

Prevlast bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus brevis* L62 nad *Escherichia coli* StrR u mješovitoj bakterijskoj kulturi

Kikelj, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:418502>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Ivana Kikelj

610/MB

PREVLAST BAKTERIJE
MLIJEČNE KISELINE *Lactobacillus*
brevis* L62 NAD *Escherichia coli
STR^R U MJEŠOVITOJ
BAKTERIJSKOJ KULTURI

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Višnje Bačun-Družina Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Ane Huđek, mag. ing.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

PREVLAST BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE *Lactobacillus brevis* L62 NAD *Escherichia coli* STR^R U MJEŠOVITOJ BAKTERIJSKOJ KULTURI

Ivana Kikelj, 610/MB

Sažetak: Bakterije su u svom prirodnom okolišu neprestano izložene različitim uvjetima stresa i suživotu s drugim mikroorganizmima. Navedeni uvjeti vrlo su slični uvjetima stacionarne faze tijekom uzgoja u laboratoriju. U ovom radu istražen je konkurentski rast stanica patogene enterobakterije *Escherichia coli* (1 i 10 dana stara) koja je rezistentna na djelovanje antibiotika streptomcina i stanica bakterijske kulture *Lactobacillus brevis* L62 (1 dan stara) koja nosi prirodnu rezistenciju na nalidiksinsku kiselinu. Navedene bakterijske kulture pomiješane su u omjeru 1:10 i 1:100, nakon čega je praćen njihov rast tijekom produljene stacionarne faze rasta. Dinamika rasta navedenih bakterijskih kultura proučavana je šaržnim uzgojem u minimalnoj podlozi, na temperaturi od 37 °C. Mlada bakterijska kultura *L. brevis* L62 rastom je suzbila patogenu bakterijsku kulturu *E. coli* Str^R. Time se pokazala pogodnim konkurentnim sojem za njeno uklanjanje.

Ključne riječi: *Escherichia coli*, *Lactobacillus brevis*, mješovite kulture, konkurentski rast

Rad sadrži: 38 stranica, 5 slika, 5 tablica, 44 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr .sc. Višnja Bačun Družina

Pomoć pri izradi: Ana Huđek, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Ksenija Durgo
2. Prof. dr. sc. Višnja Bačun-Družina
3. Izv. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić
4. Doc .dr. sc. Jurica Žučko (zamjena)

Datum obrane: 28. rujan 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Science

Scientific field: Biotechnology

PREDOMINANCE OF LACTIC ACID BACTERIA *Lactobacillus brevis* L62 OVER *Escherichia coli* STR^R IN MIXED CULTURE

Ivana Kikelj, 610/MB

Abstract: Bacteria in their natural environments live under different stress conditions and cohabitation with other microorganisms. Those conditions are very similar to stationary growth phase conditions during laboratory cultivation. In this paper is about to study of the competitive growth of the pathogenic enterobacteria *Escherichia coli* (1 and 10 days old) that is resistant to antibiotic streptomycin and the bacterial culture *Lactobacillus brevis* L62 (1 day old) that carries a natural resistance to nalidixic acid. Mentioned bacterial cultures were mixed in 1:10 and 1:100 ratio and observed during prolonged stationary phase of growth. Growth dynamics of those bacterial batch cultures was studied in minimal medium at temperature of 37 °C. The young bacterial culture *L. brevis* L62 suppressed growth of pathogenic *E. coli* Str^R. This makes *L. brevis* suitable choice to eradicate *E. coli* Str^R.

Keywords: *Escherichia coli*, *Lactobacillus brevis*, mixed cultures, competitive growth

Thesis contains: 38 pages, 5 figures, 5 tables, 44 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD Višnja Bačun-Družina, Full Professor

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

Reviewers:

1. PhD Ksenija Durgo, Full Professor
2. PhD Višnja Bačun-Družina, Full Professor
3. PhD Jasna Mrvčić., Associate professor
4. PhD. Jurica, Žučko, Assistant professor

Thesis defended: 28 September 2017

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO	3
2.1.	BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	3
2.1.1.	Bakterije roda <i>Lactobacillus</i>	5
2.2.	ENTEROBAKTERIJE.....	6
2.2.1.	Bakterije roda <i>Escherichia</i>	6
2.3.	MJEŠOVITE BAKTERIJSKE KULTURE	8
2.4.	REZISTENCIJA BAKTERIJA NA DJELOVANJE ANTIBIOTIKA.....	9
2.5.	PRODULJENA STACIONARNA FAZA RASTA BAKTERIJA.....	10
2.5.1.	Fenotip prednosti rasta u stacionarnoj fazi.....	12
2.5.2.	Stanje mirovanja stanica.....	15
2.6.	ODGOVOR BAKTERIJSKE STANICE NA STRES	17
2.6.1.	SOS odgovor	18
2.6.2.	Opći odgovor na stres.....	19
3.	EKPERIMENTALNI DIO	21
3.7.	MATERIJALI	21
3.1.1.	Bakterijski sojevi.....	21
3.1.2.	Hranjive podloge i puferi za uzgoj bakterijskih stanica	21
3.1.3.	Laboratorijska oprema za uzgoj i praćenje rasta bakterijskih stanica	25
3.1.3.1.	Pribor	25
3.1.3.2.	Aparature	25
3.1.3.3.	Kemikalije	26
3.8.	METODE	26
3.2.1.	Uzgoj bakterijskih stanica u minimalnoj podlozi.....	26
3.2.2.	Praćenje konkurentnog rasta mješovite bakterijske kulture <i>Lactobacillus brevis</i> L62 (1 dan stare) i <i>Escherichia coli</i> Str ^R (1 dan stare)	27
3.2.3.	Praćenje konkurentnog rasta mješovite bakterijske kulture <i>Lactobacillus brevis</i> L62 (1 dan stare) i <i>Escherichia coli</i> Str ^R (10 dana stare).....	27
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1.	REZULTATI KONKURETNOG RASTA <i>Escherichia coli</i> STR ^R (1 DAN STARA) I <i>Lactobacillus brevis</i> L62 (1 DAN STARA) U MJEŠOVITOJ KULTURI	28
4.2.	REZULTATI KONKURETNOG RASTA <i>Escherichia coli</i> STR ^R (10 DAN STARA) I <i>Lactobacillus brevis</i> L62 (1 DAN STARA) U MJEŠOVITOJ KULTURI	29
5.	ZAKLJUČCI	33
6.	LITERATURA	34

1. UVOD

Mnogi organizmi koji nas okružuju razvili su brojne strategije koje im omogućuju nastanjivanje gotovo svake ekološke niše. Bakterije su u svom okolišu svakodnevno izložene brojnim nepovoljnim uvjetima okoliša kao što su gladovanje, promjena temperature i pH, osmotski šok i oksidativni stres. Uslijed tog selektivnog pritiska prilagođavaju se novonastalim uvjetima brojnim morfološkim i fiziološkim promjenama, kao i promjenama u ekspresiji gena i mutacijama određenih gena u bakterijskom genomu, a koje im daju prednost rasta i bolji konkurentski fitness. Takvi stresni uvjeti povećavaju stopu mutacije i posljedično tome utječu na bakterijsku evoluciju. Specifični stres inducira određeni odgovor, pa je tako SOS odgovor induciran oštećenjem DNA, dok je protein RpoS, podjedinica RNA polimeraze, glavni regulator općeg odgovora na stres induciran različitim stresnim uvjetima.

U laboratorijskim uvjetima, nakon što se unesu u tekuću hranjivu podlogu, bakterijska populacija prolazi kroz nekoliko specifičnih faza. Nakon prilagodbe na medij u lag fazi, stanice ulaze u eksponencijalnu fazu rasta sve dok ne potroše hranjive sastojke. Nedostatak izvora hrane i nakupljanje nusproizvoda metabolizma, dovode do ulaska bakterijske kulture u stacionarnu fazu rasta i odumiranja većine roditeljskih stanica. U svom prirodnom okruženju gdje bakterije najčešće žive zajedno s velikim brojem drugih mikroorganizama, vrlo često su izložene različitim oblicima stresa. Prirodni uvjeti u kojem bakterije žive, zapravo su vrlo slični uvjetima stacionarne faze rasta tijekom uzgoja u laboratoriju.

Pojedine nesporigene bakterijske kulture nakon ulaska u stacionarnu fazu rasta, mogu pokazivati fenomen prednosti rasta u stacionarnoj fazi. Navedeni fenomen definiran je kao sposobnost stanica starije bakterijske šaržne kulture da u uvjetima stacionarne faze rastom prevladaju stanice mlađe bakterijske kulture. Kompetitivna prednost stanica fenotipa s prednošću rasta u stacionarnoj fazi (*engl.* growth advantage in stationary phase, GASP) određena je genetički i rezultat je mutacija detektiranih u specifičnim genima što rezultira fiziološkom adaptacijom stanica u uvjetima stacionarne faze (Fikel, 2006). Fenotip GASP se u laboratorijskim uvjetima demonstrira uzgojem bakterijskih stanica različite starosti u mješovitim šaržnim kulturama.

Enterobakterija *Escehrichia coli* jedan je od najvažnijih modelnih organizama, a uzgojeni sojevi dobro su prilagođeni laboratorijskim uvjetima i jednostavni su za manipulaciju. Čest je kontaminant različitih namirnica i izaziva pojavu bolesti u ljudi i životinja, a posebno zabrinjava pojava sojeva rezistentnih na djelovanje antibiotika. Rezistencija patogenih

enterobakterija na djelovanje antibiotika već dugo ugrožava uspjeh antimikrobne terapije, a povezuje se s horizontalnim prijenosom gena odgovornog za rezistenciju na djelovanje antibiotika. Bakterije mliječne kiseline vjerojatno su najbrojnija skupina bakterija povezanih s ljudima. Prepoznate su zbog svoje fermentativne sposobnosti kao i zdravstvenih i nutricionističkih pogodnosti.

U ovom diplomskom radu će se istražiti kompetitivni rast bakterija *Lactobacillus brevis* L62, koja je prirodno rezistentna na nalidiksinsku kiselinu, i *Escherichia coli*, koja nosi rezistenciju na antibiotik streptomycin, u mješovitoj kulturi. Navedene bakterijske kulture inokulirat će se u minimalni medij, te će se tijekom vremena pratiti njihov rast naciepljivanjem na kompletnu i selektivne hranjive podloge. Također, pratit će se pojava fenomena GASP u mješovitim kulturama različite starosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine heterogenu skupinu srodnih bakterija koje proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma ugljikohidrata. To su Gram-pozitivne, katalaza negativne, nesporulirajuće, anaerobne, ali aerotolerantne bakterije, štapićastog ili kuglastog oblika. Nemaju citokrome i ne mogu sintetizirati porfirine, stoga ne mogu stvarati ATP stvaranjem gradijenta protona pa se oslanjaju na fermentaciju za proizvodnju energije (Khalid, 2011). BMK mogu rasti na temperaturama od 5 do 45 °C i podnose kisele uvjete pri čemu većina sojeva može rasti na pH 4,4, međutim optimum za rast je pH 5,5-6,5. Također, za rast im je potreban kompleksni hranjivi medij (Vodnar i sur., 2010).

BMK se dijele u dva koljena: *Firmicutes* i *Actinobacteria*. Unutar *Firmicutes*, BMK pripadaju razredu *Lactobacillales* i uključuju sljedeće rodove: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella*, koji su karakterizirani niskim udjelom GC parova dušičnih baza (31-49 %). BMK iz koljena *Actinobacteria* uključuju jedino vrste iz roda *Bifidobacterium* (Liu i sur., 2014).

Glavna značajka metabolizma BMK je razgradnja različitih ugljikohidrata primarno do mliječne kiseline. S obzirom na način na koji fermentiraju heksoze BMK se dijele na homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne BMK fermentiraju heksoze isključivo do mliječne kiseline. Glukoze se razgrađuju glikolizom do piruvata, a zatim se piruvat reducira u laktat. Iz jedne molekule glukoze nastaju dvije molekule mliječne kiseline i dvije molekule ATP-a. Heterofermentativne bakterije mliječne kiseline fermentiraju heksoze fosfoglukonatnim putem do mliječne kiseline, etanola ili octene kiseline i CO₂.

Bakterije mliječne kiseline su industrijski vrlo važni organizmi prepoznati zbog svoje fermentativne sposobnosti kao i zdravstvenih i nutricionističkih pogodnosti (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010). Vjerojatno su najbrojnija skupina bakterija povezanih s ljudima. Uključuju jako djelotvorne nepatogene sojeve koji se koriste za industrijsku fermentaciju mliječnih proizvoda kruha, mesa, povrća i žitarica kao i za pripremu brojnih tradicionalnih mliječnih proizvoda (Bačun-Družina i sur., 2008). Nadasve, BMK se

smatraju neopasnim mikroorganizmima jer se neki sojevi koriste kao probiotici za poboljšanje zdravlja (Liu i sur., 2014).

