

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Mr Bojana A. Vujović

BAKTERIOFAGI KAO AGENSI U
KONTROLI FORMIRANJA BIOFILMOVA
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Bojana A. Vujović, M.Sc.

**BACTERIOPHAGES AS AGENTS IN
PSEUDOMONAS AERUGINOSA
BIOFILMS CONTROL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

POLJOPRIVREDNI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU

Mentori:

Dr Dragoslava Radin, redovni profesor
Uža naučna oblast: tehnološka mikrobiologija

Dr Vera Raičević, redovni profesor
Uža naučna oblast: ekološka mikrobiologija

Članovi komisije:

Dr Smilja Teodorović, vanredni profesor
Uža naučna oblast: biološko inženjerstvo

Dr Miomir Nikšić, redovni profesor
Uža naučna oblast: tehnološka mikrobiologija

Dr Petar Knežević, vanredni profesor
Uža naučna oblast: mikrobiologija

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se Mentorkama i Članovima Komisije na podršci, savetima i pomoći pri izradi ovog rada.

Posebno se zahvaljujem dr Veri Raičević na srdačnom kolegijalnom i prijateljskom odnosu, na rešenjima za sve situacije i probleme, na ukazanom poverenju.

Veliku zahvalnost upućujem dr Smilji Teodorović na kreiranju velikog broja eksperimenata u ovom radu, posebno na ekspertizi iz oblasti genetike, molekularnih analiza i bioinformatike. Hvala na nesebičnoj pomoći, podeljenom znanju, strpljenju za moje greške, uloženom trudu i vremenu; hvala na posvećenom i sistematičnom pristupu koji je u mnogome doprineo konačnom izgledu i kvalitetu ovog rada.

Zahvaljujem se dr Petru Kneževiću na ekspertskoj pomoći pri radu sa bakteriofagima. Hvala na ustupljenom prostoru u laboratoriji, na provedenom vremenu, podeljenom znanju i iskustvu koje je ugradio u ovaj rad, na angažovanju kojim je značajno uticao na kvalitet i kompetentnost rezultata u ovom radu. Takođe hvala koleginicama Verici Aleksić i posebno Aleksandri Petrović sa Katedre za mikrobiologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Departmana za biologiju i ekologiju u Novom Sadu na velikoj pomoći prilikom rada u njihovoj laboratoriji.

Zahvaljujem se takođe svojim dragim kolegama i prijateljima koji su dali neprocenjivi doprinos pri eksperimentalnom radu, obradi i interpretaciji dobijenih rezultata: Dejanu Laziću na savetima i velikoj pomoći u izvođenju velikog broja eksperimenata, posebno pri radu na Raman mikroskopu, Aleksandru Nedeljkoviću za pomoć pri statističkoj obradi spektara snimljenih Raman spektroskopom, dr Milanu Kojiću na korisnim savetima i pozajmljenim hemikalijama za rad sa bakteriofagima, Ivani Spasojević za pomoć u savladavanju prvih dana rada u laboratoriji kao i zajedničkom prolaženju nepoznatih protokola, Miletu Božiću na obezbeđivanju egzistencijalne podrške, Željki Rudić za pomoć pri statističkoj obradi, tehničkoj obradi i interpretaciji rezultata, Zoranu Novakoviću što je omogućio uzorkovanje na postrojenju za prečišćavanje otpadnih voda u fabrici "Somboled" u Somboru, Đerđu Šugaru na podršci, saradnji, omogućenom uzorkovanju na postrojenju za prečišćavanje otpadnih voda u Subotici, prof. dr Olgi Petrović koja uvek zna prave reči podrške i saveta.

Hvala kolegama sa Katedre za ekološku i tehnološku mikrobiologiju.

Posebno hvala mojim porodicama Vujović i Burger na podršci i nemerljivoj pomoći.

A najviše hvala Nikici i Borisu koji su ćutke i sa osmehom podelili sa mnom sav teret rada na ovoj disertaciji.

Mr Bojana Vujović

REZIME

Pseudomonas aeruginosa je štapićasta, asporogena bakterija, široko rasprostranjena u sredinama kao što su zemljište, voda, ljudski i životinjski organizmi, biljke i otpad. *P. aeruginosa* poseduje jedan cirkularni hromozom koji je smešten u citoplazmi ćelije, kao i više plazmida značajnih za patogena svojstva ove bakterije. Genom *P. aeruginosa* je veličine 5,2 do 7,1 Mbp, u kome je ukupna zastupljenost guanina i citozina oko 65%.

Najveći broj genetskih i genomskih analiza *P. aeruginosa* je usmeren ka kliničkim izolatima, dok je mnogo manja pažnja posvećena izolatima iz životne sredine, zbog čega je manje od 10% genomskih sekvenci deponovanih u Nacionalnom Centru za Biotehnoške Informacije (NCBI) izolata poreklom iz životne sredine.

Jedna od glavnih kompetitivnih prednosti *P. aeruginosa* u preživljavanju u različitim uslovima spoljašnje sredine je sposobnost formiranja biofilmova, a brojna istraživanja su pokazala da većina izolata ima ovu sposobnost. Izučavanju biofilmova se u poslednje vreme poklanja značajnija pažnja u oblastima mikrobiologije hrane, vode, životne sredine kao i medicinske mikrobiologije. Prisustvo biofilmova u životnom okruženju čoveka, različitim sistemima za transport industrijske, površinske vode, vode za navodnjavanje kao i medicinskoj opremi i pomagalima, čine biofilmove aktuelnom temom u medicini, farmaciji, ali i u kontekstu higijene hrane. Eliminacija bakterijskih biofilmova je izuzetno težak proces, zbog toga postoji potreba da se razvijaju alternativni načini za sprečavanje formiranja i kontrolu biofilmova.

Polazeći od napred navednog, osnovni naučni cilj ove doktorske disertacije je sagledavanje mogućnosti primene bakteriofaga u kontroli formiranja biofilmova, kao i uticaja na već formirane biofilmove sojeva vrste *Pseudomonas aeruginosa*, pri definisanim ekološkim uslovima u pogledu temperature, pH i koncentracije NaCl.

Iz uzoraka sedimenta, aktivnog mulja, površinske vode, vode za piće i zemljišta sa različitih lokaliteta izolovano je 30 izolata *Pseudomonas aeruginosa*.

Molekularna identifikacija i tipizacija 30 izolata *Pseudomonas* je izvršena modifikovanom MLST šemom za *P. aeruginosa* (<http://pubMLst.org/paeruginosa/>) pomoću pet housekeeping gena: *acsA*, *guaA*, *mutL*, *ppsA* i *trpE*. Za filogenetske analize je korišćen programski paket MEGA, verzija 8.

Rezultati dobijeni MLST analizom su u skladu sa idejom da su populacije *P. aeruginosa* poreklom iz različitih sredina među sobom genetski veoma slične. Homogena struktura populacije se može objasniti visokim stepenom genskih rekombinacija među populacijama, a divergenciju od terestrijalnih i slatkovodnih populacija su pokazali samo sojevi *P. aeruginosa* izolovani iz morske vode.

Izolovani *P. aeruginosa* su klasifikovani u odnosu na mogućnost formiranja biofilmova pri temperaturi od 37°C i 22°C. U uslovima inkubacije bakterija na 37°C od 30 izolata *P. aeruginosa*, najveći broj (73%) pripada grupi slabo-biofilmprodukujućih, 11% pripada grupi srednje-biofilmprodukujućih, 10% izolata je definisano kao biofilm-neprodukujući, dok izolati sa visokom produkcijom biofilmova nisu konstatovani. U odnosu na produkciju biofilmova, među testiranim izolatima nije ustanovljena značajna razlika u odnosu na poreklo izolata. Kategorizacijom izolata prema sposobnosti produkcije biofilmova pri temperaturi od 22°C, 40% izolata su biofilm-neprodukujući, 27% je slabo-produkujuće, 30% srednje-produkujuće i samo jedan izolat je visoko-produkujući (3%). Faktori životne sredine, pH, temperature i salinitet, su u različitom stepenu uticali na formiranje biofilma. Dokazano je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između biomase biofilmova formiranih na 37°C i 22°C.

Kvalitativni i kvantitativni sastav biofilmova je procenjen primenom Raman spektroskopije. Izgled spektara, raspored i intenzitet dobijenih Ramanovih pikova navode na pretpostavku da su biofilmovi ispitivanih izolata među sobom kvalitativno slični, kao i da nema razlika u kvalitetu biofilmova u zavisnosti od uslova sredine u kojima se formiraju.

Za ispitivanja mogućnosti delovanja na biofilme, iz uzoraka životne sredine je izolovano 9 bakteriofaga. Izolacija je izvršena metodom dvostrukog agara kojoj je prethodila metoda obogaćivanja, a kao bakterije domaćini su korišteni pet izolata *P. aeruginosa*. Bakteriofagi su izolovani iz uzoraka sedimenta - 6 faga, površinske vode 2 i iz uzorka vode za piće 1 bakteriofag. Ispitano je litičko delovanje izolovanih faga prema većem broju izolata *P. aeruginosa* i dokazano da svi izolovani fagi imaju sposobnost litičkog delovanja na više od jednom domaćinu. Bakteriofagi su okarakterisani

morfološki, genetski (RFLP analiza), na osnovu proteinskog profila kapsida. Na osnovu snimaka dobijenih na Transmissionom elektronskom mikroskopu izvršeno je određivanje taksonomske pripadnosti bakteriofaga. Tri faga proučavana transmissionom elektronskom mikroskopijom su imala ikozaedarnu glavu i dug, fleksibilan i nekontraktilan rep, što ih svrstava u Morfotip B1 u okviru familije *Siphoviridae* (red *Caudovirales*). Svi izolovani fagi imaju sposobnost litičkog delovanja na većem broju izolata *P. aeruginosa*.

Ispitivanje delovanja bakteriofaga na formiranje biofilma je urađeno kolorimetrijskom metodom (bojenjem Kristal violetom) u mikrotitar pločama. Ispitano je delovanje faga $\phi 4$, $\phi 5$, $\phi 8$ i $\phi 11$ na formiranje kao i na već formirane biofilme izolata B_V_7, B_PV_1, SU_AM_4, SU_AM_2, P_V_2 i referentnog soja *P. aeruginosa* ATCC 27853. U eksperimentalnim uslovima je postignut efekat umanjnja biomase biofilмова u odnosu na kontrolne biofilme pod svim testiranim uslovima sredine u pogledu temperature (22°C i 37°C) pH (6 i 7) i koncentracije NaCl (1% i 2%) u toku 24h.

Rezultati dobijeni tokom ovih istraživanja doprineli su razumevanju diverziteta ispitivanih populacija u odnosu na globalnu populaciju *P. aeruginosa* i boljem uvidu u rasprostranjenost ove bakterije, a takođe nude odgovore na aktuelna pitanja koja se odnose na rasprostranjenost kliničkih i sojeva iz prirode.

Ispitivanjem uticaja, formiranja i uklanjanja stvorenih biofilмова, delovanjem specifičnih bakteriofaga u *in vitro* uslovima tokom ove disertacije, ukazano je na važan biotehnološki izazov čija praktična primena u različitim oblastima poljoprivrede i proizvodnje hrane zahteva nastavak istraživanja.

Ključne reči: *P. aeruginosa*, genetski diverzitet, MLST, fenotipske karakteristike, biofilm, bakteriofagi

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

UDK: 578.347:579.841.1(043.3)

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is rod shape, asporogenous bacteria, wide spread in soil, water, human and animal organisms, plants and solid wastes. *P. aeruginosa* has one circular chromosome which is placed into the cell's cytoplasm, as well as more plasmids which are significant for pathogen characteristics of this bacterium. Genome size of *P. aeruginosa* is from 5.2 to 7.1 Mbp and Guanine and Cytosine content in the genome is approximately 65 %. The number of the genetic and genome's analyses of *P. aeruginosa* is directed to the clinical isolates and significantly lower attention is devoted to the isolates from environment. The consequence is that the less than 10 % of the genome's sequences deposited in the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) in USA are with environmental origin.

One of the main competitive advantages of *P. aeruginosa* survival under different environmental conditions is biofilm forming ability. Numerous investigations are shown that main part of isolates have this ability. Researches of the biofilm are paying great attention in last decades, especially in the following fields: microbiology of food, water, environment, as well as medical microbiology. Because of biofilm presence in the human environment, different facilities for water transport in industry, surface waters, water for irrigation purposes, medical equipment and tools, biofilm became very important goal for investigation in medicine, pharmacy and food hygiene. Elimination of the bacteria's biofilms is extremely hard process and because that, alternative methods for avoiding biofilm formation, as well as biofilm control are very necessary.

Taking in mind all these previously mentioned facts, investigation of *Pseudomonas aeruginosa* strains diversity selected from environment and its biofilm forming ability and forming of the identified bacteria strains collection is established as main scientific goal of this Ph.D. thesis. The goal of this Ph.D. thesis is investigations of possibility of influence, forming and removal of created biofilms by specific bacteriophages acting in *in-vivo* conditions and forming of phages collection.

From the different samples (sediment, activated sludge, surface water, drinking water and soil from few locations) are selected totally 30 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Genome identification, its differentiation and typization of all 30 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* is done by the modified MLST scheme for *P. aeruginosa* (<http://pubmLst.org/paeruginosa/>) with five housekeeping genes: *acsA*, *guaA*, *mutL*, *ppsA* and *trpE*. For phylogenetic and molecular evolution analysis, software package MEGA, version 8 is used.

The results provided by MLST analysis, confirm that the *P. aeruginosa* populations isolated from different environmental areas are very similar inside the group – from genetic similarity point of view. This homogeneity of the population can be explained by high degree of gene recombination between populations and deviation from this type of distribution are shown just *P. aeruginosa* strains, which was isolated from the Sea water.

From the possibility of biofilm forming point of view, the biggest number of 30 isolates (i.e.73 %) belongs to low-production group, 11 % to middle-production group and only 10 % of all isolates are belongs to the biofilm non-producing group. Isolates with high biofilm production at 37 °C are not registered. Between tested isolates, significant difference is not registered. Isolates categorization based on biofilm production ability at temperature of 22 °C, shows that approximately 40 % of it are biofilm non-producing, about 27 % are low-producing, 30 % of it are middle-producing and just one sample is high-producing isolate (3 %). Environmental factors, as well as pH, temperature, salinity are in different degree influenced on biofilm forming. It is proofed that statistical significant difference exist ($p < 0.05$), between biomass of the biofilms which are formed at 37 °C and 22 °C.

Look like of the Raman spectrum, its distribution and peaks intensity are such kind that the assumption is that the biofilms of investigated isolates are qualitative similar, as well as that there are no difference in biofilm's quality which provided under different forming environmental conditions.

Totally nine bacteriophages are isolated by using double layer method, before which is applied phages cultivation, incubation and collection from available *P. aeruginosa* isolates. Bacteriophages are isolated from samples of sediment (six phages), surface water

(two phages) and drinking water, one phage. Based on scanning which are done on the transmission electronic microscope, taxonomic bacteriophages assigned to family are done. Three examined phages by transmission electron microscopy had icosahedral head, long, flexible but noncontractile tail, belonging to Morphotype B1 of family *Siphoviridae* (order *Caudovirales*). Also, all isolated phages have ability for lytic action on the numerous of bacterium hosts.

Research of bacteriophages influence on biofilm forming was done by colorimetric method (colored by Crystal violet) in the micro titer plates, according to the partially modified procedure of Knezevic and Petrovic (2008). After bacteriophage ($\phi 4$, $\phi 5$, $\phi 8$ I $\phi 11$) application, on the all tested isolates (B_V_7, B_PV_1, SU_AM_4, SU_AM_2, P_V_2 and referent strain *P. aeruginosa* ATCC 27853) and under all tested environmental conditions, temperature of 22°C and 37°C, pH values of 6 and 7 and NaCl concentrations of 1% and 2%, effect of the biomass formed biofilms reduction compared with control biofilms are achieved.

The results obtained during these researches are contributed to the understanding of the diversity of the studied population in relation to the global population of *P. aeruginosa* and better insight into the prevalence of these bacteria and also provide answers on current issues related to questions of distribution and clinical strains from nature.

The influence, the formation and removal of created biofilms, applying the specific bacteriophages *in vitro*, during working on this thesis it is point out of the important biotechnological challenge which practical implementation in various fields of agriculture and food production requires continued research.

Key words: *P. aeruginosa*, genetic diversity, MLST, phenotype characteristics, biofilm, bacteriophages

Scientific field: biotechnical sciences

Specific scientific field: technological engineering

UDK: 578.347:579.841.1(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> -RASPROSTRANJENOST, MORFOLOŠKE, BIOHEMIJSKE I MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE	3
2.1.1. Genom <i>P. aeruginosa</i>	5
2.2. BIOFILMOVI <i>P. AERUGINOSA</i>	8
2.2.1. Građa biofilmova i regulacija procesa formiranja biofilmova	12
2.2.1.1. <i>Pokretljivost</i>	16
2.2.1.2. <i>Produkcija ramnolipida</i>	19
2.2.1.3. <i>Produkcija piocijanina</i>	20
2.2.2. Uticaj spoljašnje sredine na formiranje biofilmova.....	21
2.2.3. Značaj biofilmova.....	24
2.2.4. Suzbijanje i uklanjanje biofilmova.....	25
2.2.4.1. <i>Antibiofilm jedinjenja sa anti-QS aktivnošću</i>	29
2.2.4.2. <i>Antibiofilm jedinjenja bez anti-QS aktivnosti</i>	32
2.3. MOGUĆNOST PRIMENE BAKTERIOFAGA KAO ANTIMIKROBNIH AGENASA	33
2.4. BAKTERIOFAGI	35
2.4.1. Opšte karakteristike bakteriofaga	37
2.4.1.1. <i>Morfologija faga</i>	37
2.4.1.2. <i>Interakcija bakteriofaga i bakterijske ćelije</i>	38
2.4.2. Identifikacija i taksonomija bakteriofaga	41
2.4.3. Uticaj fizičkih i hemijskih agenasa na bakteriofage	44
2.4.4. Bakteriofagi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	46
4. MATERIJAL I METODE	47
4.1. IZOLACIJA I DETERMINACIJA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	47
4.2. MOLEKULARNA DETERMINACIJA IZOLATA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	48
4.2.1. Izolacija DNK.....	48
4.2.2. Kvantitet i čistoća DNK	49
4.2.3. PCR amplifikacija MLST lokusa	49

4.2.4.	Purifikacija i sekvenciranje PCR produkata.....	50
4.2.5.	Analiza sekvenci.....	51
4.2.6.	Tipizacija izolata pomoću MLST šeme.....	52
4.2.7.	Filogenetske analize.....	52
4.2.8.	Deponovanje nukleotidnih sekvenci.....	53
4.3.	SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMOVA.....	53
4.4.	POKRETLJIVOST.....	55
4.5.	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE RAMNOLIPIDA.....	55
4.6.	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PIOCIJANINA.....	56
4.7.	ISPITIVANJE SVOJSTAVA FORMIRANIH BIOFILMOVA RAMAN SPEKTROMETRIJOM.....	57
4.7.1.1.	Priprema uzorka biofilmova.....	57
4.7.1.2.	Akvizicija Ramanskih spektara.....	57
4.7.1.3.	Obrada spektara.....	57
4.8.	IZOLACIJA I DETERMINACIJA BAKTERIOFAGA.....	58
4.8.1.	Izolacija faga.....	58
4.8.2.	Propagacija i purifikacija faga.....	59
4.8.2.1.	Propagacija bakteriofaga.....	59
4.8.2.2.	Prečišćavanje i koncentrovanje izolovanih bakteriofaga.....	59
4.8.2.3.	Određivanje brojnosti faga.....	60
4.8.3.	Određivanje litičkog spektra faga.....	61
4.8.4.	Karakterizacija izolovanih bakteriofaga.....	62
4.8.4.1.	Morfologija plakova.....	62
4.8.4.2.	Izgled bakteriofaga na elektronskom mikroskopu.....	62
4.8.4.3.	Određivanje karakteristika genoma izolovanih bakteriofaga.....	62
4.8.4.4.	Određivanje proteinskog profila bakteriofaga.....	64
4.8.5.	Određivanje krive rasta bakteriofaga.....	64
4.9.	ISPITIVANJE DELOVANJA BAKTRIOFAGA NA RAST BIOFILMA I FORMIRANI BIOFILM.....	65
4.10.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	66
5.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	67
5.1.	IZOLACIJA I DETERMINACIJA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	67
5.2.	TIPIZACIJA I STRUKTURA POPULACIJE IZOLOVANIH <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	

5.2.1.	Izolacija i amplifikacija izolovane DNK	71
5.2.2.	Analiza DNK sekvenci	73
5.2.3.	Tipizacija izolata pomoću MLST šeme	74
5.2.4.	Filogenetske analize	79
5.3.	FENOTIPSKU KARAKTERISTIKU <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	86
5.3.1.	Formiranje biofilмова	86
5.3.2.	Pokretljivost	96
5.3.3.	Produkcija ramnolipida	101
5.3.4.	Produkcija piocijanina	102
5.4.	ISPITIVANJE SVOJSTAVA BIOFILMOVA RAMAN SPEKTROSKOPIJOM	104
5.5.	IZOLACIJA BAKTERIOFAGA	110
5.6.	PROPAGACIJA, PREČIŠĆAVANJE I KONCENTROVANJE IZOLOVANIH BAKTERIOFAGA	113
5.6.1.	Određivanje brojnosti faga	113
5.7.	ISPITIVANJE LITIČKOG SPEKTRA IZOLOVANIH FAGA	114
5.8.	KARAKTERIZACIJA BAKTERIOFAGA	116
5.8.1.	Morfologija plakova	116
5.8.2.	Izgled odabranih bakteriofaga na elektronskom mikroskopu	118
5.8.3.	Određivanje karakteristika genoma odabranih bakteriofaga	120
5.8.4.	Određivanje proteinskog profila odabranih faga	122
5.9.	KRIVE RASTA ODABRANIH BAKTERIOFAGA	123
5.10.	ISPITIVANJE DELOVANJA BAKTERIOFAGA NA FORMIRANJE BIOFILMOVA	126
6.	ZAKLJUČCI	138
7.	LITERATURA	145
8.	PRILOZI	166
8.1.	PRILOG 1 MESTA UZIMANJA UZORAKA, STANIŠTA I OZNAKE IZOLOVANIH <i>P.</i> <i>AERUGINOSA</i>	166
8.2.	PRILOG 2: FILOGENETSKO STABLO NA OSNOVU LOKUSA ACSA	167
8.3.	PRILOG 3: FILOGENETSKO STABLO KREIRANO NA OSNOVU LOKUSA GUAA ..	168
8.4.	PRILOG 4: FILOGENETSKO STABLO KREIRANO NA OSNOVU LOKUSA MUTL ..	169
8.5.	PRILOG 5: FILOGENETSKO STABLO KREIRANO NA OSNOVU LOKUSA PPSA ..	170
8.6.	PRILOG 6: FILOGENETSKO STABLO KREIRANO NA OSNOVU LOKUSA TRPE ..	171

8.7.	PRILOG 7: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD ₆₃₀) 24H NA 37°C, LB BUJON, PH 7, NACL 1%	172
8.8.	PRILOG 8: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD ₆₃₀) 24H NA 22°C, LB BUJON, PH 7, NACL 1%	173
8.9.	PRILOG 9: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD ₆₃) 24H NA 37°C, LB BUJON, PH 6, NACL 1%	174
8.10.	PRILOG 10: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD ₆₃₀) 24H NA 22°C, LB BUJON, PH 6, NACL 1%	175
8.11.	PRILOG 11: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD ₆₃₀) 24H NA 37°C, LB BUJON, PH 7, NACL 2%	176
8.12.	PRILOG 12: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD ₆₃₀) 24H NA 22°C, LB BUJON, PH 7, NACL 2%	177
8.13.	PRILOG 13: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD ₆₃₀) 6H NA 37°C, LB BUJON, PH 7, NACL 1%	178
8.14.	PRILOG 14: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD ₆₃₀) 6H NA 22°C, LB BUJON, PH 7, NACL 1%	179
8.15.	PRILOG 15: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD ₆₃₀) 48H NA 37°C, LB BUJON, PH 7, NACL 1%	180
8.16.	PRILOG 16: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD ₆₃₀) 48H NA 22°C, LB BUJON, PH 7, NACL 1%	181
8.17.	PRILOG 17: POKRETLJIVOST <i>P. AERUGINOSA</i> NA 22°C 24H	182
8.18.	PRILOG 18: POKRETLJIVOST <i>P. AERUGINOSA</i> NA 37°C, 24H	183
8.19.	PRILOG 19: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT ATCC 27853	184
8.20.	PRILOG 20: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT B_PV_1	184
8.21.	PRILOG 21: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT B_V_6	185
8.22.	PRILOG 22: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT B_V_7	185
8.23.	PRILOG 23: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT ČA_SE_1	186
8.24.	PRILOG 24: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT ČA_SE_8	186
8.25.	PRILOG 25: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT JS_V_13	187
8.26.	PRILOG 26: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT SU_I_1	187
8.27.	PRILOG 27: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT ČA_SE_5	188
8.28.	PRILOG 28: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT KSE_V_11	188

8.29.	PRILOG 29: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT SU_AM_2.....	189
8.30.	PRILOG 30: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT S_V_12	189
8.31.	PRILOG 31: DELOVANJE BAKTERIOFAGA Φ 4 NA BIOFILMOVE.....	190
8.32.	PRILOG 32: DELOVANJE BAKTERIOFAGA Φ 5 NA BIOFILMOVE.....	191
8.33.	PRILOG 33: DELOVANJE BAKTERIOFAGA Φ 8 NA BIOFILMOVE.....	192
8.34.	PRILOG 34: DELOVANJE BAKTERIOFAGA Φ 11 NA BIOFILMOVE NA 37°C	193
8.35.	PRILOG 35: DELOVANJE BAKTERIOFAGA Φ 11 NA BIOFILMOVE NA 22°C	194
9.	BIOGRAFIJA	195
10.	IZJAVE.....	196
10.1.	PRILOG 1	196
10.2.	PRILOG 2	197
10.3.	PRILOG 3	198

1. UVOD

Pseudomonas aeruginosa spada u grupu oportunističkih humanih patogenih bakterija iz klase Gammaproteobacteria koja zbog visokog stepena virulencije i visoke rezistencije na antibiotike predstavlja veliku pretnju po javno zdravlje stanovništva. Sposobnost ove bakterije da koristi veoma različita organska jedinjenja kao izvore nutrijenata, kao i sposobnost adaptacije na različite uslove u životnoj sredini, često ekstremne u odnosu na temperaturu ili koncentraciju jona, omogućava ovoj bakteriji da uspešno kolonizuje širok spektar ekoloških niša, uključujući zemljište, vodu, rizosferu i dr.

U životnoj sredini, rast bakterija se odvija u organizovanoj zajednici, poznatijoj kao biofilm. Smatra se da je sposobnost formiranja biofilma genetski determinisana i da oko 99% bakterija u prirodnim staništima živi pričvršćena za neku površinu formirajući biofilm, a ne kao planktonski organizmi. U ovakvim zajednicama bakterije bivaju zaštićene od spoljašnjih uticaja, doprinoseći pojavi rezistencije na antibiotike i različita druga hemijska antimikrobna sredstva.

Formirani biofilmovi imaju karakterističnu arhitekturu što je obezbeđeno produkcijom ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS), koje uključuju produkciju alginatnih polisaharida, lipida i drugih organskih makromolekula. Osim održavanja arhitekture, EPS obezbeđuje i fizičku rezistenciju biofilma. Tokom procesa sazrevanja dolazi do formiranja kanala koji omogućavaju protok hranljivih i otpadnih produkata, transport kiseonika i raznih signalnih molekula. Formiranje biofilma je pod kontrolom zavisnog quorum-senzing (QS) mehanizma, ali je ovo složen proces zavisan od velikog broja različitih uticaja uključujući dostupnost hranljivih materija. Takođe, uspeh ćelija u zajednici zahteva koordinaciju aktivnosti mnogih gena kroz kompleksne regulatorne mehanizme.

Biofilmovi, kao adaptirane bakterijske zajednice, omogućavaju bakterijama da kolonizuju i opstaju i u uslovima prisustva antibiotika i različitih biocida. Primena savremenih tehnika je poslednjih godina značajno doprinela razumevanju mikrobioloških, genetskih, molekularnih, hemijskih, biohemijskih i fizioloških struktura biofilma, ali varijabilnost biološkog materijala, promenljivost i prilagođavanje različitim uslovima sredine doprinosi stalnoj potrebi za iznalaženjem efikasnijih sredstava u njihovoj kontroli.

Poslednjih godina je poraslo interesovanje za primenu bakteriofaga kao mogućih biološki i ekološki prihvatljivih agenasa u kontroli rezistentnih, biofilm-formirajućih patogenih bakterija kao što je *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteriofagi su virusi koji inficiraju i liziraju bakterijsku ćeliju i do danas su našli primenu kao antimikrobni agensi u mnogim oblastima medicine, veterine, poljoprivrede, prehrambene tehnologije, ekologije i dr. zbog svoje široke rasprostranjenosti i netoksičnosti za ljude. Bakteriofagi mogu poslužiti kao jedan od alternativnih načina u kontroli biofilмова, s obzirom da poseduju mehanizme za degradaciju ekstracelularnog matriksa. Do danas su poznati mnogi primeri uspešne primene bakteriofaga u kontroli biofilмова *P. aeruginosa*, kao i primeri uspešne mikrobicidne primene u situacijama u kojima konvencionalni antibiotici nisu bili efikasni. Međutim, velika varijabilnost *P. aeruginosa*, mogućnost prilagođavanja, indukcija enzima, sinteza EPS-a, čine da ova bakterija uspešno odoleva čak i infekcijama bakteriofaga, zbog čega je neophodno vršiti istraživanja koja bi rasvetlila kako biologiju bakterije, tako i faga, što bi doprinelo i boljem razumevanju odnosa i uspešnijoj infekciji kada je u pitanju biofilm.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*-RASPROSTRANJENOST, MORFOLOŠKE, BIOHEMIJSKE I MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE

Naziv *Pseudomonas aeruginosa* potiče od grčke reči *Pseudo* (lažni) i *Monas*, odnosno "monada", koji je korišten u ranoj istoriji mikrobiologije za označavanje jednoćelijskih organizama. Ime *aeruginosa* potiče iz zeleno-plave nijanse kolonija kod mnogih izolata (Huw i sar., 2010) i u prevodu znači bakarna rđa.

P. aeruginosa je Gram-negativna, štapićasta, asporogena, monotriha dužine 1 - 5 µm, dijametra 0,5 - 1,0 µm, široko rasprostranjena u različitim sredinama. Sposobnost korišćenja širokog spektra organskih jedinjenja kao izvora hrane, omogućava ovoj bakteriji da kolonizuje i ekološke niše u kojoj su hranjive materije limitirane. *P. aeruginosa* je prisutna u sredinama kao što su zemljište, voda, ljudski i životinjski organizmi, biljke, otpad i bolnice (Lederberg i sar., 2000). Costerton i sar. (1994) su je označili kao jednog od najzastupljenijih organizama u akvatičnim ekosistemima sa visokom koncentracijom rastvorenog kiseonika i niskim sadržajem nutrijenata. Poznato je da je 8 - 10% gena odgovorno za regulaciju ekspresije drugih gena, što omogućava veliki broj kombinacija za aktivaciju gena, čime se objašnjava dobra prilagođenost ove bakterije različitim životnim sredinama (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984043>).

Rod *Pseudomonas* pripada klasi Gammaproteobacteria i velikoj porodici *Pseudomonadaceae*. Na osnovu 16S rRNK gena, u rod *Pseudomonas* uključeni su sojevi koji su ranije pripadali rodovima *Chryseomonas* i *Flavimonas*, a neki sojevi koji su bili svrstani u rod *Pseudomonas* sada su svrstani u rodove *Burkholderia* i *Ralstonia*. *Pseudomonas* je najvažniji rod u porodici *Pseudomonadaceae* i sadrži više od 60 vrsta.

Jedna od osnovnih taksonomskih karakteristika ove bakterije je produkcija pigmenta rastvorljivih u vodi, a najpoznatiji su piocijanin plavo-zelene boje, pioverdin žuto-zelene

i piorubin crveno-braon boje. Takođe, jedna od značajnih identifikacionih karakteristika bakterije je karakterističan miris (miris grožđa ili cveta lipe) poreklom od 2-aminoacetofenona. *P. aeruginosa* oksiduje glukozu bez pojave gasa, laktoza-negativna je, oksidaza i katalaza pozitivna.

P. aeruginosa je obligatan aerob, sa mogućnošću i anaerobne respiracije, koristeći nitrate ili druga jedinjenja kao akceptore elektrona. Optimalna temperatura rasta je na 42°C, i ova karakteristika uz produkciju piocijanina je osnovna razlika između vrste *P. aeruginosa* i drugih *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas aeruginosa je prvi put opisan kao bakterijska vrsta krajem devetnaestog veka, nakon Pasterovog otkrića sterilnog medijuma (Bhawsar i Singh, 2014). Prvi naučni rad pod naslovom “*On the blue and green coloration of bandages*” (“Plava i zelena obojenost omotača”, prev. aut.) o biologiji ove bakterije je publikovao farmakolog Carle Gessard 1882. godine. U radu je opisana osobina bakterije da produkuje plavo-zeleni pigment rastvorljiv u vodi, koji kada se osvetli UV svetlošću, fluorescira plavo-zeleno, a ovaj pigment je kasnije nazvan *pyocyanine* i po njemu je bakterija dobila ime *Bacillus pyocyaneus*, *Bacterium aeruginosa*, *Pseudomonas polycolor* i *Pseudomonas pyocyaneus* (Botzenhardt i sar., 1993).

P. aeruginosa odlikuje široka rasprostranjenost, te veliki uticaj u različitim sferama ljudske aktivnosti zbog čega je ova bakterija interesantna i mnogo proučavana:

1. *P. aeruginosa* je poznata po sposobnosti degradacije velikog broja organskih jedinjenja zbog čega ima veliki značaj u procesima bioremedijacije u životnoj sredini. Katabolizuje jedinjenja kao što su benzoati, aromatični hidrokarbonati (metilbenzeni - sporedni produkti naftne industrije i zagađivači životne sredine, prisutni u atmosferi, sedimentu, zemljištu i površinskim vodama), zatim tolueni (Pieper i sar., 1992), koji se koriste kao indikatori zagađenja, a koji se široko primenjuju kao rastvarači za emajl i boje i koriste se i u farmaceutskoj i hemijskoj industriji.

