.

Također, signali QS u određenih bakterija mogu kontrolirati ekspresiju enzima koji omogućavaju rezistenciju (Meredith i sur, 2015). U Gram-negativnom patogenu *Providencia stuartii*, koji uzrokuje urinarne infekcije, signali QS kontroliraju ekspresiju acetiltransferaza koje inaktiviraju aminoglikozidne antibiotike (Ding i sur, 2001). Što je veća gustoća stanica, više će se signalnih molekula QS osloboditi, a posljedično tome će se sintetizirati i više molekula acetiltransferaze koje će omogućiti toleranciju na aminoglikozide, što nije moguće pri manjoj gustoći bakterijske populacije.

2.2.4. Socijalne interakcije u mješovitoj bakterijskoj kulturi

Skupna tolerancija na antibiotike u mješovitoj kulturi bakterija može se postići uzajamnim, mutualističkim, međudjelovanjem bakterija različitih vrsta na način da jedan dio populacije proizvodi produkt koji pomaže drugom dijelu populacije bez dobivanja ikakve koristi od toga (Meredith i sur., 2015).

Primjer ovakvog međudjelovanja bakterijskih vrsta u mješovitoj kulturi može se uočiti u sustavu gdje dvije populacije surađuju kako bi preživjele tretman različitim antibioticima. Svaka populacija u sustavu proizvodi signalnu QS molekulu potrebnu drugoj populaciji kako bi regulirala proizvodnju proteina koji omogućava rezistenciju (Hu i sur. 2010). Još jedan primjer ovakvog međudjelovanja pronađen je u biofilmu formiranom od više vrsta bakterija. Različiti dijelovi populacije bakterija unutar biofilma surađuju kako bi smanjili prodiranje antibiotika. Na primjer, bakterijske vrste *P. aeruginosa* i *Burkholderia cepacia* proizvode polisaharide koji međusobno djeluju kako bi povećale viskoznost biofilma i tako smanjile aktivnost antibiotika (Allison i Matthews, 1992).

Lee i sur. (2010) pokazali su kako populacija *Escherichia coli* osjetljiva na antibiotik može tolerirati antibiotik pomoću samo malog broja rezistentnih članova populacije. Kada antibiotik nije prisutan, cijela populacija proizvodi signalnu molekulu indol. U prisutnosti antibiotika, samo dio populacije s mutiranim genima za proteine, efluks pumpe, ima potrebnu rezistenciju da nastavi proizvoditi indol. Oslobođeni indol regulira ekspresiju gena za efluks pumpe i mehanizme oksidativnog stresa, omogućujući tako cijeloj populaciji toleranciju na antibiotik.

3. ZAKLJUČAK

Bakterije mogu steći rezistenciju na antibiotik mutacijom u genima ili horizontalnim prijenosom gena ako se u bakterijsku stanicu nasumično unese mobilni genetički element koji nosi gene za rezistenciju. Mehanizmi koji omogućavaju rezistenciju mogu se podijeliti u tri temeljne skupine, a to su inaktivacija antibiotika, efluks pumpe i smanjena propusnost stanične stijenke te modifikacija mete djelovanja antibiotika. Među staničnom populacijom nalaze se i pojedinačne bakterije koje pokazuju fenotip tolerantan na antibiotike, a te bakterije nazivamo stanice perzisteri. Stanice perzisteri se od genetičkih mutanata razlikuju po tome što toleranciju ne mogu prenijeti na potomstvo. Također postoje i primjeri skupne tolerancije na antibiotike. Tako se na primjer tolerancija na antibiotike može ostvariti altruističkom smrću dijela bakterijske populacije tijekom djelovanja antibiotika, signalima detekcije kvoruma koji mogu inducirati ekspresiju gena omogućavajući time rezistenciju drugog dijela bakterijske populacije i mutualizmom među bakterijama. Da bi skupna tolerancija bila moguća, ključna je početna koncentracija populacije jer što je veća početna gustoća populacije, veća je i mogućnost tolerancije na antibiotik. Kombinacija mehanizama koji se javljaju u pojedinačnim stanicama kao i onih na razini populacije može se uočiti u biofilmu. Kako danas infekcije uzrokovane bakterijskim biofilmom predstavljaju značajnu prijetnju zdravlju ljudi, to upućuje da je značajno što bolje upoznati mehanizme rezistencije i tolerancije na antibiotike te osmisliti učinkovitu terapiju protiv patogenih bakterija.