Starter kulture se mogu definirati kao mikrobni pripravak koji se sastoji od velikog broja stanica barem jednog mikroorganizma koji se dodaje u sirovi pripravak kako bi se proizvela fermentirana hrana ubrzavanjem i upravljanjem fermentacijskim procesom. Skupina BMK ima centralnu ulogu u tim procesima. Izbor sojeva sa zanimljivim svojstvima koji bi se koristili kao nove, funkcionalne starter kulture može dovesti do poboljšanja procesa fermentacije i povećanja kvalitete konačnog proizvoda. Karakteristike primijenjenih sojeva moraju biti prilagođene uvjetima procesa i unutarnjim uvjetima koji prevladavaju u samoj hrani. Zato je racionalan odabir odgovarajućeg soja važan. Genetičko inženjerstvo omogućava velike mogućnosti za poboljšanje postojećih sojeva i konstrukciju novih za određene potrebe. Također, bioinformatika i komparativna genomika mogu pružiti strategije koje vode prema poboljšanju funkcionalnosti prehrambenih mikroorganizama. Naravno, odabir starter kulture ne smije samo ciljati ekspresiju funkcionalnih svojstava, već i eliminirati neželjene posljedice kao što je proizvodnja D-mliječne kiseline ili racemata mliječne kiseline ili stvaranje biogenih amina (Leroy i Vuyst, 2004). Danas su kontrolirane starter kulture bakterija mliječne kiseline dobro okarakterizirane, te prilagođene preživljavanju u odgovarajućim uvjetima. Za korištenje u prehrambenoj industriji odabrani su određeni sojevi zbog njihovog preživljavanja, rezistencije na bakteriofage, proizvodnje bakteriocina, utjecaja na okus proizvoda, te brze acidifikacije, koja inhibira rast patogena i samim time sprječava kvarenje hrane (Champomier-Verges, 2002).

Bakterije mliječne kiseline su i dio mikrobne populacije probavnog trakta ljudi i životinja. Dokazan je koristan učinak BMK unesenih fermentiranim mliječnim proizvodima na regulaciju mikroflore crijevnog trakta. Razvoj samih probiotika potječe iz spoznaje da je crijevna flora uključena u zaštitu domaćina (čovjeka ili životinja) od naseljavanja probavnog trakta patogenim i neautohtonim mikroorganizmima. Probiotičko djelovanje BMK može se iskazati različitim mehanizmima djelovanja prema patogenim mikroorganizmima u probavnom traktu: 1. smanjivanjem broja živih bakterija pomoću proizvodnje antibakterijskih spojeva (bakteriocina), natjecanjem za hranjiva ili natjecanjem za mjesta vezanja na crijevnoj epitelnj površini, 2. izmjenom metabolizma mikroorganizama na način da se poveća ili smanji enzimska aktivnost i 3. stimuliranjem imunološkog sustava povećanjem razine antitijela ili makrofagne aktivnosti (Šušković i sur., 1997).

2.1.1. Bakterije roda *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je najbrojnija skupina BMK s oko 80 vrsta i uključuje neke od najvažnijih vrsta uključenih u mikrobiologiju hrane i ljudsku prehranu. Osim toga, prilagođeni su rastu u raznovrsnim okolišnim nišama. Neke vrste *Lactobacillus* su esencijalne u proizvodnji fermentirane hrane te su korištene kao starter kulture ili konzervansi hrane. Nadalje, neke vrste ljudskog porijekla se koriste kao probiotici ili nosači cjepiva. Ovaj rod također sadrži velik broj vrsta sa statusom neopasnih bakterija (*engl.* Generally Recognised As Safe, GRAS) koji je dodijeljen od Američke agencije za hranu i lijekove (*engl.* Food and Drug Administration, FDA) i Europske agencije za sigurnost prehrambenih proizvoda (*engl.* European Food Safety Authority, EFSA). Broj opisanih vrsta bakterija brzo raste posljednjih godina, što je povezano s napretkom u razvoju inovativnih molekularnih tehnika i njihovom primjenom u mikrobnj taksonomiji i identifikaciji (Liu i sur., 2014).

Taksonomske analize iz 2012. temeljene na sekvenciranju 16S rRNA su pokazale 152 opisane vrste unutar roda *Lactobacillus* podijeljene u 15 grupa koje sadrže 3 ili više vrste, 4 grupe koje sadrže 2 vrste te 10 pojedinačnih vrsta (Liu i sur., 2014). Također, unutar roda *Lactobacillus* razlikuju se tri skupine BMK ovisno o metabolizmu ugljikohidrata, a to su: obligatno homofermentativne, obligatno heterofermentativne i fakultativno heterofermentativne bakterije.

Laktobacili imaju relativno male genome koje karakterizira veličina od oko dva mega parova baza s brojem gena u različitim vrstama od 1600 do 3000. Ta varijacija u broju gena posljedica je evolucijskih procese gubitka gena, duplikacije ili dobivanja gena. Nadalje, mozaična struktura genetičkog materijala u bakterijskom genomu upućuje na konstantni protok genetičke informacije. Iako ne prolaze kroz spolno razmnožavanje, bakterijske stanice izvode procese u kojima genetički materijal iz jedne stanice ili okoliša može biti ugrađen u drugu stanicu formirajući rekombinante. Horizontalni prijenos gena uključuje: konjugaciju za koju je potreban direktan kontakt između bakterijskih stanica, transdukciju ili prijenos genetičkog materijala posredovan djelovanjem bakteriofaga i transformaciju koja predstavlja unos slobodne DNA iz okoliša. Obično su geni koji se prenose dio mobilnih genetičkih elemenata, dijelovi DNA koji kodiraju proteine važne za olakšani prijenos DNA unutar ili između genoma (Bačun-Družina i sur., 2009).

Lactobacillus brevis, korišten u ovom istraživanju, obligatno je heterofermentativna bakterija mliječne kiseline. Može se izolirati iz fermentirane hrane kao što je kiselo tijesto, masline, krastavci, sirevi, silaža, te iz mikrobiološki onečišćenog vina i piva. Prirodno je

rezistentna na djelovanje antibiotika nalidiksinska kiselina koja spada u skupinu kinolonskih molekula širokog spektra djelovanja. Mehanizam rezistencije je uzrokovan mutacijama u genima koji kodiraju za DNA girazu i topoizmerazu IV (Li i sur., 2015). Općenito, većina bakterija roda *Lactobacillus* posjeduje prirodenu rezistenciju prema nalidiksinskoj kiselini. Osim prirodene rezistencije, bakterije rezistenciju mogu steći horizontalnim prijenosom gena od drugih bakterija.

2.2. ENTEROBAKTERIJE

Porodica *Enterobacteriaceae* najistraživanija je porodica organizama u svijetu. Čine je Gram-negativni, oksidaza-negativni, fakultativno anaerobni, nesporelirajući mikroorganizmi. Sadrže fimbrije koje su uključene u adheziju bakterijskih stanica na epitelne stanice domaćina, a neke proizvode endotoksine koji nakon otpuštanja u krvotok domaćina imaju inflamatorni i vazodilatatorni učinak te mogu imati i smrtonosne posljedice.

Nazivaju se još i crijevne bakterije. Mnogi članovi ove porodice su normalni stanovnici crijevne mikroflore ljudi i životinja, dok se drugi nalaze u vodi i tlu ili pa parazitiraju na različitim biljkama i životinjama. Pripadaju joj sljedeći rodovi: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Edwardsiella*, *Serratia* i drugi. Neki od ovih rodova su izrazito patogeni koji uzrokuju velik broj bolesti kod ljudi kao što su: septikemija, pneumonija, meningitis, infekcije urinarnog i probavnog trakta te mnoge druge. Porodica *Enterobacteriaceae* je brojčano vrlo važna za medicinske mikrobiologe jer čine oko 80 % klinički značajnih gram-negativnih bacila i oko 50 % izolata u slučajevima septikemije. Ovu porodicu čini više od 20 rodova i više od 100 vrsta, od kojih je oko 50 sigurno povezano s bolestima u čovjeka (Gillespie i sur., 2006).

Prisutnost enterobakterija u hrani je indikator fekalnog zagađenja odnosno nedovoljne higijene tijekom proizvodnje, čuvanja i manipulacije hranom. Namirnice u kojima se ustanovi njihova prisutnost smatraju se zdravstveno neispravnima. Dakle, neke nepatogene enterobakterije se normalno nalaze u debelom crijevu, dok se druge mogu unijeti preko kontaminirane ili nepropisno pripremljene hrane ili pića.

2.2.1. Bakterije roda *Escherichia*

Rod *Escherichia* pripada porodici *Enterobacteriaceae*, a najpoznatija vrsta iz tog roda je *Escherichia coli*, Gram-negativna, fakultativno anaerobna, štapičasta bakterija koja ne stvara spore. Sadrži flagele koje joj omogućuju kretanje, a ekstraintestinalni sojevi formiraju

kapsulu. Preživljava na temperaturama od 0-45 °C, a optimalna temperatura za rast im je 37 °C, dok je optimalan pH 4,3 (Fotadar, 2005).

Prirodno stanište ove bakterijske kulture je crijevni sustav čovjeka i životinja, te je neophodna za normalno funkcioniranje organizma. U probavnom traktu čovjeka, sudjeluje u probavi na način da razgrađuje bjelančevine i proizvodi vitamine B12 i K, te antagonistički djeluje na patogene bakterije (Kaper i sur., 2004). Vrlo je otporna i lako se prilagođava novim uvjetima. Česti je kontaminant različitih namirnica. Prema tome, može se naći u mesu, mlijeku i mliječnim proizvodima, gotovim jelima kao i u svježem voću i povrću i njihovim proizvodima. Bolesti koje *E. coli* izaziva povezane su s lošim higijenskim uvjetima života kao i pripremanjem hrane. Iako pripada normalnoj crijevnoj mikroflori, velik broj bakterijskih infekcija čovjeka izazvan je upravo ovom bakterijom. To su primjerice infekcije mokraćnog trakta, sepsa, upala pluća, upala slijepog crijeva, neonatalni meningitis, hemoragični kolitis i Crohnova bolest. Također, indikator je fekalnog zagađenja vode.

Genom *E. coli* K-12 soj MG1655 se sastoji od kružne DNA molekule s 4,6 Mb i oko 4584 gena. Poput svih živih oblika, novi sojevi *E. coli* evoluiraju kroz prirodni biološki proces mutacije, duplikacije gena i horizontalnog prijenosa gena što joj omogućava genetičku prilagodbu. Dokazano je da kromosom *E.coli* K-12 sadrži niz autonomno prenesenih elemenata (Blattner i sur, 1997). *E.coli* zato obuhvaća veliku populaciju bakterija koje pokazuju visok stupanj genetske i fenotipske raznolikosti. Svaki soj je podskupina jedinstvenih karakteristike koje ga razlikuju od drugih sojeva. Te razlike mogu rezultirati promjenama u fiziologiji ili životnom ciklusu bakterija. Na primjer, soj može dobiti patogena svojstva, sposobnost korištenja određenog izvora ugljika, sposobnost da naseli određenu biološku nišu ili rezistenciju na određeni antibiotik.

Stabilnost *E. coli* u vanjskom okolišu te u prisutnosti antibiotika i dezinficijensa, sposobnost prilagodbe na nezahtjevne uvjete preživljavanja i sposobnost stjecanja i prijenosa gena od različitih patogenih faktora, smješta ih u kategoriju potencijalno štetnih mikroorganizama koji zahtijevaju stalni mikrobiološki i epidemiološki nadzor. Ne smiju se podcijeniti u smislu biološke opasnosti za životinje i čovjeka (Terekhov i Serdyuchenko, 2016).

Genetički i biokemijski dobro proučena, *E.coli* je jedan od najvažnijih modelnih organizama. Uzgojeni sojevi su dobro prilagođeni laboratorijskim uvjetima i jednostavni su za rukovanje. Zbog svojeg značajnog položaja kao preferiranog modelnog organizma u

biokemijskog genetici, molekularnoj biologiji i biotehnologiji, *E. coli* K-12 bila je prvi organizam predložen za sekvenciranje cijelog genoma. Dostupnost podataka dobivenih potpunim sekvenciranjem trebalo bi poticati daljnja istraživanja prema potpunijem razumijevanju ovog važnog eksperimentalnog, medicinskog i industrijskog organizma. Također, dobiveni podaci omogućuju globalne pristupe biološkim procesima u živim stanicama i vode ka novim načinima gledanja na evolucijsku povijest bakterija.

2.3. MJEŠOVITE BAKTERIJSKE KULTURE

Bakterije u svom prirodnom okolišu najčešće rastu u mješovitim populacijama koje tvore dva ili više mikroorganizama. Ukoliko su uvjeti kao što su temperatura, pH, dostupnost vode i slično unutar određenih granica, a okoliš sadrži dostupan izvor energije i ostale hranjive tvari potrebne za mikrobni rast, doći će do razvoja mikrobne zajednice.