2. Produkuje ramnolipide (biosurfaktante široko primenjivane u oblasti bioremedijacije), kvinolone (koji imaju antimikrobno delovanje), cijano-vodonik, fenazin i lektine koji suprimiraju rast fitopatogena (Lederberg i sar., 2000).
3. *P. aeruginosa* je okarakterisana kao oportuni patogen koji retko inficira zdravu osobu, ali često izaziva infekcije kod imunokompromitovanih pacijenata, kao što su oboleli od cistične fibroze, kancera i AIDS-a (Botzenhardt i sar., 1993).
4. Pokazuje rezistentnost prema velikom broju različitih tipova hemoterapeutika i antibiotika čineći je patogenom teškim za eliminaciju (Lederberg i sar., 2000).

U okviru vrste se razlikuje veliki broj sojeva, a razlika je bazirana na makroskopskim i mikroskopskim morfološkim karakteristikama (izgledu kolonije na agaru, veličini štapića), karakterističnom mirisu i biohemijskim osobinama (produkciji pijocianina, biosurfaktanata i drugih) (Gilardi i sar., 1985). Fenotipske karakteristike bakterije su u vezi sa fiziološkom ulogom koju imaju u ekosistemu ili kao potencijalno patogenog organizma. Takođe, fenotipske manifestacije su povezane i sa faktorima spoljašnje sredine, koje predstavljaju fenotipsku adaptaciju na brojne faktore životne sredine. Molekularnim tehnikama se poslednjih 15 - 20 godina značajno unapredilo znanje o raznovrsnosti sojeva *P. aeruginosa*, kao i o interakciji između genotipa i fenotipa (Speert, 2002).

Upravo je sposobnost formiranja biofilmova, opisana u sekciji 2.2, jedna od najbolje proučenih fenotipski karakteristika *P. aeruginosa*.

2.1.1. Genom *P. aeruginosa*

P. aeruginosa poseduje jedan cirkularni hromozom koji je smešten u citoplazmi ćelije, kao i više plazmida značajnih za patogena svojstva ove bakterije. Genom *P. aeruginosa* je veličine 5,2 do 7,1 Mbp (Schmidt i sar., 1996), u kome je ukupna zastupljenost guanina i citozina oko 65%. Prvi potpuno sekvenciran genom, u okviru projekta *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project (PseudoCAP), potiče iz laboratorijskog referentnog izolata PAO1, koji je inicijalno izolovan iz rane pacijenta u Australiji. Veličine je 6,264,403 baznih parova (bp) i poseduje čak 5,570 predviđenih otvorenih okvira čitanja (Open Reading Frames-ORFs), što ga po kompleksnosti približava

jednostavnijim eukariotima poput kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Detaljne informacije o projektu i anotaciji genoma dostupne su na internet stranici The Pseudomonas Genome Database (<http://www.pseudomonas.com>) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984043>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26578582>).

Takođe je sekvenciran kompletan genom kliničkog, ExoU-pozitivnog izolata PA14 (https://pga.mgh.harvard.edu/Parabiosys/projects/host-pathogen_interactions/sequencing.php), čija je veličina procenjena na 6,54 Mb. Smatra se da se preko 92 % genoma izolata PA14 nalazi u izolatu PAO1, dok je preko 96 % PAO1 DNK pronađeno u DNK izolata PA14. Kasnije su usledili projekti sekvenciranja i drugih *P. aeruginosa* izolata, poput LES (Winstanley i sar., 2008) (6.601.757 bp, G+C sastav 66,3 %) (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/pseudomonas.html>), PA7 (Roy i sar., 2010) (6.588.339 bp, ~95 % identičnosti sa DNK drugih izolata), PA45 (6.615.955 bp, G+C sastav 66,3 % i 6.822 gena) (Segata i sar., 2013), FRD1 (Silo-Suh i sar., 2015), izolata ST-1146 (Jeukens i sar., 2014) i drugih (Boylea i sar., 2012).

Genom *P. aeruginosa* se često opisuje kao mozaični, sa visokokonzerviranim jezgrom, koje je isprekidno sa više desetina DNK segmenata veličine od nekoliko stotina nukleotida, do 200 Kbp (tzv. aksesorni genom). Dok je u jezgri ustanovljena interklonalna divergencija nukleotida oko 0,5 % - 0,7 %, aksesorni genom odlikuju visoko varijabilne sekvence (Specner, 2003; Klocgether i sar., 2011; Sanchez i sar., 2014), koje vode poreklo iz genoma drugih vrsta i rodova, a insertovane su pomoću horizontalnog transfera gena (Sanchez i sar., 2014). Postoje navodi da aksesorni genom čini od 6,9 - 18,0 % čitavog *P. aeruginosa* genoma (Ozer i sar., 2014). Dodavanje novih DNK, mobilizacija profaga, delecije i mutacije nukleotida, kao i inverzije hromozoma usled homologne rekombinacije, deluju na jezgro genoma kontinualno ga menjajući, što dalje dovodi i do promena u fenotipu čineći razlike među sojevima *P. aeruginosa*. U jednoj studiji je pokazano da je više od 80 % genoma soja PAO1 istovetno sa kliničkim i izolatima poreklom iz životne sredine (Spencer i sar., 2003). Ipak, genetske i genomske analize *P. aeruginosa* su uglavnom bile usmerene ka kliničkim izolatima pacijenata sa cističnom fibrozom pluća, dok se mnogo manja pažnja posvećivala izolatima iz životne

sredine, zbog čega je manje od 10 % genomskih sekvenci deponovanih u Nacionalnom Centru za Biotehnoške Informacije (NCBI) poreklom iz životne sredine (Sanchez i sar., 2014).

Veliki broj molekularnih genetičkih metoda se koristi za tipizaciju izolata *P. aeruginosa* (Grundmann i sar., 1995). MLST (Multilocus Sequence Typing) je molekularna tehnika koja se koristi za karakterizaciju izolata bakterijskih vrsta, dakle omogućava razlikovanje sojeva iste vrste. Zasnovana je na analizi DNK fragmenata više kontinuirano aktivnih, konzerviranih gena (tzv. housekeeping gena koji su neophodni za obavljanje osnovnih životnih procesa). Dužina fragmenata za analizu od 450-500 bp je najčešće optimalna za precizno sekvenciranje pomoću svega jednog para prajmera i dovoljno informativna za identifikaciju različitih alela u populaciji. 2004. godine je razvijen MLST sistem za *P. aeruginosa* (Curran i sar., 2004). Smatra se univerzalnom, nedvosmislenom i reproducibilnom tehnikom za karakterizaciju *P. aeruginosa* izolata i proučavanje njihovog diverziteta, a koristi se i za epidemiološka istraživanja i moguću detekciju puteva prenošenja ove bakterije. Tehnika takođe omogućava upoređivanje izolata korišćenih u različitim istraživanjima. Uobičajena je upotreba nukleotidnih sekvenci sedam housekeeping gena u okviru MLST analize: *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* i *trpE* (Tabela 1). Kriterijumi koji su uticali na izbor lokusa uključuju veliki broj faktora kao što su: biološka uloga (na primer, različite uloge u osnovnim ćelijskim funkcijama kao što je replikacija DNK i biosinteza aminokiselina), veličina (>600 bp), lokacija (na primer, da je najmanje 6 kbp udaljen od poznatih faktora virulencije, insercija lizogenih faga ili drugih elemenata), različitost sekvenci (idealna sekvenca bi bila ona koja sadrži očuvane domene koji polaze od varijabilnog srednjeg dela). (Curran i sar., 2004). Osim informacije o razlikama među izolatima *P. aeruginosa*, pokazano je da je MLST analiza dovoljno informativna za analizu filogenetskih odnosa među izolatima (Curran i sar., 2004, Khan i sar., 2008) i izučavanje mikroevolucije na bazi različitih faktora, kao što je mesto uzorkovanja izolata.

Tabela 1. Sedam gena koji se koriste za tipizaciju *Pseudomonas aeruginosa* u okviru MLST sheme

lokus	Pretpostavljena funkcija gena	Pozicija u PAO1 genomu (bp)
<i>acsA</i>	Acetil koenzim A sintetaza	969670
<i>aroE</i>	Šikimat dehidrogenaza	26711
<i>guaA</i>	GMP sitaza	4227237
<i>mutL</i>	Protein reparacije nesparenih nukleotida (<i>mismatch repair</i>)	5551681
<i>nuoD</i>	NADH dehidrogenaza 1, lanac C, D	2983963
<i>ppsA</i>	Fosfoenolpiruvat sintaza	1914037
<i>trpE</i>	Antranilat sintaza, komponenta I	670980

Nukleotidne sekvence na svakom genskom lokusu, koje se razlikuju u bilo kom obimu (u jednom ili mnogo nukleotida) se označavaju brojevima koji predstavljaju različite alele, te se svaki izolat nedvosmisleno može predstaviti skupom od sedam brojeva/alela koji definiše alelni profil ili tip sekvenci (Sequence Type - ST). Na ovaj način se za svaki analizirani gen dobija veliki broj postojećih alela u okviru vrste, te izuzetno puno različitih alelnih profila. Na primer, u MLST šemi baziranoj na 7 gena, 30 detektovanih alela po lokusu rezultira u 20 milijardi različitih genotipova. (<http://pubmlst.org/general.shtml>). Dobijeni alelni profili se potom sa relativnom lakoćom mogu porediti sa onima koji već postoje u centralnim bazama podataka.

2.2. BIOFILMOVI *P. AERUGINOSA*

Sposobnost formiranja biofilмова je jedna od glavnih kompetitivnih prednosti *P. aeruginosa* u preživljavanju različitih uslova spoljašnje sredine, otpornosti na delovanje različitih antimikrobnih agenasa (Goldberg, 2002) i virulencije.

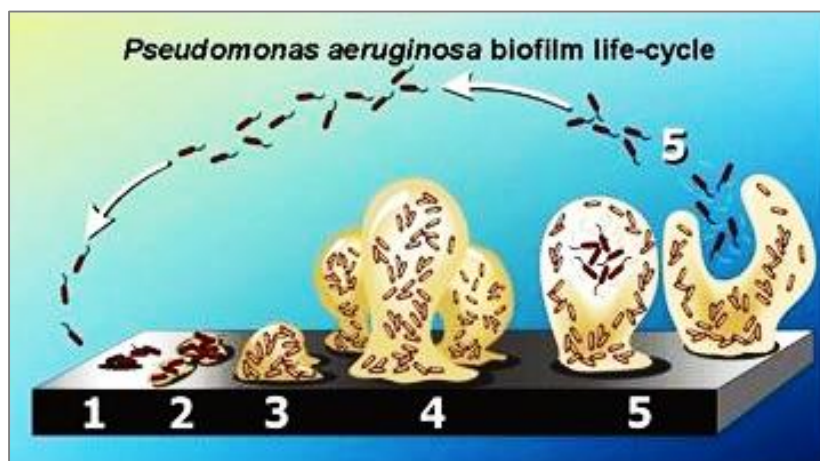
Bakterije se javljaju u dva populaciona oblika: planktonski, živeći suspendovano u rastvoru, ili sesilni, pričvršćeni na površini ili unutar zajednice biofilma. Smatra se da većina poznatih bakterija u prirodi živi u organizovanim zajednicama, tj. da se na jednu detektovanu planktonsku bakteriju mogu naći 1.000 jedinki unutar biofilma (Momba i sar., 2000). Biofilmovi su otkriveni 1674. godine kada je Antonie van Leuwenhoek opisao zajednice „*animalcules*“ koje je sakupio sa površine zuba (Costerton, 1999).

Mikroorganizmi imaju prirodnu sklonost da se pričvrste za vlažne površine, multiplikuju i grade glikokaliks (pretežno od mikrobnih egzopolisaharida (EPSS) uz dodatak proteina, nukleinskih kiselina, lipida, jona i ćelijskih ostataka) formirajući biofilme (Coenye i Nelis, 2010; Oraz i sar., 2006). Glikokaliks je od velike važnosti za bakterije i pruža im zaštitu od spoljašnjih uticaja, kao što su isušivanje i antimikrobni agensi, ali može poslužiti i kao rezervoar nutrijenata (Alison, 1993.).

Biofilmovi predstavljaju dobro organizovane zajednice mikroorganizama. U prirodi se javljaju kao monospecijski izgrađeni iz jedne bakterijske vrste, ili kao zajednice velikog bakterijskog diverziteta, kada su izgrađeni iz većeg broja različitih vrsta. Sposobnost formiranja biofilмова je jedna od karakteristika kojom se pravi distinkcija među sojevima *P. aeruginosa*. Mnogi autori su pokazali da većina izolata ima ovu sposobnost (97 %), kao i da je najveći broj (oko 40 %) visoko biofilm-produkujućih sojeva (Vasiljević i sar., 2014).

Postoje različite teorije o formiranju biofilмова. Prema jednoj teoriji (Rasamiravaka i sar., 2015) biofilmovi se formiraju u pet odvojenih faza (Slika 1):

1. formiranje inicijalnog sloja - reverzibilna adhezija bakterija na površinu;
2. adhezija ili ireverzibilno vezivanje bakterija uz stvaranje mikrokolonija uronjenih u egzopolisaharidnu supstancu (EPS);
3. maturacija, tj. rast i širenje bakterijske mikrokolonije;
4. maturacija do zauzimanja celog raspoloživog prostora;
5. disperzija, odvajanje bakterija i povratak na planktonski način života.



Slika 1. Faze formiranja biofilмова

Proces formiranja biofilmova se može objasniti fizičko-hemijskim i biohemijskim principima, pri čemu na početku procesa dominiraju fizički i hemijski činioci, dok kasnije dominiraju biološki. Inicijalno, bakterije se transportuju ka površini delovanjem fizičkih sila ili kretanjem pomoću flagela, što zavisi od dostupne energije, svojstava površine, bakterijske orijentacije, temperature, pritiska, lokalnih promena u životnoj sredini i drugih faktora. Zbog niske energije aktivacije za desorpciju bakterija, ne dolazi do jačanja spojeva među bakterijama. Garrett i sar. (2008) su objedinili i opisali fizičke sile angažovane u ovom procesu (van der Waalove, prostorne-sterne i elektrostatičke interakcije), kao DVLO (Derjanguin, Verwey, Landau i Overbeek) sile, kojima je kretanje bakterija objašnjeno kao rezultat interakcije između ćelije i površine i ravnoteže između van der Waalovih sila privlačenja i odbijanja (zbog negativnog naelektrisanja ćelija). Do ireverzibilnog vezivanja dolazi kada fizički nastavci bakterija (flagele, pili ili fimbrije) savladaju fizičke sile odbijanja, a izraštaji se povežu sa mrežom osnovnog sloja supstrata i hemijskim reakcijama oksidacije i hidratacije učvršćuju vezu bakterija i površine. Neki rezultati pokazuju da mikrobna adhezija zavisi i od hidrofилnih/hidrofobnih osobina površine (Liu, 2004).

Dalji razvoj biofilma zavisi od deoba ćelija. Nakon deobe, ćerka ćelija se širi iznad i izvan mesta vezivanja formirajući klaster. Sve interakcije i rast unutar biofilma dešavaju se u formi pečurkaste strukture (Slika 1). Smatra se da je ovaj oblik najpogodniji da obezbedi protok nutrijenata u biofilmu. Rapidno povećanje populacije se odigrava tokom eksponencijalne faze rasta i zavisi od okruženja. Ukoliko su uslovi povoljni, biološki procesi nadvladavaju hemijske i fizičke, dolazi do ekskrecije polisaharida intercelularne adhezije (PIA) i uz prisustvo dvovalentnih katjona formiraju se jače veze među ćelijama. U ovoj fazi su opisane promene koje se odnose na različit bakterijski oblik (prelaz planktonskog u stacionoarni oblik). Dolazi do promene ekspresije gena u korist adhezivnih potreba populacije: produkcija površinskih nastavaka je inhibirana, dok je ekspresija mnogih gena za produkciju proteina ćelijske površine i produkata ekskrecije povećana. Površinski proteini kao što su OprC i OprE omogućavaju transport ekstracelularnih produkata u ćeliju, a produkata ekskrecije iz ćelije. Struktura bakterijskih polisaharida mnogih Gram-negativnih bakterija je prosta, izgrađena iz homopolisaharida ili heteropolisaharida. Ovi molekuli obezbeđuju mehaničku stabilnost i ključni su za

adheziju i koheziju biofilma, kao i zaštitu od dinamičkih uslova spoljašnje sredine. Oni održavaju strukturu biofilma. Hall-Stoodley i Stoodley (2002) su identifikovali razliku u ekspresiji gena planktonskih i sesilnih ćelija, kao i 57 biofilm-povezanih proteina koji nisu nađeni u profilu planktonskih ćelija.

U stacionarnoj fazi rasta, pri visokoj ćelijskoj koncentraciji, javlja se serija signalnih mehanizama u biofilmu i oni su kolektivno označeni kao quorum sensing (QS). QS opisuje proces u kome se brojni autoinduceri koriste da stimulišu ekspresiju gena mehaničkih i enzimskih procesora alginata, koji čine glavni deo ekstracelularnog matriksa.

U fazi odumiranja dolazi do raspadanja biofilma i enzimi koje zajednica proizvodi razlažu polisaharide koji su držali biofilm zajedno. *P. aeruginosa* proizvodi alginat liazu koja razlaže matriks biofilma. Paralelno, operoni koji kodiraju proteine flagela su dodatno regulisani, tako da bakterije ponovo dobijaju mehanizam za kretanje, a geni koji kodiraju stvaranje pora su deregulišući i na taj način je kompletiran genetički ciklus adhezije i kohezije u biofilmu.

Kod *P. aeruginosa*, pričvršćivanje bakterija je omogućeno ekstracelularnim izraštajima, fimbrijama, pilima, flagelama i ekstracelularnim polisaharidnim matriksom koji omogućava formiranje mostova između bakterija i formiranje filma. Nakon intracelularne signalizacije, dolazi do transkribovanja drugog seta gena u odnosu na planktonske ćelije pa se u zajednici biofilma osobine ćelija menjaju u odnosu na suspendovan rast: smanjuje se rast, postoji vertikalna genska regulacija i produkcija ekstracelularnog matriksa.

Tokom sledećeg stepena rasta biofilma, maturacije, biofilmovi dobijaju karakterističnu arhitekturu. Produkcijom ekstracelularnih polisaharida alginata i surfaktanta ramnolipida, obezbeđuje se održavanje arhitekture i određenog stepena fizičke rezistencije. Tokom procesa sazrevanja, dolazi do stvaranja kanala u biofilmu koji obezbeđuju protok nutrijenata i odliv otpadnih materija, a takođe služe za transport kiseonika i različitih signalnih molekula. Organizacija biofilmova može da bude u jednom sloju, ili u vidu složene trodimenzionalne strukture. (Kokare i sar., 2009).

2.2.1. Građa biofilmova i regulacija procesa formiranja biofilmova

U osnovi biofilmova su egzopolisaharidne supstance (EPS) koje se razlikuju po svojim hemijskim i fizičkim osobinama, ali su primarno izgrađene iz biomelukula egzopolisaharida, ekstracelularne DNK (eDNK) i polipeptida (Rasamiravaka i sar., 2015). EPS je negativno naelektrisan, želatinozne strukture i hidriran, zbog čega se lako prilagođava i menja svoju strukturu pod delovanjem različitih uslova sredine (Garvey et al., 2015). Neki polisaharidi su neutralni ili polianjonski, što im omogućava vezivanje sa dvovalentnim katjonima (Ca^{2+} , Mg^{2+}) koji se smatraju vezom sa polimernim lancima i obezbeđuju veću stabilnost i čvrstinu rastućeg biofilma.

Količina EPS-a koji se stvara zavisi od mikroorganizama, a takođe zavisi od starosti biofilma (tokom sazrevanja količina se povećava). EPS se može vezivati sa jonima metala, dvovalentnim katjonima i makromolekulima, kao što su proteini, DNK, lipidi i huminske materije. Produkcija EPS-a zavisi i od nutritivnog statusa medijuma u kome bakterije rastu: veća količina ugljenika, kao i ograničavajuća koncentracija azota, kalijuma i fosfata potpomažu sintezu EPS-a. EPS igra važnu ulogu u strukturi i funkciji različitih zajednica biofilmova, uz potencijalnu fizičku zaštitu od prodora različitih antimikrobnih agenasa u biofilm. EPS je takođe odgovoran za zaštitu bakterija od različitih uticaja sredine, kao što su promene pH, UV zračenje, promene osmotskog pritiska, isušivanje, toksično delovanje jona metala, katjona i drugih toksina. U mikroskopskom svetu, biofilmovi se mogu označiti kao “gradovi mikroba” sa EPS-om koji čini oko 85 % ukupne mase biomase.

P. aeruginosa proizvodi najmanje tri polisaharida (alginat, Pel i Psl) koji su odgovorni za stabilnost biofilma. Razlika u mukoidnim i nemukoidnim sojevima *P. aeruginosa* je bazirana na različitom kvantitativnom sastavu ovih polisaharida, jer je dokazano da skoro svi sojevi *P. aeruginosa* imaju genetički mehanizam za sintezu alginata, glavne nežive komponente biofilmova (Kobayashi, 2005; Vallet i sar., 2004). Alginat je lančani negranati polimer D-manuronske i L-guluronske kiseline i doprinosi stabilnosti biofilma kao i zadržavanju vlage i nutrijenata. Pel je polisaharid izgrađen uglavnom iz glukoze, nedovoljno razjašnjene uloge, dok se smatra da Psl čini primarni skelet biofilma i uključen je u prvoj fazi formiranja biofilmova.

Ekstracelularni DNK (eDNK) predstavlja značajnu funkcionalnu komponentu EPS-a. *P. aeruginosa* oslobađa eDNK koji je neophodan za inicijalno formiranje biofilma i utiče na povećanje viskoziteta (Vallet i sar., 2004). Pre svega, biofilm *P. aeruginosa* ima zaštitnu ulogu zahvaljujući sadržaju DNaze I i dokazano je da su biofilmovi deficitarni u molekulima eDNK osetljiviji prema delovanju deterdženata (natrijum-dodecil sulfata). Ekstracelularni DNK (eDNK) ima ulogu u ranoj fazi formiranja biofilma kao komponenta međucelijske komunikacije, konstituše izvore nutrijenata za bakterije tokom perioda u kojima se nutrijenti prisutni u manjoj meri od potrebne.

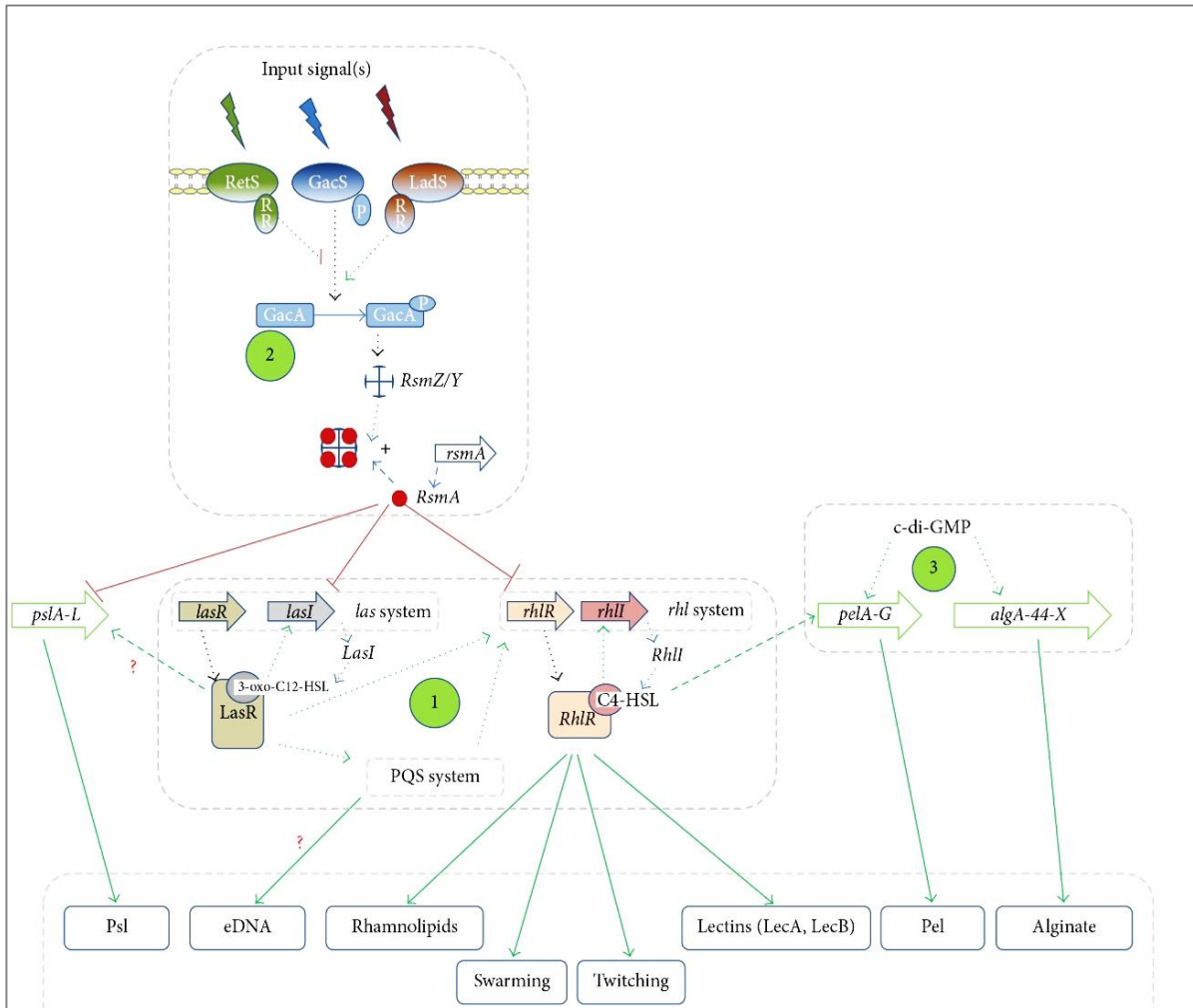
Osim uloge u pokretanju, ekstracelularni izraštaji bakterije, flagele, tip IV fimbrije i tzv. cup fimbrije, takođe imaju ulogu u formiranju matriksa i igraju važnu ulogu u adheziji i međucelijskoj komunikaciji (ireverzibilnom pričvršćivanju) i stvaranju mikrokolonija u biofilmovima (Rasamiravaka, 2014).

Složen sistem regulacije formiranja biofilma podrazumeva složenu bakterijsku mašineriju uključujući QS sistem i dvokomponentni regulatorni sistem, koji su uglavnom usmereni na produkciju EPS-a (Kievit, 2009) (Slika 2).

QS mehanizam u formiranju biofilma

QS je međucelijska komunikacija koja se javlja među mnogim bakterijama da bi se detektovala gustina populacije produkovanjem difuzibilnih signalnih molekula koji koordinišu produkciju faktora virulencije, pokretljivost i formiranje biofilma (Parsek i Greenberg, 2005, Jimenez i sar., 2012).

P. aeruginosa ima dva glavna QS sistema (las i rhl) koji regulišu produkciju (sintezom LasI i RhII) i percepciju (transkripcionim faktorima LasR i RhIR) autoindukovanih signalnih molekula N-(3-oxododekanoil) L-homoserin laktona (3-oxo-C12-HSL) i N-butanoil L-homoserin laktone (C4-HSL) tj. N-Acyl-homoserin laktone (AHL) (Jimenez i sar., 2013) (Slika 2). Treći QS sistem, zasnovan na kvinolon signalima (PQS sistem), je povezan sa acilhomoserin laktone (AHLs) (Jimenez i sar., 2012).



Slika 2. Regulacija procesa formiranja biofilмова (Rasamiravaka i sar., 2015)

Davies i sar., 1998 su opisali ulogu *las* sistema za formiranje i sazrevanje biofilma, upoređujući divlji soj, sa mutiranim sojem. Kod promenjenog soja, biofilmovi postaju ravni, nerazvijeni i brzo nestaju sa površine nakon tretmana natrijum-dodecil sulfatom. Međutim, tačna uloga *las* sistema u formiranju biofilma je i dalje nejasna. Gilbert i sar., su 2009. godine pronašli da QS regulator LasR može da se veže za promotorni region *psl* operona, sugerišući da bi *las* mogla imati ulogu u regulisanju *psl* ekspresije.

Jedan od dva pomenuta QS Sistema, *rhl* sistem je opisan kao uticajan na formiranje *P. aeruginosa* biofilma (Sakuragi i Kolter, 2007) poboljšavajući biosintezu Pel polisaharida.

PQS sistem je povezan sa otpuštanjem eDNK tokom razvoja biofilmova; biofilmovi koji su formirani od *pqsA* mutanta sadrže manje eDNK nego divlji tipovi (Yang i sar., 2007; Allesen-Holm i sar., 2006).

Sve ovo ukazuje da su sva tri QS sistema poznata i igraju ulogu u procesu formiranja biofilmova *P. aeruginosa*.

Značajna je i indirektan veza između formiranja biofilmova i QS, kroz kontrolu kretanja tipa „rojenja“ i „grčenja“, kao i produkcije ramnolipida i lektina.

Regulacija formiranja biofilmova sa GacS/GacA i RetS/LadS dvokomponentnim sistemima

GacS/GacA sistem je jedan od ukupno 60 dvokomponentnih sistema do sad nađenih u genomu *P. aeruginosa* (Rodrigue, 2000) i koji je označen kao super-regulator QS sistema i uključen je u produkciju nekoliko faktora virulencije, kao i formiranje biofilmova (Parkins, 2001).

Uloga ovog sistema je u regulaciji ekspresije malih regulatornih RNK, koji posttranskripciono regulišu *psl* lokus (*pslA-L*). Naime, *Gac* sistem sadrži transmembransku senzor kinazu (GacS) koja fosforiliše regulator (GacA) koji za uzvrat pozitivno reguliše ekspresiju malih regulatornih RNK (*RsmZ* i *RsmY*) (Slika 2). Ovi mali regulatorni RNK molekuli (*RsmZ* i *RsmY*) hvataju mali RNK-vezujući regulatorni protein *RsmA* koji posttranskripciono reguliše *psl* lokus (*pslA-L*) (Brencic, 2009; Brenic, 2009, Irie, 2010).

Pokazano je da *RetS* i *LadS* interaguju sa *GacS/GacA* sistemom modulacijom fosforilisanog stanja *GacS*, koji posledično inhibiraju i unapređuju fosforilaciju *GacA* (Goodman, 2009, Records, 2010). Interesantno je da je predloženo da *GacS/GacA* i *RetS/LadS* sistemi budu uključeni u posredovanje u prelazu fenotipa iz akutnog do hronične faze infekcije. Hibridni senzor histidin kinaza *RetS* je poznat po sprečavanju formiranja biofilma (Goodman, 2004) kada histidin kinaza deluje antagonistički na efekat

RetS (Ventre, 2006). Zaista, RetS mutanti formiraju strukturiraniji biofilm nego tip *P. aeruginosa* PAO1 (Goodman, 2004).

C-di-GMP zavisna biosinteza polisaharida i formiranje biofilmova

Produkcija polisaharida zavisi od intracelularnog zajedničkog delovanja bis-(3'-5')-cikličnog dimera guanozin monofosfata (c-di-GMP) (Hickman, 2005; Merighi, 2007). U bakterijskim ćelijama, c-di-GMP nastaje iz dva molekula guanozin trifosfata, diguanilat ciklazom i raspada se na 2-GMP molekula dejstvom specifičnih fosfodiesteraza (Hengge, 2009) (Slika 2).

Visoke koncentracije c-di-GMP unapređuju biosintezu polisaharida (alginata i Pel), a proces vezivanja c-di-GMP do PelD i Alg44 je zaslužan za Pel i alginat polimer formaciju (Merighi, 2007, Hengge, 2009). Međutim, molekularni mehanizam kojim se reguliše ova interakcija polimerizacije prekursora šećera nije poznata. Nizak nivo c-di-GMP povećava bakterijsku pokretljivost i bakterijku dispregiju (Merighi, 2007).

2.2.1.1. Pokretljivost

P. aeruginosa poseduje dva tipa ćelijskih struktura koje joj omogućavaju kretanje: jednu polarnu flagelu kojom se kreće kroz akvatičnu sredinu i polarne pile tipa IV (tfp) koji omogućavaju kretanje kroz čvrstu sredinu. Osim kretanja koja su moguća upotrebom struktura za kretanje, *P. aeruginosa* je sposobna i za kretanje kroz polučvrstu sredinu tzv. „rojenje“. Ono predstavlja organizovano kretanje po površini zavisno (ili nezavisno) od posedovanja flagela ili drugih struktura za kretanje i međućelijske komunikacije (Fraser i Hughes, 1999; Harshey, 1994) regulisano rhl sistemom (Daniels i sar., 2004) i odgovorno za prve faze stvaranja biofilmova. Kretanje „rojenjem“ se javlja kada su izvori azota limitirani, tj. kada se aminokiseline koriste kao jedini izvor azota, i uglavnom se ne vidi kada je medijum bogat azotom. (Morris i sar., 2011). Jedan od regulatora „rojenja“ je dvokomponentni sistem *GacS/GacA*. Mutacijom *GacA* dolazi do povećanja „rojenja“ kod *P. aeruginosa*, dok mutacija ovih regulatora kod *P. fluorescens* dovodi do hiperpokretljivosti i kompetitivne prednosti u odnosu na divlji tip pri kolonizaciji korena.

Na primer, sojevi kojima nedostaje *GacA*, odgovoran za produkciju egzopolisaharida i formiranje biofilmova, pokazuju povećano "rojenje", dok *P. aeruginosa* sa povećanom produkcijom egzopolisaharida (EPS) pokazuje slabiju pokretljivost.

Smatra se da je ovaj tip kretanja regulisan setom preklapajućih regulatornih mehanizama, odnosno, ovaj tip kretanja predstavlja i mehanizam prilagođavanja bakterije i posledica je uslova sredine. Različiti eksperimenti su dokazali da je produkcija HAAs i/ili ramnolipida glavni faktor regulacije pojave "rojenja" kliničkih izolata (Murray i sar., 2010). Identifikacija regulatornih proteina koji utiču na kretanje "rojenjem" kao reakcije na uslove sredine ostaje i dalje predmet istraživanja.