4. LITERATURA

- Allen H. K., Donato J., Wang H. H., Cloud - Hansen K. A., Davies J., Handelsman J. (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 251 - 259.
- Allison D. G., Matthews M. (1992) Effect of polysaccharide interactions on antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 484 – 488.
- Andersson D. I., Hughes D. (2010) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 260 – 271.
- Blair J. M. A., Webber M. A., Baylay A. J., Ogbolu D. O., Piddock L. J. V. (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 42 – 51.
- Bolla J. M., Alibert-Franco S., Handzlik J., Chevalier J., Mahamoud A., Boyer G., Kieć-Kononowicz K., Pagès J. M. (2011) Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* **585**: 1682 - 1690.
- Brem J., van Berkel S. S., Aik W., Rydzik A. M., Avison M.B., Pettinati I., Umland K.D, Kawamura A., Spencer J., Claridge T. D. W., McDonough M. A., Schofield C. J. (2014) Rhodanine hydrolysis leads to potent thioenolate mediated metallo- β -lactamase inhibition. *Nat. Chem.* **6**: 1084 – 1090.
- Burns J. L., Ramsey B. W., Smith A. L. (1993) Clinical manifestations and treatment of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Adv. Pediatr. Infect. Dis.* **8**: 53 – 66.
- Chen I., Dubnau D. (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 241 – 249.
- Chitsaz M., Brown M. H. (2017) The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. *Essays Biochem.* **61**: 127 - 139.
- Daniels R., Vanderleyden J., Michiels J. (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 261 – 289.
- Davies J., Davies D. (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 417 – 433.

- Davies J., Davies D. (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 417 – 433.
- Davin-Regli A., Bolla J. M., James C. E., Lavigne J. P., Chevalier J., Garnotel E., Molitor A., Pagès J. M. (2008) Membrane permeability and regulation of drug influx and efflux in enterobacterial pathogens. *Curr. Drug Targets* **9**: 750 - 759.
- Džidić S., Šušković J., Kos B. (2007) Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol. Biotechnol.* **46**: 11–21.
- Engelberg-Kulka H., Sat B., Reches M., Amitai S., Hazan R. (2004) Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics. *Trends Microbiol.* **12**: 66 – 71.
- Flemming H. C., Wingender J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 623 – 633.
- Grohmann E., Muth G., Espinosa M. (2003) Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 277 - 301.
- Guglielmini J., de la Cruz F., Rocha E. P. (2013) Evolution of conjugation and type IV secretion systems. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 315 – 331.
- Hall C. W., Mah T. F. (2017) Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**: 276 – 301.
- Hu B., Du J., Zou R., Yuan Y. (2010) An environment-sensitive synthetic microbial ecosystem. *PLoS One* (objavljeno online 12. svibnja 2010.). doi: 10.1371/journal.pone.0010619
- Johnson A. P., Woodford N. (2013) Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J. Med. Microbiol.* **62**: 499 – 513.
- Kester J. C., Fortune S. M. (2014) Persisters and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **49**: 91 - 101.
- Kumar A., Schweizer H. P. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**: 1486 – 1513.