Organizmi prisutni u mješovitoj kulturi u međusobnoj su interakciji. Interakcije mogu imati pozitivan i negativan učinak ili biti bez učinka na vrste uključene u zajednicu. Kategorije interakcija između dvije vrste koje žive zajedno su: neutralizam, mutualizam, komensalizam i antagonizam. Neutralizam je relativno rijedak oblik interakcije među mikroorganizmima gdje jedan mikroorganizam ne utječe na drugi. Vrsta interakcije od koje oba člana imaju koristi je mutualizam. Primjer mutualizma je formiranje biofilma koji omogućuje antibiotsku rezistenciju (Faust i Raes, 2012). Biofilm se definira kao zajednica mikroba umetnuta u kalup načinjen od organskog polimera koji je pričvršćen na površinu. Dokazano je da prostorna organizacija u biofilmovima omogućuju mikroorganizmima djelotvornosti poput kometabolizma i uzajamnog opskrbljivanja hranom. Uz to su i manje podložni okolišnim promjenama. Navedeno dovodi do dugoročne stabilnosti (Durakovi i sur., 2009). Komensalizam je oblik zajednice od koje jedan član ima koristi, dok na drugog nema utjecaja. Uobičajen primjer je biorazgradnja tvari. Jedna bakterijska vrsta metabolizira supstrat i time omogućuje korištenje drugog supstrata drugoj bakterijskoj vrsti. Antagonističko djelovanje vrsta unutar zajednice možemo podijeliti na kompeticiju, natjecanje za hranjive tvari koje se u okolišu nalaze u ograničenim količinama, zatim predatorstvo kad predator napada plijen i njime se hrani i parazitizam gdje za razliku od predatorstva postoji određen stupanj suživota između parazita i domaćina. U predatorskom i parazitskom odnosu jedna bakterijska vrsta profitira na štetu druge, dok je kompeticija štetna za obje vrste. Hranjive tvari su žarište kompeticije za mikroorganizme, no mogu se natjecati i za prostor ili neki drugi čimbenik što rezultira da svi članovi mješovite populacije imaju manji rast u usporedbi s rastom svakog člana pojedinačno.

Pojedine fenotipe, čiste kulture ne eksprimiraju, već samo kad se nalaze u mješovitoj kulturi s drugim mikroorganizmom. Pri tome prilagođavaju svoj metabolom, genom i proteom novonastalim uvjetima, a to predstavlja predmet istraživanja. Rezultati mnogih dosadašnjih istraživanja mikrobne kompeticije zapravo su predviđanja dobivena *in vitro* istraživanjima, a koje treba testirati i u prirodnom okruženju. Pojava tehnologija kao što su sekvenciranje gena, profiliranje ekspresije i sofisticirana mikroskopija omogućuju napredak istraživanja vezanih za mikrobnu distribuciju i fiziologiju u složenim sustavima koji nisu bili mogući u prošlosti, a koji bi trebali olakšati testiranje *in vitro* predviđanja (Hibbing i sur., 2010).

2.4. REZISTENCIJA BAKTERIJA NA DJELOVANJE ANTIBIOTIKA

Rezistencija mikroorganizama na antimikrobne lijekove jedna je od najvećih prijetnji ljudskom zdravlju. Danas predstavlja vrlo raširenu pojavu, a neki su patogeni bakterijski uzročnici postali rezistentni na više klasa ili sve raspoložive antibiotike. Iako je otkriće antibiotika i mogućnost liječenja po život opasnih zaraznih bolesti donijelo pravu revoluciju u medicini, njihova laka dostupnost, nepropisna upotreba i obilato korištenje u poljoprivredi izazvalo je pojavu širenja sojeva koji su rezistentni na njihovo djelovanje.

Antibiotička rezistencija je prirodni fenomen. Pri korištenju antibiotika, bakterija koja se može oduprijeti antibiotiku ima veće šanse za preživljavanje od one koja je osjetljiva na njegovo djelovanje. Osjetljive bakterije budu ubijene ili inhibirane antibiotikom što rezultira selektivnim pritiskom preživljavanja rezistentnih sojeva bakterija.

Antibiotici djeluju preko pet glavnih mehanizama a to su: ometanje sinteze stanične stijenke, inhibicija sinteze proteina, ometanje sinteze nukleinske kiseline, inhibicija metaboličkog puta i reorganizacija stanične membrane (Džidić i sur., 2008).

Neke bakterije su prirodno rezistentne na određeni antibiotik. No, rezistenciju mogu steći kao rezultat kromosomskih promjena ili izmjenom genetičkog materijala putem plazmida ili transpozona. *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* i stafilokoki, organizmi koji uzrokuju respiratorne i kožne infekcije, te članovi porodica *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas*, organizmi koji uzrokuju dijareju, infekcije urinarnog trakta i sepsu su sada rezistentne na gotovo sve starije antibiotike (Neu, 1992). Spontane mutacije su jedan od načina stjecanja antibiotičke rezistencije. To su najčešće točkaste kromosomske mutacije na više lokusa. Horizontalni prijenos genetskog materijala je glavni mehanizam širenja otpornosti na antibiotike. Geni se mogu prenijeti procesima konjugacije, transformacije i transdukcije, te se zatim ugraditi u kromosom domaćina rekombinacijom. Rezistencija

bakterija na antibiotik tetraciklin u većini slučajeva povezana je s unosom novih gena mobilnim elementima (Džidić i sur., 2008).

Uporaba i zlouporaba antibiotika kod ljudi rezultirala je bakterijama otpornim na antibiotike. No, antibiotskoj rezistenciji doprinosi i neprimjerena uporaba antibiotika u stočarstvu. Svjetska zdravstvena organizacija (*engl.* World Health Organization, WHO) zabranila je korištenje antibiotika kao faktora rasta u životinjskoj hrani kako bi se spriječila selekcija i širenje rezistencije (World Health Organization, 2006). Međutim, osim antibiotika, teški metali koji se koriste u uzgoju životinja i akvakulturi mogu poticati širenje rezistencije koselekcijom. Dokazano je kako prisutnost teških metala kao što su živa, kadmij, bakar i cink predstavlja izvore onečišćenja tla i vode, a njihovo nakupljanje do kritične koncentracije, može također potaknuti i rezistenciju na antibiotike (Seiler i Berendonk, 2012). Polovica svjetske proizvodnje antibiotika čine hranjiva i terapijski lijekovi na farmama životinja. Sve je više dokaza da se rezistentne bakterije iz peradi, svinja i goveda, mogu naći u hrani za ljude, te zatim koloniziraju ljudski probavni trakt i prenose gene za rezistenciju na ljudske komenzale (Džidić i sur., 2008).

Brojne bakterijske vrste su i same proizvođači antibiotika. Prirodni antibiotici su sekundarni metaboliti mikroorganizama koji žive u prirodnom okolišu. Mnogi antimikrobni proizvodi koji se danas koriste u ljudskoj i životinjskoj medicini imaju svoje korijene u antibakterijskim spojevima koje proizvode bakterijski rodovi *Streptomyces*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium* i *Pterotus*. Identifikacijom navedenih spojeva i njihovih aktivnih komponenti, razvili su se snažni analozi (Mathew, 2007). Sinteza antibiotika i drugih sekundarnih metabolita odvija se u stacionarnoj fazi rasta bakterija. Kako bi se potaknula sinteza antibiotika, u laboratorijskim uvjetima, *E.coli* je izložena stresu. Kao rezultat, bakterija ulazi u stacionarnu fazu rasta, te dolazi do povećane sinteze bakteriocina. Sinteza sekundarnih metabolita nije neophodna za preživljavanje bakterija, no smatra se da im može dati kompetitivnu prednost u prirodnom okruženju (Kuhar i Žgur-Bertok, 1999). Sposobnost bakterije da proizvede antibiotik kao i da ukloni njegov učinak usko je povezana s mehanizmom odgovora bakterije na stres.

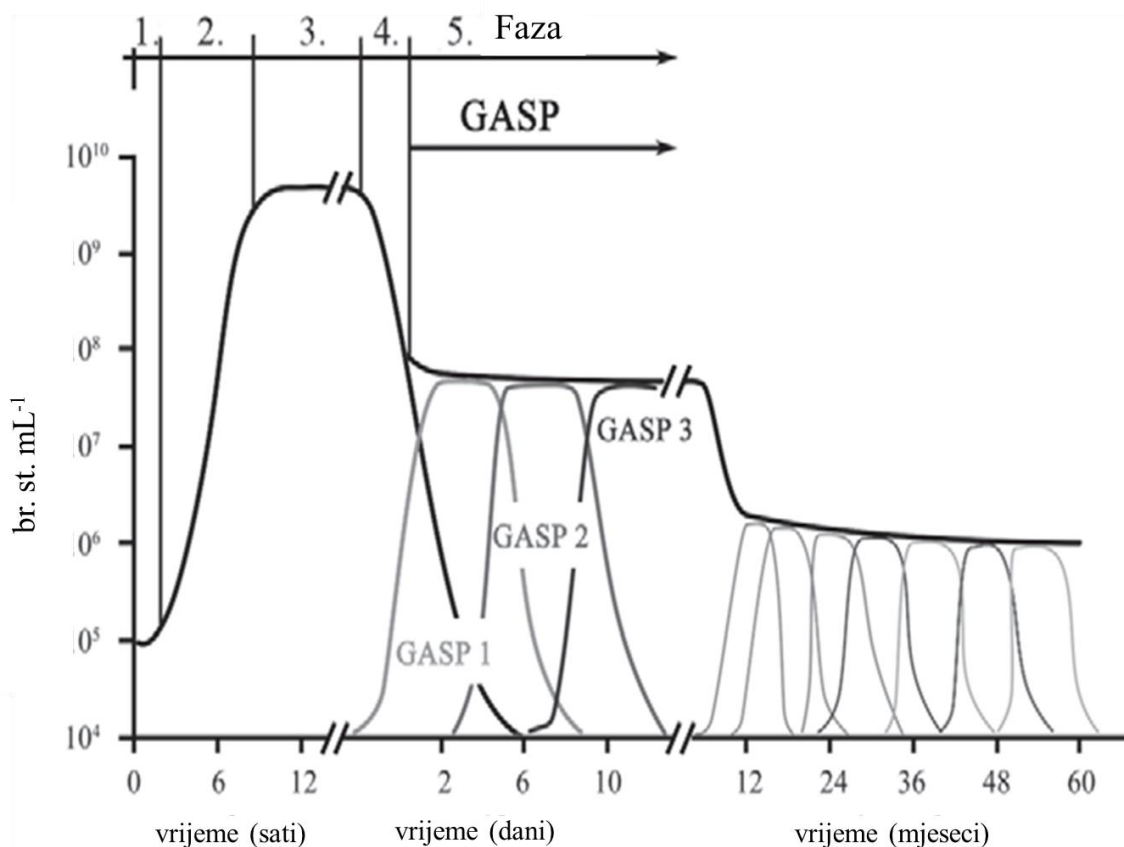
2.5. PRODULJENA STACIONARNA FAZA RASTA BAKTERIJA

E. coli kao modelni organizam, poslužila je za određivanje faza životnog ciklusa bakterijske kulture šaržnim laboratorijskim uzgojem. Nakon inokulacije u svježi bogati medij, stanice prolaze 5 faza koje su prikazane na slici 1. U početnoj lag fazi, stanice se prilagođavaju novonastalim uvjetima. Dolazi do povećanja njihova volumena, te sintetiziraju

enzime i druge makromolekule potrebne za rast i razmnožavanje (Rolfe i sur., 2012). Slijedi eksponencijalna ili lag faza karakterizirana intenzivnim rastom i razmnožavanjem bakterijskih stanica. Broj stanica se udvostručuje stalnom brzinom dok postoji dovoljno hrane, a koncentracija nusprodukata metabolizma ne poraste do vrijednosti koja usporava ili onemogućava rast. Tada populacija ulazi u stacionarnu fazu. U ovoj fazi brzina rasta stanica izjednači se s brzinom odumiranja stanica, a aktivnost samih stanica je vrlo mala. Ulaskom u fazu odumiranja vijabilnost stanica naglo opada, te većina njih odumire (Finkel, 2006; Bačun-Družina i sur., 2011). No, moguće je i da stanice ostanu vijabilne, ali se ne mogu detektirati ili ponovno uzgajati (*engl.* viable but nonculturable state, VBNC), tj. prijeđu u stanje mirovanja. Nakon smrti dijela stanica, preživjele stanice mogu katabolizirati ostatke odumrlih stanice uključujući aminokiseline iz proteina, ugljikohidrate iz stanične stijenke, lipide iz stanične membrane, pa čak i DNA. *E. coli* se može održati u šaržnoj kulturi, bez dodatka nutrijenata kroz period od više od 5 godina. Taj period naziva se produljena stacionarna faza (Finkel, 2006). Sposobnost bakterije *E. coli* da raste tijekom produljene stacionarne faze naziva se prednost rasta u stacionarnoj fazi (*engl.* growth advantage in stationary phase, GASP) ili fenomen GASP.