„Trzajuće kretanje“ je kretanje koje ne zavisi od flagela i javlja se kao sukcesivno istežanje polarnih pila tipa IV (Mattick, 2002). Poznato je da je regulisano *rhl* sistemom i da je ovaj tip kretanja neophodan za stvaranje jednog sloja bakterija u okviru mikrokolonija (O'Toole i Kolter, 1998).

Murray i sar., 2010 su pokazali da je i za kretanje „rojenjem“ i „trzajuće kretanje“ neophodno postojanje funkcionalnih flagela, odnosno da su opisani načini kretanja međusobno povezani.

Veliki broj publikacija obrađuje uticaj ramnolipida na pokretljivost (Caiazza i sar., 2005; Deziel i sar., 2003; Kohler i sar., 2000; Nozawa i sar., 2007; ShROUT i sar., 2006), a takođe ukazuje na značaj rojenja za formiranje biofilmova i rezistentnost na antibiotike (Caiazza i sar., 2007; Merritt i sar., 2007; Overhage i sar., 2008; ShROUT i sar., 2006).

Morris i sar. (2011) su pokazali da najbolja pokretljivost uz formiranje tendrila zavisi od produkcije biosurfaktanta ramnolipida, dok su Tremblay i Deziel, (2008) dokazali da je za ovaj tip kretanja, osim flagela, potrebna produkcija i dva biosurfaktanta - ramnolipida i 3-hidroksialkanoinske kiseline. Pošto je produkcija ramnolipida uključena i u druge aspekte razvoja biofilmova, smatra se da su ove osobine ćelija povezane, tj. smatra se da postoji jasna veza između "rojenja" i formiranja biofilmova. Međutim u radu Vu i sar., 2009 je pokazano da se u slučaju *P. aeruginosa*, tokom "rojenja" sekretuju mono- i di-ramnolipidi, zajedno sa njihovim prekursorom 3-(3-hidroksialnoiloksi) alkanoične

kiseline (HAA). HAA i ramnolipidi se sintetišu delovanjem tri enzima (RhlA, RhlB, i RhlC) koja su pod kontrolom quorum sensing regulatora *RhlR*. Iako je HAA odgovorna za "rojenje" *P. aeruginosa* pod različitim uslovima, nova istraživanja ukazuju da *rhlAB* mutanti, koji ne mogu sintetisati HAA, i dalje imaju sposobnost "rojenja" na podlogama koje sadrže sukcinat ili glutamat.

Sposobnost kretanja *P. aeruginosa* je u tesnoj vezi sa sposobnošću formiranja biofilmova. Smatra se da flagele obezbeđuju formiranje masivnog biofilma i da su odgovorne za stalnu kolonizaciju, dok pili tipa IV omogućavaju pričvršćivanje za epitelijalne ćelije, doprinose formiranju biofilmova i odgovorni su za potpunu virulenciju (Murray i sar., 2010). Sojevi bakterija koji rastu u uslovima koji doprinose „rojenju“ (medijum sa glutatom ili sukcinatom kao izvorom ugljenika) formiraju ravne i uniformne biofilme, dok sojevi koji nemaju mogućnost „rojenja“ formiraju biofilme u kojima su ćelijske zajednice slabije povezane među sobom (Shrout i sar., 2006).

Osim *P. aeruginosa*, i mnoge druge bakterije pokazuju osobinu pokretljivosti, uključujući neke široko rasprostranjene u vodi i zemljištu: *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae* i *Proteus mirabilis*, a kod *Proteus mirabilis*, *S. enterica* serovar Typhimurium i vrste roda *Serratia* (Belas i sar., 2005; Butler i sar., 2010; Williamson i sar., 2008) je takođe nađena veza između pokretljivosti, rezistentnosti na antibiotike, virulencije i potencijala formiranja biofilmova.

Sa medicinskog aspekta, pokretljivost *P. aeruginosa* je ispitivana zbog potencijalne virulencije i patogenosti ove bakterije povezane sa infekcijom, pričvršćivanjem i kolonizacijom tkiva, kao i sekrecijom enzima i toksina koji omogućavaju *P. aeruginosa* da prelaze preko barijera tkiva i onesposobljavaju odbrane imunog sistema. Naime, flagele i pili tipa IV su površinske organele koje omogućavaju virulentnost kod akutnih i hroničnih infekcija ovom bakterijom. Bakterijama kojima su odstranjene flagele pokazuju slabiju inflamaciju i manji mortalitet u slučajevima akutne pneumonije, zbog čega se zaključilo da flagele imaju receptornu ulogu i sposobnost okidača u početku zapaljenskog procesa, kao i da njihov gubitak ne znači samo gubitak pokretljivosti. (Murray i sar., 2010).

2.2.1.2. Produkcija ramnolipida

Ramnolipidi po hemijskoj strukturi predstavljaju glikolipide izgrađene iz L-ramnoze i 3-hidoksilalkanoične kiseline. Prvi put su identifikovani sredinom XX veka u kulturama *P. aeruginosa*, a šesdesetih godina XX veka je bila otkrivena struktura molekula ramnolipida. Ramnolipidi se sastoje iz mono- i di-ramnoze vezane sa 3-hidroksi masnom kiselinom različite dužine, najčešće kao L-ramnosil-3-hidroksidekanoil-3-hidroksidekanoat (monoramnolipid) i L-ramnosil-L-ramnosil-3-hidroksidekanoil-3-hidroksidekanoat (diramnolipid). Sinteza ramnolipida započinje redukcijom keto jedinjenja katalizovanom NADPH- β -ketoacil reduktazom (RhlG) i odvija se preko prekursora ramnolipida 3-(3-hidroksialkanoiloksi) alkanoične kiseline (HAAs), aktivnošću aciltransferaze RhlA. U finalnoj reakciji, RhlB i RhlC ramnosiltransferaze dodaju dTDP-L-ramnozu na HAAs i nastaju mono i diramnolipidi.

Produkcija ramnolipida je vezana za stacionarnu fazu rasta, zavisi od dostupnog izvora ugljenika i pod kontrolom je *rhl* quorum-sensing (QS) mehanizma. Geni *rhlA* i *rhlB* indukovani N-butiril homoserin laktonom aktiviraju *RhlR*. *RhlC* geni su u operonu lokalizovanom u blizini gena koji kodira protein nepoznate funkcije koji je takođe regulisan *RhlR* sistemom. Aktivacija *rhl* sistema dovodi do povećanja populacije *P. aeruginosa* (Rasamiravaka i sar., 2015).

Ovaj glikolipidni surfaktant pokazuje citotoksičan efekat prema eukariotskim ćelijama, smanjuje površinski napon na površini, utiče na pokretljivost i pomaže u obezbeđivanju nutrijenata unutar biofilmova (Abdel-Mawgoud i sar., 2010., Boles i sar., 2005., Glick i sar., 2010., Kohler i sar., 2000., Ochsner i sar., 1994., Read i sar., 1992.). Sojevi koji su pokazivali najintenzivniju pokretljivost "rojenjem" su produkovali najviše ramnolipida (Morris i sar., 2011).

Ramnolipidi koje produkuje *P. aeruginosa* imaju veliki potencijal za aplikaciju u industriji i bioremedijaciji (Rashedi, 2006). Naime, ramnolipidi su amfipatički molekuli izgrađeni od hidrofobnog lipidnog i hidrofилnog ugljenohidratnog dela. Ovakva struktura omogućava ovim molekulima sa površinski-aktivnim svojstvima formiranje emulzija

koje izazivaju pseudosolubilizaciju nesolubilnih supstanci, što omogućava *P. aeruginosa* da koriste različite izvore ugljenika, kao što su alkani. Oni, takođe, povećavaju vezivanje sa mnogim supstratima menjajući i povećavajući hidrofobnu površinu ćelija. Ove karakteristike čine *P. aeruginosa* konkurentnom u bioremedijacionim procesima. Štaviše, dodavanje ramnolipida podstiče bioremedijativni proces u zemljištu kontaminiranim pirenom (koji nastaje nepotpunim sagorevanjem fosilnih goriva) i teškim metalima kao što su bakar i cink.

Ramnolipidi su nađeni i u sputumu pacijenata obolelih od cistične fibroze. Otkriveno je da ramnolipidi mogu da inaktiviraju cilije ćelija traheje sisara, ukazujući da imaju ulogu kao faktori virulencije. Proučavajući njihovu ulogu u patogenezi, nađeno je da ramnolipidi indukuju brzu ćelijsku lizu *Dictyostelium discoideum* i *Burkholderia pseudomallei* (Morris i sar., 2011).

2.2.1.3. Produkcija piocijanina

Piocijanin, derivat fenazina, je karakterističan plavo-zeleni pigment rastvorljiv u vodi, a privlači pažnju istraživača zbog sledećih svojstava: antibiotske, antifugalne i antiviralne aktivnosti, citotoksičnog efekta prema kancerogenim ćelijama i drugih. Hassani i sar. (2012) su objasnili biohemijski niz i genetsku osnovu sinteze ovog pigmenta, smatrajući ga značajnim i zbog njegove uloge u virulenciji *P. aeruginosa*. Piocijanin se proizvodi iz horizminske kiseline, fenazinskim putem, a prvi proizvod ovog puta je fenazin-1-karboksilna kiselina, koja se konvertuje u piocijanin u dva koraka što je katalizovano enzimima PhzM i PhzS. Dokazano je da je PhzM aktivan samo u slučajevima prisustva i PhzS, što implicira da je interakcija protein-protein uključena u formiranje piocijanina. Uloga fenazina je mnogostruka; smatra se da su fenazini povezani sa antitumornom aktivnošću, a naglašena je i uloga piocijanina izolovanog iz sojeva *P. aeruginosa* u bioterapiji kancera (Hassani i sar., 2012).

Sudhakar i sar. (2015) su ukazali da antimikrobno delovanje prema *E.coli*, *S. aureus*, *Proteus* sp., *Klebsiella* sp. zavisi od koncentracije pigmenta. Povećana koncentracija smanjuje aktivnost bakterija (Gram-pozitivne su osetljivije od Gram-negativnih), dok je *Pseudomonas*, koji ne proizvodi ovaj pigment, bio rezistentan, što ukazuje da je

rezistentnost na pigment karakteristika roda. Fakultativni anaerobi su bili značajno otporniji, dok su denitrifikacione bakterije bile osetljivije u toku anaerobne respiracije, nego aerobne.

Prvi otkriveni antibiotik je bio *pyocyanasa*, otkriven 1888. godine od strane E. De Freudenreich-a. To je bila smeša nekoliko antibakterijski aktivnih supstanci: piocijanina, 1-hidroksifenazina i jedne uljane frakcije. Ovaj prirodni antibiotik se koristio u tretmanu tifusa, difterije i kuge. Piocianaza se ne proizvodi komercijalno jer je nestabilna i toksična. Piocijanin i 1-hidroksifenazin imaju takođe i antifugalno delovanje, na primer prema *Candida albicans* i *Aspergillus fumigatus* (Kerr i sar., 1999).

2.2.2. Uticaj spoljašnje sredine na formiranje biofilmova

Različiti faktori životne sredine kao što su nivo kiseonika, pH, temperatura i osmotski pritisak utiču na formiranje biofilma. Takođe, istraživanja su pokazala da povećanje koncentracije jona metala i koncentracije antibiotika utiče na formiranje biofilmova (Vivas i sar., 2008).

- **Uticaj pH**

Poznato je da promena pH utiče na rast bakterija, što predstavlja osnovni princip delovanja velikog broja antibakterijskih sredstava. Regulisanje citoplazmatske pH se odvija preko protonske pumpe u membrani, koja izbacuje protone iz citoplazme da bi se generisao transmembranski elektrohemijski gradijent. Ovaj mehanizam omogućava bakteriji da u izvesnoj meri odgovori na promene internog ili eksternog pH, prilagođavajući aktivnost i sintezu proteina vezanih za različite procese u ćeliji. Međutim, velike varijacije pH u spoljašnjoj sredini mogu inaktivirati mehanizme regulacije i imati biocidni efekat na mikroorganizme. Studije su pokazale da postepeno povećanje kiselosti povećava šanse za preživljavanje ćelije u poređenju sa naglim povećanjem, dodavanjem HCl-a (Li, 2001), što je još jedna potvrda da bakterija ima mehanizme koji omogućavaju bakterijskoj populaciji da se prilagodi na male promene pH sredine.

Međutim, postoje procesi koji se ne prilagođavaju lako na promene pH, a jedan od njih je ekskrecija egzopolimernih supstanci (polisaharida), ključnih u procesu formiranja

biofilmova. Optimalni pH za produkciju polisaharida zavisi od vrste, ali je pH 7 optimalan za većinu bakterija (Oliveira i sar., 1994), što ukazuje da nizak pH ima negativni efekat na proces formiranja biofilmova.

- **Reološke i adhezivne osobine**

Po svojim fizičkim karakteristikama, biofilmovi su kao viskoelastični fluidi: pokazuju i ireverzibilnu viskoznu deformaciju i reverzibilnu elastičnu reakciju. Naime, ekstracelularne polimerne substance (alginat i ksantan) sa vodom formiraju visoko hidratantan viskoelastični gel, što daje mehaničku stabilnost biofilmu.

Takođe, matriks formiran od EPS-a je odgovoran za izlaganje elastičnom naponu, polimerne veze u matriksu u velikoj meri mogu da amortizuju napone koji dolaze spolja. Mnoge osobine se menjaju povećavanjem temperature. Povećavanjem temperature polisaharida produkuju se supstance nalik gelu koji postepeno povećava jačinu do kritične tačke, kada se gel pretvara u rastvor. Slično se ponaša viskozitet polisaharida koji može uticati na prijanjanje biofilma (Garret i sar., 2008).

- **Uticaj temperature**

Uticaj temperature na formiranje biofilma se ogleda u održavanju optimalnog nivoa metabolizma nutrijenata, a što je u direktnoj vezi i zavisi od prisustva enzima. Optimalna temperatura omogućava normalan rast bakterijske populacije, a suprotno, odstupanje od optimalne temperature dovodi do redukovanja efikasnosti rasta, kao posledice redukcije enzimskih reakcija. Temperatura okoline utiče na fizičke osobine i komponente unutar i oko ćelija. Smanjivanje temperature dovodi do smanjenih adhezivnih sposobnosti marinskih *Pseudomonada* (Garret i sar., 2008), što je verovatno posledica smanjenja efekta bakterijskih površinskih polimera na nižim temperaturama. Herald i Zottola (1988) su ukazali da i kvantitet bakterijskih površinskih izraštaja zavisi od temperature, odnosno broj flagela se menjao u zavisnosti od temperature: na 35°C bakterije su imale jednu flagelu, na 21°C dve do tri, dok su na 10°C imale nekoliko flagela. Ova istraživanja su ukazala da se inicijalna interakcija između bakterija i supstrata povećava snižavanjem temperature, povećavajući šansu za pričvršćivanjem. Pretpostavka je da i uniformnije osobine polisaharida pri nižim temperaturama povećavaju adheziju biofilma, jer se mnogi

polisaharidi menjaju i prelaze iz uređenog stanja na nižoj temperaturi i u prisustvu jona u neuređeno stanje na višim temperaturama i pri nižoj koncentraciji jona.

- **Ekspresija gena kao odgovor na uslove sredine**

U jednoj studiji je pokazano (Mulchayi i Lewenza, 2011) da se prilagođavanje bakterije na različite uslove sredine odvija modifikacijom ekspresije gena, a čest način prilagođavanja predstavlja korišćenje dvo-komponentnog sistema koji je uključen u formiranje biofilмова. Tipičan dvokomponentni senzor je izgrađen iz histidin kinaze u ćelijskoj membrani sa ulogom senzora i regulatora citoplazmatskog odgovora. Nakon prijema signala-promene uslova u spoljašnjoj sredini, dolazi do aktiviranja mehanizma odgovora u citoplazmi, što uslovljava aktivaciju ili represiju određenih grupa gena. Kod *P. aeruginosa* su poznati mnogi sezorni proteini (GacS, RetS, LadS, SadS i PhoQ), kao i senzori (BfiS, BfmS i MifS) koji kontrolišu rast biofilma u različitim fazama sazrevanja, iako su mnogi signali životne sredine koji dovode do njihovog aktiviranja nepoznati.

Pokazano je da uspešna ćelijska adaptacija unutar zajednice biofilмова zahteva koordinaciju aktivnosti mnogih gena u složenoj mreži regulatornih aktivnosti. Jedan od signala iz životne sredine koji utiče na ove mehanizme je dostupnost nutrijenata, iako se smatra se da je ceo kompleks biofilмова mnogo složeniji i uključuje integraciju mnogih različitih signala iz životne sredine.

RetS je odgovoran na transkripcionom i postranskripcionom nivou za ekspresiju Tip III sektreternog sistema važnog za virulenciju i za represiju gena *pel* i *psl* odgovornih za biosintezu EPS-a. Jedan od poznatih signala koji utiče na ovaj mehanizma je koncentracija Mg^{2+} . Ustanovljeno je da smanjena koncentracija Mg^{2+} može da bude signal za limitiranje transkripcije *RetS* kao i da utiče na promenu načina života bakterija sa planktonskog na agregiran u biofilmu. Istovremeno, utiče na aktivaciju drugog dvokomponentnog sistema *PhoPQ* koj dovodi do ekspresije gena za rezistenciju na antibiotike.

2.2.3. Značaj biofilmova

Bakterijske populacije u prirodi su dominantno prisutne u organizovanim zajednicama, (biofilm) koje im omogućuju preživljavanje ali i osvajanje novih ekoloških niša (Hall-Stoodley i sar., 2004).

Izučavanju biofilmova se u poslednje vreme poklanja značajnija pažnja u oblasti mikrobiologije hrane, vode, životne sredine kao i medicinske mikrobiologije. Prisustvo biofilmova u životnom okruženju čoveka, različitim sistemima za transport industrijske, površinske vode, vode za navodnjavanje, kao i medicinskoj opremi i pomagalicama, čine biofilmove aktuelnom temom u medicini, farmaciji ali i u kontekstu higijene hrane.

Prisustvo biofilma je relevantan faktor rizika u prehrambenoj industriji zbog moguće kontaminacije prehrambenih proizvoda patogenim mikroorganizmima ali i mikroorganizmima izazivačima kvarenja hrane. Prisustvo čvrstih površina na postrojenjima za preradu hrane, odgovarajuća vlaga, stalno prisustvo sirovine i izvora nutrijenata, pružaju dobre uslove za formiranje biofilma u prehrambenoj industriji. Ovo se odnosi i na formiranje biofilmova od strane vrsta roda *Pseudomonas* (Meliani i Bensoltane., 2015) u postrojenjima za preradu hrane, gde predstavljaju rezervoar mikroorganizama i služe kao potencijalni izvor kontaminacije sirovina i prerađevina u različitim fazama proizvodnje hrane. Osim toga, prisutnost biofilma može dovesti do kvarenja hrane, ekonomskih gubitaka, smanjenja roka trajanja proizvoda ili prenosa patogena (Stepanović i sar., 2003). Bakterije u biofilmu su uglavnom dobro zaštićene od spoljašnjih faktora stresa, kao što su ultraljubičasti zraci, dehidracija ili antimikrobni i dezinfekcioni agensi. Zbog toga ih je izuzetno teško otkriti i uništiti (Winkelströter i sar., 2014). Različita industrijska postrojenja imaju probleme sa rastom biofilmova, što dovodi do velikih troškova čišćenja i održavanja. Ovo uključuju različite grane industrije, kao što su prehrambena, vodoprivredna, industrija papira, optičkih sredstava, oblast stomatologije i medicine, a takođe su ljudi izloženi biofilmovima i u kućnom okruženju (Barker i Bloomfield, 2000; Scott i sar., 1982). Kvarenje proizvoda, smanjena efikasnost proizvodnje, korozija, neprijatni mirisi, infekcije, zapušavanje cevovoda i kvarenje opreme su neki od primera uzrokovanih štetnim biofilmom.

Sa druge strane, biofilmovi mogu biti korisni za prehrambenu industriju i mogu se koristiti u biotehnološkim procesima (Stier, 2005). Na primer, pomažu u proizvodnji fermentisane hrane i u tretmanu otpada a njihova primena može doprineti razvoju novih biotehnoloških procesa. Korist od formiranih biofilmova se takođe ogleda i na polju bioremedijacije u postupcima uklanjanja teških metala, radionuklida, organskih zagađivača (Garrett i sar., 2008) i drugim.

Povećana tolerancija biofilmova na antibiotike i dezinfekciju, kao i velika perzistentnost na različitim površinama usmerila su istraživanja u pravcu pronalaženja rešenja za njihovu kontrolu i uklanjanje kao i razvoj metoda za procenu efikasnosti ovih tretmana. Istraživanja su usmerena ka primeni novih tehnologija i materijala na primer na bazi biorazgradivih polimera kao što su poli- (laktid-ko-glikolid) i termoreverzibilnih hidrogelova (Tamilvanan i sar., 2008), ka korišćenju prirodnih antibiotika kao antibiofilm jedinjenja (Lewis i Ausubel, 2006) ali su i obnovljeni interesi u kontroli biofilma korišćenjem bakteriofaga (Knežević i Petrović, 2008; Donlan, 2009).

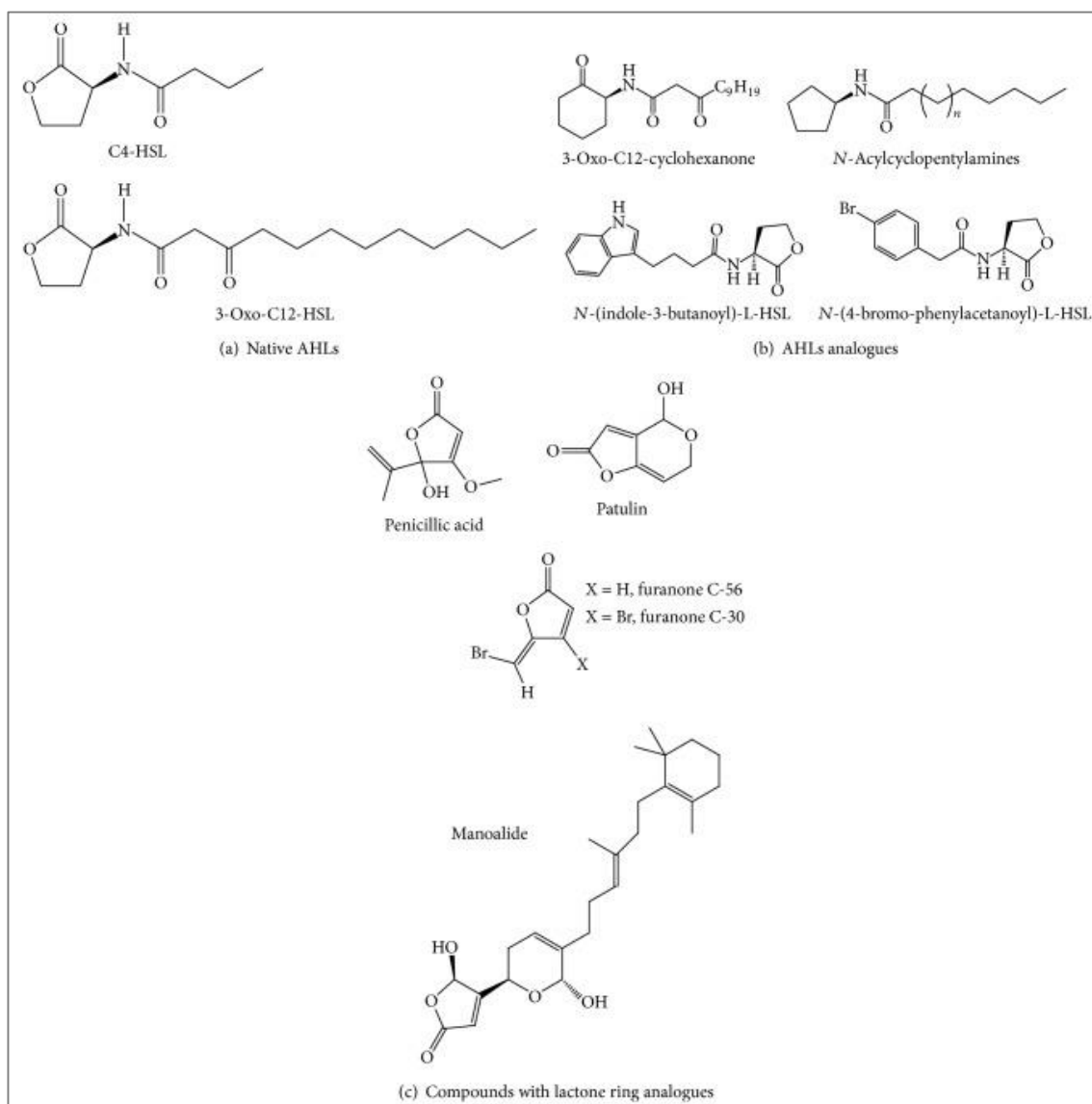
Opisani su različiti *in vitro* i *in vivo* modeli koji se bave kvantifikovanjem i kvalifikovanjem biofilmova (Coenye i Nelis, 2010).

2.2.4. Suzbijanje i uklanjanje biofilmova

Bakterijski biofilmovi pokazuju povećanu toleranciju na antibiotike i hemijsku dezinfekciju, kao i otpornost na fagocitozu i ostale komponente sistema odbrane organizma. Naučnici su otkrili 10 proteinskih pumpi na spoljašnjoj strani bakterijske membrane. Pretpostavlja se da se rezistentnost *P. aeruginosa* na deterdžente i antibiotike zasniva na radu ovih pumpi koji izbacuju ove supstance iz ćelije (Stover i sar., 2000).

Poseban problem u uklanjanju biofilmova *P. aeruginosa* predstavlja izražena rezistentnost na antibiotike ove bakterije. Ranije se smatralo da biofilmovi povećavaju rezistenciju na antibiotike primarno kao fizička barijera, sprečavajući ili značajno ugrožavajući prolazak antibiotika kroz heterogeni matriks od makromolekula u koje su uronjene ćelije. Eksperimenti kojima je ispitivana ova hipoteza su pokazali da mehanička razgradnja zrelog petodnevnog biofilma ima slab efekat na osetljivost *P. aeruginosa*

prema primenjenom aminoglikozidnom antibiotiku gentamicinu. Suprotno ovome, tretman biofilma starog više od 24h ili 5 dana alginat liazom (AlgL) je drastično smanjilo rezistenciju na gentamicin, što ukazuje da rezistencija na antibiotike nije vezana samo za fizičku barijeru, nego da i hemijske karakteristike biofilмова imaju uticaja na ovu osobinu. Prateći kinetiku delovanja *AlgL* pokazano je da, osim alginata i druge komponente, kao eDNK, utiču na rezistenciju *P. aeruginosa* na gentamicin (Aspe i sar., 2012). eDNK ima kompenzatornu ulogu u nedostatku alginata; sojevi *P. aeruginosa* koji proizvode manje alginata, povećavaju sekreciju eDNK. Takođe, eDNK ima regulatornu ulogu u indukciji gena za rezistentnost na antibiotike.



Slika 3 Struktura prirodnih i sintetičkih AHL jedinjenja inhibitora formiranja biofilma *P. aeruginosa* (Rasamiravaka, 2014)

Mulcahy i sar. (2010) su objasnili zaštitnu ulogu eDNK koja po njima utiče na smanjenje propustljivosti membrane za katjonske antimikrobne peptide, iako ovo nije ubedljivo pokazano i za gentamicin.

Među makrolidim antibioticima, azitromicin (derivat iz *Saccharopolyspora erythraea*) je najbolje proučeni anti QS antibiotik, koji pokazuje snažno inhibitorno delovanje (Skindersoe i sar., 2008). Subinhibitorna koncentracija azitromicina, 2 µg/mL, smanjuje produkciju AHL signala i faktora virulencije (Pechere, 2001), a takođe smanjuje ekspresiju *GacA* i *RsmA* na nivou translacije (Perez-Martinez i Haas, 2011), inhibira sintezu alginata (Skindersoe i sar., 2008) i smanjuje nivo sva tri tipa pokretljivosti *P. aeruginosa* (Bala i sar., 2011).

Penicilinska kiselina i patulin (Slika 3), dva sekundarna fungalna metabolita roda *Penicillium* pokazuju efekat na ekspresiju gena kontrolisanu QS, najverovatnije uticajem na Rhlr i LasR regulatorne proteine na posttranskripcionom nivou. Biofilmovi tretirani patulinom i tobramicinom su bili mnogo osetljiviji na antibiotike (Rasmusen, 2005), dok tretmani samo patulinom nisu uticali na biofilm. Genotoksičnost patulina trenutno limitira njegovu upotrebu (Glaser i Stopper, 2012).

Testiranjem uticaja različitih dezinfekcionih sredstava se pokazalo da prisustvo 19 ppm vodonik-peroksida, 1 ppm monohloramina i 0,5 ppm slobodnog hlora neće sprečiti formiranje biofilмова na testiranim površinama (Momba i sar. 2000).

Dezinfekciona svojstva UV svetlosti su davno poznata i u širokoj su upotrebi su u mnogim postrojenjima za pripremu vode za piće ili dezinfekciju efluenta. U novije vreme se pribegava novoj tehnologiji označenoj kao pulsna UV (PUV) koji predstavlja diskontinualni, ponavljajući tretman UV svetlošću (Garvey i sar., 2012). Istraživanja su pokazala da je ova tehnologija uspešna u produženoj inaktivaciji mnogih bakterijskih vrsta, kako pričvršćenih na neku površinu, tako i suspendovanih u vodi (Farrell i sar., 2009). U poređenju sa konvecionalnim kontinualnim UV zračenjem, pulsni, ponavljajući svetlosni tretman je pokazao prednost u odnosu na brzinu i efikasnost pretvaranja električne energije u energiju fotona. Upotrebom ove tehnologije je dokazan značajan

nivo inaktivacije biofilmova *Pseudomonas* pri primenjenim dozama UV od 16,2 J/pulsu na 20 i 37°C (Garvey i sar., 2015).

Gvožđe je nutrijent neophodan mnogim živim organizmima, posebno shvatajući i njegovu ulogu kao donora i akceptora elektrona. Zbog ograničenih mogućnosti bakterija da koriste samo Fe²⁺ jone, ovaj element koji je jako raširen u životnoj sredini često predstavlja ograničavajući faktor rasta. Naime, gvožđe je u prirodi prisutno u nerastvorljivom obliku Fe³⁺ jona, dok su mikroorganizmima dostupni rastvorljivi Fe²⁺ joni nestabilni i često oksiduju u pH neutralnim sredinama. Gvožđe takođe reguliše ekspresiju gena *P. aeruginosa* preko proteina regulatora usvajanja gvožđa (Fur), a takođe je neophodno za funkcionisanje međucelijske komunikacije u QS mehanizmu. Ove karakteristike su navele naučnike da ispituju mogućnost uticaja gvožđa na formiranje biofilmova. Musk i sar. (2005) su pokazali da je koncentracija gvožđa između 1 - 100 µM odgovorna za formiranje robusnih biofilmova *P. aeruginosa*. Van ovih opsega, ova bakterija može da egzistira samo u planktonskom obliku. Yang i sar. (2007) su pokazali da povećanje nivoa eDNK u EPS smanjuje koncentraciju gvožđa. Berlutti i sar. (2005) su objasnili da koncentracije gvožđa od 1 µM podstiče kretanje „trzajuće kretanjem“, dok koncentracije između 10 i 100 µM stimulišu ćelijsku agregaciju i formiranje biofilmova. Feri i fero joni mogu biti potencijalno katjonske veze i na taj način povećati viskozitet matriksa biofilmova.

Poslednjih godina je poraslo interesovanje za izučavanje nanočestica, uključujući i nanočestice gvožđe-oksida koje nalaze i svoju komercijalnu primenu (Park i sar., 2011). SPIONS predstavljaju superparamagnetske nanopartikule gvožđe-oksida koje su se pokazale u terapiji i reparaciji tkiva, a nova istraživanja sa Fe₃O₄ su pokazala njihov toksičan efekat prema nekoliko patogenih bakterija: *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* i *P. aeruginosa*. Iako su ovi rezultati usmereni na planktonske bakterije a ne na biofilme koje oni formiraju, pokazano je da upotreba Fe₃O₄ nanopartikula povećava biomasu biofilmova preko povećanja broja ćelija i smanjenja količine eDNK u matiksu biofilma, što ukazuje da ima uticaja na biofilm.

Istraživanja su usmerena i na upotrebu prirodnih produkata biljaka i životinja u uklanjanjanju biofilmova. Naime, biljke i životinje su izložene delovanju bakterija i imaju

razvijene različite odgovore na infekciju, uključujući i aktivaciju odbrambenog mehanizma i/ili ekspresije gena protiv stresa (Hartmann i sar., 2014). Može se očekivati da eukarioti imaju razvijene hemijske mehanizme da se odbrane od patogena, ubijajući ih ili isključivanjem mehanizama virulencije, kao što je QS sistem i/ili formiranje biofilmova. U Tabelama 2 i 3 su nabrojani neki od do sada poznatih prirodnih i sintetičkih produkata sa anti-biofilm aktivnošću.

2.2.4.1. Antibiofilm jedinjenja sa anti-QS aktivnošću

Nekoliko klasa molekula ima uticaja kako protiv formiranja biofilmova tako i anti-QS osobine (LaSarre i Federle, 2013).

Poznato je nekoliko sintetičkih analoga AHL-a koji efikasno deluju na QS mehanizam i inhibiraju formiranje biofilmova (Slika 3, Tabela 2). To su AHL sintetički analogi kojima su dodate aromatične grupe N-(indol-3-butanolil)-L-HSL i N-(4-bromo-fenilacetanolil)-L-HSL.