- Lee H. H., Molla M. N., Cantor C. R., Collins J. J. (2010) Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* **467**: 82 – 85.
- Levy S. B. i Marshall B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**: 122 –129.
- Lewis K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 48 – 56.
- Lewis K. (2010) Perister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**: 357- 372.
- Meredith H. R., Srimani J. K., Lee A. J., Allison J., Lopatkin A. J., You L. (2015) Collective antibiotic tolerance mechanisms dynamics and intervention. *Nat. Chem. Bio.* **11**: 182 – 188.
- Miller M. B., Bassler B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:165 - 199.
- Munita J. M., Arias C. A. (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* (objavljeno online 01. listopada 2016.). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- Norman A., Hansen L. H., Sørensen S. J. (2009) Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **364**: 2275 – 2289.
- Pagès J. M., James C. E., Winterhalter M. (2008) The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 893 –903.
- Pandey D. P., Gerdes, K. (2005) Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* **33**: 966 – 976.
- Paterson D. L., Bonomo R. A. (2005) Extended-spectrum betalactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**: 657 – 686.
- Penesyan A., Gillings M., Paulsen I. T. (2015) Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules.* **20**: 5286 - 5298.
- Piddock LJ. (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 382 – 402.
- Piddock LJ. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 629 - 636.

- Ren H., He X., Zou X., Wang G., Li S., Wu Y. (2015) Gradual increase in antibiotic concentration affects persistence of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemoth.* **70**: 3267 – 3272.
- Renbarger T. L., Baker J. M., Sattley W. M. (2017) Slow and steady wins the race: an examination of bacterial persistence. *AIMS Microbiol.* **3**: 171 - 185.
- Rice K. C., Firek B. A., Nelson J. B., Yang S. J., Patton T. G., Bayles K. W. (2003) The *Staphylococcus aureus* cidAB operon: evaluation of its role in regulation of murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* **185**: 2635 – 2643.
- Rice K. C., Mann E. E., Endres J. L., Weiss E. C., Cassat J. E., Smeltzer M. S., Bayles K. W. (2007) The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 8113 – 8118.
- Rodríguez-Martínez J. M., Cano M. E., Velasco C., Martínez-Martínez L., Pascual A. (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J. Infect. Chemother.* **17**: 149 - 182.
- Singh P. K., Amy L., Schaefer A. L., Matthew R., Parsek M. R., Moningerk T. O., Michael J., Welsh M. J., Greenberg E. P. (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**: 762 - 804.
- Stokes H. W., Gillings M. R. (2011) Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 790 -819.
- Tanouchi Y., Lee A. J. L., Meredith H., You L. (2013) Programmed cell death in bacteria and implications for antibiotic therapy. *Trends Microbiol.* **21**: 265 - 270.
- Thomas C. M., Nielsen K. M. (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 711 – 721.
- Tuomanen E., Durack D., Tomasz A. (1986) Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**: 521 – 527.
- Van den Bergh B., Fauvart M., Michiels J. (2017) Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**: 219 – 251.

Verstraeten N., Braeken 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.

von Wintersdorff C. J. H., Penders J., van Niekerk J. M., Mills N. D., Majumder S., van Alphen L. B., Paul H. M. Savelkoul H. M., Petra F. G., Wolffs P. F. G. (2016) Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front. Microbiol.* (objavljeno online 19. veljače 2016.). doi: 10.3389/fmicb.2016.00173

Woodford N., Ellington M. J. (2007) The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**: 5 – 18.

Wright G. D. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **57**: 1451 - 1470.

Yang W., Moore I. F., Koteva K. P., Bareich D. C., Hughes D. W., Wright G. D. (2004) TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *J. Biol. Chem.* **279**: 52346 – 5235

5. PRILOZI

5.1. Popis i objašnjenje kratica

- QS – detekcija kvoruma (*engl.* quorum sensing)
- DNK – deoksiribonukleinska kiselina
- PCD – programirana stanična smrt (*engl.* programmed cell death)
- CAT – skupna tolerancija na antibiotike (*engl.* collective antibiotic tolerance)
- MDR – rezistencija na više antibiotika (*engl.* multidrug resistance)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Manja Perić