Produljena stacionarna faza je fiziološki i metabolički vrlo dinamičan period u kojem je uravnoteženo odumiranje i nastanak novih stanica. Ona je odgovor nesporulirajućih bakterija na uvjete gladi nizom morfoloških i fizioloških promjena. Moguća su dva ishoda ovakve prilagodbe. Prva je nemogućnost prilagodbe na nove uvjete i ulazak u fazu odumiranja, a druga je da populacija stanica razvije mehanizme koji joj omogućuju brzu prilagodbu na stresne uvjete i nastavak vijabilnosti kroz produljenu stacionarnu fazu. U tom periodu kontinuirano nastaju nove generacije GASP mutanata (Bačun-Družina i sur., 2011). Dakle, genetička varijabilnost i prirodna selekcija pozitivnih mutacija omogućuje adaptaciju na novonastale uvjete i mogućnost kolonizacije svake niše prirodnog okoliša što je vrlo bitno za bakterijsku evoluciju.

U prirodnom okolišu, ne samo da je količina hranjivih tvari najčešće ograničena, već je kompeticija za iste vrlo velika. Tada bakterije većinom egzistiraju u uvjetima koji su slični onima u produljenoj stacionarnoj fazi u kojoj je za preživljavanje neophodna ekspresija širokog spektra gena odgovornih za odgovor na stres, te aktivacija alternativnih metaboličkih putova. Stoga, rast bakterija u produljenoj stacionarnoj fazi služi kao odličan model za te duge periode gladi (Yeiser i sur., 2002).



Slika 1. Krivulja rasta šaržne bakterijske kulture. Prikazano je 5 faza rasta: 1. lag faza, 2. eksponencijalna faza, 3. stacionarna faza, 4. faza odumiranja i 5. produljena stacionarna faza rasta. Krivulje GASP 1, GASP 2 i GASP 3 prikazuju pojavu GASP mutanata (Preuzeto i prilagođeno prema Bačun-Družina i sur., 2011).

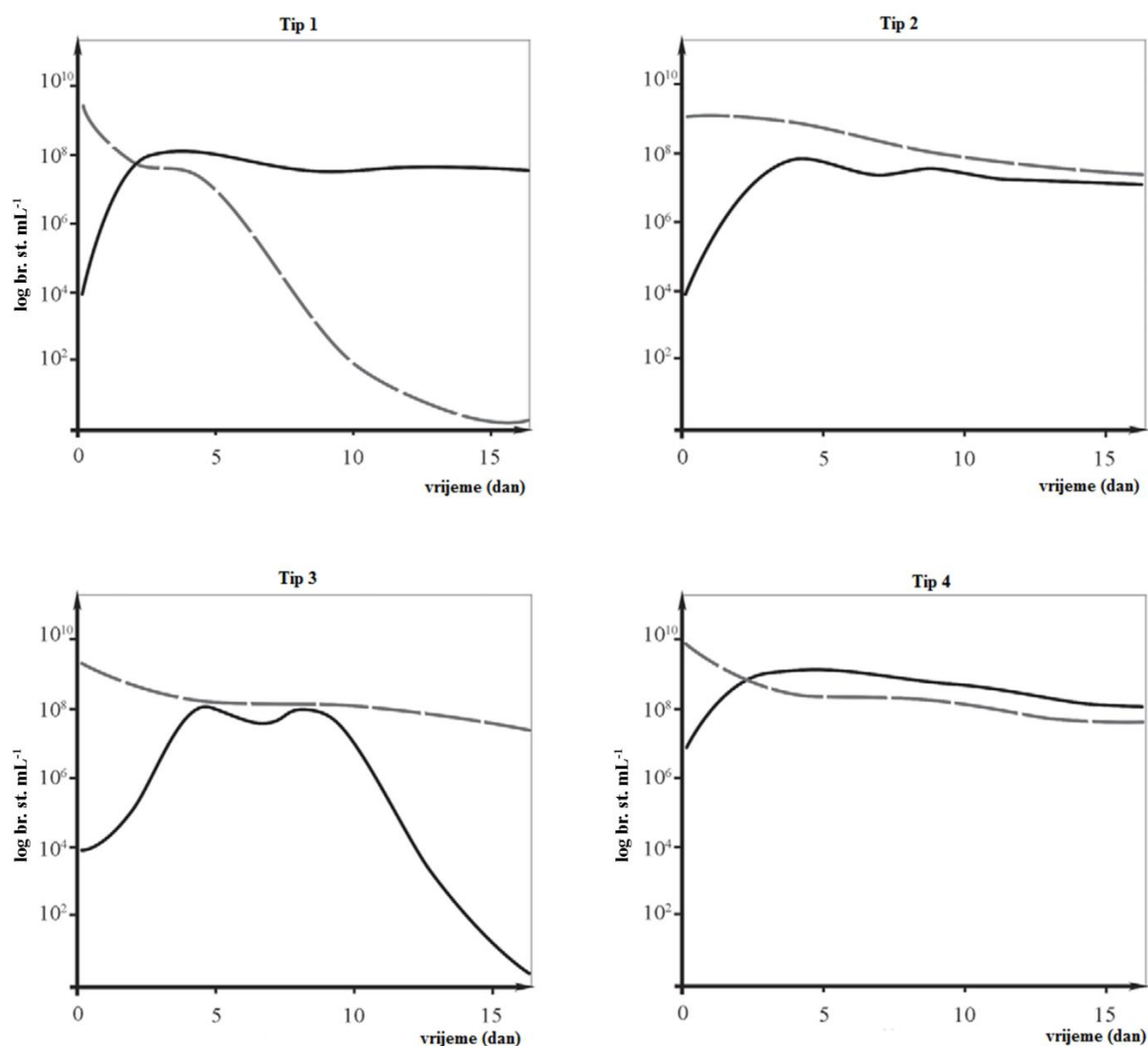
2.5.1. Fenotip prednosti rasta u stacionarnoj fazi

Fenotip prednosti rasta u stacionarnoj fazi (GASP) je definiran kao sposobnost starih stanica u šaržnoj kulturi da nadrastu mladu staničnu kulturu. Dokazano je da se bakterijska kultura *E.coli* može održati u produljenoj stacionarnoj fazi kroz period od do 5 godina, samo uz dodatak vode (Zinser i Kolter, 2004). U uvjetima gladi, stanice fenotipa GASP pokazuju bolju sposobnost adaptacije, te nadrastaju svoje roditelje divljeg tipa, kao većinu. GASP mutanti mogu skupljati ostatke odumrlih stanica. Preživjela populacija je vrlo dinamična te je konstantan izvor genetičke raznolikosti. Unutar takve populacije, mutanti s boljom sposobnošću prilagodbe, preživljavaju period gladi, te se svaka nova generacija mutanata natječe protiv one stare.

U tipičnom eksperimentu GASP kompeticije, stanice stare bakterijske kulture (npr. 10 dana stara) se inokuliraju kao brojčana manjina u mladu staničnu kulturu (1 dan stara), najčešće u omjerima 1:10, 1:100, 1:1000 i 1:10000 (Bačun-Družina i sur., 2011). Praktički svaka LB šaržna kultura *E.coli* će rezultirati stanicama koje eksprimiraju GASP fenotip nakon 10 dana inkubacije. Na primjer, ako se uzorak *E.coli* inkubiran u LB mediju, 10 dana pri 37 °C s aeracijom, prenese u 1 dan staru kulturu, unutar nekoliko dana manjina starih stanica će povećati svoj broj, uz prateću redukciju broja mladih stanica. Stanice različite starosti su razlikovane korištenjem kromosomski kodiranog markera za antibiotsku rezistenciju. Početna manjina starih stanica nakon nekog vremena nadrase mladu populaciju. Nakon 7-10 dana neće ostati ni jedna mlada stanica. Kompetitivna prednost stanica koje eksprimiraju GASP fenotip je određena genetički i nije posljedica fiziološke adaptacije na uvjete stacionarne faze (Finkel, 2006). Nadalje, kontinuirano dolazi do pojave novih mutanata kako kultura biva inkubirana produljeni vremenski period. Ne samo da stanice iz 10 dana stare kulture nadrastu stanice svježije prekonoćne kulture, nego stanice 20 dana stare kulture nadrastu stanice 10 dana stare kulture (Finkel i Kolter, 1999).

Fenotip GASP je inicijalno proučavan u izgladnjelim kulturama *E. coli* uzgajanim aerobno u LB mediju. Od tada, uočen je i u kulturama *E. coli* uzgajanim u minimalnom glukoznom mediju i anaerobno u LB mediju te u kulturama drugih bakterijskih vrsta (Zinser i Kolter, 2004).

U mješovitim bakterijskim kulturama uočena su 4 tipa GASP fenotipa: jaki, slabi, umjereni i abortivni. Kod jakog GASP fenotipa, značajno manji broj stanica stare bakterijske kulture u usporedbi s mladom kulturom ostaje nepromijenjen samo kratko vrijeme. Nakon nekoliko dana, stara bakterijska kultura koja sadrži povoljne mutacije, zbog bolje prilagodbe na loše uvjete tijekom dugog rasta i gladovanja, nadrase mladu kulturu. Stara kultura ostaje vijabilna, dok mlada postupno odumire. Slabi GASP fenotip je karakteriziran sposobnošću starih stanica da povećaju svoj broj u kompetitivnom rastu, te da se zadrži isti broj starih i mladih stanica u kulturi tijekom rasta od 14 dana. Kod abortivnog GASP fenotipa, stanice ostarjele populacije pokazuju prednost rasta pred mladim stanicama na početku, te se njihov broj poveća kroz kratki period, nakon kojeg budu potpuno eliminirane od strane roditeljskih stanica. Umjereni tip GASP fenotipa je pronađen kod praćenja kompetitivnog rasta 10 dana stare enterobakterije i 1 dan starih stanica *Lactobacillus brevis*. Nakon nekoliko dana stare stanice su nadrasle mlade stanice te je broj obje kulture ostao stabilan tijekom 25 dana. Prethodno opisani tipovi fenotipa GASP prikazani su na slici 2 (Bačun-Družina i sur., 2011).



Slika 2. Četiri vrste fenotipa prednosti rasta u stacionarnoj fazi: tip 1 – jaki, tip 2 – slabi, tip 3 – abortivni i tip 4 – umjereni. Puna linija označava 10 dana, a isprekidana 1 dan staru bakterijsku kulturu. Grafovi su prikazani kao logaritam broja živih stanica ovisno o vremenu (Preuzeto i prilagođeno prema Bačun-Družina i sur., 2011).

Kompetitivna prednost stanica fenotipa GASP određena je genetički i rezultat je mutacija u specifičnim genima. U bakterijskim kulturama s prednošću rasta ustanovljene su mutacije u 3 lokusa. Prva je u genu *rpoS*, koji kodira alternativni sigma (σ) faktor RpoS ili σ^S , koji je odgovoran za globalne promjene u ekspresiji gena na početku rasta na nedostatku ugljika u *E.coli*. Procesi regulirani sa σ^S mijenjaju fiziološko stanje stanice na više načina: općenito je usporen metabolizam, dolazi do povećanja rezistencije na gladovanje, pH, osmotski, temperaturi i oksidativni stres (Zinser i Kolter, 2004). Druga mutacija je u genu *lrp*

koji kodira transkripcijski faktor, leucin regulatorni protein. Lrp kao i σ^S sudjeluje u regulaciji mnogih gena, te je induciran tijekom prelaska u stacionarnu fazu. Mutacijom dolazi do takve promjene u strukturi proteina, da mu je onemogućeno vezanje na DNA čime je spriječena regulacija transkripcije (Zinser i Kolter, 2004). U najbolje proučenim sojevima, mutacije se sastoje od duplikacije 46 pb u *rpoS*, delecije 3 pb u *lrp* (Finkel, 2006). Treća mutacija je u genu *cstA* koji kodira oligopeptid permeazu, transporter visokog afiniteta za aspartat i glutamat. Definirana je kao genomski rearanžman koji uključuje dvije IS5 insercijske sekvence. Rearanžan se odvija u dva koraka. U prvom koraku, koji je induciran glađu, dolazi do insercije IS5 elementa u regulatornu regiju *cstA* gena. U drugom koraku dolazi do homologne rekombinacije između tog IS5 elementa i postojećeg (starog) IS5 elementa. Rezultat je inverzija u bakterijskom genomu. Dolazi do zamjene mjesta gena *cstA*, koji se pritom inaktivira i operona *ybeJ-gltJKL*, koji se aktivira i povećava kapacitet stanice za transport i rasta na aminokiselinama kao jedinom izvoru ugljika (Zinser i Kolter, 2004). Iako je svaki od navedenih gena uključen u drugačiji proces, svaka rezultira povećanom sposobnošću stanice da koristi aminokiseline alanin, arginin, aspartat, glutamat, glutamin, serin, treonin i prolin kao jedini izvor ugljika i energije (Finkel, 2006). Također, dokazano je kako mutacije generalno doprinose promjeni ekspresije gena. Evolucijske implikacije ovih saznanja su da je adaptacija na novi okoliš, barem u početku, određena promjenama u regulaciji aktivnosti već postojećih gena, a ne stvaranju novih (Zinser i Kolter, 2004).