Tabela 2. Sintetički produkti sa inhibitornim delovanjem na biofilm (Rasamiravaka,2014)

Sintetička jedinjenja (poreklo prirodnog jedinjenja)	QS inhibicija	Aktivnost		Sinergija sa antibioticima i/ili efekat imune odbrane
		Inhibicija biofilma	Disperzija biofilma	
TAGE i CAGE (bromoageliferin)	NC	+ (24 h)	+	NC
Dihidrosventrin (sventrin)	NC	+ (24 h)	+	NC
N-(4-bromo-fenilacetanolil)-1-HSL	+ antaonist AHL (las sistem)	+ (24 h)	NC	NC
N-(indol-3-butanolil)-L-HSL (AHLs)	+ antaonist AHL (las sistem)	+ (24 h)	NC	NC
3-okso-C12-cikloheksanon (AHLs)	+ antaonist AHL (las sistem)	+ (24 h)	NC	NC
C10-ciklopentilamid (AHLs)	+ (lasI i rhlA)	+ (24 h)	NC	NC
Furanon C-30 i C-56 (Furanon)	+ (las, rhl sistem)	+ (24 h)	NC	NC
S-fenil-L-cisteinsulfoksid (Cistein sulfoksid alin)	+ (las, rhl sistem)	+ (24 h)	NC	NC
Difenil disulfid (derivat disulfida)	+ (las, rhl sistem)	+ (24 h)	NC	NC
Azitromicin[‡] (eritromicin)	+ (gacA, las i rhl sistem)	+ (72 h)	+	+ ⁽¹⁾

Legenda: +: da; -: ne; NC: ne postoji veza.

[‡]: subinhibitorna koncentracija

^(a): Trajanje eksperimenta.

⁽¹⁾: Aminoglikozidi.

Tabela 3. Prirodni produkti koji inhibitorno deluju na biofilmove (Rasamiravaka, 2014)

Prirodno jedinjenje	Poreklo	Klasa	QS inhibicija	Aktivnost		Sinergija sa antibioticima
				Inhibicija biofilma	raspršivanje	
Alginat ljaza	<i>P. aeruginosa</i>	Enzim	-	+	+	+ ⁽¹⁾
Ursolinska kiselina	<i>Diospyros dendo Welw.</i>	Triterpenoid	-	+ (24 h) pokretljivost	NC	NC
p-Kumaroil-Hidroksi-ursolinska kiselina	<i>Diospyros dendo Welw.</i>	Estar kumarne kiseline i triterpena	NC	+ (24 h)	NC	NC
Zingeron	<i>Zingiber officinale Rosc.</i>	Fenolno jedinjenje	NC	+ (168 h) c-di-GMP	NC	+ ⁽²⁾
Casban diterpen	<i>Croton nepetalefolius Bill.</i>	Diterpenoid	NC	+ (24 h)	NC	NC
DNaza I	Govedi pancreas	Enzim	NC	+ (24 h)	+	+ ⁽³⁾
DNaza 1I.2	Humani rožnati sloj kože	Enzim	+	+ (24 h)	+	+ ⁽³⁾
Paraoksanaze I	Humani i mišji serum	Enzim (laktoaza)	+	+ (24 h)	NC	NC
Manoalid	<i>Luffariella variabilis</i> (Polejaef, 1884) (morski sunder)	Sesterterpenoid	+ (las sistem)	+ (24 h)	NC	NC
Solenopsin A	<i>Solenopsis invicta</i> (mrav)	Alkaloid	+ (rhl sistem)	+ (24 h)	NC	NC
Katehin	<i>Conbretum albiflorum</i> (Tul.) Jongkind	Flavonoid	+ (las rhl sistem)	+ (24 h)	NC	NC
Naringenin	Komercijalni	Flavonoid	+ (las rhl sistem)	+ (48 h)	NC	NC
Estar kumarne kiseline	<i>D. trichocarpa</i> Baker.	Fenolno jedinjenje	+ (las rhl sistem)	+ (48 h)	+	+ ⁽¹⁾
Ajoen	<i>Allium sativum</i> L.	Organosumporno jedinjenje	+ (las rhl sistem)	+ (96 h)	NC	+ ⁽¹⁾
Derivati elaginske kiseline	<i>Terminalia cebula</i> Retz.	Fenolno jedinjenje	+ (las rhl sistem)	+ (72 h)	NC	+ ⁽¹⁾
Rozmarinska kiselina	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Fenolno jedinjenje	+ (las rhl sistem)	+ (18 h)	-	NC
Eugenol	<i>Syzygium arimaticum</i> (L.)	Fenilpropanoid	+ (las pqs sistem)	+ (24 h)	NC	NC
Kurkumin	<i>Curcuma longa</i> L.	Fenolno jedinjenje	+ (AHLs)	+ (48 h)	NC	NC
Bergamotin i dihidroksilbergamotin	<i>Citrus paradisi</i> Macfad (crveni i beli grejfruti)	Furokomarini	+ (AI-1 i AI-2)	+ (24 h)	NC	NC
Penicilinska kiselina	<i>Penicillium sp.</i>	Furanon	+ (LasR, RhlR)	NC	NC	NC
Patulin	<i>Penicillium sp.</i>	Fuopiranon	+ (LasR, RhlR)	- ¹	NC	+ ⁽¹⁾
Emodin	<i>Rheum palmatum</i> L.	Antrahinon	+ (vezivanje TraR)	+ (72 h)	NC	+ ⁽³⁾
Baikalein	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Flavonoid	+ (vezivanje TraR)	+ (72 h)	NC	+ ⁽³⁾

Legenda: +: da; -: ne; NC: ne postoji veza.

‡: subinhibitorna koncentracija. ^(a): Trajanje eksperimenta. ⁽¹⁾: Aminoglikozidi.

Oni pokazuju inhibitornu aktivnost na *LasR* QS sistemu, kao i na formiranje biofilmova (Geske i sar., 2005). Takođe, AHL analogi kod kojih je homoserin lakton prsten zamenjen prstenom cikloheksanona, negativno regulišu ekspresiju *LasI* AHL sintaze, što ima za posledicu smanjenje ekspresije faktora virulencije piocijanina i elastaze i izmenu u morfologiji/fenotipu biofilmova (Smith i sar., 2003).

Analozi ciklopentil AHL-a nerastvorljivi u vodi inhibiraju *lasI* i *rhlA* ekspresiju, produkciju faktora virulencije uključujući elastaze, piocijanin, ramnolipide i formiranje biofilmova bez uticaja na bakterijski rast (Ishida i sar., 2007).

U Tabeli 3 su sistematski prikazani prirodni produkti koji imaju inhibitorno delovanje na biofilm. Halogeni furani (furani C-30 i C-56) koje produkuje marinska makroalga *Delisea pulchra*, smanjuju produkciju biofilma, delujući na *las* i *rhl* sistem *P. aeruginosa* (Hentzer i sar., 2003). Inhibicija bakterijske kolonizacije je dokazana i u eksperimentima sa infekcijom pluća miša (Wu i sar., 2004).

Manoalid, sesterpenoid iz morskog organizma *Luffariella variabilis* takođe pokazuje antibiofilm i anti QS aktivnost (*las* sistem) bez antimikrobne aktivnosti (Skindersoe i sar., 2008) kao i antibiotsku aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama (Ebada i sar., 2010).

Solenopsin A, alkaloid izolovan iz *Solenopsis invicta* inhibira produkciju piocijanina prekidanjem *rhl* signalnog sistema i smanjuje produkciju biofilma u zavisnosti od doze (Park i sar., 2008). Slično deluje i fenolna komponenta kurkumin, koji je glavni sastojak korena kurkume (*Curcuma longa* L.), a i koja utiče na gensku regulaciju faktora virulencije (piocijanina, elastaze i proteaze) i inhibira vezivanje bakterija na površinu polipropilena. Slabljenje produkcije faktora virulencije pod uticajem je i derivata elagične kiseline iz *Terminalia chebula* delovanjem na *lasIR* i *rhlIR* ekspresiju gena.

Rosmarinska kiselina, fenolno jedinjenje koje produkuje biljka *Ocimum basilicum* L, sprečava formiranje biofilmova ali ne može da proдре u zreо biofilm u *in vivo* i *in vitro* uslovima (Walker i sar., 2004). Takođe je označena i kao potencijalni QS inhibitor (Annapoorani i sar., 2012).

I mnoga druga jedinjenja izolovana iz biljaka pokazuju anti-biofilm i anti-QS aktivnost, kao što su flavon baikalein in korena *Scutellaria baicalensis* Georgi (Zeng i sar., 2008), ekstrakt iz tradicionalne Kineske lekovite biljke rabarbara (*Rheum palmatum* L.) (Ding i sar., 2011), eugenol iz karanfilića *Syzygium aromaticum* (L.) i druge (Husain i sar., 2013). U novije vreme je dokazano da *Meliaceae*, *Melastomataceae*, *Lepidobotryaceae* i *Sapindaceae* iz neotropskih kišnih šuma Kosta Rike pokazuju značajnu anti QS aktivnost i inhibiraju formiranje biofilмова *P. aeruginosa* (Ta i sar., 2014).

Ajoen, alil sulfid izolovan iz belog luka (*Allium sativum* L.) takođe ima uticaja na QS regulisane gene, uključujući produkciju ramnolipida. Osim toga, ajoen daje sinergizam sa antibiotikom tobramicinom u kontroli *P. aeruginosa* biofilma, poboljšavajući uklanjanje *P. aeruginosa* iz pluća inficiranih miševa (Jakobsen i sar., 2012).

2.2.4.2. Antibiofilm jedinjenja bez anti-QS aktivnosti

Mnogi organizmi, uključujući prokariote i eukariote (morski organizmi, biljke i životinje) su opisani kao proizvođači sekundarnih metabolita koji imaju uticaj na biofilm. Neki od tih produkata su poslužili i kao model za proizvodnju sintetičkih antibiofilm komponenata protiv *P. aeruginosa*.

Pokazano je da alkaloidi iz marinskih sunđerā (*Agelas conifer*, *Agelaceae*) mogu da posluže kao osnova za sintezu dva derivata (*trans*-bromoageliferin analog 1 (TAGE) i *cis*-bromogeliferin analog 2 (CAGE)) koji uspešno inhibiraju formiranje biofilмова, a takođe mogu da razgrade postojeće biofilmove bez baktericidnog ili inhibirajućeg efekta na rast bakterija (Huigens i sar., 2007).

Sličan efekat pokazuje i dihidro-sventrin iz *Agelas sventres*.

Goveđa pankreasna DNaza I i DNaza IL2 pokazuje izraženu antibiofilm aktivnost (Eckhart i sar., 2007).

Ekstrakti đumbira (*Zingier officinale* Rosc.) koji se dugi niz godina koriste kod Indijanaca, Azijata i Arabljana za lečenje mnogih bolesti, inhibiraju formiranje biofilмова *P. aeruginosa* PA14 redukcijom c-di-GMP produkcije kao i produkcije

ukupnih polisaharida (Kim i Park, 2013). Glavni sastojak suvog korena đumbira, zingeron (vanilil aceton) inhibira formiranje biofilмова i povećava osetljivost *P. aeruginosa* na ciprofloksacin (Kumar i sar., 2013) a takođe inhibira i kretanje (plivajuće, „rojenje“ i „trzajuće kretanje“).

2.3.MOGUĆNOST PRIMENE BAKTERIOFAGA KAO ANTIMIKROBNIH

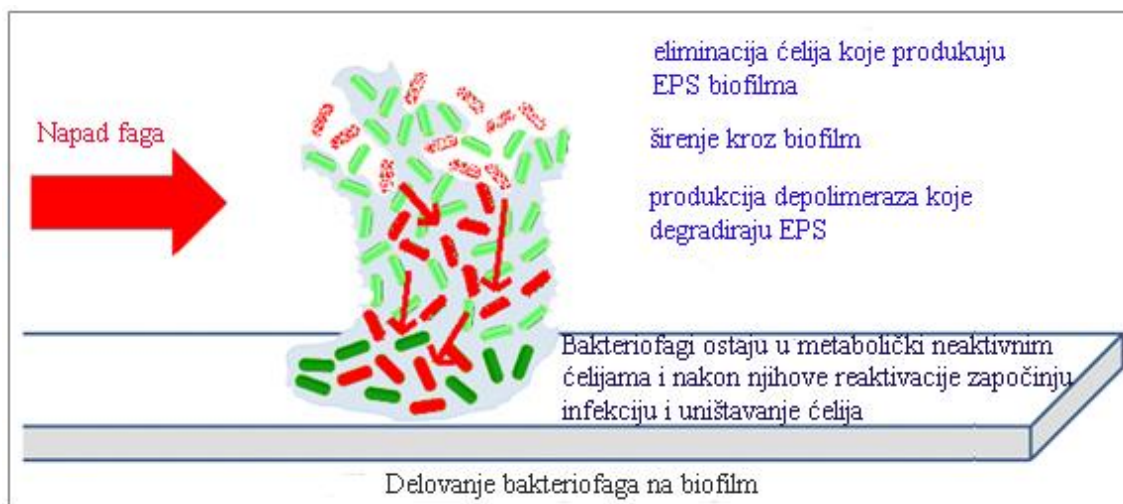
AGENASA

Odmah nakon otkrića bakterifaga, započela su eksperimentalna istraživanja u cilju njihove primene kao biocida, za različite humane i animalne patogene. Felix d'Herelle je uspešno testirao terapijski efekat faga na pilićima i kravama. Uspeh nakon testiranja faga na čoveku je doveo do velike podrške istraživanjima dvadesetih godina prošlog veka, a tokom četrdesetih je farmaceutska kompanija Eli Lilly započela i komercijalnu proizvodnju faga u SAD. Tokom Drugog Svetskog rata, terapija fagima je korištena među vojnicima Sovjetskog Saveza u lečenju gangrene i dizenterije. Industrijska proizvodnja antibiotika pedesetih godina prošlog veka, smanjila je interesovanje za primenu faga u lečenju, da bi interesovanje poslednjih godina ponovo poraslo nakon razvoja rezistencije velikog broja bakterija na antibiotike i oni postaju dobra alternative i anti-mikrobni agensi za razne patogene (Aatterbury i sar., 2007; Goncalves i sar., 2014).

Upotreba faga u terapiji protiv *P. aeruginosa* je bila uobičajena praksa u eri preantibiotika, da bi se nakon otkrića antibiotika interesovanje smanjilo. Međutim, poslednjih godina, usled porasta rezistencije sojeva *Pseudomonas aeruginosa* na primenjene terapije antibiotikom, raste interesovanje za primenu faga (Kumari i sar., 2008), posebno u zemljama Istočne Evrope. Kokteli faga koji sadrže veliki broj različitih faga protiv njihovih ciljanih domaćina, (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *E.coli*, *P. aeruginosa*) kombinovani u preparatu "Pyofagi" se široko primenjuju u Gruziji za lečenje gnojnih upala na koži, rana i infekcije pluća (Knežević, 2012).

Biofilmovi predstavljaju vrlo čestu adaptaciju bakterija koja im omogućava da naseljavaju različita staništa. Oni predstavljaju jedinstven problem za antibiotike i druge biocide, zbog prirode ekstracelularnog matriksa i prisustva metabolički neaktivnih ćelija

unutar biofilmova. Mnogi hemijski agensi uspešno deluju protiv planktonskih ćelija, ali potpuno su neefikasni protiv biofilmova (Harper i sar., 2014).



Slika 4. Mehanizama delovanja bakteriofaga na biofilm (Harper i sar., 2014)

Bakteriofagi poseduju nekoliko osobina (Slika 4) kojima uspevaju da deluju na biofilmove:

1. Amplifikacijom bakteriofaga unutar ćelije domaćina se lokalno povećava njihov broj. Šireći se kroz biofilm i eliminišući bakterije koje proizvode EPS, uništavaju biofilm i smanjuju mogućnost za njegovu regeneraciju;
2. Produkcijom (ili indukcijom) enzima depolimeraze koje degradiraju ekstracelularni matriks;
3. Preživaljavanjem u metabolički neaktivnim ćelijama iz kojih, nakon njihove reaktivacije, započinju infekciju i uništavanje ćelija (Harper i sar., 2014).

Kako je broj bakterija u životnoj sredini visok, a biofilm uobičajena životna forma, infekcija bakterija unutar biofilma se smatra evolutivnom adaptacijom faga da koriste bakterije u ovakvom obliku (Abedon i sar., 2010).

Poznato je da genomi bakteriofaga sadrže gene koji kodiraju sintezu enzima sposobnih da razgrade elemente matriksa biofilma (Sillankorva i sar., 2011; Leiman i sar., 2004). Takođe, mnogi fagi sadrže enzime u repu virusne partikule koji pomažu prodiranje kroz ćelijski zid bakterije, a moguće je da imaju ulogu i u degradaciji matriksa biofilma

(Leiman i sar., 2004). Prisustvo enzima u repu faga se smatra zajedničkom karakteristikom litičkih faga i označeno je kao “opšti model infekcije bakteriofaga sa repom” prema Yan i sar. (2014).

Relativno niski ekonomski troškovi i jednostavnost čini ih pristupačnim rešenjem u terapiji. Međutim, nedostatak poznavanja mehanizama o bakterijskoj patogenosti, kao i prirodi fag-bakterija interakcije, nedostatak životinjskih modela za ispitivanja, kao i ogledi koji su dokazivali neuspeh upotrebe faga u terapiji, dovelo je do sporog razvoja ove grane (Kwiatek i sar., 2015).

2.4. BAKTERIOFAGI

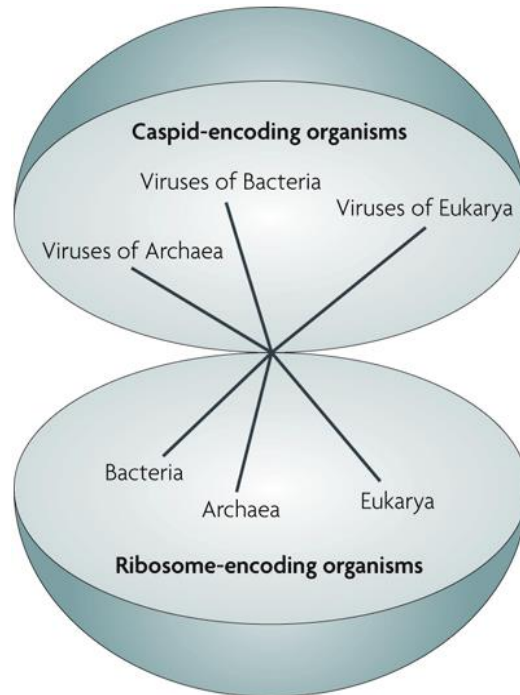
Bakteriofagi se definišu kao obligatni intracelularni paraziti bakterija, koji nemaju samostalan metabolizam a prisutni su u širokom rasponu bioloških niša i generalno se mogu naći na svim mestima na kojima i bakterija domaćin (Guttman, 2005). Procenjuje se da postoji 10^{31} faga u biosferi, što ih čini najrasprostranjenijim organizmima na planeti (Rohwer i Edwards., 2002). Fagi su izuzetno brojni u različitim životnim sredinama, pa se tako u litru morske vode može naći oko 10^{10} faga (Benson i sar., 2000) i 10^7 - 10^9 po gramu sedimenta i zemljišta (Danovaro i sar., 2001).

Model interakcije faga i domaćina doprineo je uspostavljanju polja za razvoj molekularne biologije (Cairns, i sar., 1992). Tek nedavno je sagledan značaj faga u ekosistemima (Wommack i Colwell., 2000) uključujući okeanima kao značajnim predatorima bakterija i njihova uloga u kruženju esencijalnih nutrijenata (azota i fosfora) (Wilhelm, i Suttle., 1999). Danas se zna da fagi doprinose globalnom geohemijskom ciklusu i predstavljaju najveći rezervoar genetske raznolikosti na Zemlji (Suttle, 2007). Takođe, bakteriofagi igraju važnu ulogu u biologiji bakterija, njihovom diverzitetu i evoluciji (Jessup i Forde., 2008).

Pitanje da li su bakteriofagi (i virusi uopšte) živa bića je predmet rasprava između evolucionih biologa (La Scola i sar., 2003; Raoult i sar., 2004).

Inspirisani preklapanjem veličine virusnih čestica i genoma celularnih organizama (Koonin, 2005) kao i zapažanjem da je protein virusnog kapsida jedina komponenta

jedinstvena za svet virusa (Krupovic i Bamford, 2008), Raoult i Forterre (2008) su sve organizme podelili na organizme koji poseduju gene za sintezu ribozoma, odnosno organizme koji poseduju gene za sintezu kapsida (Slika 5).



Slika 5. Virusi sa kapsidima i tri dominijuma celularnih organizama sa univerzalnim zajedničkim pretkom (Raoult i Forterre, 2008)

Međutim, Moreira i Lopez-Garcia (2009) isključuju viruse iz stabla života zbog nemogućnosti samostalnog održavanja, odnosno nemogućnosti da se razmnožavaju samostalno.

Mnogi evolucionari biolozi naglašavaju značaj virusa u predćelijskoj fazi evolucije (Koonin i sar., 2009) i granicama horizontalnog transfera gena (Ludmir i Enquist, 2009). Ukazujući na neobjašnjeno poreklo većine virusnih gena i nedostatak sličnosti sa ćelijskim genima, Claverie i Ogata (2009) upozoravaju da je današnja slika stabla života nepotpuna i da se o položaju virusa ne bi trebalo spekulirati.

Bakteriofage su otkrili, paralelnim istraživanjima, Frederick Twort i Felix d'Herelle, 1915. odnosno 1917. godine i od tada se njihovom istraživanju poklanja velika pažnja u mnogim laboratorijama sveta. Međutim, i pre njihovog zvaničnog otkrića, bilo je radova koji su ukazivali na njihovo prisustvo. Prvi među njima je bio rad Hankina koji je 1896

godine objavio da vode reka Jamuna i Gang u Indiji imaju antiseptičnu aktivnost prema mnogim vrstama bakterija, kao i protiv *Vibrio cholerae*. Eksperimentalno je pokazano da čestice sa animikrobnom aktivnošću prolaze kroz filter i bivaju uništene kipućim zagrevanjem. On je zaključio da ovo antiseptično svojstvo pokazuju neke hemijske volatilne substance (Summers, 2005).

2.4.1. Opšte karakteristike bakteriofaga

Stogodišnja istraživanja faga su pokazala da su ovi virusi raznovrsni i sveprisutni u biosferi, u širokom spektru bioloških niša. Bakteriofagi su prisutni svuda u biosferi gde su prisutne i bakterije. Njihova staništa su veoma raznovrsna i nalaze se u okeanima, zemljištu, biljkama i životinjama. Jedna od njihovih osnovnih karakteristika je veoma uska specifičnost prema bakteriji-domaćinu, ograničena na istu vrstu bakterija, ili čak soj. Virusi često doprinose velikom bakterijskom diverzitetu kroz horizontalni transfer genetskog materijala, što se posebno uočava na bakterijskoj virulenciji i rezistenciji na lekove (Tan i sar., 2007). Stoga bakteriofagi igraju ključnu ulogu u oblikovanju prirodnih populacija bakterija (Wang i sar., 2004).

Veličina genoma faga varira od nekoliko kilobaznih parova do 498 kilobaza kod *Bacillus* faga G, najvećeg faga sekvenciranog do danas (Guttman, 2005).

2.4.1.1. Morfologija faga

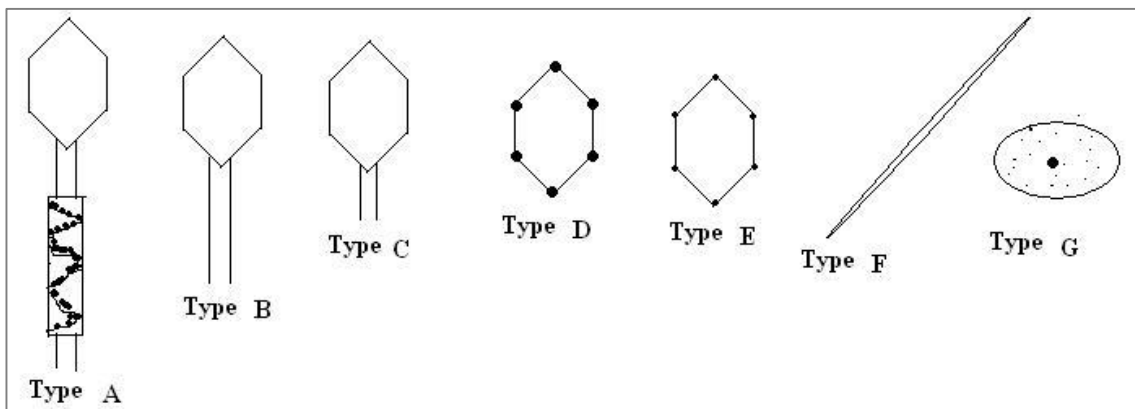
Bakteriofagi, kao i sve druge čestice virusa (ili virioni) se sastoje od dva ili tri dela: genetičkog materijala sačinjenog od DNK ili RNK (uvek samo jedna vrsta nukleinskih kiselina, jednolančana ili dvolančana), proteinskog omotača koji štiti te gene i u nekim slučajevima omotača od lipida koji okružuje proteinski omotač kad su virusi izvan ćelije. Proteinski omotač faga je označen kao kapsid, a zajedno sa nukleinskom kiselinom čini nukleokapsid. Kapsid je izgrađen iz morfoloških subjedinica nazvanih kapsomere. Raspored kapsomera u kapsidu određuje simetriju nukleokapsida. Poznato je nekoliko tipova simetrije: spiralna simetrija, kada su kapsomere raspoređene spiralno oko nukleinske kiseline, kubna simetrija, kada su kapsomere raspoređene tako da grade

ikozaedar i binarna simetrija. Fagi koji imaju binarnu simetriju su izgrađeni iz glave i repa i pripadaju porodici *Caudovirales*. Fagi nepravilnog oblika su označeni kao pleomorfni.

Zbog složenosti građe, Bradley je 1976 godine sistematizovao morfološke tipove bakteriofaga, svrstavajući ih u sedam grupa (Slika 6):

1. Morfotip A – fagi sa dugim, kontraktilnim repom (fagi iz porodice *Myoviridae*);
2. Morfotip B – fagi sa dugačkim, fleksibilnim, ali nekontraktilnim repom (fam. *Siphoviridae*);
3. Morfotip C – fagi sa kratkim repom (fam. *Podoviridae*)
4. Morfotipovi D i E - fagi sa kubnom simetrijom;
5. Morfotip F – fagi sa spiralnom simetrijom i
6. Morfotip G – pleomorfni fagi.

U okviru svake grupe se nalazi i veći broj podgrupa koje se odnose na morfološke specifičnosti u okviru grupe.



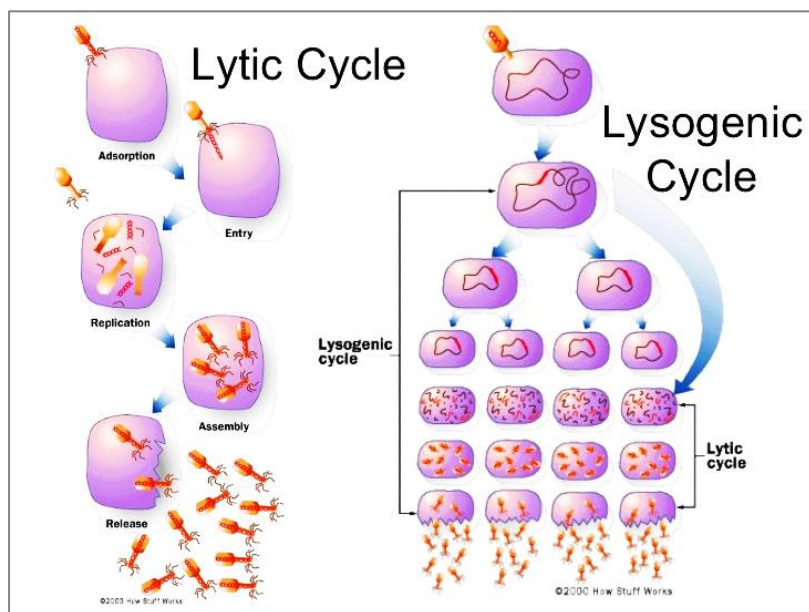
Slika 6. Različiti morfotipovi bakteriofaga, Bradley, 1976

2.4.1.2. Interakcija bakteriofaga i bakterijske ćelije

Interakcije bakteriofaga i bakterija su složene i zavise od osobina bakterije, bakteriofaga i uslova sredine.

U zavisnosti od karakteristika ciklusa umnožavanja, bakteriofagi su podeljeni u dve velike grupe: litički fagi (virulentni) i umereni fagi.

Obligatno litički fagi se nakon infekcije ćelije domaćina replikuju (Slika 7), i litički ciklus se završava dezintegracijom, tj. lizom ćelije domaćina. Najbolje proučeni fag iz ove grupe je T4 fag *Escherichia coli*.



Slika 7. Litički i lizogeni ciklus faga

Umerenim fagima nazivaju se oni fagi koji imaju mogućnost da nakon infekcije bakterijske ćelije integrišu svoju nukleinsku kiselinu u genom bakterije (profag). Profag se replikuje paralelno sa genomom bakterije domaćina, prenosi se na sledeću generaciju bakterija, a da se pri tome virusni proteini ne ekspimiraju, osim represornog proteina koji inhibira ekspresiju ostalih gena faga. Pod određenim okolnostima (delovanjem UV, X zraka ili mutagenih hemikalija), aktivnost represornog proteina može biti izgubljena, kada se profag može iseći iz bakterijskog hromozoma i ući u litički ciklus. Proces kojim se inicira litički ciklus umerenog faga se naziva indukcija. Najbolje proučeni fag iz ove grupe je λ fag. Umereni fagi mogu bakterijskoj ćeliji da obezbede nove osobine, ekspimiranjem virusnih gena, ili ugradnjom u bakterijske gene (Knežević, 2012).

Proces infekcije bakterijske ćelije započinje adsorpcijom faga za ćeliju domaćina. Pričvršćivanje faga za površinu bakterijske ćelije je rezultat reakcije antireceptora (adhezina, liganada) na bakteriofagu i receptora na površini bakterijske ćelije, a zavisi i od fiziološkog stanja ćelije domaćina i niza spoljašnjih fizičkih (temperature) i hemijskih

faktora (koncentracije dvovalentnih katjona, ugljenih hidrata i dr.). Ova reakcija je visokospecifična, što znači da fagi prepoznaju sve bakterijske ćelije sa odgovarajućim receptorima bez obzira na njihovu taksonomsku pripadnost (grupna specifičnost). Tako na primer, fag δ inficira *P. aeruginosa* i *Salmonella enterica* serotip Typhimurium (Knežević, 2009). Fagi koji mogu inficirati različite vrste ili rodove bakterija se označavaju kao fagi širokog spektra. Za razliku od njih, fagi uskog litičkog spektra su oni koji mogu inficirati samo bakterije unutar jedne vrste. Do rezistencije na fage dolazi kada bakterija usled fenotipskih ili genotipskih promena izgubi receptor za vezivanje faga, ili promeni njihovu strukturu.

Nakon adsorpcije, fagi ubacuju svoj genom u ćeliju domaćina, a kao rezultat penetracije, na površini bakterijske ćelije ostaje pričvršćen prazan kapsid, pa se ovaj proces označava i kao dekapcidacija.

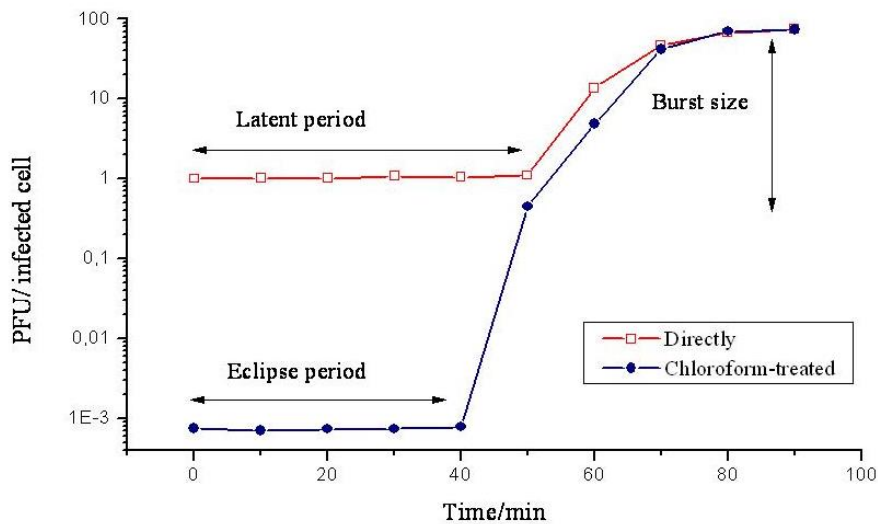
Sledeća faza je multiplikacija, kada nukleinska kiselina (NK) faga služi kao matrica za sintezu raznih virusnih proteina koji štite virusnu NK, inhibiraju biosintetske procese domaćina, razgrađuju proteine domaćina i drugih, kao i onih koji učestvuju u replikaciji virusnog genoma i na kraju sintetišu proteinske komponente viriona. Po završetku ovog procesa u bakterijskoj ćeliji se nalaze replike genoma faga i komponente kapsida.

U sledećoj fazi dolazi do sklapanja virusnih partikula (faza integracije) i formiranja zrelih infektivnih čestica (faza maturacije). Na kraju ove faze je moguće elektronskim mikroskopom u ćeliji uočiti zrele virusne partikule.

Oslobađanje faga se najčešće dešava liziranjem ćelije domaćina, dok se manji broj faga oslobađa pupljenjem. Dodatak hloroforma u kulturu bakterija inficiranu fagima rezultira prevremenom lizom ćelija, pošto hloroform razara citoplazmatičnu membranu i omogućava razgradnju ćelijskog zida lizinima.

Kao rezultat infekcije litičkim fagom, iz jedne inficirane ćelije se oslobodi veliki broj novih viriona koji mogu da inficiraju druge bakterijske ćelije.

Ukoliko se svi procesi, od adsorpcije do lize, predstave grafički, tako da je na X osi vreme, a na Y osi broj bakteriofaga, dobija se kriva rasta (One step growth) prikazana na Slici 8.



Slika 8. Kriva umnožavanja virusa

Nakon penetracije i tokom replikacije nukleinske kiseline faga i sinteze komponenti kapsida nije moguće detektovati virusne partikule, i ovaj period je označen kao period eklipse. U toku procesa maturacije, dolazi do povećanja broja virusa, ali samo intracelularno. Period eklipse i maturacije zajedno čine latentni period, u kome se fagi ne mogu detektovati ekstracelularno. Oslobođanjem virusa se povećava njihov titar ekstracelularno, do postizanja platoa. Prestanak rasta bakteriofaga označava kraj ciklusa.

2.4.2. Identifikacija i taksonomija bakteriofaga

Ukupan broj vrsta faga se procenjuje na milione (Rohwer, 2003) ali njihova klasifikacija i dalje ostaje izazov. Uprkos velikom broju i velikoj raznovrsnosti, malo se zna o biološkoj raznovrsnosti faga, njihovoj biogeografiji ili filogeniji. Ali, ipak tokom poslednjih decenija postala je široko prihvaćena činjenica da bakteriofagi imaju ogroman značaj u biosferi.

Od otkrića faga taksonomija i klasifikacija faga je prošla kroz nekoliko etapa. U periodu 1920-1930-ih godina klasifikacija je bila bazirana na specifičnosti bakterijskih domaćina. Pojava elektronske mikroskopije (1940-1950) je omogućila merenje veličine faga, dužine

repa, utvrđivanje simetrije kapsida što sve dovodi do razvoja taksonomije faga na osnovu morfotipova. Tokom šesdesetih godina dvadesetog veka, napredak u biohemijskim metodama izolacije nukleinskih kiselina iz faga doprinosi dodatnim informacijama i usložnjava taksonomsku šemu faga.

Prvi globalni pokušaj da se sistematski klasifikuju virusi predstavljen je na Međunarodnom kongresu mikrobiologa u Moskvi 1966. godine, sa misijom razvoja univerzalnog taksonomskog sistema za sve viruse koji napadaju životinje, biljke, gljive, bakterije, a kasnije i arhea. Prema ovoj konvenciji, a po analogiji sa Lineovim hijerarhijskim sistemom, virusi su grupisani po zajedničkim karakteristikama u različite nivoe grupa, tako da podgrupe imaju manje zajedničkih atributa. Porodice su deljene na genuse i subgenuse u zavisnosti od konfiguracije (linearna, kružna) i veličine genoma. Međutim, ovim pristupom veliki broj faga nije moguće klasifikovati (Nelson 2006).

Bakteriofagi su slabo proučeni a naša saznanja o njima baziraju se na karakteristikama faga T4 i λ , dok je većina drugih, oko 5.000 novootkrivenih slabo ili potpuno neistražena (Ackerman, 2006).

Prema važećoj taksonomiji, bakteriofagi su svrstani u različite taksonomske kategorije, od kojih je najčešće korišćena familija. Karakteristike na osnovu kojih je izvršena klasifikacija su karakteristike genoma, način replikacije, hemijski sastav viriona, biološke i antigene osobine i morfologija faga (simetrija i složenost viriona, tj. prisustvo ili odsustvo repa). Taksonomski sistem je odobren od strane Međunarodnog komiteta za taksonomiju virusa (International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) i on zahteva vizualizaciju čestica faga elektronskim mikroskopom za određivanje morfologije kapsida i kompletno sekvenciranje faga, pri čemu se podaci o genomu skladiše u GenBank bazu podataka (Rohwer i Edwards, 2002).

Prema ICTV, morfologija viriona i sastav nukleinskih kiselina su danas osnova za klasifikaciju faga u 13 porodica. Preko 95 % svih faga opisanih u literaturi pripadaju redu *Caudovirales* u koji su svrstane tri glavne porodice koje se odlikuju različitom morfologijom repa: *Siphoviridae* imaju duge fleksibilne repove (60 % okarakterisanih

faga), 25 % su *Myoviridae* sa dvostrukim slojevima kontraktilnih repova i 15 % su *Podoviridae* sa kratkim, zatupastim repovima. Poliedarski, filamentozni i pleomorfni fagi predstavljaju samo 3-4 % ukupno opisanih faga i raspoređeni su u 10 porodica, od kojih su neke izuzetno male (Ackermann, 2007).

Kod faga sa repom odnos proteina i dsDNK je 1: 1. Međutim, njihov nukleinski materijal je veoma zgusnut, upakovan u glavi i čini 20 – 50 % ukupne mase (Earnshaw i Harrison, 1977).

Svi *Caudovirales* imaju glave sa ikozaedarnom simetrijom (20 strana/12 temena) ili njihove derivate, sastavljene od više kopija jednog ili dva velika proteina glave. Veličina glave faga je u korelaciji sa veličinom upakovanog genoma, u promeru između 45 i 100 nm. Uglovi ikozaedra se uglavnom sastoje od monomera kapsidnih proteina, dok se svaka strana sastoji od heksamera istih (ili sličnih) proteina (Gutmann 2005).

Protein koji povezuje strukture glave i repa ("portal protein") je jedan od ključnih virusnih struktura uključenih u ciklus infekcije. Ovaj konektor je homo-oligomerni struktura i kontroliše ulazak DNK i sklapanje repa na nezrelu glavu za vreme morfogeneze novih čestica. U toku infekcije, menja konformaciju i omogućuje izlaz DNK iz viriona u pravcu bakterijske ćelije (Valpuesta i sar., 2000), a rep faga se kači za domaćina i služi kao kanal za genomnu injekciju. Osnova repa je tri ili šestostrukosimetrična i sastoji se od spiralnih diskova, a ukupna dužina varira od 3 do 825 nm. Oni obično imaju na distalnom kraju ploče, bodlje ili terminalna vlakna.

Fagi sa dugim repom mogu biti kontraktilni, kao što je kod *Myoviridae* (npr faga T4), ili nekontraktilni, kao što su *Siphoviridae* (npr, fag λ). Svi fagi sa dugim repom imaju veliki gen (obično > 2 kbp) koji kodira protein odgovoran upravo za utvrđivanje dužine repa. Kontraktilni repovi su često vrlo složene građe. Na primer, rep T4 faga se sastoji od 22 različita proteina (Mesyanzhinov, 2004) dok je cevast nekontraktilni rep izgrađen od višestrukih kopija jednog proteina, poznatog kao glavni protein repa.

Prema ICTV metodama, trenutno, se zanemaruje ogromna količina dostupnih podataka o sekvenci genoma što povremeno izaziva kontradiktorne situacije. Tako u taksonomskim

sistemima i *Salmonella* fag P22 i *E.coli* fag T7 pripadaju porodici *Podoviridae*, zbog prisustva kratkih repova. Međutim, poznato je skoro 40 godina da P22 genetski pripada fagu sa dugim repom zbog rekombinacije između dva genoma i nastanka funkcionalnog hibrida (Botstein i Herskovic, 1974). Slučajevi poput ovih ohrabрили su istraživače da se okrenu molekularnim metodama klasifikacije, ali se pokazalo da je teško jer nema univerzalnog gena, analoga 16S rRNK koji se koristi u bakteriologiji, a koji je zajednički za fage svih porodica (Paul i sar., 2002).

Tokom 2008. godine, Lavigne i saradnici koristili su metode integrisanih alata BLAST i postavili temelj za klasifikaciju na bazi sekvenciranja faga i ratifikacije u ICTV.

Sa druge strane, bakteriofagi namenjeni primeni moraju biti taksonomski detaljno okarakterisani iz više razloga: poznavanje taksonomskih karakteristika faga omogućava međusobno poređenje različitih izolata i bolje razumevanje biologije faga, klasifikacija je osnov filogenetskih istraživanja i poznavajući neke karakteristike faga, moguće je predvideti druge (npr. na osnovu veličine kapsida je moguće proceniti veličinu genoma) (Knežević, 2012).

2.4.3. Uticaj fizičkih i hemijskih agenasa na bakteriofage

Većina faga je veoma otporna na sušenje, dok je neotporna na visoke temperature i UV zračenje. Osetljivost faga na promene pH vrednosti značajno variraju i generalno se smatra da opseg pH vrednosti sredine koji je optimalan za bakterije u velikoj meri određuje i opseg pH vrednosti u kome su fagi stabilni.

Osim ekstremnih pH vrednosti, na vijabilnost faga utiču i urea, uretan, askorbinska kiselina, neki helatni agensi, alkoholi i druge supstance, a njihov efekat uglavnom zavisi od koncentracije i temperature. Hloroform, etar i deterdženti deluju štetno na fage sa lipidima. Viricidni efekat pokazuju i soli teških metala, soli srebra i preparati joda (Knežević, 2012).

2.4.4. Bakteriofagi *Pseudomonas aeruginosa*

Fagi *P. aeruginosa* su već dugo poznati, a korišteni su u eksperimentima i u terapijskim tretmanima u Istočnoj Evropi (Deresinski, 2009). Bradley, 1965 je dao pregled osnovnih morfoloških tipova faga *P. aeruginosa* svrstavajući ih ih u četiri osnovna morfološka tipa: sa kontraktilnim repom, sa dugačkim nekontraktilnim repom, fagi bez repa sa malom kapsomerom koji sadrže RNK i filamentozni fagi (Takeya i Amako, 1966).

Međutim, sadašnja saznanja o njihovom diverzitetu pokazuju da su oni svrstani u najmanje 7 rodova koji obuhvataju samo litičke fage (slični T7, ΦKMV, LUZ24, N4, PB1, ΦKZ, JG004) uz još toliki broj rodova sa umerenim fagima (Essoh i sar., 2013).

Većina opisanih bakteriofaga *P. aeruginosa* su *Caudovirales*, imaju glavu i rep, sadrže dvostruku DNK (dsDNA) i pripadaju familijama: *Siphoviridae*, *Myoviridae* i *Podoviridae*. Manja grupa su poliedarski, nitasti ili pleomorfni koji kao genetski materijal mogu sadržati ss/dsDNK ili ss/dsRNK (Ackermann, 2006). Komparativna analiza DNK sekvenci deset faga iz jednog kataloga sa osam faga druge kolekcije rezultiralo je zaključkom o odsustvu homologije među njima, što potvrđuje široku raznolikost faga *P. aeruginosa* (Kwan i sar., 2006). GenBank navodi 40 kompletnih genomnih sekvenci faga sa repom *P. aeruginosa* (Sepúlveda-Robles i sar., 2012).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni naučni cilj ove doktorske disertacije je sagledavanje mogućnosti primene bakteriofaga u kontroli formiranja biofilmova, kao i uticaja na već formirane biofilme sojeva vrste *Pseudomonas aeruginosa*, pri definisanim ekološkim uslovima u pogledu temperature, pH i koncentracije NaCl.

Da bi se realizovao postavljeni cilj disertacije bilo je neophodno sagledati obe komponente, *Pseudomonas aeruginosa* i bakteriofage i zbog toga su postavljeni ciljevi:

- Izolacija i identifikacija izolata *Pseudomonas aeruginosa* poreklom iz životne sredine;
- Kategorizacija izolata *Pseudomonas aeruginosa* poreklom iz životne sredine (sedimenta, aktivnog mulja, površinske vode, vode za piće i zemljišta) prema sposobnosti formiranja biofilmova;
- Ispitivanje uticaja staništa na produkciju biofilmova kod izolata *Pseudomonas aeruginosa*;
- Analiza populacione strukture i međusobnih odnosa izolata *Pseudomonas aeruginosa* iz životne sredine sa teritorije Srbije;
- Ispitivanje mogućnosti primene Raman spektromikroskopije za određivanje kvalitativnih karakteristika biofilmova kod *Pseudomonas aeruginosa* kao i kvaliteta biofilmova u zavisnosti od uslova sredine u kojima se formiraju;
- Izolacija bakteriofaga i određivanje njihove taksonomske pripadnosti;
- Karakterizacija izolovanih bakteriofaga;
- Ispitivanje litičkog delovanja bakteriofaga.

Poseban cilj ove disertacije je i formiranje kolekcije identifikovanih izolata *Pseudomonas aeruginosa*, kao baze za buduća istraživanja i upoznavanja sa diverzitetom sojeva vrste *Pseudomonas aeruginosa* poreklom iz životne sredine sa teritorije Srbije. Takođe, cilj ovih istraživanja je i formiranje kolekcije faga koja može predstavljati osnovu za praktičnu primenu faga u kontroli biofilmova u različitim oblastima poljoprivrede i proizvodnje hrane.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. IZOLACIJA I DETERMINACIJA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

U toku rada je sakupljeno ukupno 30 uzoraka: 16 uzoraka površinske vode, 1 uzorak sirove i 1 uzorak prečišćene otpadne vode, 3 uzorka vode za piće, 3 uzorka aktivnog mulja i 1 uzorak otpadnog mulja sa Postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, 4 uzorka sedimenta i 1 uzorak zemljišta (Slika 13). Uzorci su sakupljeni pod aseptičnim uslovima u sterilnu PVC ambalažu – 500 mL vode u flašama i oko 400 g čvrstih uzoraka u sterilnim vrećama. Po dolasku u laboratoriju, uzorci su skladišteni u frižideru na temperaturi od 4°C. Eksperimentalna istraživanja izvršena su u laboratoriji Katedre za ekološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Izolacija *P. aeruginosa* je izvršena metodom obogaćenja. U cilju povećanja uspešnosti izolacije, izvršeno je obogaćivanje materijala inkubacijom uzoraka (24h/37°C/ 120 rpm) u Luria-Bertani (LB) bujonu (Trypton 10 g/L, Ekstrakt kvasca 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH=7,2), pri čemu su tečni uzorci mešani u LB bujonu 1:2 (v/v), dok su čvrsti mešani u odnosu 1:9 (w/v). Nakon nakupljanja, ezom je inokulisana kap kulture na Cetrimide agaru (Merck, Nemačka). Inkubacija je trajala 24 sata na 42°C. Tipične kolonije *P. aeruginosa*, idenitifikovane na osnovu karakterističnih morfoloških karakteristika su reizolovane do dobijanja čistih kultura. Čiste kulture su dobijene metodom iscrpljivanja. Čistoća kultura je proveravana mikroskopiranjem (imerzioni objektiv, uveličanje objektiva od 100x, svetlosni mikroskop Nikon, Japan).

Primarna identifikacija do nivoa vrste je izvršena na osnovu morfoloških karakteristika rasta kolonija na Cetrimide agaru, rezultata bojenja ćelija po Gram-u i biohemijskih osobina dobijenih primenom API testa (20NE, Beiomereux, Francuska) i očitavanja na API WEB-u.

Izolovane kulture, suspendovane u LB bujonu su čuvane u 20 % glicerolu na -80°C.

Izolovane bakterije su testirane na sposobnost formiranja biofilmova, sposobnost kretanja, produkcije ramnolipida i piocijanina.

4.2. MOLEKULARNA DETERMINACIJA IZOLATA PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Genetska identifikacija i diferencijacija, tipizacija 30 izolata izolovanih iz različitih ekosistema, je izvršena modifikovanom MLST šemom za *P. aeruginosa* (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) (videti Tabelu 1, Poglavlje 2.1.1) pomoću sledećih pet housekeeping gena: Acetil koenzim A sintetaza - *acsA*, GMP sintaza - *guaA*, Protein reparacije nesparenih nukleotida - *mutL*, Fosfoenolpiruvat sintaza - *ppsA* i Antranilat sintaza, komponenta I - *trpE*.

4.2.1. Izolacija DNK

Izolati čuvani u LB bujonu u 20 % glicerolu na -80°C su zasejani na Meso-peptonski agar i inkubirani na 42°C u toku 24h da formiraju pojedinačne kolonije. Pojedinačne kolonije su inokulisane u 5 mL LB bujona i inkubirane preko noći na 37°C u orbitalnom šejkeru na 120rpm. Za izolaciju genomske DNK je korišteno 1 mL bakterijske kulture gajene preko noći uz upotrebe kita za izolaciju QIAamp DNA Mini (Qiagen, SAD), prema sledećem protokolu:

1. 1 mL bakterijske kulture je centrifugirano 5 minuta na 5.000 x g (7.500 rpm) na sobnoj temperaturi (15–25°C), nakon čega su suspendovane ćelije lizirane dodavanjem 180 µL ASL pufera.
2. Inaktivacija nukleaza i digestija proteina je izvršena sa 20 µL proteinase K u toku 2h na 56°C, nakon čega je izvršena dodatno liziranje i mešanje digestovanih proteina u rastvoru dodavanjem 200 µL pufera AL i inkubacijom 10 minuta na 70°C.
3. Precipitacija DNK je izvršena sa 200 µL etanola (96–100 %), nakon čega je suspenzija DNK prenešena u Mini spin kolonu, gde je centrifugiranjem (8.000 rpm/1 minut) izvršeno nakupljanje DNK na silika gel membrani.
4. Izolovana DNK je zatim dva puta ispirana: dodavanjem 500 µL pufera AW1 i 500 µL pufera AW2. Nakon svakog od koraka dobijeni rastvor je centrifugiran pri velikoj brzini da bi se izvršilo razdvajanje DNK od primenjenog pufera.

5. U završnoj fazi, QIAamp Mini spin kolona je premeštena u novu tubicu za prikupljanje i centrifugirana je pri punoj brzini (20.000 x g) 1 minut, kako bi se eliminisao potencijalni prenos pufera AW2, nakon čega je izolovana DNK resuspendovana u 100 µL destilovane vode, dodavanjem vode na membranu i centrifugiranjem na 6000 x g (8.000 rpm) 1 minut.
6. Izolovane DNK su skladištene na -20°C.

4.2.2. Kvantitet i čistoća DNK

Kvantifikovanje genomske DNK je izvršeno upotrebom NanoPhotometra (Implen P300, SAD), na sledeći način:

1. Koncentracija DNK je očitavana iz 2 µL miniprepa.
2. Koncentracija DNK je određena očitavanjem apsorbance uzoraka na 260 nm.
3. Čistoća izolovanih DNK je određena računanjem odnosa apsorbanci na 260 nm i 280 nm, pri čemu su za dalju analizu korišćeni samo uzorci sa vrednostima $A_{260}/A_{280} = 1,7-1,9$, koji ukazuju na "čistu" DNK, izdvojenu od proteina i drugih mogućih kontaminanata.

4.2.3. PCR amplifikacija MLST lokusa

Unutrašnji fragmenti pet odabranih housekeeping gena veličine 800 - 950 bp su amplifikovani pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR). Forward (F) i Reverse (R) prajmeri upotrebljeni za umnožavanje (Curran i sar.,2004), kao i očekivane dužine amplifikovanih fragmenata su prikazani u Tabeli 4. Za amplifikaciju odabranih gena je pripremano 50 µL reakcione smeše: 10 ng hromosomalne DNK, 0,4 µM F i R prajmera (Invitrogen, SAD), 1x PCR pufera A (Kapa Biosystems, SAD), 200 µM dNTP (deoksinukleozid trifosfata) (Kapa Biosystems, SAD) i 1,25 U *Taq* polimeraze (Kapa Biosystems, SAD). Volumen je dopunjen sa destilovanom vodom do 50 µL. PCR reakcije su se odvijale pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija 1 minut na 95°C, denaturacija 1 minut na 95°C, vezivanje prajmera 1 minut na 55°C - 61°C (u zavisnosti od gena), ekstenzija 1 minut na 72°C, 30 - 35 ciklusa (u zavisnosti od gena) i finalna ekstenzija 10

minuta na 72°C. Reakcije su izvršene u PCR aparatu (termosajkleru) (Kyratec, Australija). PCR produkti su čuvani na 4°C.

Tabela 4. Amplifikovani geni i njihova funkcija; sekvence prajmera i veličina amplifikata

Lokus	Funkcija gena	Sekvence prajmera (5'-3')		Vel amp (bp)
		PCR prajmeri		
<i>acsA</i>	Acetil koenzim A sintetaza	FW	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	842
		RW	GCCACACCTACATCGTCTAT	
<i>guaA</i>	GMP sintaza	FW	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	940
		RW	GACGTTGTGGTGCGACTTGA	
<i>mutL</i>	Protein reparacije nesparenih nukleotida (<i>mismatch repair</i>)	FW	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	940
		RW	GGTGCCATAGAGGAAGTCAT	
<i>ppsA</i>	Fosfoenolpiruvat sintaza	FW	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	989
		RW	GTATCGCCTTCGGCACAGGA	
<i>trpE</i>	Antranilat sintaza, komponenta I	FW	GCGGCCAGGGTCGTGAG	811
		RW	GGTGTCCATGTTGCCGTTCC	

Provera uspešnosti PCR reakcije je izvršena postupkom gel elektroforeze na 1 % agaroznom gelu u 1 x TBE puferu. Korišteno je 5 µL smeše PCR reakcije, koja je pre aplikacije u elektroforezi obojena (6x Loading dye, Fermentas Life Sciences GmbH, Litvanija). Za poređenje dužine dobijenih fragmenata je korištena DNK poznate dužine (1 Kb) (MassRulerTMDNA ladder, Mix, Fermentas Life Sciences GmbH, Litvanija). Umnoženi fragmenti su vizualizovani na gelu u komori pomoću UV svetla na transiluminatoru (Vilber, Francuska) i fotografisani. Pomoću fotografija gela je proveran uspeh amplifikacije specifičnog PCR proizvoda adekvatne dužine, na osnovu poređenja dobijenih fragmenata DNK sa fragmentima poznate dužine.

4.2.4. Purifikacija i sekvenciranje PCR produkata

Za prečišćavanje i sekvenciranje PCR produkata su korišćene usluge komercijalnog centra MacroGen Europe, Holandija (www.macrogen.com). Sekvenciranje (po Sanger-u, 1977) obe DNK niti purifikovanih PCR proizvoda je izvršeno na bazi BigDye Terminator kita za sekvenciranje, koristeći 25 µL produkta PCR reakcije i 10 µmol prajmera za

sekvenciranje (Tab 5). Prečišćeni uzorci su sekvencirani u automatskim genetskim analizatorima ABI3730XL i ABI3700 (Applied Biosystems, SAD).

Tabela 5. Amplifikovani geni i njihova funkcija; sekvence prajmera i veličina amplifikata za sekvenciranje

Lokus	Funkcija gena	Sekvence prajmera (5'-3')		Vel amp (bp)
		Prajmeri za sekvenciranje		
<i>acsA</i>	Acetil koenzim A sintetaza	F	GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT	390
		R	AGGTTGCCGAGGTTGTCCAC	
<i>guaA</i>	GMP sintaza	F	AGGTCGGTTCCTCCAAGGTC	372
		R	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA	
<i>mutL</i>	Protein reparacije nesparenih nukleotida (<i>mismatch repair</i>)	F	AGAAGACCGAGTTCGACCAT	441
		R	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	
<i>ppsA</i>	Fosfoenolpiruvat sintaza	F	GGTGACGACGGCAAGCTGTA	369
		R	GGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG	
<i>trpE</i>	Antranilat sintaza, komponenta I	F	TTCAACTTCGGCGACTTCCA	441
		R	CCCGGCGCTTGTTGATGGTT	

4.2.5. Analiza sekvenci

Forward (F) i Reverse (R) sekvence lokusa *ppsA*, *guaA*, *acsA*, *mutL* i *trpE* su vizualizovane pomoću softvera Finch TV (Verzija 1.4.0., Geospiza Inc.), nakon čega je izvršena detaljna vizualna inspekcija svih pojedinačnih sekvenci, u cilju potvrde njihove ispravnosti. Kako bi se utvrdilo da dobijene sekvence odgovaraju ciljanom genu *P. aeruginosa*, sve pojedinačne sekvence su upoređene sa postojećim sekvencama u bazi podataka nukleotidnih sekvenci NCBI (National Center for Biotechnology Information), koristeći BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Za svaki lokus svakog od izolata, F i R sekvence su objedinjene u konsenzus sekvencu, formiranu upotrebom BLAST aplikacije “align two sequences”, dostupnoj na NCBI web stranici. Pojedinačna nepreklapanja (odstupanja) nukleotida poravnatih F i R sekvenci su manualno ispravljena vizuelnim pregledom sekvenci. Kvalitetni nepreklapajući segmenti F odnosno R sekvence na 5' odnosno 3' kraju su upotrebljeni, u cilju dobijanja dužih konsenzus sekvenci. Za svaki od pet analiziranih lokusa, izvršeno je višestruko poravnanje (alignment) sekvenci svih izolata, koristeći hijerarhijski metod za višestruka poravnanja, koji je implementiran u ClustalW alatu u programskom paketu MEGA, verzija 8 (Tamura

i sar., 2013). Višestruko poravnate sekvence pojedinačnih lokusa svih izolata su prilepljene pomoću alata Fasta Alignment Joiner, dostupnog na http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/alignment_joiner.php#, i korišćene za dalje analize u programskom paketu MEGA, verzija 8 (Tamura i sar., 2013).

4.2.6. Tipizacija izolata pomoću MLST šeme

U MLST šemi, nukleotidne razlike među alelima nisu uzete u obzir, te su različite DNK sekvence na svakom od pet analiziranih genskih lokusa označene brojevima koji predstavljaju različite alele, nezavisno od toga da li se razlikuju u pojedinačnom nukleotidu ili na mnogim pozicijama u sekvenci. Brojevi su dodeljivani na osnovu postojećih brojeva - alela u *P. aeruginosa* MLST bazi podataka (<http://pubmLst.org/general.shtml>). Izolatima koji su okarakterisani istim alelima na svakom od analiziranih lokusa su dodeljeni isti brojevi. Aleli koji se nisu poklapali sa postojećim alelima u bazi podataka su označeni kao “novi”. Na ovaj način, svaki izolat je okarakterisan skupom od pet brojeva, koji definišu njegov alelni profil ili tip sekvenci (ST). Dobijeni alelni profili su poređeni sa onima koji su dostupni u MLST bazi podataka. Tako su proučavani izolati okarakterisani ili kao postojeći ST profil iz MLST baze podataka ili kao “novi”. Dobijeni aleli i ST profili su analizirani u pogledu njihove zastupljenosti u analiziranom uzorku sa teritorije Republike Srbije, kao i na globalnom nivou.

4.2.7. Filogenetske analize

Za filogenetske analize je korišćen programski paket MEGA, verzija 8 (Tamura i sar., 2013). Analize su izvršene koristeći kako pojedinačne genske sekvence (*ppsA*, *guaA*, *trpE*, *acsA* i *mutL*), tako i sekvence dobijene povezivanjem pojedinačnih lokusa u lanac (objedinjeni). Maximum Likelihood filogenetska stabla su kreirana upotrebom Tamura 3 modela sa 1000 bootstrap replikata. Pored genskih sekvenci dobijenih iz *P. aeruginosa* izolovanih u okviru ovog istraživanja, u filogenetske analize su uključene i sekvence svih pet lokusa poreklom iz sledećih izabranih *P. aeruginosa* sojeva: 1) kliničkog soja PAO1, danas referentnog laboratorijskog soja, koji je inicijalno izolovan iz rane pacijenta u

Australiji (pristupni broj u nukleotidnoj bazi podataka GenBank 110645304); 2) kliničkog soja PA14, danas takođe referentnog soja, koji je ExoU-pozitivan i virulentniji od PAO1 (pristupni brojevi u nukleotidnoj bazi podataka GenBank KE136335.1, KE136336.1 i CP000438.1); 3) izolata poreklom iz životne sredine, soja *P. aeruginosa* Ocean-1206 iz vode okeana (pristupni brojevi u nukleotidnoj bazi podataka GenBank 193075189, 193075053, 193075121, 189544363 i 197111284); 4) izolata poreklom iz životne sredine, soja *P. aeruginosa* Coastal-1303 iz priobalne zone okeana (pristupni brojevi u nukleotidnoj bazi podataka GenBank 193075193, 193075057, 193075125, 189544367 i 197111288); 5) izolata poreklom iz životne sredine, soja *P. aeruginosa* Pond-1540 iz vode jezera u Japanu (pristupni brojevi u nukleotidnoj bazi podataka GenBank 193075201, 193075065, 193075133, 189544375 i 197111296) i 6) izolata poreklom iz životne sredine, soja *P. aeruginosa* M18 izolovan iz rizosfere dinje u Meksiku (pristupni broj u nukleotidnoj bazi podataka GenBank 386056071). Adekvatne sekvence *Pseudomonas putida* preuzete iz NCBI baze podataka (pristupni broj 26986745) su korišćene kao out grupa u filogenetskoj analizi.

Broj polimorfnih mesta, kao i sinonimnih i nesinonimnih substitucija su određeni koristeći MEGA, verzija 8 (Tamura i sar., 2013).

4.2.8. Deponovanje nukleotidnih sekvenci

Dobijene nukleotidne sekvence će biti deponovane u centralnu bazu podataka GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

4.3. SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMOVA

Sposobnost formiranja biofilmova je testirana u trajanju od 6, 24 i 48 sati, na temperaturama od 22°C (sobna temperatura) i 37°C. Takođe je testirana sposobnost formiranja biofilmova u toku 24 sata pri različitim uslovima pH (pH 7 i pH 6) i sadržaja NaCl (1 % i 2 %), kako na 22°C tako i na temperaturi od 37°C. U svim ogledima je primenjen statički model rasta biofilmova, kolorimetrijski metod sa Kristal violetom, u

sterilnim mikrotitar pločama sa 96 otvora po modifikovanom protokolu Stepanović i sar. (2010):

1. Bunarići mikrotitar ploče su inokulisani sa 200 μ L bakterijske kulture inkubirane preko noći (na 37°C, 120 rpm), OD₆₅₀=0,3 - 0,4.
2. Nakon inkubacije, sadržaj iz bunarića je ispražnjen, i otvori isprani dva puta sa 250 μ L PBS pufera kako bi se odstranile zaostale planktonske ćelije bakterije.
3. Nakon sušenja na vazduhu, formirani biofilm je fiksiran dodavanjem 250 μ L metanola u trajanju od 15 minuta i ponovo sušen na vazduhu.
4. Bojenje formiranog biofilma je urađeno sa 200 μ L 0,4 % kristal-violetom tokom 15 minuta.
5. Boja je isprana vodom sa česme, a resuspenzija boje u biofilmu je izvršena sa 250 μ L 33 % sirćetnom kiselinom u toku 20 minuta.
6. Absorbanca je očitana na čitaču mikrotitar ploča ELx808, BioTek (SAD), na talasnoj dužini $\lambda=630$ nm.
7. Svi eksperimenti su urađeni tri puta, u tri ponavljanja, a rezultati tumačeni na osnovu srednjih vrednosti očitanih vrednosti absorbanci.

Dobijene vrednosti su upoređene sa standardnim biofilm-neprodukujućim sojem *P. aeruginosa* ATCC 27853 što je bila osnova za klasifikaciju izolata *Pseudomonas aeruginosa* na biofilm-neprodukujuće, slaboprodukujuće, srednjeprodukujuće i visokoprodukujuće sojeve prema predlogu Perez i sar., 2011. Klasifikacija sojeva je zasnovana na odnosu izmerenih vrednosti absorbance (optičke gustine, OD) izolata iz životne sredine sa vrednostima absorbance kontrolnog soja, *P. aeruginosa* ATCC 27853, na sledeći način:

OD (izolata) \leq OD (kontrole) = biofilm-neprodukujući izolat

OD (kontrole) \leq OD (izolata) \leq 2OD (kontrole) = slabo biofilm-produkujući izolat

2OD (kontrole) \leq OD (izolata) \leq 4OD (kontrole) = srednje biofilm-produkujući izolat

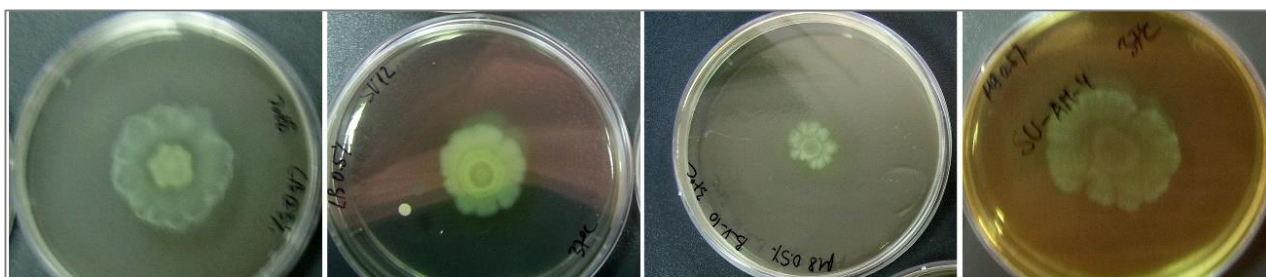
4OD (kontrole) \leq OD (izolata) = visoko biofilm-produkujući izolat.

Prema istom modelu je na osnovu dobijenih rezultata o formiranju biofilмова nakon inkubacionog perioda od 6h, data klasifikacija izolata u odnosu na potencijal formiranja

biofilмова na sledeće kategorije: nema potencijala za formiranje, slab, srednji i visok potencijal za formiranje biofilмова.

4.4. POKRETLJIVOST

Ispitivanje pokretljivosti je izvršeno na LB medijumu sa 0,1 % i 0,3 % agara za procenu pokretljivosti flagelama, na LB i M8 medijumu (obogaćenom sa 1M MgSO₄, 1M CaCl₂, 0,2 % glukoze i 0,5 % triptona) sa 0,5 % agara za procenu veličine “rojenja” i na LB medijumu sa 1 % agara za ocenu “trzajućeg kretanja”.



Slika 9. Oblici kolonija *P. aeruginosa* u testu pokretljivost

Pripremljena podloga (10 mL) je razlivena u petri kutije nakon čega je sterilisana i sušena 60 minuta u laminarnoj komori (sterilizacija UV svetlošću tokom prvih 20 minuta) (Tremblay i Deziel, 2008). Odmereno je 5 μ L kulture inkubirane preko noći (37°C/120 rpm), gustine OD₍₆₀₀₎=0,3 – 0,4 i inokulisano u centru petri kutije. Testovi su urađeni u tri ponavljanja, paralelno u uslovima 22°C i 37°C. Rezultati rasta su očitavani nakon 24 sata merenjem prečnika rasta inokuluma, kao i fotografisanjem digitalnim foto-aparatom (Slika 9).

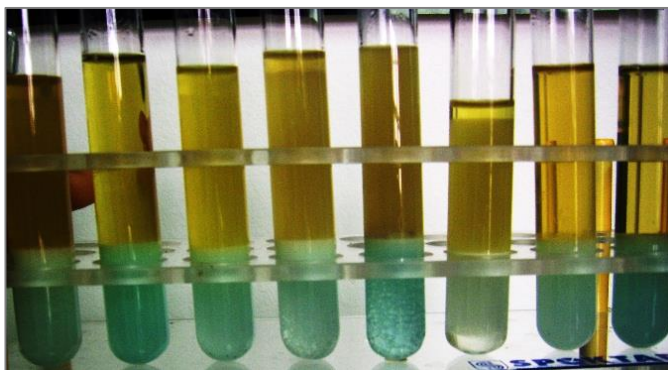
4.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE RAMNOLIPIDA

Koncentracija ramnolipida je određena Orcinol metodom opisanom Fang i sar., 2005. Odmerenih 0,5 mL supernatanta bakterijske kulture u stacionarnoj fazi rasta u koji je dodat 1 mL rastvora hloroform:etanol 2:1 (v/v) je sušeno (u sušnici na 105°C) do isparenja. Na zaostao talog je dodato 0,2 mL dH₂O i 1,8 mL rastvorenog orcinola u 53 %

H₂SO₄. Dobijena smeša je inkubirana u vodenom kupatilu na 80°C 30 minuta, a zatim ohlađena 15 minuta na sobnoj temperaturi. Absorbanca je očitavana na UV/VIS spektrofotometru (T70, PG Instruments LTD, Velika Britanija), na talasnoj dužini $\lambda=420$ nm. Merenja su urađena u tri ponavljanja, a rezultati su očitavani iz standardne krive za L-ramnozu, i pomnoženi sa koeficijentom 3,4 da bi se dobila koncentracija ramnolipida.