2.5.2. Stanje mirovanja stanica

Kada su izložene stresu, nesporogene bakterije mogu ući u stanje mirovanja. Pritom gube sposobnost formiranja kolonija na hranjivom mediju. Dakle, stanice koje su metabolički ili fiziološki aktivne, ali ne mogu biti uzgajane na specifičnom mediju, su vijabilne ali nekulturable stanice (*engl.* viable but nonculturable, VBNC). Može se reći da je to jedinstvena strategija preživljavanja mnogih bakterija u nepovoljnim uvjetima okoliša (Fakruddin i sur., 2013). Nekoliko je testova kojima se može dokazati ovo stanje, a uključuju neki aspekt metaboličke aktivnosti ili staničnog integriteta koji pokazuje da su te stanice žive iako nisu sposobne stvarati kolonije na hranjivom mediju (Oliver, 2005).

Stanice ulaze u VBNC stanje kao odgovor na neku vrstu okolišnog stresa, kao što je izgladnjivanje, nepovoljna temperatura, osmotski pritisak, promjene pH, dostupnost kisika ili izlaganje svjetlu. Ovi okolišni stresovi mogu biti letalni ako stanica ne uđe u stanje mirovanja. Osim toga, procesi za koje se normalno smatra da su bakteriocidni, mogu rezultirati VBNC

stanicama. To uključuje procese kao što su pasterizacija mlijeka i kloriranje otpadnih voda (Oliver, 2005).

Do danas je identificirano 85 vrsta bakterija koje mogu ući u VBNC stanje, uključujući 18 nepatogenih i 67 patogenih vrsta (Zhao i sur., 2017). Od ljudskih patogena to su: *Campylobacter* spp., *E.coli*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, nekoliko *Salmonella* i *Shigella* spp. i *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus* (Oliver, 2005).

VBNC stanice održavaju cjelovitost stanice, ali pokazuju smanjenje veličine i promjenu oblika same stanice. Stanična membrana i stijenka razlikuju se od normalnih stanica. U citoplazmatskoj membrani imaju promijenjen sastav masnih kiselina, a unutar stanične stijenke povećana je umreženost peptidoglikana, povećana količina mukopeptida kovalentno vezanog s lipoproteinima i smanjena prosječna duljina glikanskih lanaca. Održavaju visoku razinu ATP-a, imaju visok membranski potencijal i pokazuju kontinuiranu ekspresiju gena (Zhao i sur, 2017).

Stanje mirovanja je značajno za preživljavanje samo ako stanice mogu ponovno postati metabolički aktivne i kulturabilne. Stanice ulaze u fazu regeneracije kada se osiguraju odgovarajući uvjeti. Ti uvjeti specifični su za vrstu, pa čak i soj. Osim toga, dokazano je da nakon regeneracije VBNC patogene stanice zadržavaju virulenciju. Oživljavanje može biti potaknuto različitim faktorima kao što su povećanje koncentracije hranjivih tvari, povećanje ili smanjenje temperature, prisutnost kemijskih stimulansa na primjer natijevog piruvata, aminokiseline i Tween 80, pa čak i ko-kultivacija s drugim stanicama (Zhao i sur, 2017).

U usporedbi s kulturabilnim stanicama, VBNC stanice posjeduju veću fizičku, kemijsku i antibiotsku otpornost, što je rezultat njihove niske metaboličke aktivnosti i jače stanične membrane. Istraživanja su pokazala da velik broj patogenih bakterija može preživjeti procese tretiranja hrane i vode i zadržati virulenciju u procesiranoj hrani, pasteriziranom mlijeku, vodi i određenom okolišu. Prisutnost VBNC stanica smatra se prijetnjom za zdravlje ljudi i sigurnost hrane zbog nemogućnosti njihove detekcije standardnim metodama ispitivanja hrane i pića. Stanice u stanju mirovanja ne mogu uzrokovati bolesti, no nakon ponovne regeneracije može doći do pojave infekcije i bolesti (Zhao i sur.,2017).

Iako molekularni mehanizmi na kojima se temelji nastanak VBNC stanja nisu potpuno poznati, nađeno je nekoliko gena koji imaju važnu ulogu u formiranju VBNC stanja. Valja

spomenuti gen *rpoS*, koji kodira protein RpoS, sigma faktor stacionarne faze koji omogućuje bakteriji da preživi pod različitim okolišnim uvjetima stresa. Ta sposobnost podrazumijeva da RpoS povećava sposobnost stanice da se prilagodi okolišu i tako ometa stvaranje VBNC stanica. Dokazano je da *rpoS* mutanti kojima nedostaje ppGpp brže ulaze u VBNC stanje nego divlji sojevi. Također, uočena je niža razina RpoS tijekom indukcije VBNC stanja. Iako se smatra da je RpoS prepreka za formiranje VBNC stanica, one nastavljaju eksprimirati gen *rpoS* jer im je važan za održavanje rezistencije na stres. Ova hipoteza je potvrđena i pokazano je da mutanti *rpoS* gube sposobnost uzgajanja u hranjivom mediju i umiru prije VBNC stanica njihovih roditeljskih sojeva. Dakle, ekspresija gena *rpoS* usko je vezana uz očuvanje stanja VBNC (Zhao i sur., 2017).

2.6. ODGOVOR BAKTERIJSKE STANICE NA STRES

Bakterije se u svom prirodnom okolišu, u kojem žive zajedno s velikim brojem drugih mikroorganizama, nalaze pod konstantnim uvjetima stresa. Vrlo često su to nedostatak hranjivih tvari, nepovoljna temperatura, UV-zračenje, pH okoliša, osmotski pritisak i prisutnost različitih toksičnih tvari. Štoviše, prirodni uvjeti u kojima bakterije žive slične su uvjetima stacionarne faze rasta tijekom uzgoja u laboratoriju. Kako bi preživjele nepovoljne promjene u svom okolišu, bakterije su razvile obrambene mehanizme, tj. mehanizme prilagodbe. Generalno, stanica će zamijeniti rast rezistencijom na stresne uvjete i to je mehanizam koji joj omogućuje opstanak.

Proteini čija je sinteza posljedica odgovora na okolišne stresne uvjete mogu biti podijeljeni u nekoliko grupa. Opći proteini stresa nastaju kao odgovor na mnoge podražaje stresa i u više vrsta bakterija. Oni su obično nespecifično inducirani i uključeni su u popravak DNA ili proteina. Druga skupina su specifični proteini stresa za određeni stres i treća su proteini općeg metabolizma koji su potaknuti nekim specifičnim stresom, na primjer, proteini glikolitičkog metaboličkog puta (Champomier-Verges, 2002).

Neki organizmi reagiraju na stres fiziološkim odgovorom, dok drugi povećavaju populaciju genetički promijenjenog potomstva. Nastale genetičke varijacije koje omogućuju adaptaciju na okoliš nazivaju se adaptivne mutacije, a u stanicama koje su izložene stresu dolazi do stresom inducirane mutageneze. Konstitutivni mutator fenotip općenito rezultira mutacijama u genima koji kodiraju enzime potrebne za popravak DNA ili proteine koji osiguravaju točnost replikacije DNA. Poznata su dva odgovora na stres koja kad su inducirana povećavaju mutagenezu. To su SOS odgovor induciran genotoksičnim stresom i odgovor na stres reguliran proteinom RpoS koji je induciran različitim vrstama stresa (Matic, 2013).

2.6.1. SOS odgovor

E. coli i druge bakterije imaju vrlo učinkovit odgovor na oštećenja DNA, a to je odgovor SOS koji smanjuje letalne i mutagene posljedice izlaganja DNA agensima koji je oštećuju. Kada je DNA oštećena, pojavljuju se područja jednolančane DNA (ssDNA), izravno kao posljedica oštećenja ili neizravno kao posljedica DNA popravka. Jednolančana DNA djeluje kao signal koji inducira SOS odgovor. Protein RecA, bakterijska rekombinaza, prepoznaje i veže ssDNA. Nastali nukleoproteinski kompleks stimulira cijepanje represora LexA što rezultira derepresijom gena uključenih u SOS odgovor. Mnogi od tih gena kodiraju za enzime koji potiču popravak DNA, rekombinaciju i sintezu DNA. U *E. coli* je poznato oko 30 gena koji su reprimirani djelovanjem LexA represora (Foster, 2007).

Tri gena, inducirana kao dio SOS odgovora u *E. coli*, kodiraju DNA polimeraze (DNA Pol) koje imaju sposobnost repliciranja oštećene DNA. Nazivaju se DNA mutaze jer uvode mutacije translezijskom sintezom DNA, a to su DNA polimeraza II, IV i V. Navedene polimeraze privremeno preuzimaju mjesto replikativne polimeraze (Pol III) i sintetiziraju preko oštećenja u kalupu DNA. Jedna od polimeraza SOS odgovora je Pol II, kodirana genom *polB*, koja je u većini slučajeva točna i procesivna. Njezina glavna uloga je ponovno pokretanje zakočene replikacijske vilice kao posljedice nakupljanja oštećenja u DNA. Prelazi preko oštećenja, pa stoga uvodi mutacije u molekulu DNA (Foster, 2007). Druge dvije polimeraze, Pol IV i Pol V pripadaju široko rasprostranjenoj Y-porodici polimeraza. Za članove ove porodice karakterističan je manjak procesivnosti i niska vjernosti kod sparivanja neoštećenog kalupa. Pol IV i Pol V, koje su kodirane genima *dinB* i *umuDC*, nemaju 3'→5' egzonukleaznu aktivnost i imaju nisku procesivnost. Ova svojstva omogućuju im da uspješno zaobiđu oštećenja na DNA, ali također i ugroze točnost replikacije neoštećenog kalupa (Matic, 2013).

Kada su inducirane SOS odgovorom ili nekim drugim putevima, Pol IV i Pol V povećavaju stopu spontanih mutacija stanice čak i u odsustvu oštećenja u DNA. Taj fenotip se može vidjeti u laboratoriju korištenjem mutanata konstitutivno aktivnim SOS odgovorom. U takvim sojevima Pol IV povećava frekvenciju mutacije 3 puta, a Pol V 10 puta. Pretpostavlja se da su mutacije posljedica pogreški koje su nastale djelovanjem polimeraza koje su sklone pogreškama a koje su replicirale neoštećenu DNA. Također, dokazano je kako Pol IV djeluje kao mutator čak i u odsustvu indukcije odgovora SOS (Foster, 2007).

Izloženost egzogenim agensima koji oštećuju DNA nije jedini način na koji se može inducirati SOS odgovor. Oštećenja DNA uzrokovana djelovanjem metaboličkih intermedijera

ili pogreškama u replikaciji, rekombinaciji i segregaciji kromosoma, ako nisu popravljani, mogu biti moćni stimulansi SOS odgovora. Odgovor SOS će također biti induciran, bar djelomično, kad god pada nivo aktivnog LexA, te pri izlaganju antibioticima i visokom tlak (1000 puta većem od atmosferskog) (Foster, 2007).

2.6.2. Opći odgovor na stres

Kada *E. coli* i njeni srodnici uđu u stacionarnu fazu ili dožive određeni stres, oni induciraju opći odgovor na stres. Glavni kontrolor tog odgovora je protein RpoS, produkt gena *rpoS*, također nazvan σ^S . Sigma faktori su podjedinice RNA polimeraze koje usmjeravaju transkripciju na određeni promotor. Tijekom eksponencijalnog rasta, većina gena je transkribirana djelovanjem RNA polimeraze koja je u kompleksu s vegetativnim sigma faktorom, σ^{70} . Kad stanice uđu u stacionarnu fazu, količina aktivnog RpoS naglo poraste, što rezultira transkripcijom gena potrebnih za preživljavanje tijekom perioda nedostatka hranjivih tvari, visokog osmotskog pritiska, niskog pH i ekstremnih promjena temperature. S obzirom da RpoS regulon nije induciran samo u stacionarnoj fazi, nego odgovara na mnoge uvjete stresa, smatra se dijelom općeg odgovora na stres (Foster, 2007).

Protein RpoS je reguliran na razini transkripcije, translacije, stabilnosti proteina i aktivnosti proteina. Transkripcija gena *rpoS* je kontrolirana pomoću cikličkog AMP-a (cAMP) i signalizacijom s ppGpp i polifosfatima (Matic, 2013). cAMP se veže na ciklički AMP receptor protein (*engl.* Cycli AMP receptor protein, CRP) pri čemu nastaje kompleks cAMP-CRP. Nastali kompleks reprimira transkripciju gena *rpoS* tijekom eksponencijalne faze, a aktivira tijekom stacionarne faze rasta bakterije (Hengge-Aronis, 2002). Nukleotid guanozin 3',5'-difosfat (ppGpp) je alarmon, mala signalna molekula koja bakterijskim stanicama omogućuje brzi odgovor na stres. Inducira ekspresiju gena *rpoS* pri uvjetima gladovanja vežući se na β i β' podjedinicu RNA polimeraze (Hengge-Aronis, 2002). Stabilnost sekundarne strukture mRNA-RpoS je modulirana nizom čimbenika, a uključuje RNA vezujući protein Hfq, protein nalik histonu HU, LeuO regulator transkripcije i male nekodirajuće RNAs: DsrA RNA, RprA RNA i OxyS RNA. Regulacija na razini stabilnosti proteina očituje se održavanjem niske razine RpoS u stanicama koje intenzivno rastu. ATP ovisna proteaza ClpXP degradira RpoS u reakciji koju potiče RssB (*engl.* Regulator of sigma S). Aktivnost RpoS ovisna je o vezanju na jezgru RNA polimeraze. S obzirom da σ^S nije jedini sigma faktor u stanici, dolazi do kompeticije za mjesto vezanja. Regulacija na razini aktivnosti proteina se zato očituje u mehanizmu koji mu omogućuje vezanje na RNA polimerazu, jer je afinitet RpoS za RNA polimerazu najmanji od svih sigma faktora.

Indukcija regulona RpoS koja uključuje oko 10 % sveukupnog broja gena u *E. coli* (Weber i sur., 2005), rezultira morfološkim i metaboličkim modifikacijama i omogućuje rezistenciju na mnoge stresove npr. rezistencija na UV, temperaturni šok, oksidativni stres i ekstremna osmolarnost. Funkcija ovog regulona je da osigura preživljavanje bakterije, ali pritom ne dolazi do očuvanja originalne genetičke informacije (Matic, 2013).

3. EKPERIMENTALNI DIO

3.7. MATERIJALI

3.1.1. Bakterijski sojevi

U eksperimentalnom radu korišteni su sojevi *Lactobacillus brevis* L62 Nal^R i *Escherichia coli* K-12 soj MG1655 koji su čuvani u 50%-tnom glicerolu na temperaturi -80 °C i dio su zbirke Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Streptomycin rezistentni sojevi bakterije *Escherichia coli*, 1 dan stari i 10 dana stari, izolirani su u ovom istraživanju i također čuvani u 50%-tnom glicerolu na temperaturi -80 °C.

3.1.2. Hranjive podloge i puferi za uzgoj bakterijskih stanica

U radu su korištene kompletne hranjive podloge MRS i LB, minimalne podloge MML i M9, kompletna MRS podloga s nalidiksinskom kiselinom kao selektivna podloga za rast bakterija mliječne kiseline, kompletna LB podloga sa streptomycinom kao selektivna podloga za rast enterobakterija i minimalna podloga s laktozom kao provjera za rast eneterobakterija. Navedene podloge pripremljene su prema uputama proizvođača i sterilizirane u autoklavu pri temperaturi 121 °C u trajanju od 15 minuta i tlaku od $1,01 \times 10^5$ Pa.

▪ Kompletna podloga

Za uzgoj *Lactobacillus brevis* korištena je MRS kompletna hranjiva podloga (*engl.* Man, Rogosa and Sharpe broth, MRS) u krutom i tekućem obliku. Sastav navedene podloge nalazi se u tablici 1. Kruta MRS podloga sadrži 20 g L⁻¹ agara koji se dodaje prije sterilizacije.

Tablica 1. Sastav MRS kompletne hranjive podloge

SASTOJAK	KOLIČINA
Glukoza	20 g
Mesni ekstrakt	10 g
Kvašćev ekstrakt	10 g
Kazein hidrolizat	10 g
Kalijev hidrogenfosfat	5 g
Natrijev acetat	2 g
Amonijev citrat	2 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{MnSO}_4 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	0.05 g
Tween 80	1 mL
Destilirana voda	do 1000 mL

Za uzgoj bakterije *Escherichia coli* korištena je LB (Luria Bertani) hranjiva podloga u krutom i tekućem obliku. Njezin sastav nalazi se u tablici 2. Kruta LB podloga sadrži 15 g L⁻¹ agara koji se dodaje prije sterilizacije.

Tablica 2. Sastav LB kompletne podloge

SASTOJAK	KOLIČINA
Bakto-tripton	10 g
Kvašćev ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
Destilirana voda	do 1000 mL

▪ Minimalna podloga

Minimalna podloga pogodna za rast bakterija *Lactobacillus brevis* je MML podloga (*engl.* minimal medium for *Lactobacillus*). Njezin sastav nalazi se u tablici 3. Nakon sterilizacije dodano je 20 mL 20%-tne glukoze u 1 L ohlađene podloge.

Tablica 3. Sastav MML podloge

SASTOJAK	KOLIČINA
Kazein hidrolizat	10 g
Kalijev hidrogenfosfat	5 g
Natrijev acetat	2 g
Amonijev citrat	2 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,05 g
Tween 80	1 mL
Destilirana voda	do 1000 mL

Minimalna podloga pogodna za rast bakterije *Escherichia coli* je M9. Sastav navedene podloge nalazi se u tablici 4. Nakon sterilizacije je dodano 2 mL MgSO₄, 100 µL CaCl₂, 10 mL 20%-tne glukoze i 1 mL tiamina (2 mg mL⁻¹) u 1 L tople podloge.

Tablica 4. Sastav M9 podloge

SASTOJAK	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
Destilirana voda	do 1000 mL

▪ **Selektivna podloga za rast bakterije *Lactobacillus brevis***

Sastav selektivne podloge za rast bakterije *Lactobacillus brevis* jednak je sastavu MRS podloge samo što je nakon sterilizacije i hlađenja dodano 300 µL otopine antibiotika nalidiksinske kiseline koncentracije 100 mg mL⁻¹ u 1 M NaOH. Konačna koncentracija nalidiksinske kiseline iznosila je 30 µL mL⁻¹ podloge.

▪ **Selektivna podloga za rast enterobakterija**

Selektivna podloga za enterobakteriju *Escherichia coli* je minimalna podloga s laktozom. Sastav podloge jednak je M9 minimalnoj podlozi samo što je nakon sterilizacije dodano 2 mL 1M MgSO₄, 100 µL CaCl₂, 10 mL 20 %-tne laktoze i 1 mL tiamina. Selektivna podloga za eneterobakterije u mješovitoj kulturi sa *Lactobacillus brevis* jednakog je sastava kao i LB podloga samo što je nakon sterilizacije i hlađenja u podlogu dodano 1 mL otopine antibiotika

streptomicina koncentracije 100 mg mL^{-1} u 1 M NaOH . Konačna koncentracija streptomicina iznosila je $100 \text{ }\mu\text{L mL}^{-1}$ podloge.

▪ **Fosfatni pufer**

Sastav fosfatnog pufera (*engl.* Phosphate-buffered saline, PBS), korištenog za razrjeđenja bakterijskih kultura, nalazi se u tablici 5. Sterilizacija pufera provodi se pri temperaturi $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i tlaku $1,01 \times 10^5 \text{ Pa}$.

Tablica 5. Sastav fosfatnog pufera (PBS-a)

SASTOJAK	KOLIČINA
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,15 g
K_2HPO_4	0,2 g
Destilirana voda	do 1000 mL

3.1.3. Laboratorijska oprema za uzgoj i praćenje rasta bakterijskih stanica

3.1.3.1. Pribor

- Aluminijska folija
- Automatske pipete (20, 200, 1000 μ L)
- Erlenmeyerove tikvice različitih volumena
- Filter veličine pora 0,45 μ m
- Kivete po Eppendorfu različitih volumena
- Kivete za spektrofotometar
- Laboratorijske žlice
- Marker za pisanje
- Papir za vaganje i zamatanje čepova
- Pipete različitih volumena
- Pipetni nastavci
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Propipete
- Staklene boce
- Staklene čaše
- Staklene epruvete
- Staklene i plastične menzure različitih volumena
- Vata za pravljenje čepova

3.1.3.2. Aparature

- Analitička vaga model 1712 MP8, Silver edition, *Sartorius*, Velika Britanija
- Aparatura za termostatiranje BTE-S, *Termo-medicinski aparati*, Hrvatska
- Automatska tresilica X-463, *New Brunswick scientific*, SAD
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu HC-240, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Laminar, *Iskra*, Slovenija
- Spektrofotometar Cecil Instruments Ltd, *Technical Centre Cambridge*, Engleska
- Vaga, *Sartorius*, Velika Britanija
- Velika centrifuga 21 M/E Centrifuge, *Beckman*, Velika Britanija
- Vibromikser EV-202 i EV-100, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Zamrzivač: Ultra low temperature freezer, *New Brunswick scientific*, SAD

3.1.3.3. Kemikalije

- Agar, *Kemika*, Hrvatska
- Amonijev citrat, *Kemika*, Hrvatska
- Amonijev dihidrogenfosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), *Kemika*, Hrvatska
- Bromtimolno modriilo, *Kemika*, Hrvatska
- Bakto-tripton, *Kemika*, Hrvatska
- Glicerol, *Kemika*, Hrvatska
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), *Kemika*, Hrvatska
- Kalijev klorid (KCl), *Kemika*, Hrvatska
- Kazein hidrozilat, *Kemika*, Hrvatska
- Kvašćev ekstrakt, *Kemika*, Hrvatska
- Manganov (II) sulfat tetrahidrat ($\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$), *Kemika*, Hrvatska
- Magnezijev sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), *Kemika*, Hrvatska
- Man, Rogosa i Sharpe tekuća hranjiva podloga (MRS), *Biolife*, Velika Britanija
- Man, Rogosa i Sharpe kruta hranjiva podloga (MRS), *Biolife*, Velika Britanija
- Natrijev acetat, *Kemika*, Hrvatska
- Natrijev citrat, *Kemika*, Hrvatska
- Natrijev klorid (NaCl), *Kemika*, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), *Kemika*, Hrvatska
- Tween 80, *Kemika*, Hrvatska

3.8. METODE

3.2.1. Uzgoj bakterijskih stanica u minimalnoj podlozi

Jedan dan stara bakterijska kultura *Lactobacillus brevis* L62 nacijepljena je u minimalnu MML podlogu i inkubirana 20 sati na 37 °C uz aeraciju (100 o min^{-1}).

Bakterijska kultura *Escherichia coli* Str^R (1 dan i 10 dana stara) nacijepljene su u minimalnu M9 podlogu i inkubirane 20 sati na 37 °C uz aeraciju.

Trajne kulture navedenih sojeva čuvane su u 50%-tnom glicerolu pri temperaturi -80 °C.

3.2.2. Praćenje konkurentnog rasta mješovite bakterijske kulture *Lactobacillus brevis* L62 (1 dan stare) i *Escherichia coli* Str^R (1 dan stare)

Prekonoćne bakterijske kulture *Escherichia coli* Str^R (1 dan stara) i *Lactobacillus brevis* L62 (1 dan stara) pomiješane su u omjeru 1:10. Odgovarajući omjer dobiven je prebacivanjem manjeg volumena bakterijske kulture *Escherichia coli* u veći volumen bakterijske kulture *Lactobacillus brevis*. Pripremljen je volumen od minimalno 10 mL mješovite bakterijske kulture koji je raspoređen u 3 staklene epruvete od kojih je svaka imala početni volumen od 3 mL. Pripremljene mješovite kulture vraćene su na tresilicu na 37 °C.

Konkurentni rast stanica praćen je kroz nekoliko dana naciepljivanjem odgovarajućih razrjeđenja na krutu MRS podlogu, te selektivne podloge za laktobacile (MRS+Nal) i enterobakterije (LB+Str). Prvo razrjeđenje napravljeno je naciepljivanjem 10 µL originalne suspenzije u 90 µL PBS pufera. Drugo razrjeđenje dobiveno je naciepljivanjem 10 µL prvog razrjeđenja u 90 µL PBS pufera. Naredna razrjeđenja, do maksimalno šestog, pripremljena su na isti način.

Brojanjem poraslih kolonija na određenim hranjivim podlogama i obradom dobivenih podataka nacrtane su krivulje rasta od nultog radnog dana na dalje.

3.2.3. Praćenje konkurentnog rasta mješovite bakterijske kulture *Lactobacillus brevis* L62 (1 dan stare) i *Escherichia coli* Str^R (10 dana stare)

Bakterijske kulture *Escherichia coli* Str^R (10 dana stara) i *Lactobacillus brevis* L62 (1 dan stara) uzgojene su preko noći u minimalnim podlogama nakon čega su pomiješane u omjerima 1:10 i 1:100. Konkurentni rast stanica praćen je kao i kod mješovite kulture s 1 dan starom bakterijom *Escherichia coli* Str^R. Obradom rezultata, nacrtane su krivulje rasta od nultog radnog dana na dalje.