4.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PIOCIJANINA

Izolati *P. aeruginosa* inkubirani preko noći (37°C, 120 rpm), OD₆₀₀=1,0 su inokulisani u 25 mL LB bujona 1:100 (v/v) i inkubirani 24h na termostatorajućem orbitalnom šejkeru (Biosan ES-20, Litvanija) (200 rpm) na 37°C. Nakon inkubacije, sadržaj je centrifugiran 10 minuta na 10.000 rpm/4°C. U 7,5 mL supernatanta je dodato 4,5 mL hloroforma; sadržaj je vorteksovan pulsiranjem 10 x 2 sekunde, nakon čega hloroform menja boju u plavo-zelenu usled prisustva piocijanina (Slika 12). U cilju boljeg diferenciranja izdvojenog pigmenta, sadržaj je centrifugiran 10 minuta na 10.000 rpm/4°C, nakon čega



je plavi rastvor sa dna kivete premešten u novu epruvetu, dodato je 1,5 mL 0,2M HCl i sadržaj mešan pulsiranjem na vorteksu 10 x 2 sekunde, nakon čega plava boja rastvora prelazi u crvenu.

Slika 10. Ekstrakcija piocijanina hloroformom

Nakon centrifugiranja rastvora 2 minuta na 10.000 rpm/4°C, merena je absorbanca izdvojenog crvenog dela sadržaja na UV/VIS spektrofotometru, pri talasnoj dužini $\lambda=520$ nm. Kao slepa proba je korišćen rastvor 0,2M HCl. Sva merenja su urađena u tri ponavljanja, a rezultat je izveden iz prosečne vrednosti izmerenih absorbanci.

$$\text{konc. piocijanina} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml bakt. kulture}} \right) = Abs_{520} \times 17.072$$

4.7. ISPITIVANJE SVOJSTAVA FORMIRANIH BIOFILMOVA RAMAN SPEKTROMETRIJOM

4.7.1.1. Priprema uzorka biofilmova

Raman spektrometrijom je izvršeno snimanje uzoraka biofilmova nastalih nakon inkubacije od 24h na 37°C i 22°C u LB bujonu standardnog sastava (pH 7, NaCl 1%), kao i modifikovanom bujonu: LB pH 7, NaCl 2% i LB pH 6, NaCl 1%. Biofilmovi nastali u epruveti su sakupljeni u kivete (1,5 mL uzorka biofilma) i centrifugirani na 3.000 obr/min. u trajanju od dva minuta. Istaložena biomasa je tri puta ispirana sterilnom destilovanom vodom kako bi se odstranili ostaci bujona.

4.7.1.2. Akvizicija Ramanskih spektara

Merenja Ramanovih signala je urađeno na aparatu HORIBA Jobin Yvon Xplora (HORIBA Jobin Yvon S.A.S., Villeneuve-d'Ascq, Francuska) sa mikroskopom BX51 (Olympus, Tokyo, Japan). Ekscitacija je vršena laserom od 532 nm snage 90 mW, korišćenjem objektiva uveličanja 100x. Kao detektor je korišćena CCD kamera (Syncerity, HORIBA Scientific, Edison, New Jersey, SAD) hladena na -60°C. Uzorci su postavljeni direktno na kvarcnu mikroskopsku predmetnu pločicu i analizirani na sobnoj temperaturi. Svaki uzorak je sniman u opsegu 200 – 3.200 cm⁻¹ u trajanju od 10-30 sekundi. Svaki uzorak je snimljen 30 puta. Za komunikaciju sa uređajem korišćen je softver LabSpec 6 (Horiba Scientific, Villeneuve-d'Ascq, Francuska).

4.7.1.3. Obrada spektara

Ramanski spektri uzoraka mikroorganizama su pre poređenja obrađeni u „R“ statističkom softveru (R Development Core Team, 2014) uz korišćenje „hyperSpec“ paketa (Beleites i Sergio, 2014). Kako bi se anulirale razlike između pojedinačnih spektara nastale usled fluorescencije ili fluktuacije temperature na CCD uređaju, prvo je uklonjena pozadina

(fluorescencija) uz pomoć metode koja se zasniva na „SNIP clipping“ algoritmu (Morhač, Kliman i sar., 1997), a zatim su spektri normalizovani. Nakon toga je izdvojen spektralni opseg od 600 do 1.800 cm^{-1} i od 2.600 do 3.150 cm^{-1} koji je korišćen za dalje poređenje.

4.8. IZOLACIJA I DETERMINACIJA BAKTERIOFAGA

Izolacija bakteriofaga je izvršena iz uzoraka zemljišta, sedimenta i vode. Za izolaciju su korišteni isti uzorci kao za izolaciju bakterije domaćina - *P. aeruginosa*.

4.8.1. Izolacija faga

Izolacija bakteriofaga je urađena metodom dvostrukog agara kojoj je predhodila metoda obogaćenja (Adams, 1959; Carlson, 2005; Knežević i sar., 2009), obzirom da je njihov broj u prirodi relativno mali. Homogenizacija uzoraka je izvršena centrifugiranjem na 8000 x g 15 minuta. Tečni uzorci su centrifugirani direktno, dok su čvrsti predhodno resuspendovani u fosfatnom (PBS) puferu (8,1 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,61 g/L Na_2HPO_4 , 0,2 g/L KH_2PO_4 , pH 7) u odnosu 1:9. Nakon toga, uzorci su inkubirani u duploj koncentraciji LB bujona (1:1 v/v) sa 0,1 mL bakterijske ćelije (domaćina) u ekspanencijalnoj fazi rasta u toku 24h na 35°C u orbitalnom šejkeru (120 rpm). Nakon završene inkubacije, dezintegracija bakterijskih ćelija-domaćina i separacija ćelijskih ostataka je izvršena dodavanjem hloroforma do 2 % finalne koncentracije i centrifugiranjem 11.000 x g 10 minuta, nakon čega su oslobođeni bakteriofagi izolovani iz uzorka metodom plaka, odnosno dvostrukog agara.

Ovaj metod podrazumeva primenu dva sloja hranljivih agara: donji sloj, sa 1,5 – 2 % agara razliven u petri kutijama (po 10 mL) na koji se nanosi gornji sloj („soft“ ili „top“ agar) koji sadrži 0,7 % agara. Kao hranjivi medijum je korišćen Trypton agar (1 g/L triptona, 0,1 g/L ekstrakta kvasca, 0,1 g/L glukoze, 0,8 g/L NaCl, 0,022 g/L CaCl_2 , pH 7,2). U 4 mL istopljenog i do 46°C ohlađenog „top“ agara je dodato 100 μL bakterije domaćina (suspendovane u LB bujonu, u ekspanencijalnoj fazi rasta, $\approx 10^9$ cfu/mL) i 100 μL suspenzije faga. Nakon kratkog mešanja među prstima, ova smeša je nanosena i kružnim pokretima ravnomerno raspoređena preko donjeg sloja agara. Inkubacija je

vršena na 37°C u toku 24 sata, nakon čega je registrovana pojava sitnih prosvetljenih zona “plakova” kojima je potvrđeno prisustvo bakteriofaga (specifičnih za upotrebljenu bakteriju domaćina) u uzorku. U cilju dobijanja „čiste“ kulture bakteriofaga izvršena je uzastopna reizolacija pojedinačnih, dominantno zastupljenih morfološki istovetnih plakova. Pojedinačni plak je zahvatan petljom mikrobiološke eze i resuspendovan u 1 mL obogaćenog Tripton bujona (10 g/L triptona, 1 g/L ekstrakta kvasca, 1 g/L glukoze, 8 g/L NaCl, 0,022 g/L CaCl₂, pH 7,2). Reizolacija je ponovljena tri puta, nakon čega se smatra da su na Petri kutiji prisutni samo plakovi koji potiču od istog virusa.

4.8.2. Propagacija i purifikacija faga

4.8.2.1. Propagacija bakteriofaga

Propagacija je urađena na čvrstim podlogama (Sambrok i Russell, 2001). U cilju propagacije, tj. umnožavanja bakteriofaga, bakteriofagi su zasejani u 40 - 50 ponavljanja, metodom dvostrukog agara. Nakon inkubacije, u petri kutije je dodavano 5 mL SM pufera i nakon kratke inkubacije na sobnoj temperaturi, fagi suspendovani u puferu, kao i fagi u top agaru su prenešeni u sterilnu kivetu, nakon čega je suspenzija faga dalje prečišćavana i koncentrovana.

4.8.2.2. Prečišćavanje i koncentrovanje izolovanih bakteriofaga

Izolovani fagi su prečišćeni metodom po Sambrooku i Russelul (2001). Suspenzija faga je prvo centrifugirana na 11.000 x g tokom 10 minuta na 4°C, nakon čega je supernatant sa fagima profiltriran kroz filtre pora 0,47 µm (Minisart, Sartorius) u sterilne erlenmajer posude. Precipitacija faga je izvršena dodavanjem 1M NaCl i 10 % (w/v) polietilen glikola 8.000 (PEG8000) u suspenziju faga, koja je nakon toga razlivena u kivete. Kivete su inkubirane na ledu u frižideru preko noći, a potom su precipitirani fagi istaloženi centrifugiranjem na 11.000 x g 10 minuta na 4°C. Dobijeni supernatant je odliven, a talog faga u PEG8000 je resuspendovan u SM puferu (približno 0,2 ml za svakih 50 ml supernatanta). Dalje prečišćavanje faga je izvršeno izopikničkim ultracentrifugiranjem u

gradijentu CsCl-a. Različite koncentracije CsCl-a pripremljene su u SM puferu (Tabela 6).

Tabela 6. Priprema različitih koncentracija CsCl-a za ultracentrifugiranje u gradijentu gustine

Gustina (g/cm ³)	CsCl (g)	SM pufer (mL)
1,33	11	23,42
1,45	15	21,25
1,5	16,75	20,5
1,7	23,75	18,75

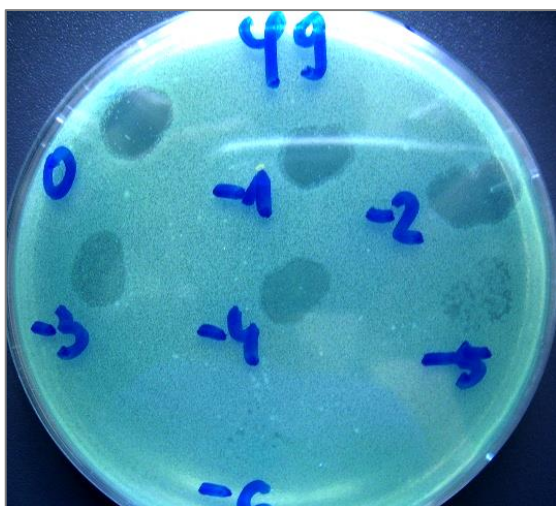
Gradijent CsCl-a je pripreman tako da zauzima 60 % zapremine prozirnih kiveta od polikarbonata. Na samom dnu gradijenta se nalazio rastvor najveće gustine, zatim 1,5 g/cm³, zatim 1,45 g/cm³ a na vrhu 1,33 g/cm³. Na površinu gradijenta dodavana je suspenzija faga sa CsCl-om (0,75 g/mL), tako da se slojevi ne izmešaju. Centrifugiranje je vršeno na 20.000 rpm u toku 6 sati na 4° C upotrebom rotora Beckman SW27. Nakon centrifugiranja, trake sa koncentrovanim virusima su pokupljene pomoću šprica i igle i potom su prebačene u sterilne polikarbonatne kivete.

Na ovaj način dobijene prečišćene i purifikovane suspenzije virusnih partikula (oko 4ml) su dijalizirane u 8 litre SM pufera tokom 48 sati u cilju uklanjanja CsCl-a

Sve aktivnosti vezane za prečišćavanje i koncentrovanje bakteriofaga su realizovane na Katedri za mikrobiologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Departmana za biologiju i ekologiju, Univerziteta u Novom Sadu.

4.8.2.3. Određivanje brojnosti faga

Broj faga (titar faga) je određen „spot test“ metodom dvostrukog agara (Bozzola i Russell, 1998; Carlson, 2005): Na 10 mL predhodno u Petri kutije razlivenog donjeg agara je ravnomerno nanešeno 4 mL istopljenog i do 46°C ohlađenog “top” agara u koga je dodato 100 µL bakterije domaćina u eksponencijalnoj fazi rasta. Nakon agarizacije goornjeg sloja, aplicirano je po 10 µL suspenzije faga. Primenjena je serija razblaženja faga

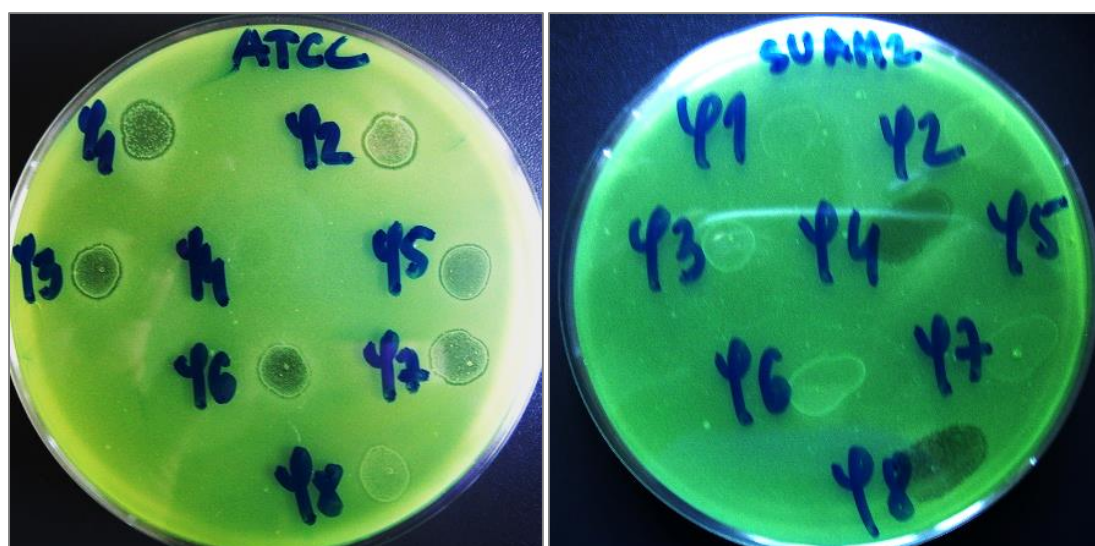


Slika 11. Određivanje titra faga $\phi 9$ metodom "spot testa"

(10^{-1} - 10^{-6}) u PBS puferu, kako bi se mogli uočiti i prebrojati pojedinačni plakovi (Slika 11). Prebrojavanje je izvršeno nakon inkubacije od 24h, a broj izražen kao PFU/mL (plaque forming units), uzimajući u obzir veličinu primenjenog razblaženja.

4.8.3. Određivanje litičkog spektra faga

Osetljivost različitih izolata *P. aeruginosa* prema različitim fagima je testirana metodom plaka, „spot testom“ (spot metodom). Testirani izolati bakterija su dodavani u „top agar“ a zatim je nanošeno po 10 μ L suspenzije faga na površinu. Nakon inkubacije (24h/37°C) su pregledane zone na kojima su aplicirani fagi (Slika 12). Rezultati su izraženi simbolima: ++ što označava bistru zonu plaka, + označava mutnu zonu plaka, 0 nije došlo do formiranja plaka. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta.



Slika 12. Litičko delovanje bakteriofaga metodom „spot testa“

4.8.4. Karakterizacija izolovanih bakteriofaga

4.8.4.1. Morfologija plakova

Morfologija plakova je opisana nakon pregleda pojedinačnih plakova i njihovog izgleda (oblika, veličine, prozračnosti i prisustva oreola) na podlozi (Trypton agaru) u Petri kutijama nakon zasejavanja suspenzije faga metodom dvostrukog agara. Oblik i prozračnost (“bistri”, “mutni”) su dati opisno, dok je veličina određena merenjem u mm.

4.8.4.2. Izgled bakteriofaga na elektronskom mikroskopu

Morfološke karakteristike faga su posmatrane pomoću transmisione elektronske mikroskopije kako bi se odredila taksonomska pripadnost izolovanih faga. Priprema preparata je vršena prema protokolu Bozzola i Russell (1998); Carlson (2005) za negativno bojenje. Kap suspenzije faga koncentracije 10^9 - 10^{10} pfu/mL je nanešena na formvarom obloženu bakarnu mrežicu od 400 mesh-a, fagi su adsorbovani 5 min, višak tečnosti je uklonjen i fagi su potom kontrastirani sa 0,5 % uranil acetata u trajanju od 1 minuta. Fagi su posmatrani i fotografikonisani Philips CM12 transmisionim elektronskim mikroskopom pri naponu od 80 kV na Institutu za zoologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

4.8.4.3. Određivanje karakteristika genoma izolovanih bakteriofaga

U cilju izolacije DNK iz viriona, suspenzija faga prečišćena u gradijentu CsCl-a tretirana je DNK-zom i RNK-zom na 37°C u toku 1 sata kako bi se uklonila celokupna bakterijska DNK koja je zaostala nakon prečišćavanja suspenzije faga. Po završetku inkubacije, DNK-za je inaktivisana na 65°C u toku jednog časa i kratkotrajnom inkubacijom u frižideru. Izolacija DNK iz bakteriofaga vršena je nakon razaranja kapsida primenom EDTA (finalna koncentracija 20 mM), proteinaze K (finalna koncentracija 50 µg/mL) i SDS-a (finalna koncentracija 0,5 %). Smeša je inkubirana 1 čas na 56°C, prohlađena i

tretirana ekvilibrisanim fenolom (v/v 1:1) nakon čega je smeša centrifugirana na 3.000 x g u toku 5 minuta na sobnoj temperaturi. Vodena faza izdvojena u gornjem sloju kivete je prenetu u novu kivetu i tretirana jednakim volumenom smeše fenola i hloroforma (v/v 1:1). Smeša je ponovo centrifugirana (3.000 x g, 5 minuta), a vodena faza je prenetu u nove kivete i tretirana istim volumenom hloroforma (Sambrook i Russell, 2001). Nakon centrifugiranja, vodena faza je ponovo prenetu u nove kivete. Precipitacija DNK je izvršena pomoću etanola (96 %), uz dodatak natrijum acetata (do 1/10 zapremine). Ova smeša je inkubirana 30 minuta na -20°C, nakon čega je DNK razdvojena od tečne faze centrifugiranjem na 10.000 x g u toku 5 minuta na 4°C. Pelet ostao nakon centrifugiranja je ispran sa 70 %-nim etanolom, a zatim smeša ponovo centrifugirana 10.000 x g, 20 minuta na 4°C. Supernatant je odbačen, a talog tj. izdvojena DNK osušena na sobnoj temperaturi i rastvorena u TE puferu (pH 7,6).

Izolovana DNK je tretirana restrikcionim enzimima u cilju određivanja veličine genoma i utvrđivanja klonalne različitosti faga. U Tabeli 7 je dat prikaz korišćenih enzima. Restrikcija endonukleazama je vršena tako što je DNK prema preporuci proizvođača pomešana sa odgovarajućim dilucionim puferom za digestiju, vodom i preporučenom koncentracijom enzima (1 U/mL). Nakon inkubacije DNK fragmenti su razdvojeni agarozu gel elektroforezom na 1,5 % gelu sa etidijum bromidom, nakon čega su gelovi izloženi UV zracima u cilju vizuelizacije dobijenih traka i fotografisani.

Tabela 7. Restrikcioni enzimi korišćeni u radu

Restrikcioni enzim	Restrikciono mesto	Proizvođač
EcoR I	5'... G↓AATTC ...3'	Thermo Scientific, Litvania
EcoR V	5'... GAT↓ATC ...3'	Thermo Scientific, Litvania
Dra I	5'... TTT↓AAA ...3'	Thermo Scientific, Litvania
BamH I	5'... G↓GATTCC ...3'	Thermo Scientific, Litvania
Hind III	5'...A↓AGCTT ...3'	Thermo Scientific, Litvania
Xba I	5'... T↓CTAGA ...3'	Thermo Scientific, Litvania

G - guanin, A - adenin, T - timin, C - citozin

Analize su urađene na Katedri za mikrobiologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Departmana za biologiju i ekologiju, Univerziteta u Novom Sadu.

4.8.4.4. Određivanje proteinskog profila bakteriofaga

Proteinski profil faga određen je metodom SDS-PAGE (natrijumdodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza) (Laemmil, 1970). U prvoj fazi, iz faga prečišćenih u gradijentu gustine CsCl-a je izvršena ekstrakcija proteina ledenim metanolom i hloroformom. Smeša koja sadrži suspenziju faga, metanol i hloroform u odnosu 1:1:0,75 je centrifugirana na 10.000 x g, 10 minuta na 4°C. U gornjem sloju izdvojen hloroform sa puferom je uklonjen, a proteini koncentrisani u sredini kivete su tretirani sa istom zapreminom metanola. Nakon centrifugiranja, izdvojeni talog je zadržan, dok je metanol izdvojen u gornjem delu odbačen. Ovaj korak je ponovljen još jednom, nakon čega je stvoreni pelet rastvoren u 20 µL SDS-PAGE puferu sa beta-merkaptetanolom.

Nakont toga su uzorci prokuvani 10 minuta, a zatim stavljeni na 12,5 % w/v poliakrilamid razdvajajući gel na 15 V/cm u toku 100 minuta u puferu (Tris-HCl 0,25 mol/L, glicin 0,19 mol/L, SDS 0,1 % w/v, APS 10 % w/v, pH 8,65). U cilju utvrđivanja molekulske mase proteina je korišćen proteinski marker sa preteinima različitih molekulskih masa. Gelovi su nakon elektroforeze obojeni bojom Coomassie Brilliant Blue R, a zatim obezbojeni. Gelovi sa proteinskim trakama su uslikani i molekulska masa glavnog proteina kapsida je izračunata preko krive konstruisane na osnovu dužine pređenog puta u odnosu na pređeni put proteina iz markera poznate molekulske mase.

Analize su urađene na Katedri za mikrobiologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Departmana za biologiju i ekologiju, Univerziteta u Novom Sadu.

4.8.5. *Određivanje krive rasta bakteriofaga*

Kriva rasta bakteriofaga je urađena metodom "one step growth" (Carlson, 2005): 5 mL suspenzije bakterija u ekspanzionalnoj fazi rasta ($\approx 10^9$ cfu/mL) je pomešano sa 5 mL suspenzije faga ($\approx 10^8$ pfu/mL), tako da odnos čestica faga i bakterija bude približno 0,1. Suspenzija je inkubirana na 37°C u vodenom kupatilu. Svakih deset minuta je uzimano 1 mL suspenzije, tretirano sa 2 kapi hloroforma, razblaženo do 10^{-3} u PBS puferu i zasejavano metodom dvostrukog agara. Nakon 24h inkubacije na 37°C plakovi na površini Petri kutije su prebrojeni i rezultati predstavljeni grafički.

4.9. ISPITIVANJE DELOVANJA BAKTRIOFAGA NA RAST BIOFILMA I FORMIRANI BIOFILM

Ispitivanje delovanja bakteriofaga na formiranje biofilma je urađeno kolorimetrijskom metodom (bojenjem Kristal violetom) u mikrotitar pločama, prema delimično modifikovanoj proceduri Knežević i Petrović (2008). Eksperimentalno je testiran uticaj faga na formiranje biofilma, kao i na već formirani biofilm u različitim uslovima sredine: pH 7/NaCl 1 %; pH 6/NaCl 1 % i pH 7/NaCl 2 %, i pri različitim uslovima temperature: na 37 i 22°C u trajanju 24 sata. Kao medijum je korišten LB bujon, koji je za potrebe eksperimenta izmenjen (pH 6 i koncentracija NaCl 2 %) u kome su testirani izolati bakterija inkubirani do $OD_{600}=0,3$ ($\approx 10^9$ cfu/mL).

U cilju ispitivanja delovanja faga na proces formiranja biofilma u bunarić mikrotitar ploče je istovremeno aplicirano 100 μ L suspenzije odabranog izolata bakterije ($\approx 10^9$ cfu/mL) u eksponencijalnoj fazi rasta i 100 μ L suspenzije (u SM puferu) odabranog faga ($\approx 10^9$ pfu/mL), dok su za ispitivanje uticaja faga na formirani biofilm odabrani bakterijski izolati inkubirani 24h u mikrotitar pločama, nakon čega je sadržaj iz bunarića ispražnjen, formirani biofilm ispran sa 250 μ L PBS pufera, a u bunariće je zatim dodata suspenzija faga (200 μ L, $\approx 10^9$ pfu/mL) i ploče vraćene na inkubaciju. Paralelno, u bunarićima ploče je praćen rast i formiranje biofilma testiranih izolata bakterija, koji je služio kao kontrola u odnosu na koju je izvršena procena uticaja delovanja faga.

Nakon završene inkubacije, izvršena je priprema (ispiranje, sušenje, fiksiranje i bojenje) i merenje formirane biomase na predhodno opisan način, za kvantifikaciju biofilмова kolorimetrijskom metodom sa Kristal violetom.

Eksperimenti su postavljeni u triplikatu i ponovljeni tri puta.

Rezultati delovanja bakteriofaga su izraženi procentualno (odstupanje veličine biomase tretiranih biofilмова u odnosu na kontrolne biofilmove) i predstavljeni grafički.

4.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Osnovna statistička obrada podataka i utvrđivanje korelativnih odnosa je urađeno u softverskom paketu Microsoft Office Excel 2013. Za utvrđivanje statističke razlike korišten je neparametarski test Kruskal-Wallis.

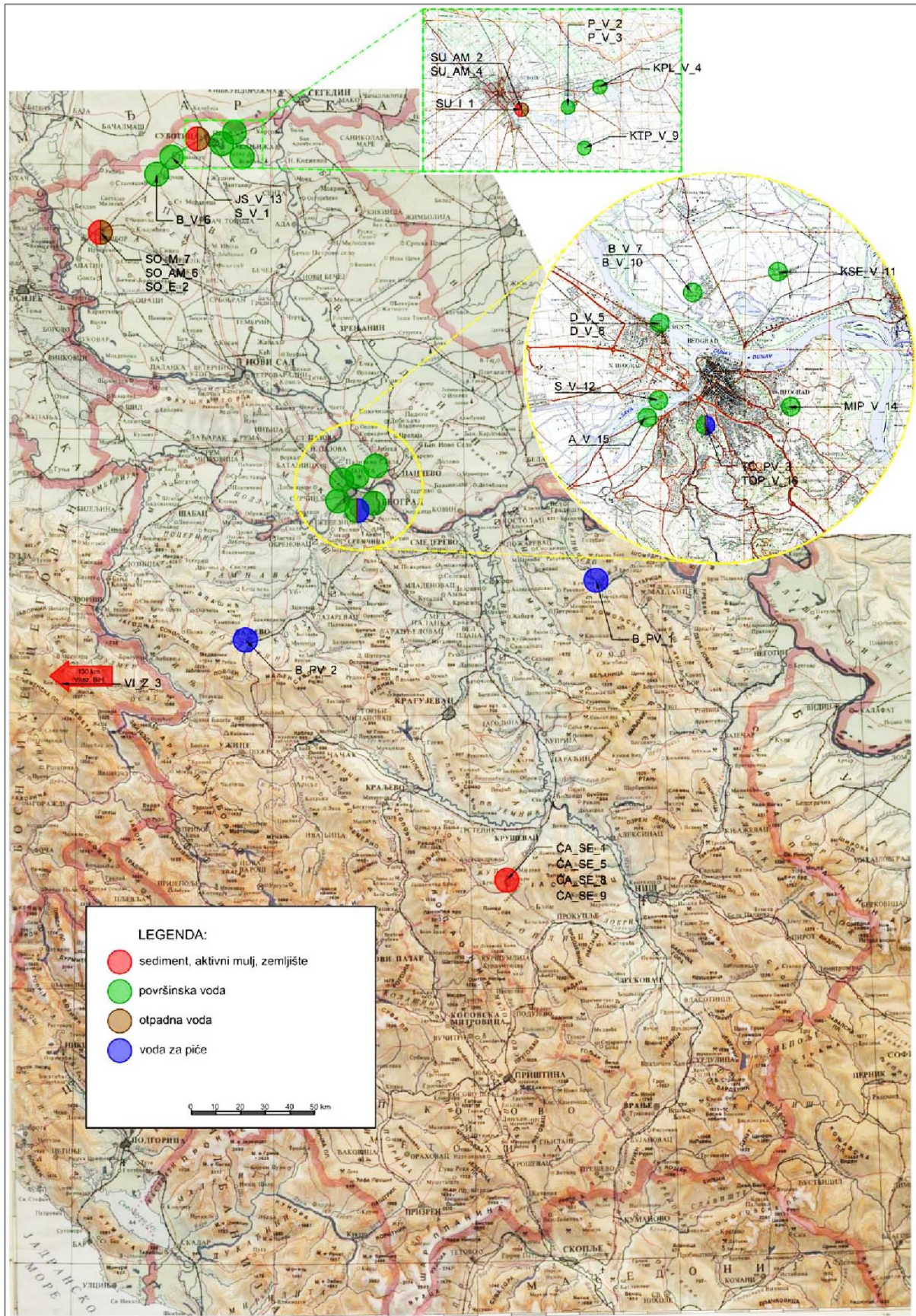
5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. IZOLACIJA I DETERMINACIJA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

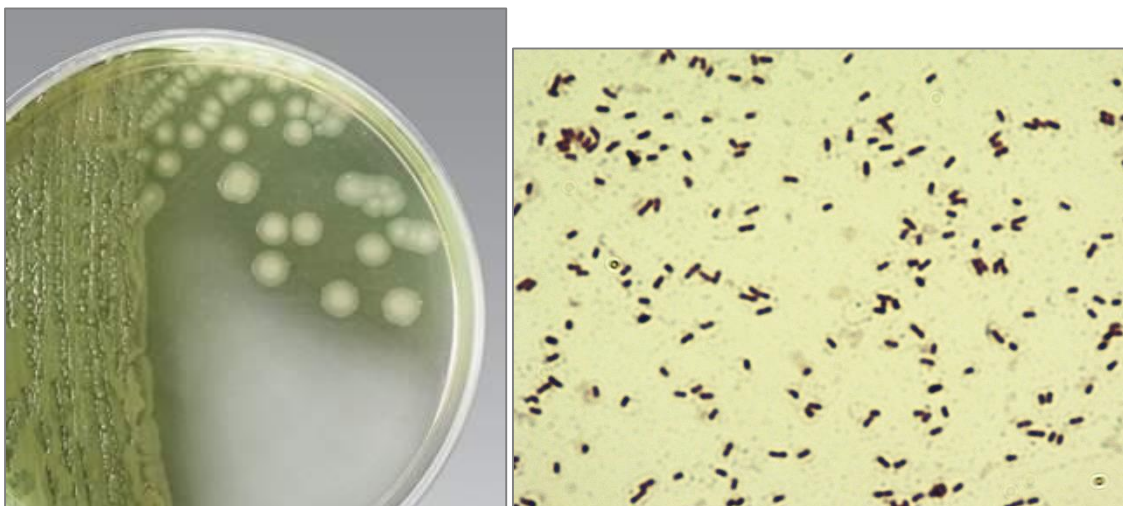
U ovom radu je oformljena kolekcija od 30 izolata bakterije *Pseudomona aeruginosa* koji su poreklom iz životne sredine, sa sledećih lokaliteta: tri izolata iz uzoraka vode za piće, 16 izolata iz površinskih voda, po jedan izolat iz sirove i prečišćene otpadne vode, tri izolata iz aktivnog mulja i jedan iz otpadnog mulja sa postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, jedan izolat iz obradiovg zemljišta i četiri uzorka iz sedimenta akumulacije vode za piće (Slika 13, Prilog 1).

Primarna identifikacija izolata je izvršena do nivoa vrste na osnovu izgleda kolonija na Cetrimid agaru, nakon inkubacije na 42°C u toku 24 sata, reakcije bojenja po Gram-u, oblika ćelija i rezultata dobijenih primenjenim API 20NE (Beiomereux, Francuska) testom i očitavanja na APIWEB-u.

Tipične kolonije su bile dijametra 3 - 5 mm, jasnih ivica, sjajne površine i sluzave konzistencije. Kolonije su plavo-zelene boje (Slika 14). i prijatnog mirisa cveta lipe. Nakon bojenja po Gramu, uočeno je da su pojedinačne ćelije Gram-negativne, štapićastog oblika (Slika 14). Očitavanjem rezultata reakcija API testa, utvrđeno je da izolovane bakterije pripadaju vrsti *P.aeruginosa*, sa preciznošću od 95,8 – 99,9 % (Tabela 8).



Slika 13. Lokaliteti uzimanja uzoraka za izolaciju bakterija



Slika 14. Izgled kolonija *P. aeruginosa* na Cetrimid agaru (levo); Gram-negativni štapići SU_AM_2 izolata *P. aeruginosa* (desno)

Tabela 8. Sličnosti izolata *Pseudomonas aeruginosa* prema rezultatima API testa

IZOLATI	API WEB <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%)	IZOLATI	API WEB <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%)
ČA_SE_1	99,9	B_PV_1	99,9
ČA_SE_5	98,9	KSE_V_11	96,7
P_V_2	99,9	S_V_12	96,7
P_V_3	96,7	JS_V_13	96,7
KPL_V_4	99,9	SU_AM_4	99,9
SU_I_1	99,9	MIP_V_14	96,5
SU_AM_2	99,3	A_V_15	99,9
VI_Z_3	96,7	SO_E_2	99,9
S_V_1	99,3	SO_AM_6	98,9
D_V_5	96,7	B_PV_2	99,9
B_V_6	99,0	TC_PV_3	96,7
D_V_8	96,7	TOP_V_16	99,4
B_V_7	99,9	SO_M_7	99,9
KTP_V_9	96,7	ČA_SE_8	99,4
B_V_10	96,7	ČA_SE_9	97,5

Svi izolati su bili oksidaza i katalaza pozitivni, negativni na indol produkciju triptofana i acidifikaciju glukoze a pozitivni na arginin dehidrogenazu, eskulin dihidrogenaza negativni i želatin hidroliza pozitivni. Svi testirani izolati su bili sposobni da oksiduju D-glukozu, D-manitol, glikonat, L-malat i usvajaju citrat, a nisu imali sposobnost fermentacije L-arabinose, D-manoze i maltoze.

5.2. TIPIZACIJA I STRUKTURA POPULACIJE IZOLOVANIH *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Analiza populacione strukture i međusobnih odnosa izolata *Pseudomonas aeruginosa* iz životne sredine je urađena tipizacijom izolata pomoću MLST šeme, kao i filogenetskim analizama.

MLST (Multilocus sequence typing) analiza je relativno nov pristup u analizi bakterijskih sojeva unutar vrsta, a bazira se na analizi sedam housekeeping gena, jer se smatra da su razlike među ovim genima dovoljno informativne da mogu da prikažu razlike i među najrodnijim sojevima (Khan i sar., 2008). Kao što je ranije navedeno, ovom analizom se vrši upoređivanje nukleotidnih sekvenci, pri čemu se svaka razlika među sekvencama (kako u jednom, tako i u više nukleotida) označava dodeljivanjem drugačijeg alelnog broja. Kombinacija sedam alelnih brojeva, koji se odnose na analizirane gene, čini alelni profil analiziranog izolata, koji se zatim poredi sa profilima iz MLST baze podataka (<http://pubmlst.org/general.shtml>), a koja objedinjuje patogene i sojeve iz životne sredine.

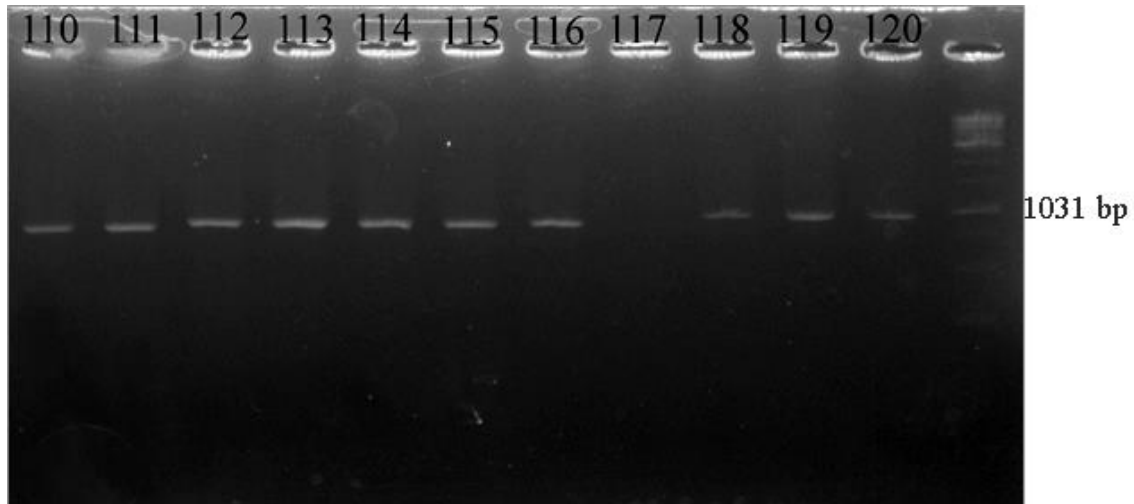
Prema saznanjima autora, u Srbiji do sada nije izvršena tipizacija i analiza populacija *Pseudomonas aeruginosa*, kako iz životne sredine, tako i izolata iz kliničke prakse, što je upravo bio jedan od osnovnih motiva za ovo istraživanje. U predstavljenoj studiji je analizirano 30 *Pseudomonas aeruginosa* izolata iz životne sredine sa teritorije Republike Srbije, na osnovu pet (*acsA*, *guaA*, *ppsA*, *mutL* i *trpE*), od sedam postojećih MLST markera. Dobijeni rezultati su upoređivani sa onima dostupnim u bazi podataka, u cilju opisivanja *P. aeruginosa* populacija iz Srbije, kao i dobijanju informacija o stepenu sličnosti bakterijskih populacija poreklom iz različitih staništa i geografskih lokacija. Posebno je važan doprinos u mogućnosti poređenja analiziranih delova genoma izolata iz životne sredine sa relevantnim genskim sekvencama kliničkih izolata, jer je otvoreno pitanje da li klinički (patogeni) sojevi *P. aeruginosa* čine subpopulaciju unutar populacije *P. aeruginosa* (Grosso-Becerra i sar., 2014). Naime, neka od dosadašnjih istraživanja ukazuju na veliku sličnost izolata *P. aeruginosa* poreklom iz životne sredine, sa kliničkim sojevima, izazivačima bolesti, kako na molekularnom nivou, tako i u pogledu njihove virulencije i otpornosti na antibiotike. Ipak, zbog velikog značaja ove bakterije,

istraživanja poput ovog nastavljaju da budu veoma aktuelna, posebno kada se radi o istraživanjima izolata iz životne sredine, koja su manje zastupljena u literaturi. U prilog ovoj činjenici govori i podatak da je od 55 do sada sekvenciranih genoma *P. aeruginosa* dostupnih u NCBI bazi podataka, veoma mali broj izolata iz životne sredine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/187>).

Dodatno, koristeći MLST sekvence, u radu je predstavljena i filogenetska analiza 30 *P. aeruginosa* izolata iz Srbije. Filogenetska analiza omogućava razmatranje evolutivne istorije i odnosa između izolata. Evaluacijom dobijenih genskih sekvenci prema izabranom modelu njihove evolucije (u ovom radu je korišćen Tamura 3 model koji je naročito pogodan za analizu genoma bogatih GC parovima, kakav je genom *P. aeruginosa*), Maximum Likelihood metodom su dobijeni filogenetski podaci kojima se procenjuju odnosi među DNK molekulima (tzv. genska stabla bazirana na informacijama dobijenim sa pojedinačnih lokusa). Takođe, ovom metodom se generišu hipoteze o međusobnom evolutivnom odnosu izolata (filogenetsko stablo zasnovano na svim analiziranim lokusima – tzv. concatenated ili objedinjena sekvenca).

5.2.1. Izolacija i amplifikacija izolovane DNK

U prvom koraku analize, izvršena je izolacija hromozomske DNK 30 izolata *Pseudomonas aeruginosa* poreklom iz uzoraka iz životne sredine, nakon čega je izvršena amplifikacija unutrašnjih segmenata pet odabranih gena (*acsA*, *guaA*, *ppsA*, *mutL* i *trpE*). Uspešnost umnožavanja željenih genskih segmenata je proveravana pomoću gel elektroforeze, vizuelnim upoređivanjem amplifikovanih fragmenata naspram standarda poznate dužine (Slika 15). Nakon vizuelne potvrde o dobijanju ispravnih amplifikovanih fragmenata DNK na gelu (Slika 15), PCR produkti su poslani na dalju obradu DNK, prečišćavanje i sekvenciranje.



Slika 15. Amplifikovani fragmenti *trpE* gena (kolone 110,111), *acsA* gena (kolone 112,113,11,115,116) i *guaA* gena (kolone 118,119,120), očekivane dužine 811 bp (*trpE*), 842 bp (*acsA*), 940 bp (*guaA*), razdvojeni gel elektroforezom i upoređeni sa standardom (1 Kb DNK marker, MassRulerTMDNA ladder, Mix, Fermentas Life Sciences GmbH, Litvanija).

Kolona 117 – nije dobijen očekivani produkt zbog neodgovarajućih uslova reakcije

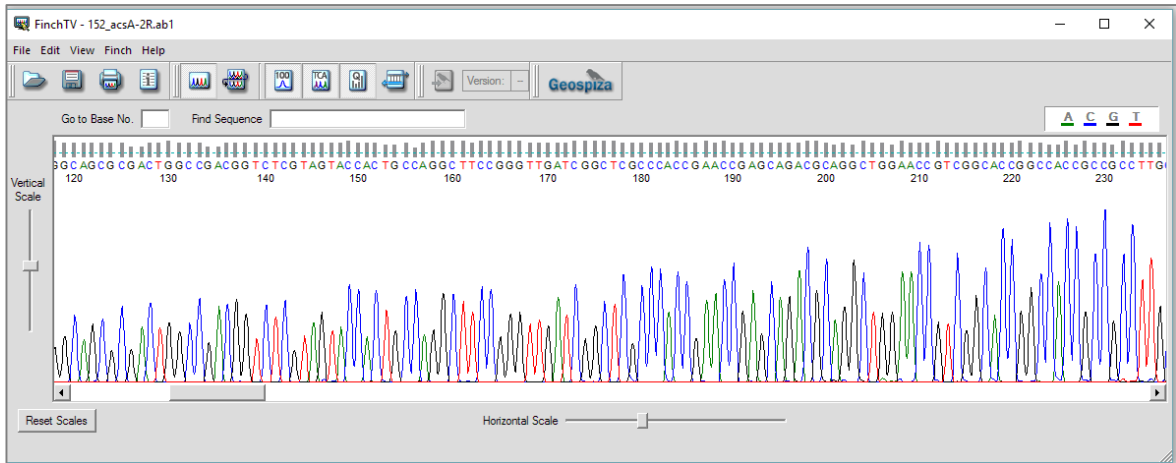
Precizni podaci o uspešno amplifikovanim genskim lokusima za svaki izolat su prikazani u Tabeli 9.

Tabela 9. Testirani izolati i amplifikovani lokusi koji su korišteni u MLST analizi

Izolati <i>P. aeruginosa</i>	Amplifikovani lokusi	Izolati <i>P. aeruginosa</i>	Amplifikovani lokusi
ČA_SE_1	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA</i>	B_PV_1	<i>acsA, guaA, ppsA, trpE</i>
ČA_SE_5	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>	KSE_V_11	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>
P_V_2	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>	S_V_12	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>
P_V_3	<i>acsA, guaA, mutL, trpE</i>	JS_V_13	<i>acsA, mutL, ppsA, trpE</i>
KPL_V_4	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>	SU_AM_4	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>
SU_I_1	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>	MIP_V_14	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>
SU_AM_2	<i>acsA, mutL, ppsA, trpE</i>	A_V_15	<i>acsA, guaA, ppsA, trpE</i>
VI_Z_3	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>	SO_E_2	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>
S_V_1	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>	SO_AM_6	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>
D_V_5	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>	B_PV_2	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>
B_V_6	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>	TČ_PV_3	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>
D_V_8	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>	TOP_V_16	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>
B_V_7	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>	SO_M_7	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>
KTP_V_9	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>	ČA_SE_8	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>
B_V_10	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>	ČA_SE_9	<i>acsA, guaA, mutL, ppsA, trpE</i>

5.2.2. Analiza DNK sekvenci

Ukupno je dobijeno 288 DNK sekvenci koje reprezentuju 144 izolat-lokus para, sekvenciranih u oba smera i to: 30 *acsA*, 28 *guaA*, 28 *mutL*, 29 *ppsA* i 29 *trpE*, koje su pojedinačno pregledane u programskom paketu FinchTV (slika 16).



Slika 16. Izgled sekvence izolata VI_Z_3 na lokusu *acsA*

Karakteristike ispitivanih lokusa su date u Tabeli 10. Sadržaj G+C parova je bio visok i kretao se od 63,6 % (*ppsA*) do 67,2 % (*acsA*). Poznato je da je genom *P. aeruginosa* bogat G+C nukleotidima; o visokom G+C sadržaju referišu i Maatallah i sar. (2011), navodeći vrednosti od 63 % (*nuoD*) do 70 % (*aroE*). Broj polimorfnih mesta se kretao od 14 % do 21,5 %, dok je za objedinjenu sekvencu iznosio 12,9 %.

Tabela 10. Karakteristike analiziranih *housekeeping* gena testiranih izolata *P. aeruginosa*

Lokus	Dužina	Broj polimorfni mesta	Sadržaj GC (%)
<i>acsA</i>	573	95	67,2
<i>guaA</i>	844	130	66,2
<i>mutL</i>	452	97	66,5
<i>ppsA</i>	704	99	63,6
<i>trpE</i>	633	113	64,8
objedinjen	3206	413	

5.2.3. Tipizacija izolata pomoću MLST šeme

Za svaki analizirani lokus, dobijene nukleotidne sekvence svih izolata su unete u MLST bazu podataka (<http://pubmLst.org/general.shtml>) pomoću funkcije “batch sequence query”, gde su poređene sa svim ostalim dostupnim sekvencama u cilju očitavanja alela. Dodeljeni brojevi koji reprezentuju alelne varijante na svakom lokusu su predstavljeni u Tabeli 11. Novi aleli, koji nisu prethodno opisani u MLST bazi podataka, nisu pronađeni u analiziranoj populaciji izolata iz Srbije.

Tabela 11. Alelni brojevi za pojedinačne lokuse i alelni profili kreirani u MLST analizi

Izolat	acsA	guaA	mutL	ppsA	trpE	ST (alelni profil)
AV15	134	57	*	6	3	Mogući: NOV 1
BPV1	4	16	*	6	3	Mogući: 109, 253, 540, 828, 1571, 1619, 2093, 2250 ili 2251
BPV2	134	57	3	6	3	NOV 1
BV10	134	57	3	6	3	NOV 1
BV6	134	57	3	6	3	NOV 1
BV7	134	57	3	6	3	NOV 1
CASE1	5	11	28	20	*	Mogući: NOV 2
CASE5	5	11	28	20	5	NOV 2
CASE8	5	57	13	4	3	NOV 3
CASE9	5	11	28	20	5	NOV 2
DV5	11	5	29	4	3	NOV 4
DV8	25	11	3	38	7	NOV 5
JSV13	134	*	3	6	3	Mogući: NOV 1
KPLV4	11	6	18	15	19	487
KSEV11	134	57	3	6	3	NOV 1
KTPV9	134	57	3	6	3	NOV 1
MIPV14	16	30	11	20	7	555
PV2	5	11	28	20	5	NOV 2
PV3	5	11	28	*	5	Mogući: NOV 2
SOAM6	134	57	3	6	3	NOV 1
SOE2	134	57	3	6	3	NOV 1
SOM7	17	12	3	4	7	Mogući: 244, 597, 1227, 1338, 1530, 1531, 166, 1884, 1941 ili 2137

Izolat	acsA	guaA	mutL	ppsA	trpE	ST (alelni profil)
SUAM2	4	*	12	6	3	Mogući: 253, 540, 828, 1282, 1502, 1571, 1607 ili 2176
SUAM4	36	29	7	10	7	Mogući: 170 ili 1697
SUI1	134	57	3	6	3	NOV 1
SV1	134	57	3	6	3	NOV 1
SV12	134	57	3	6	3	NOV 1
TCPV3	11	11	11	27	7	198
TOPV16	6	1	1	12	1	Mogući: 395 ili 625
VIZ3	134	57	3	6	3	NOV 1

*Nedostajuće sekvence

Tabela 12. Frekvencija detektovanih alelnih varijanti po lokusima u srpskoj i MLST *P. aeruginosa* populacijama

Alelne varijante	SRB	SRB (%)	MLST	MLST (%)
<i>acsA</i>				
4	2	0,07	142	4,43
5	6	0,20	142	4,43
6	1	0,03	343	10,7
11	3	0,10	309	9,64
16	1	0,03	164	5,12
17	1	0,03	340	10,61
25	1	0,03	4	0,12
36	1	0,03	67	2,09
134	14	0,47	1	0,03
<i>guaA</i>				
1	1	0,04	342	10,67
5	1	0,04	499	15,57
6	1	0,04	136	4,24
11	7	0,25	530	16,54
12	1	0,04	169	5,27
16	1	0,04	138	4,31
29	1	0,04	8	0,25
30	1	0,04	61	1,9
57	14	0,50	59	1,84
<i>mutL</i>				
1	1	0,04	100	3,12
3	15	0,54	963	30,05
7	1	0,04	228	7,11

Alelne varijante	SRB	SRB (%)	MLST	MLST (%)
11	2	0,07	379	11,83
12	1	0,04	136	4,24
13	1	0,04	214	6,68
18	1	0,04	29	0,9
28	5	0,18	19	0,59
29	1	0,04	10	0,31
<i>ppsA</i>				
4	3	0,10	718	22,4
6	16	0,55	421	13,14
10	1	0,03	89	2,78
12	1	0,03	228	7,11
15	1	0,03	234	7,3
20	5	0,17	41	1,28
27	1	0,03	4	0,12
38	1	0,03	29	0,9
<i>trpE</i>				
1	1	0,03	205	6,4
3	18	0,62	387	12,07
5	4	0,14	46	1,44
7	5	0,17	758	23,65
19	1	0,03	153	4,77

Alelne varijante pronađene u analiziranim *P. aeruginosa* izolatima, kao i njihova učestalost i učestalost u procentima u populaciji Srbije i u globalnoj MLST bazi podataka su prikazane u Tabeli 12.

Uočava se značajna razlika u frekvenciji alela ispitivane populacije *P. aeruginosa*, u odnosu na podatke deponovane u MLST bazi podataka. Ovi podaci mogu da nagoveste veliku razliku u učestalosti alela izolata iz Srbije u odnosu na globalnu populaciju bakterije. Međutim, važno je napomenuti da rezultati ne predstavljaju reprezentativni odnos, pre svega zbog malog broja izolata ispitanih na teritoriji Srbije. Naime, u MLST bazi podataka se nalazi ukupno 3205 izolata iz različitih delova sveta koji se, na pet lokusa značajnih za ovo istraživanje, odlikuju sledećim brojem jedinstvenih alela: 113 (*acsA*), 120 (*guaA*), 134 (*mutL*), 112 (*ppsA*) i 158 (*trpE*). S druge strane, broj izolata iz Srbije varira od 28 do 30 (u zavisnosti od lokusa), koji imaju daleko manji broj jedinstvenih alelnih varijanti: 9 (*acsA*), 9 (*guaA*), 9 (*mutL*), 8 (*ppsA*) i 5 (*trpE*). Takođe, u svetskim

okvirima je i MLST baza podataka relativno malog obima, te je i nju potrebno obogatiti novim podacima (Khan i sar., 2008).

Kao što je ranije navedeno, kombinacijom alelnih profila na sedam genskih lokusa se dobija alelni profil (ST) analiziranog izolata, koji se može uporediti sa profilima iz MLST baze podataka. ST profili, zasnovani na pet genskih lokusa, koji su dobijeni u okviru ovog istraživanja su prikazani u Tabeli 11. U velikom broju slučajeva je bilo moguće nedvosmisleno utvrditi alelni profil dostupan u MLST bazi podataka, na osnovu pet korišćenih markera. Tako je, na primer, pokazano da tri analizirana izolata imaju isti profil sa postojećim izolatima u bazi: KPL_V_4 (ST 487), MIP_V_14 (ST 555) i TČ_PV_3 (ST 198). Kada se kombinacija određenog seta alelnih brojeva ne može pronaći u MLST bazi podataka, dobijeni ST profil se označava kao "NOV". Veoma je značajno da su u izolatima sa teritorije Srbije pronađene sasvim nove kombinacije alelnih varijanti, kakve do sada nisu opisane MLST šemom. Tabela 11 pokazuje da je utvrđeno čak pet novih ST profila (NOV 1, 2, 3, 4 i 5), od kojih je NOV 1 najzastupljeniji u ispitivanim *P. aeruginosa* populacijama. U određenom broju izolata nije bilo moguće utvrditi ST na osnovu pet genskih lokusa, jer se oni uklapaju u veći broj alelnih profila. Tako je, na primer, za izolat SO_M_7 detektovano da može predstavljati neki od sledećih ST profila: 244, 597, 1338 i 1661, dok se TOP_V_16 uklapa u ST 395 i 625. Bitno je naglasiti da će buduća analiza preostala dva MLST lokusa dati kompletnu i sasvim pouzdanu tipizaciju *P. aeruginosa* sa ispitivanih lokacija.

Poređenjem dobijenih podataka sa onim u MLST bazi, pokazano je da KPL_V_4 izolat *P. aeruginosa* izolovan iz vode kanala Palić-Ludaš ima identičan alelni profil (ST 487) kao izolat poreklom iz sputuma dobijen u Holandiji (PA0220), kao i izolat koji potiče iz Australije (AUS672). Dalje, *P. aeruginosa* izolovana iz vode Mirijeuskog potoka (MIP_V_14) ima istovetan profil izolatu poreklom iz sputuma dobijenog u Holandiji (HA_B2), kao i australijskim izolatima iz bronhoskopa i drugih izvora (AUS695 i AUS515, respektivno). Takođe je utvrđeno da izolat iz vode sa česme u topčiderskom parku (TČP_V_3) ima identičan alelni profil (ST 198) kao i kanadski *P. aeruginosa* izolat poreklom iz sputuma (F1SIB1) i španski izolati koji potiču iz krvi i sputuma (PAamb243 i FQSE39-0910, respektivno). Izolat označen kao SU_AM_4 potiče iz aktivnog mulja postrojenja za prečišćavanje otpadne vode u Subotici, a genetski je sličan *P. aeruginosa*

izolovanim iz sputuma u Velikoj Britaniji (8643, 9950, 8871) i Australiji (AUS453), bronhoskopa u Senegalu (D-410) i izolatu CI-605 poreklom iz Obale Slonovače. Ovi rezultati pokazuju da su izolati iz životne sredine u Republici Srbiji po svom genetskom profilu identični *P. aeruginosa* izolatima iz veoma različitih staništa i raznolikog geografskog porekla. Takođe je bitno napomenuti da nijedan od testiranih izolata ne deli ST profil sa nekim od dostupnih izolata poreklom iz vode, koji potiču iz Australije, Brazila, Kine, Francuske, Portorika, Španije, Švajcarske, Velike Britanije i Sjedinjenih Američkih Država (SAD), kao ni iz zemljišta, koji potiču iz SAD i Meksika.

Razumevanje strukture zajednice i genetičkih odnosa među sojevima *P. aeruginosa* prisutnih u prirodi je neophodno za sticanje boljeg uvida u ekologiju i rasprostranjenost ove bakterije. Dobijeni rezultati, čak i kada su ograničeni na male ekološke niše, ili ograničena geografska područja, kao što je bio slučaj i u istraživanju sprovedenom u ovom radu, poređenjem sa dostupnim podacima postaju deo globalnog istraživanja diverziteta *P. aeruginosa*, a takođe nude odgovore na aktuelna pitanja koja se odnose na rasprostranjenost kliničkih sojeva i sojeva iz prirode.

Istraživanja Pirnay i sar. (2005), iako su bila usmerena na područje reke Woluwe u Belgiji, su pružila odgovor i na celokupni diverzitet ove bakterije. *Pseudomonas* je primarno vodeni mikroorganizam, ali uspešno naseljava i druga staništa, a virulentnost i patogenost ne zavise od geografskog područja ili ekološke niše koje naseljavaju. Oni su zaključili, da je populacija *P. aeruginosa* reke Woluwe autohtona i deo homogenog diverziteta ove bakterije u svetu. Do sličnih zaključaka su došli i Aoi i sar. (2000) ispitujući *P. aeruginosa* iz Ushubetsu reke u Japanu, koja je u velikoj meri pod uticajem ljudske aktivnosti. I drugi su predložili da se izlati *P. aeruginosa* iz životne sredine genotipski, hemotaksonomski i funkcionalno ne razlikuje od kliničkih izolata (Khan i sar., 2008).

Rezultati dobijeni MLST analizom u ovom radu prvi put opisuju genetsku strukturu populacije *P. aeruginosa* iz Srbije. Oni takođe obogaćuju MLST bazu podataka, koja je na samom začetku u pogledu izolata iz životne sredine, budući da uzorci iz vode čine 7,87 %, a uzorci iz zemljišta samo 0,31 % baze. Fokusiranje istraživanja na izolate iz životne

sredine u budućnosti će u znatnoj meri doprineti boljem razumevanju *P. aeruginosa* populacija na globalnom nivou. Naime, studije poput ove i drugih (Khan i sar., 2008) opisuju veliki broj novih ST iz životne sredine, što nije iznenađujuće u kontekstu mlade MLST baze podataka. Tek će nova istraživanja biti u mogućnosti da rasvetle jedinstvenost, zastupljenost, geografsku rasprostranjenost i moguća staništa novootkrivenih tipova. Rezultati dobijeni ovom analizom govore u prilog navodima da su populacije *P. aeruginosa* poreklom iz različitih sredina među sobom genetski veoma slične. Homogena struktura populacije se može objasniti visokim stepenom genskih rekombinacija među populacijama (Khan i sar., 2008).

5.2.4. Filogenetske analize

Osim informacije o razlikama među izolatima *P. aeruginosa*, MLST analiza je dovoljno informativna za analizu filogenetskih odnosa među izolatima i izučavanje mikroevolucije na bazi različitih faktora, kao što je poreklo uzorkovanja izolata (Curran i sar., 2004, Khan i sar., 2008). U cilju utvrđivanja filogenetskih odnosa, upotrebljena su višestruka poravnanja sekvenci pojedinačnih gena (*ppsA*, *guaA*, *trpE*, *acsA* i *mutL*), kao i višestruka poravnanja sekvenci dobijena povezivanjem pojedinačnih lokusa u lanac (objedinjena sekvenca) testiranih izolata *P. aeruginosa*. Pored izolata *P. aeruginosa* iz Srbije, u filogenetske analize su uključene i druge izabrane sekvence dostupne u NCBI bazi podataka (Tabela 13).

Proširivanjem obima analize sojeva *P. aeruginosa* iz različitih geografskih područja, vrlo udaljenih od staništa izolata korištenih u ovom radu, kvalitet informacija o međusobnim odnosima populacija ove bakterije se povećava i omogućava se razmatranje grupisanja gena i izolata u odnosu na ove kriterijumu. Kao out grupa (“negativna kontrola”) srodnosti sa izolatima *P. aeruginosa* je korištena genomski sekvenca *Pseudomonas putida*.

Tabela 13. Naziv izolata, zemlja porekla, stanište i pristupni brojevi u NCBI bazi podataka

Izolat	Pristupni brojevi u NCBI bazi podataka	Zemlja porekla	Stanište	Komentar
PAO1	110645304	Australija	Referentni laboratorijski soj/rana pacijenta	Klinički
PA14	KE136335.1, KE136336.1 i CP000438.1	SAD	Referentni laboratorijski soj	Klinički/virulentniji od PAO1/ExoU pozitivan
Ocean-1206	193075189, 193075053, 193075121, 189544363 i 197111284	Japan	Voda okeana	Životna sredina
Coastal-1303	193075193, 193075057, 193075125, 189544367 i 197111288	Japan	Priobalna zona okeana	Životna sredina
Pond-1540	193075201, 193075065, 193075133, 189544375 i 197111296	Japan	Voda jezera	Životna sredina
M18	386056071	Meksiko	Rizosfera dinje	Životna sredina
<i>Pseudomonas putida</i>	26986745			Out grupa

U radu je kreirano pet filogenetskih stabala na osnovu pojedinačnih genskih sekvenci i tri stabla koristeći objedinjene podatke svih sekvenci. Kreirana su *Maximum Likelihood* filogenetska stabla upotrebom Tamura3 modela sa 1.000 *bootstrap* replikata. Dužina grana dobijenih filogenetskih stabala se meri u broju substitucija po mestu. Sve pozicije na kojima postoje delecije ili nedostaju podaci su uklonjene iz analize. Samo bootstrap vrednosti veće od 70 % su prikazane na filogenetskim stablima.

Filogenetsko stablo kreirano na osnovu genskog lokusa *acsA* je prikazano u Prilogu 2. Analiza je uključila 37 nukleotidnih sekvenci. Konačni skup analiziranih podataka je obuhvatio 573 pozicije. Rezultati ukazuju na gensku sličnost izolata iz Srbije koji su pripali istoj grupi, odnosno klasteru: VI_Z_3, JS_V_13, S_V_12, SU_I_1, KSE_V_11, B_V_7, B_V_6, S_V_1, B_V_10, KTP_V_9, SO_E_2, B_PV_2, SO_AM_6 i A_V_15, dok su neki od preostalih izolata iz Srbije sa umerenom pouzdanošću grupisani sa

referentnim i izolatima *P. aeruginosa* iz drugih studija. Na primer, izolat iz aktivnog mulja postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda u Subotici (SU_AM_2) i izolat dobijen iz uzorka bunarske vode iz sela Mustajić kod Kučeva (B_PV_1) su na *acsA* genskom lokusu slični kliničkom izolatu PA14, dok je izolat MIP_V_14, dobijen iz površinske vode u Mirijevu grupisan sa meksičkim izolatom iz rizosfere dinje (M18).

Filogenetsko stablo kreirano na osnovu lokusa *guaA* je prikazano u Prilogu 3. Analiza je uključila 35 nukleotidnih sekvenci. Konačni skup analiziranih podataka je obuhvatio 842 pozicije. Analizom stabla je ustanovljeno da je 13 srpskih izolata *P. aeruginosa*, gotovo istovetno kao kod *acsA* lokusa, grupisano zajedno (VI_Z_3, S_V_12, SU_I_1, KSE_V_11, B_V_7, B_V_6, S_V_1, B_V_10, KTP_V_9, SO_E_2, B_PV_2, SO_AM_6 i A_V_15), dok su neki od preostalih testiranih izolata grupisani sa referentnim i izolatima *P. aeruginosa* iz drugih studija. Tako izolat B_PV_1 i na ovom lokusu pokazuje gensku sličnost sa kliničkim izolatom PA14, a izolat MIP_V_14 je, zajedno sa TOP_V_16, grupisan sa izolatom M18. Izolati TČ_PV_3, ČA_SE_9, P_V_3, ČA_SE_5, ČA_SE_1, P_V_2, D_V_8 i SU_AM_4 su grupisani sa izolatom iz jezera u Japanu, dok je izolat SO_M_7 grupisan sa referentnim kliničkim izolatom PAO1.

U Prilogu 4 je dat prikaz filogenetskog stabla kreiranog na osnovu lokusa *mutL*. Analiza je uključila 35 nukleotidnih sekvenci. Konačni skup analiziranih podataka je obuhvatio 452 pozicije. Analizirajući izolate na osnovu informacija iz ove genske sekvence, pojedinačno se izdvaja izolat ČA_SE_8. Jednu grupu čini skup izolata ČA_SE_1, P_V_2, ČA_SE_5, P_V_3 i ČA_SE_9. Izolat SU_AM_2 je grupisan sa referentnim kliničkim izolatom PA14. Šesnaest izolata (VI_Z_3, S_V_12, SU_I_1, KSE_V_11, B_V_7, B_V_6, S_V_1, B_V_10, KTP_V_9, SO_E_2, B_PV_2, SO_AM_6, D_V_8, JS_V_13, SO_M_7 i KPL_V_4), uz izolate iz okeana i jezera u Japanu pripadaju grupi referentnog kliničkog izolata PAO1.

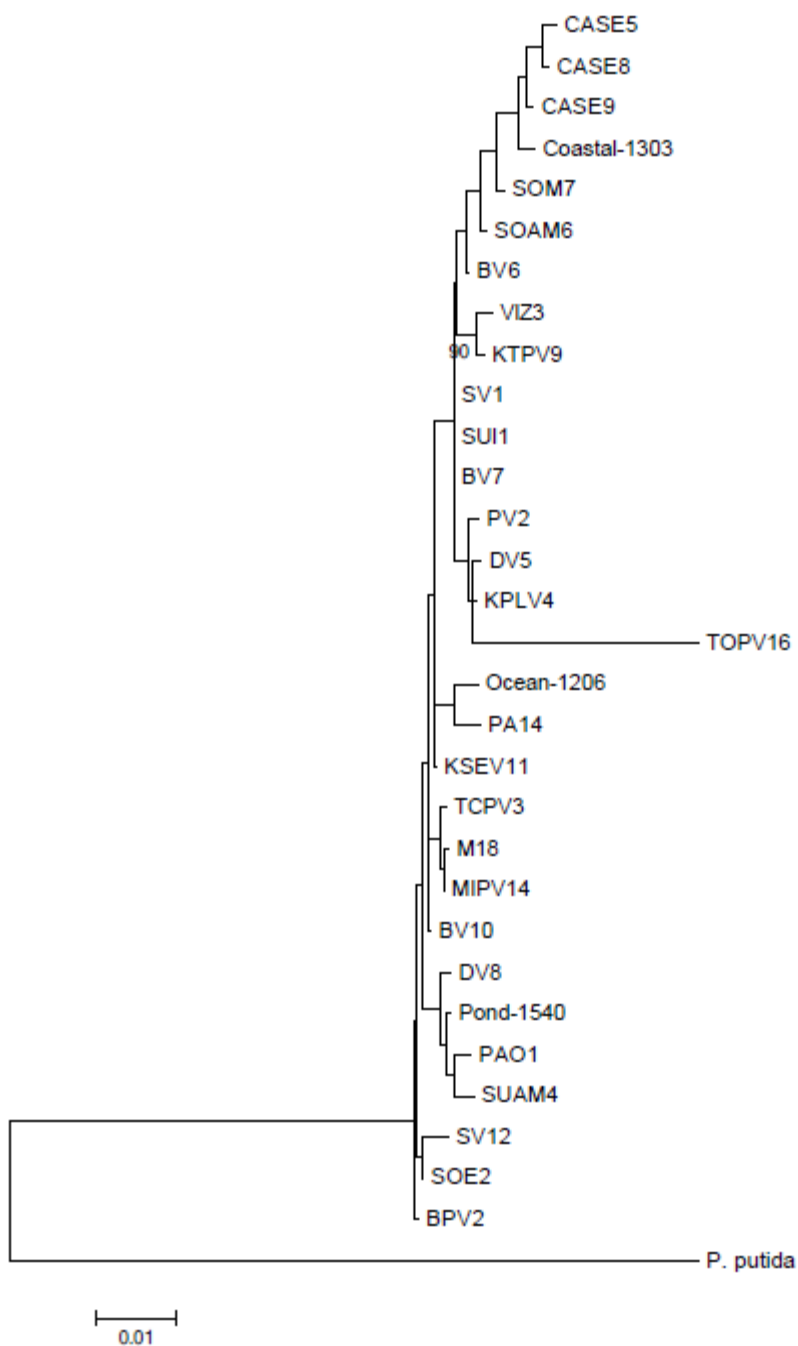
Filogenetsko stablo kreirano na osnovu lokusa *ppsA* je prikazano u Prilogu 5. Analiza je uključila 36 nukleotidnih sekvenci. Konačni skup analiziranih podataka je obuhvatio 704 pozicije. Rezultati indikuju sličnost među izolatima MIP_V_14, ČA_SE_9, ČA_SE_5, ČA_SE_1 i P_V_2, kao i sličnost izolata SU_AM_4 sa kliničkim sojem PAO1. Izolati

VI_Z_3, S_V_12, SU_I_1, KSE_V_11, B_V_7, B_V_6, S_V_1, B_V_10, KTP_V_9, SO_E_2, B_PV_2, SO_AM_6, D_V_8, JS_V_13, A_V_15, SU_AM_2, B_PV_1, ČA_SE_8 i TČ_PV_3 su grupisani sa referentnim kliničkim sojem PA14.