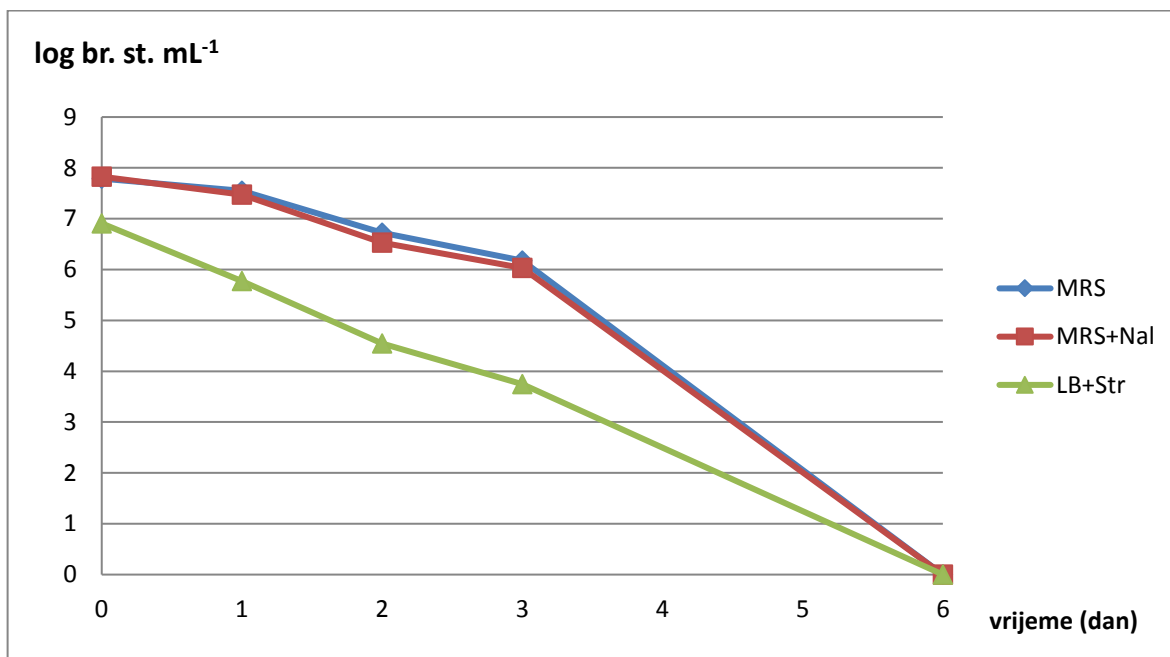
4. REZULTATI I RASPRAVA

Uzgojem mješovitih nesporogenih bakterijskih kultura različite starosti u uvjetima nedostatka hranjivih tvari, promatraju se interakcije među korištenim bakterijama te pojava fenomena GASP. Uzgoj mješovitih kultura u uvjetima gladovanja u laboratoriju imitira prirodno stanište bakterija u kojem one obitavaju u uvjetima ograničene količine dostupnih hranjivih tvari i izražene kompeticije s drugim vrstama za taj isti supstrat. U ovom diplomskom radu praćen je konkurentski rast patogene enterobakterije *E. coli* Str^R (1 dan stare i 10 dana stare) i bakterije mliječne kiseline *L. brevis* L62 (1 dan stare), koja nosi prirodnu rezistenciju na antibiotik nalidiksinsku kiselinu u mješovitoj kulturi tijekom produljenog perioda nedostatka izvora ugljika. Navedene bakterijske kulture pomiješane su u omjerima 1:10 i 1:100, nakon čega je praćen njihov rast naciepljivanjem na hranjivu podlogu te brojanjem poraslih kolonija. Rezultati uzgoja bakterijskih stanica u mješovitim kulturama, statistički su obrađeni korištenjem Microsoft Excela i prikazani su grafički kao ovisnost logaritma broja živih bakterijskih stanica po mililitru o vremenu. Na grafu su prikazane srednje vrijednosti podataka za svaku točku, napravljene na osnovu najmanje tri eksperimenta.

4.1. REZULTATI KONKURETNOG RASTA *Escherichia coli* STR^R (1 DAN STARA) I *Lactobacillus brevis* L62 (1 DAN STARA) U MJEŠOVITOJ KULTURI

Dembele i sur. (1998) dokazali su inhibitorno djelovanje 17 sojeva laktobacila, uključujući i *L. brevis* Lb12 izoliran iz mliječnih proizvoda, na rast enterobakterija uključujući 8 izolata *E. coli*. Antagonističko djelovanje određeno je metodom s dvostrukim slojem agara. U ovom istraživanju bakterijske stanice *E. coli* Str^R (1 dan stare) i *L. brevis* L62 (1 dan stare) pomiješane su u omjeru 1:10, te je praćen konkurentni rast kroz 6 dana pri temperaturi 37 °C. Ukupan broj stanica u mješovitoj kulturi praćen je naciepljivanjem stanica na kompletnu podlogu (MRS), brojanjem poraslih kolonija i preračunavanjem broja poraslih kolonija u broj stanica po mililitru bakterijske suspenzije. Broj stanica *E. coli* Str^R i *L. brevis* L62, pojedinačno, određen je naciepljivanjem stanica na selektivne podloge za *E.coli* Str^R i *L. brevis* L62, a koje sadrže streptomycin i nalidiksinsku kiselinu. Zatim je izbrojan broj poraslih kolonija i preračunat u broj stanica po mililitru bakterijske suspenzije iz čega je dobivena logaritamska vrijednost. *E. coli* Str^R dodatno je genotipski provjerena naciepljivanjem na minimalnu podlogu s laktozom. Slika 3 prikazuje krivulju rasta mješovite kulture *E. coli* Str^R (1 dan stare) i *L. brevis* L62 (1 dan stare) iz koje je vidljivo da početne koncentracije

bakterijskih stanica ostaju u ustaljenom omjeru uz postupni pad. Šestog dana nije zabilježen rast ni jedne bakterijske kulture. Navedeno čini *L. brevis* pogodnim konkurentnim sojem za suzbijanje *E. coli* koja se ne može ukloniti antibiotikom, a pojavljuje se kao česti kontaminant hrane i ljudski je patogen. Mehanizam ovakvog odgovora bakterijskih stanica na dane uvjete nije poznat, a dobivene rezultate trebalo bi analizirati dodatnim molekularnim metodama analize.

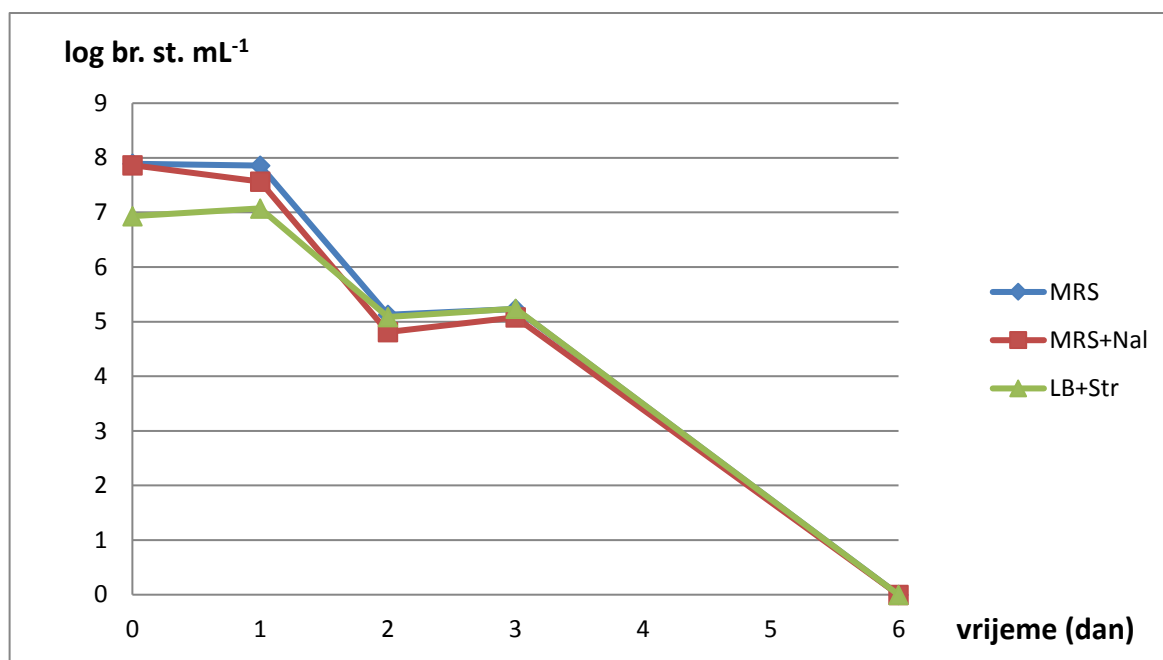


Slika 3. Grafički prikaz krivulje rasta mješovite bakterijske kulture *Escherichia coli* Str^R (1 dan stare) i *Lactobacillus brevis* L62 (1 dan stare), pri 37 °C u omjeru 1:10 praćen na kompletnoj hranjivoj podlozi (MRS) te selektivnim podlogama za *Escherichia coli* Str^R (LB+Str) i *Lactobacillus brevis* (MRS+Nal).

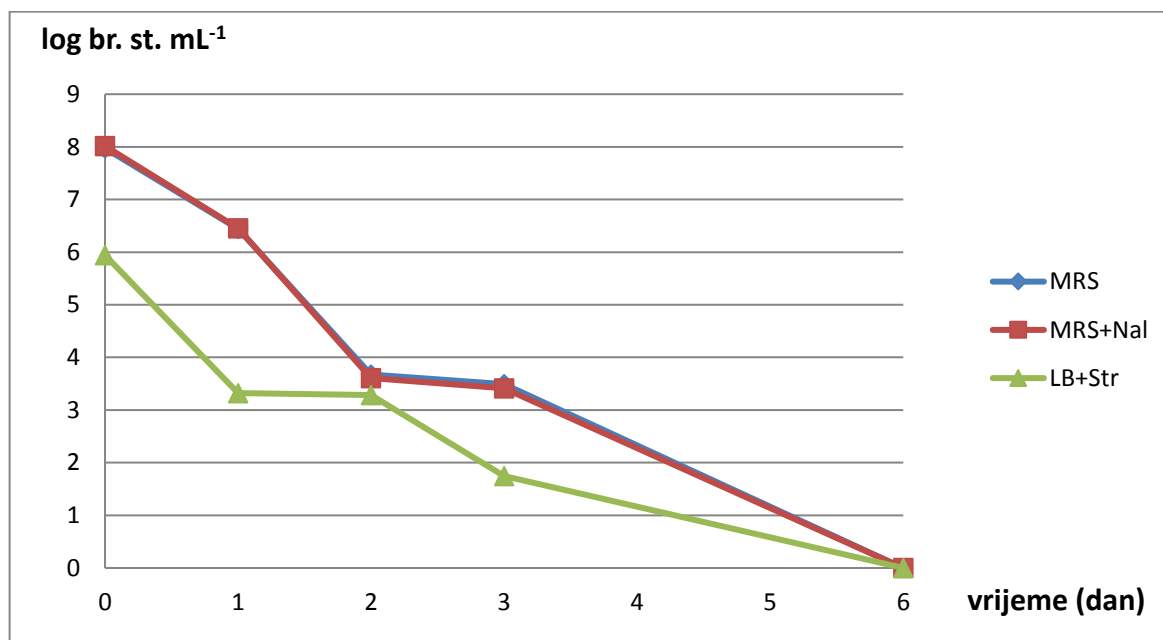
4.2. REZULTATI KONKURETNOG RASTA *Escherichia coli* STR^R (10 DAN STARA) I *Lactobacillus brevis* L62 (1 DAN STARA) U MJEŠOVITOJ KULTURI

U tipičnom eksperimentu promatranja pojave mutanata GASP, stanice 10 dana stare kulture inokuliraju se kao brojčana manjina u mladu, 1 dan staru kulturu. Istraživanje konkurentskog rasta bakterija *E. coli* i *Salmonella enterica* rezistentnih na nalidiksinsku kiselinu i streptomycin, pomiješanih u omjeru 1:100, rezultiralo je pojavom GASP mutanata jakog fenotipa. No, uočene su značajne razlike u ovisnosti o tome koja bakterijska vrsta i s kojom antibiotskom rezistencijom je korištena kao stara. Ekspresija jakog fenotipa iskazana

je u svakoj od kombinacija mješovitih kultura koje se sastoje od starih sojeva s rezistencijom na antibiotik i mladih stanica divljeg tipa. U obratnom slučaju, s 10 dana starim stanicama divljeg tipa i 1 dan starim rezistentnim sojem, nije iskazan jaki GASP fenotip. U mješovitoj kulturi bakterijskih stanica *E. coli* i *S. enterica* divljeg tipa, pojava jakog GASP fenotipa nije uočena, već su stanice postupno odumirale kroz period od 15 dana (Bačun-Družina i sur., 2007). Istraživanje konkurentskog rasta bakterije *L. brevis* L62 s enterobakterijama *E. coli* i *S. enterica* serotip *Typhimurium* pokazalo je pojavu umjerenog fenotipa GASP. 10 dana stare enterobakterije nadmašile su 1 dan stare stanice *L. brevis* L62 i nastavile rasti zajedno u koncentraciji od 10^8 st mL^{-1} tijekom 25 dana pri temperaturi od 30 °C. Početni omjer enterobakterija prema *L. brevis* bio je 1:10 i 1:100 (Bačun-Družina i sur., 2008). Bakterijske stanice *E. coli* Str^R (10 dan stare) i *L. brevis* L62 (1 dan stare), u ovom istraživanju, pomiješane su u omjeru 1:10 i 1:100, te je praćen konkurentni rast kroz 6 dana pri temperaturi 37 °C. Ukupni i pojedinačni broj bakterijskih stanica praćen je na isti način kao i u mješovitoj kulturi *E. coli* Str^R (1 dan stare) i *L. brevis* L62 (1 dan stare). Na slici 4 i slici 5 prikazane su krivulje rasta opisane mješovite kulture. Iz rezultata je vidljivo da stanice starije bakterijske kulture *E. coli*, rezistentne na antibiotik streptomycin, nemaju sposobnost prerasti stanice mlađe bakterijske kulture *L. brevis* L62 ni u jednom od pripremljenih omjera. U oba slučaja postupno se smanjivao broj stanica, a nakon 6 dana uzgoja, nije detektiran rast ni jedne bakterijske vrste. Dakle, starija bakterijska kultura *E. coli* Str^R nije iskazala ni jedan od GASP fenotipa u mješovitoj kulturi s mlađom kulturom *L. brevis*. S obzirom da je mlada bakterijska kultura *L. brevis* L62 suzbila rast starije bakterijske kulture *E. coli* Str^R, pogodna je za njeno uklanjanje. Iz svih opisanih istraživanja vidljivo je da su rezultati kompeticije dviju bakterijskih vrsta u mješovitoj kulturi, ovisni o posjedovanju antibiotske rezistencije i o bakterijskoj vrsti koja je korištena. Dokazano je da ulaskom u produljenu stacionarnu fazu bakterijska kultura prolazi niz morfoloških i fizioloških promjena kao i promjena u ekspresiji gena te vrlo značajno, dolazi do pojave mutacija unutar bakterijskog genoma. Stoga, rezultati ovog istraživanja, mogli bi se pobliže objasniti određivanjem proteoma i potencijalno sekvenciranjem genoma ispitivanih bakterija.



Slika 4. Grafički prikaz krivulje rasta mješovite bakterijske kulture *Escherichia coli* Str^R (10 dana stare) i *Lactobacillus brevis* L62 (1 dan stare), pri 37 °C i u omjeru 1:10 praćen na kompletnoj podlozi (MRS) te selektivnim podlogama za *Escherichia coli* Str^R (LB+Str) i *Lactobacillus brevis* (MRS+Nal).



Slika 5. Grafički prikaz krivulje rasta mješovite bakterijske kulture *Escherichia coli* Str^R (10 dana stare) i *Lactobacillus brevis* L62 (1 dan stare), pri 37 °C i u omjeru 1:100 praćen na kompletnoj podlozi (MRS) te selektivnim podlogama za *Escherichia coli* Str^R (LB+Str) i *Lactobacillus brevis* (MRS+Nal).

U ovom istraživanju, u svim mješovitim bakterijskim kulturama, nakon 6 dana uzgoja, nije detektiran rast ni jedne vrste stanica. Stanice su ili prešle u fazu odumiranja ili se javlja mogućnost pojave stanica koje su ušle u mirujuće stanje u kojem su vijabilne, ali su izgubile sposobnost formiranja kolonija na hranjivom mediju. Nedetektabilno, ali vijabilno stanje više puta je dokazano u bakterije *E. coli* (Oliver, 2005; Joers i sur., 2010; Maisonneuve i sur., 2011; Tashiro i sur., 2012) te bakterije mliječne kiseline *Bifidobacterium longum* 46 i *Bifidobacterium lactis* Bb-12 (Lahtinen i sur, 2006) te *Lactobacillus plantarum* (Oliver, 2005). Navedeno stanje jedna je od strategija preživljavanja nesporogenih bakterija u nepovoljnim uvjetima i potrebno ju je dokazati nekom od metoda detekcije VBNC bakterijskih stanica.

Sažetak o doprinosu istraživanja

Ovo istraživanje bavilo se proučavanjem konkurentnog rasta enterobakterije *E. coli* rezistentne na antibiotik streptomycin i bakterije mliječne kiseline *L. brevis* L62. Brza evolucija rezistencije na antibiotike otkriva važnost razumijevanja temeljne dinamike evolucije, a praćenje rasta bakterijske kulture u stresnim uvjetima daje nam uvid u dinamiku i mehanizam genetičke raznolikosti. Takva saznanja mogu dati objašnjenje bakterijske patogenosti, povećane antibiotske rezistencije, preživljavanje kontaminanata hrane, formiranje biofilma, „quorum sensing“ i starenje. Nadalje, javlja se povećan interes i potreba za razvojem antimikrobne alternative kao sredstva za sprječavanje ili smanjenje prevlasti patogenih rezistentnih na antibiotike. S obzirom da je mlada bakterijska kultura *L. brevis* L62 suzbila rast starije bakterijske kulture *E. coli*, patogena koji se ne može ukloniti antibiotikom, pogodna je za njezino uklanjanje. Zato *L. brevis* ima potencijalnu primjenu u industrijskoj proizvodnji hrane i pročišćavanju vode. No, s obzirom da postoji mogućnost pojave stanja VBNC potreban je dodatan oprez i nastavak istraživanja.

5. ZAKLJUČCI

1. Stanice mlade bakterijske kulture *Lactobacillus brevis* L62 (1 dan stare) uzgajane u mješovitoj kulturi sa stanicama mlade bakterijske kulture *Escherichia coli* Str^R (1 dan stare) u omjeru 10:1 pri 37 °C pokazuju dobar konkurentski rast. Istraživana bakterijska kultura *Lactobacillus brevis* L62 pokazala se pogodnim konkurentskim sojem za suzbijanje patogene bakterije *Escherichia coli* Str^R.
2. Stanice stare bakterijske kulture *Escherichia coli* Str^R (10 dana stare) uzgajane u mješovitoj kulturi u minimalnoj podlozi s mlađim bakterijskim stanicama *Lactobacillus brevis* L62 (1 dan stare) u omjer 1:10 i 1:100 nisu iskazale fenotip prednosti rasta u stacionarnoj fazi.

6. LITERATURA

Baćun-Družina, V., Butorac, A., Mrvčić, J., Landeka Dragičević, T., Stehlik-Tomas, V. (2011) Bacterial Stationary Phase Evolution. *Food Technol. Biotechnol.* **49**, 13-23.

Baćun-Družina, V., Čagalj, Ž., Gjuračić, K. (2007) The growth advantage in stationary phase (GASP) phenomenon in mixed cultures of enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **266**, 119-127.

Baćun-Družina, V., Mrvčić, J., Butorac, A., Stehlik-Tomas, V., Gjuračić, K. (2009) The influence of gene transfer on the lactic acid bacteria evolution. *Mljekarstvo* **3**, 181-192.

Baćun-Družina, V., Mrvčić, J., Filipčić, M., Stehlik-Tomas, V. (2008) Moderate growth advantage in stationary phase (GASP) phenomenon of enterobacteria over *Lactobacillus brevis* L62 in mixed cultures. *Abstracts of the 4th Central European Congress on Food and 6th Croatian Congress on Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists*, Cavtat, str. 197.

Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. **277**, 1453–1462.

Champomier-Vergès, M.C., Maguin, E., Mistou, M.Y., Anglade, P., Chich, J.F. (2002) Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *J. Chromatogr. B.* **771**, 329-342.

Dembele, T., Obdrialek, V., Votava, M. (1998) Inhibition of Bacterial Pathogens by *Lactobacilli*. *Zent. bl. Bakteriolog.* **288**, 395-401.

Duraković, L., Duraković, Z., Blažinkov, M., Bošnjak, M., Sikora, S., Delaš, F., Markov, K., Skelin, A., Čvek, D. (2009) Mikrobne zajednice i biofilmovi. *Hrvat. čas. prehrambenu tehnol biotehnol. nutr.* **4**, 92-97.

Džidić, S., Šušković, J., Kos, B. (2008) Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol. Biotechnol.* **46**, 11-21.

Fakruddin, M., Mannan, K.S., Andrews, S. (2013) Viable but Nonculturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective. *ISRN. Microbiol.* **2013**, 1-6.

Faust, K., Raes, J. (2012) Microbial interactions: from network to models. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 538-550.

Faust, K., Raes, J. (2012) Microbial interactions: from network to models. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 538-550.

Finkel, S.E., Kolter R. (1999) Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 4023–4027.

Finkel, S.E. (2006) Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 113-120.

Foster, P.L. (2007) Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**, 373–397.

Fotadar, U., Zaveloff, P., Terracio, L. (2005) Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *J Basic Microbiol.* **45**, 403-404.

Hengge-Aronis, R. (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 373–395.

Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B. (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 15-25.

Jöers, A., Kaldalu, N., Tenson, T. (2010) The Frequency of Persisters in *Escherichia coli* Reflects the Kinetics of Awakening from Dormancy. *J.Bacteriol.*, **192**, 3379–3384.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123-140.

Khalid, K. (2011) An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci.* **1**, 1-13.

Kuhar, I., Žgur-Bertok, D. (1999) Transcription regulation of the colicin K cka gene reveals induction of colicin synthesis by differential responses to environmental signals. *J. Bacteriol.* **181**, 7373- 7380.

Lahtinen, S.J., Ouwehand, A.C., Reinikainen, J.P., Korpela, J.M., Sandholm, J., Salminen, S.J. (2006) Intrinsic properties of so-called dormant probiotic bacteria, determined by flow cytometric viability assays. *Appl. Environ Microbiol.* **72**, 5132-5134.

Leroy, F., De Vuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends. Food Sci. Technol.* **15**, 67-78.

Li, S., Li, Z., Wei, W., Ma, C., Song, X., Li, S., He, W., Tian, J., Huo, X. (2015) Association of mutation patterns in GyrA and ParC genes with quinolone resistance levels in lactic acid bacteria. *J. Antibiot.* **68**, 81-87.

Liu, W., Pang, H., Zhang, H., Cai, Y. (2014) Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. U: Lactic Acid Bacteria (Zhang, H., Cai, Y., ured.), Springer Science+Business Media, Dordrecht, str. 104.

Maisonneuve, E., Shakespeare, L.J., Jørgensen, M.G., Gerdes, K. (2011) Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 13206–13211.

Mathew, A.G., Cissell, R., Liamthong, S. (2007) Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog Dis*, **4**, 115-133.

Matic, I. (2013) Stress-induced mutagenesis in bacteria, U: Stress-Induced Mutagenesis, (Mittelman, D., ured) Springer, New York, str. 1-19.

Neu, H.C. (1992) The crisis in antibiotic resistance. *Science.* **257**, 1064-1074.

Oliver, J.D. (2005) The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J. Microbiol.* **43**, 93-100.

Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. (2010) Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Ann. Biol. Res.* **1**, 218-228.

Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D.S., Alston, M., Stringer, M.F., Betts, R.P., Baranyi, J., Peck, M.W., Hinton, J.C.D. (2012) Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *J. Bacteriol.* **194**, 686–701.

Seiler, C., Berendonk, T. U. (2012) Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* **3**, 399 doi: 10.3389/fmicb.2012.00399

Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**, 57-73.

Tashiro, Y., Kawata, K., Taniuchi, A., Kakinuma, K., May, T., Okabe, S. (2012). RelE-Mediated Dormancy Is Enhanced at High Cell Density in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **194**, 1169–1176.

Terekhov, V.I., Serdyuchenko, I.V. (2016) Bacteria of the genus *Escherichia*. *J. Vet. Med.* **2**, 35-42.

Vodnar, D.C., Paucean, A., Dulf, F.V., Socaciu, C. (2010) HPLC characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj. Napoca.* **38**, 109-113.

Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., Hengge, R. (2005) Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli* : σ S -Dependent Genes, Promoters , and Sigma Factor Selectivity. *J. Bacteriol.* **187**, 1591-1603.

World Health Organization (2006) Antibiotic resistance, <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>>. Pristupljeno: 20.srpnja 2017.

Yeiser, B., Pepper, E.D., Goodman, M.F., Finkel, S.E. (2002) SOS-induced DNA polymerase enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8737-8741.

Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C.W., Ding, T. (2017) Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Patogens. *Front. Microbiol.* **8**, 580. doi: 10.3389/fmicb.2017.00580.

Zinser, E.R., Kolter, R. (2004) *E. coli* evolution during stationary phase. *Res. Microbiol.* **155**, 328-336.