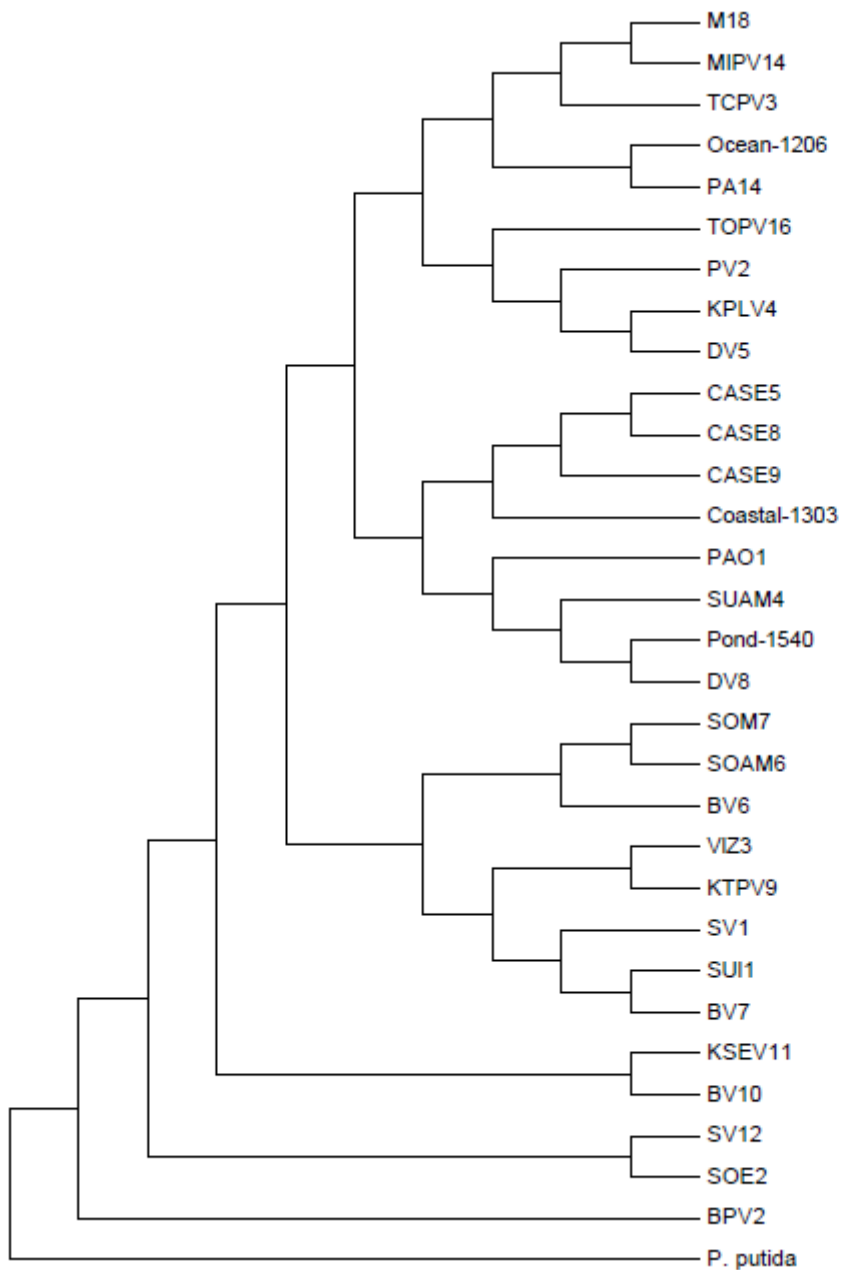
Filogenija na osnovu genskog lokusa *trpE* je prikazana u Prilogu 6. Analiza je uključila 36 nukleotidnih sekvenci. Konačni skup analiziranih podataka je obuhvatio 633 pozicije. Na osnovu ovog stabla, testirane izolate je moguće razdvojiti u dve grupe: 1) izolati grupisani oko referentnog kliničkog soja PAO1: D_V_8, SU_AM_4, MIP_V_14, TČ_PV_3, SO_M_7, TOP_V_16 i sojevi M18 i soj iz jezera u Japanu i 2) izolati grupisani oko referentnog kliničkog soja PA14: A_V_15, B_V_7, SO_AM_6, ČA_SE_8, B_PV_2, SO_E_2, KTP_V_9, S_V_12, B_PV_1, KSE_V_11, JS_V_13, D_V_5, VI_Z_3, B_V_6, B_V_10, S_V_1, SU_AM_2 i SU_I_1, kao i soj *P. aeruginosa* izolovan iz okeana.

Na Slici 17 je prikazano filogenetsko stablo dobijeno spajanjem svih pet analiziranih genskih sekvenci. Analiza je uključila 31 nukleotidnu sekvencu. Konačni skup analiziranih podataka je obuhvatio 3.204 pozicije. Dobijena filogenija ukazuje na veliku homogenost ispitivane populacije. Ovaj rezultat nije neočekivan, budući da je analiza zasnovana na poređenju housekeeping gena, koji su dobro očuvani tokom evolucije i takođe je zabeležen u drugim studijama (Khan i sar., 2008).

Filogenetsko stablo je predstavljeno i kao kladogram (Slika 18), koji može dati jasniju sliku o međusobnom odnosu između ispitivanih izolata *P. aeruginosa*. Bitno je naznačiti da ovaj dijagram ne daje informacije o povezanosti predaka i potomaka i nivou promena koje su se dogodile. Dobijeni rezultati sugerišu visoku sličnost nukleotidnih sekvenci izolata MIP_V_14 i meksičkog izolata M18 iz rizosfere dinje, kao i njihovo grupisanje, zajedno sa TČ_PV_3, TOP_V_16, P_V_2, KPL_V_4, D_V_5 i izolatom iz okeana, u PA14 kompleks. Izolati ČA_SE_5, ČA_SE_8, ČA_SE_9, SU_AM_4 i D_V_8, zajedno sa priobalnim i jezerskim izolatima iz Japana, s druge strane, pripadaju PAO1 grupi. Izolati SO_M_7, SO_AM_6, B_V_6, VI_Z_3, KTP_V_9, S_V_1, SU_I_1 i B_V_7 čine zasebnu grupu, dok preostale tri grupe uključuju sledeće članove: 1) KSE_V_11 i B_V_10, 2) S_V_12 i SO_E_2 i 3) B_PV_2.



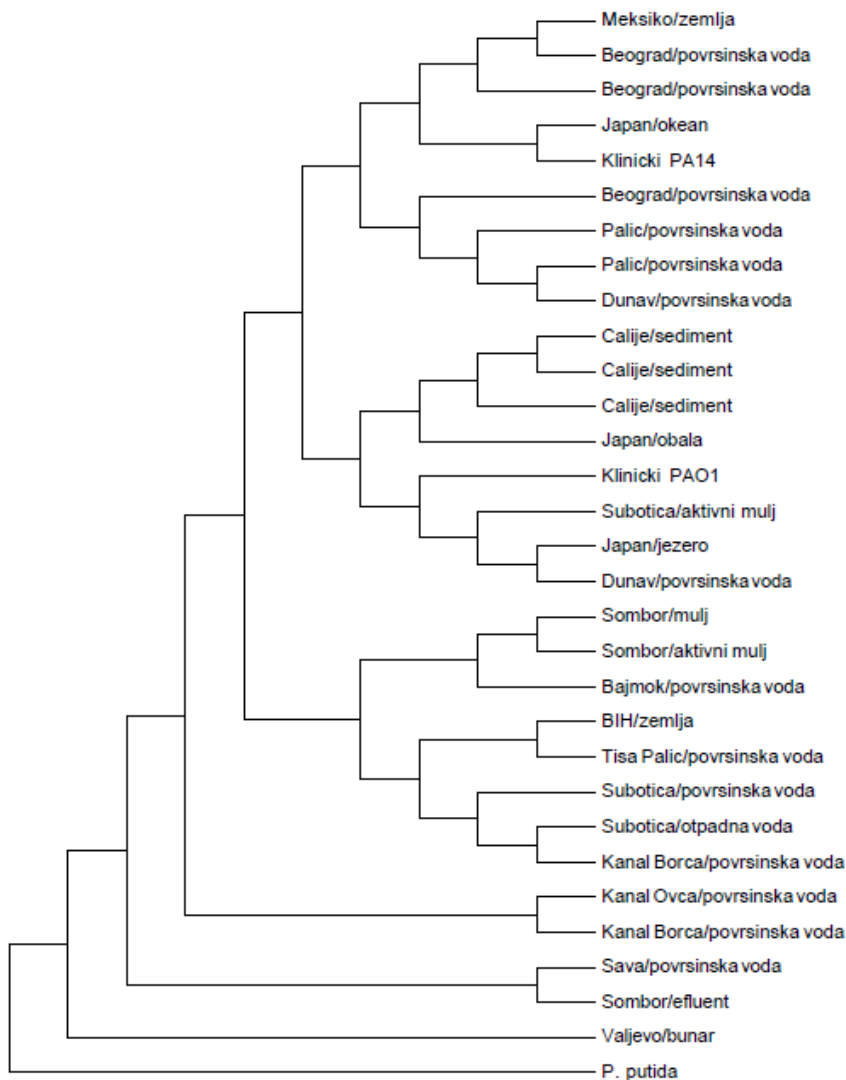
Slika 17. *Maximum Likelihood* filogenetsko stablo generisano na osnovu svih pet analiziranih genskih lokusa



Slika 18. Kladogram dobijen iz *Maximum Likelihood* filogenetskog stabla generisanog na osnovu svih pet analiziranih genskih lokusa

Dobijena filogenija se takođe može posmatrati sa istaknutim staništem i geografskim područje sa kojeg su izolati *P. aeruginosa* dobijeni (Slika 19). Rezultati ove analize sugerišu da su svetski izolati iz životne sredine, kao i referentni klinički izolati, rasuti po filogenetskom stablu. Uočava se odsustvo grupisanja ispitivanih izolata na osnovu mikro ili makro geofskog položaja, kao i dokazane virulentnosti. Takođe, ne može se jasno detektovati uticaj staništa na međusobni odnos testiranih izolata, osim u slučaju izolata iz

sedimenta, koji se zajedno grupišu. Grupisanje uslovljeno staništem je zabeleženo u istraživanju sa *P. aeruginosa* izolatima iz životne sredine, posebno kada je reč o izolatima poreklom iz okeana (Khan i sar., 2008). Razlika koja naizgled postoji između ovog i navedenog istraživanja može biti posledica nekoliko faktora. Pre svega, *Maximum Likelihood* filogenetsko stablo kreirano na osnovu spojenih sekvenci svih pet genskih lokusa se odlikuje relativno slabom statističkom potporom.



Slika 19. Kladogram dobijen iz *Maximum Likelihood* filogenetskog stabla generisanog na osnovu svih pet analiziranih genskih lokusa sa akcentom na stanište i geografsko poreklo izolata

Buduće analize će uključiti svih sedam MLST gena, kao i dodatne kliničke, kao i izolate iz životne sredine iz Srbije i sveta, čime se očekuje poboljšanje bootstrap vrednosti. Takođe će biti razmotrena upotreba dodatnih softverskih paketa za molekularno

evolucione analize, kao što je Minimum Spanning Tree (MST) analiza u cilju detekcije potencijalnih klonalnih kompleksa u ispitivanoj populaciji *P. aeruginosa*.

Bitno je naglasiti da su u ovom istraživanju sprovedena dva različita pristupa, MLST i filogenetska analiza, u kojima se genska različitost tretira na sasvim drugačije načine – dok se u MLST analizi svaka promena, nezavisno od nivoa genetske varijacije tretira kao zaseban alel, u filogenetskoj analizi se razmatraju sve promene na svakoj poziciji u višestruko poravnatim sekvencama. U oba slučaja, istraživanja sprovedena u ovom radu, kao i dobijeni rezultati su u skladu sa studijama koji su sprovodili drugi naučnici predhodnih godina. Poslednje dve decenije prevladava mišljenje da je populacija *P. aeruginosa* panmiktična (Denamur i sar., 1993; Picard i sar., 1994), dok je analizom 6 lokusa na 19 kliničkih i izolata iz prirode otkrivena izukršтана struktura populacije sa visokim stepenom rekombinacija (Kiewitz i TummLer, 2000). Primenom MLST šeme (Curran i sar., 2004) je pokazano da je struktura populacije ne-klonalna, sa pojedinim klonalnim kompleksima koji obuhvataju bliske genotipove.

5.3.FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Zbog velikog značaja koji *Pseudomona aeruginosa* ima kao oportuni humani patogen, veliki broj studija je usmereno ka ispitivanju ove bakterije i karakteristika koje joj omoućavaju široku rasprostranjenost, dobru prilagođenost i rezistenciju (Driscoll i sar. 2007, Gellatly i Hancock, 2013, Grosso-Becera i sar. 2014). Efikasno uklanjanje ove bakterije koja iz žiotne sredine dospeva u ljudsko okruženje, predmete i mesta gde borave ljudi je moguće tek nakon detaljne identifikacije svojstava koje bakterije imaju.

5.3.1. Formiranje biofilmova

Veliki broj studija je ukazao da izolati *P. aeruginosa*, posebno oni koji potiču iz različitih životnih sredina, pokazuju i razlike u sposobnosti formiranja biofilmova (Head i Yu, 2004; Grosso-Becera i sar. 2014). Iako je većina sojeva *P. aeruginosa* sposobna da

formira biofilmove, opisano je i oko 2 % sojeva koji nemaju ovu sposobnost (Perez i sar., 2011).

U ovom radu su prikazani rezultati testiranja sposobnosti produkcije biofilмова 30 izolata *P. aeruginosa* iz životne sredine pri različitim uslovima temperature (37°C i 22°C), pH (7 i 6) i saliniteta (koncentracija NaCl 1 % i 2 %). Testiranje je urađeno kolorimetrijskom metodom sa kristal violetom, u mirkotitar pločama. Rezultati izmerenih absorbanci su prikazani u Prilozima 7 - 16. Dobijeni rezultati su statistički obrađeni (primenom deskriptivne statističke analize i korelacije u MS Office Excel paketu i statistički Kruskal-Wallis test-om) i korišteni za prikaz i tumačenje rezultata.

U prvoj fazi eksperimenta je izvršeno testiranje sposobnosti formiranja biofilмова u toku 24 sata na temperaturama od 37 i 22°C u LB bujonu pri pH 7 i pri koncentraciji NaCl 1 %. Rezultati ispitivanja su pokazali da su testirani izolati *P. aeruginosa* uspešnije formirali biofilm na 22°C ($\bar{x}_{(OD_{630})}=0,20$) (Prilog 8), nego na 37°C ($\bar{x}_{(OD_{630})}=0,13$) (Prilog 7). Minimalna izmerena vrednost absorbance, koja označava biomasu biofilma, pri uslovima temperature od 37°C je iznosila $OD_{630}=0,07$ i konstatovana je na izolatima označenim kao BP_V_2, TOP_V_16 i D_V_8 (Prilog 7), dok su najniže izmerene absorbance na 22°C iznosile $OD_{630}=0,05$ (izmerena na SO_AM_6), $OD_{630}=0,06$ (SU_AM_4) i $OD_{630}=0,07$ izmerena na izolatima ČA_SE_9 i MIP_V_14 (Prilog 8). Maksimalne izmerene vrednosti na 37°C su imali izolati B_PV_1 i TČ_PV_3, $OD_{630}=0,24$ (Prilog 7), dok je na 22°C maksimalan rezultat iznosio $OD_{630}=0,58$ i izmeren je na izolatu B_PV_1 (Prilog 8).

Poznat je značaj i uticaj temperature na rast i razvoj mikroorganizma, pre svega uticaj na odvijanje metaboličkih procesa, u pogledu brzine usvajanja nutrijenata, delovanja enzima i fizičkih karakteristika komponenata u okolini ćelije.

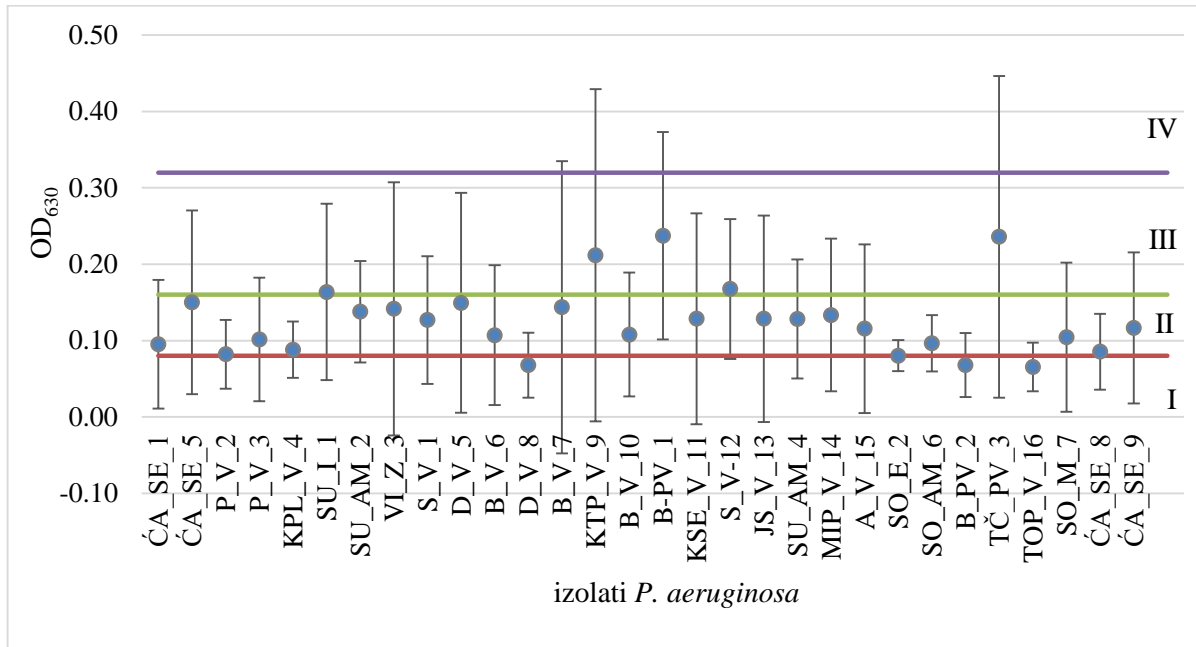
Da bi se ispitalo da li su dobijeni rezultati u ovom radu koji ukazuju na razliku u formiranju biofilмова na različitim temperaturama značajni, primenjen je neparametarski Kruskal-Wallis statistički test. Sprovedenim testom je utvrđena statistički značajna razlika između biofilмова gajenih na 37°C i 22°C ($H=8,938$, $p<0,05$). Istraživanja

sprovedena u ovom radu su pokazala da su niže temperature bile stimulativne za razvoj biofilmova *P. aeruginosa*, odnosno da je temperatura značajan faktor u rastu biofilmova.

Iako postoje različita saopštenja o uspešnosti formiranja biofilmova pri različitim temperaturama, veliki broj autora naglašava značaj temperature pri istraživanju biofilmova. Garrett i sar. (2008) su došli do zaključka da su na nižim temperaturama karakteristike polisaharida uniformne čime se povećava mogućnost inicijalne interakcije bakterije i supstrata, a time je povećana i mogućnost adhezije. Slične rezultate su predstavili i Hostacka i sar. (2010), koji su objavili da je na 37°C i do 98 % smanjena mogućnost produkcije biofilmova. Međutim, rezultati Kannan i Gautam (2015) ukazuju na čvršću i stabilniju strukturu biofilma na 37°C, u odnosu na 28°C, 33°C i 42°C, što je povezano sa povećanom proizvodnjom ekstracelularnog matriksa *Pseudomonas aeruginosa* na 37°C.

Na osnovu dobijenih rezultata, poređenjem srednjih vrednosti izmerenih absorbanci testiranih izolata sa izmerenom absorbancom referentnog soja *P. aeruginosa*, ATCC 27853 (Perez i sar., 2011) izvršena je kategorizacija testiranih izolata na biofilm-neprodukujuće, slabo biofilm-produkujuće, srednje biofilm-produkujuće i visoko biofilm-produkujuće izolate. Rezultati su predstavljeni grafički, na Grafikonima 1 i 2.

Na Grafikonu 1 je prikazana kategorizacija izolata u odnosu na vrednosti absorbanci (OD₆₃₀) na 37°C. Od 30 izolovanih bakterija, najveći broj (67 %) je označen kao slabo-produkujući, oko 13 % je označeno kao srednje-produkujući, 20 % je definisano kao biofilm-neprodukujući, dok izolati sa visokom produkcijom biofilmova nisu konstatovani, pri temperaturi od 37°C. Rezultati ispitivanja Perez i sar. (2011) ukazuju na sličan odnos među kliničkim izolatima *P. aeruginosa*. Od 74 ispitana izolata, 68 % je okarakterisano kao slabo-produkujući, a samo su dva izolata bila okarakterisna kao srednje-produkujući. Ispitujući kliničke izolate, Sanchez i sar. (2013) su zaključili da 83 % *P. aeruginosa* ima sposobnost formiranja biofilmova i da je srednja vrednost izmerene biomase biofilmova iznosila $0,142 \pm 0,094$ što je u opsegu rezultata dobijenih u ovom radu.

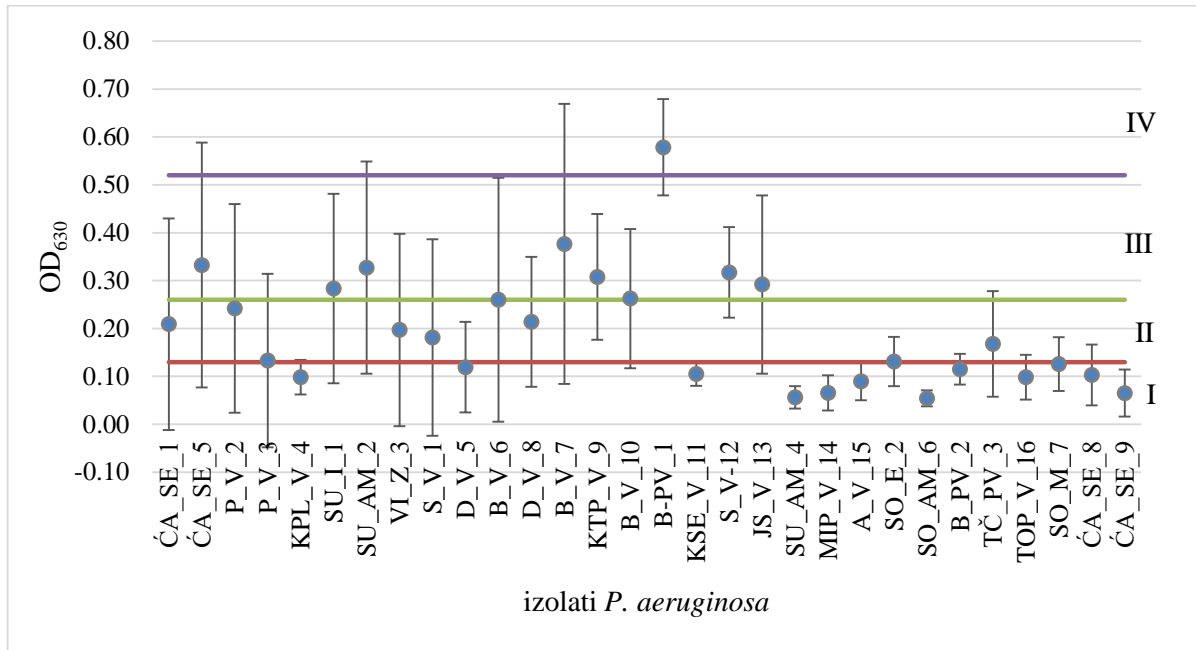


Grafikon 1. Kategorizacija izolata *P. aeruginosa* u odnosu na sposobnost formiranja biofilмова na 37°C (pH 7/NaCl 1%) u toku 24 sata u odnosu na srednje vrednosti izmerenih absorbanci na 630 nm; vertikalne linije predstavljaju vrednosti standardne devijacije.

I – biofilm-neprodukujući izolati; II – biofilm-slaboprodukujući izolati; III – biofilm-srednjeprodukujući izolati, IV – biofilm-visokoprodukujući izolati

Statistički je testiran i značaj razlike u sposobnosti formiranja biofilмова u odnosu na stanište testiranog izolata *P. aeruginosa*. Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u produkciji biofilмова izolata koji potiču iz različitih sredina (za površinsku vodu i sediment $H=0,003$; površinsku vodu i vodu za piće $H=1,01$; sediment i vodu za piće $H=0,692$) na 37°C.

Ukoliko se kategorizacija izolata izvrši u odnosu na sposobnost formiranja biofilмова na 22°C, dobija se različita slika: 40 % izolata su biofilm-neprodukujući, 27 % ih je slaboprodukujućih, 30 % srednje-produkujućih i samo jedan izolat je visoko-produkujući (3 %) (Grafikon 2). Ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika u sposobnosti formiranja biofilma na 22°C ($p > 0,05$) među izolatima koji potiču iz različitih staništa ($H=0,955$ za površinsku vodu i sediment, $H=2,586$ za površinsku vodu i vodu za piće i $H=0,692$ za sediment i vodu za piće).



Grafikon 2. Kategorizacija izolata *P. aeruginosa* u odnosu na sposobnost formiranja biofilмова na 22°C (pH 7/NaCl 1%) u toku 24 sata u odnosu na srednje vrednosti izmerenih absorbanci na 630 nm; vertikalne linije predstavljaju vrednosti standardne devijacije.

I – biofilm-neprodukujući izolati; II – biofilm-slaboprodukujući izolati; III – biofilm-srednjeprodukujući izolati, IV – biofilm-visokoprodukujući izolati

U radu je testiran i uticaj pH sredine na formiranje biofilмова. U ovom testiranju je primenjen modifikovani LB bujon, slabo kisele reakcije (pH 6), a testovi su urađeni takođe pri temperaturama od 22°C i 37°C. Poznato je da bakterije imaju sposobnost uticaja na interne i eksterne vrednosti pH, promenom aktivnosti i sintezom proteina uključenih u različite procese u ćeliji (Olsen, 1993). Ovo ukazuje da bakterije imaju mehanizme koji omogućavaju populaciji da se prilagodi na male promene u pH sredine.

Rezultati izmerenih minimalnih i maksimalnih vrednosti absorbance, kao i izračunate srednje vrednosti su prikazane u Prilozima 9 i 10. Minimalne vrednosti OD₆₃₀ u uslovima snižene pH vrednosti su iznosile OD₆₃₀=0,02 na 37°C, tj. OD₆₃₀=0,01 na 22°C izmerene kod srednje-biofilm-produkujućih izolata ĆA_SE_1 i ĆA_SE_5, na 37°C i ĆA_SE_5 na 22°C. Masivne biofilmove na pH 6 su formirali nisko i srednje biofilm-formirajući izolati: OD₆₃₀=0,83 SU_AM_2 i OD₆₃₀=1,76 S_V_12 na 37°C, dok na 22°C takođe srednje biofilm-formirajući izolat S_V_12 (OD₆₃₀=1,57) i izolat KSE_V_11 (OD₆₃₀=0,72) koji je pri uslovima pH 7 označen kao biofilm-neprodukujući izolat.

Iako su zabeležene razlike među testiranim izolatima u sposobnosti da formiraju biofilm na pH 6 pri različitim temperaturama, pokazano je da ova razlika nije statistički značajna ($p > 0,05$, $H = -14,708$).

Poređenjem srednjih vrednosti izmerenih absorbanci pri pH 7 i pH 6, zaključeno je da je niža pH vrednost bila stimulatívna za 17/30 testiranih izolata na 37°C u odnosu na višu pH, dok je na 22°C u većini merenja (20/30) konstatovana slabija produkcija biofilma na pH 6 u odnosu na pH 7. Testiranjem razlike u formiranju biofilмова formiranih pri pH 6 u odnosu na pH 7 je utvrđeno da uočena razlika nije statistički značajna ($p > 0,05$; za $t = 37^\circ\text{C}$ $H = 1,257$; za $t = 22^\circ\text{C}$ $H = -4,962$).

Rezultati testiranja izolata *P. aeruginosa* u sposobnosti formiranja biofilмова pri povišenoj koncentraciji NaCl (2 %) na temperaturama od 22°C i 37°C su prikazani u Prilozima 11 i 12.

Iako neka istraživanja (Martinez, 2011) ukazuju na inhibitorski efekat NaCl (2 %, 4 %, i 7 %) na biofilmove *P. aeruginosa*, dobijeni rezultati u ovom istraživanju ukazuju da su pri ovim uslovima sredine, izolovane *P. aeruginosa* formirale najmasivnije biofilmove, a srednje vrednosti izmerenih OD₆₃₀ su iznosile 0,27 na 37°C (Prilog 11) i 0,40 na 22°C (Prilog 12). Uočene razlike u formiranju biofilмова na različitim temperaturama, nisu statistički značajne ($p > 0,05$, $H = -4,386$) u uslovima povišenog saliniteta.

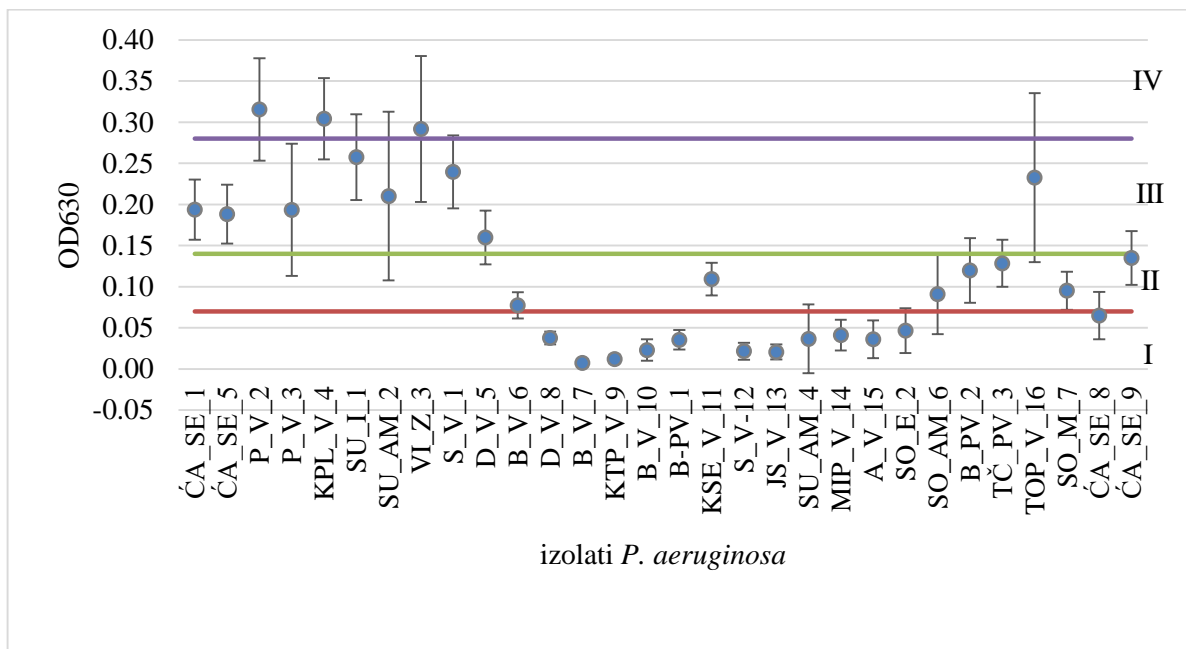
Poređenjem srednjih vrednosti dobijenih absorbanci u testiranim uslovima koncentracije NaCl proizilazi da su uslovi povišenog saliniteta (2 %) bili stimulatívni za rast biofilмова u odnosu na biofilm formiran pri koncentraciji NaCl od 1 %: 16 od 30 izolata je na 37°C formiralo masivnije biofilmove, dok je na 22°C za 22 od 30 izolata ovakva sredina bila stimulatívna. Statističkim testom je dobijeno da na 22°C ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$, $H = -29,353$) u formiranom biofilmu na testiranim različitim koncentracijama NaCl, dok je razlika u formiranim biofilmovima pri testiranim različitim uslovima saliniteta sredine na 37°C statistički značajna ($p < 0,05$, $H = 68,48$).

Na osnovu dobijenih rezultata je jasno da ova istraživanja ne mogu podržati stav da bi hipertonični slani rastvori bili efikasna sredstva protiv rasta i formiranja biofilмова koju zastupaju neki naučnici (Kwong i sar. 2007) navodeći kako bi suze zbog sadržaja soli mogle biti dobar antimikrobni agens.

Interesantno je zapažanje da su pri povišenoj koncentraciji soli, niske OD₆₃₀ vrednosti konstatovane kod nekih nisko ili srednje biofilm-produkujućih izolata (ĆA_SE_5, SU_I_1, B_V_6 i ĆA_SE_8), ali i kod izolata B_PV_1 koji je pri nižoj koncentraciji (1 %) NaCl označen kao visoko-biofilm produkujući izolat (Prilog 11 i 12). Takođe, maksimalne vrednosti su konstatovane kod nisko-biofilm produkujućih izolata B_V_7 i JS_V_3 (OD₆₃₀=0,62 i OD₆₃₀=0,57) i srednje-biofilm produkujućeg izolata P_V_2 OD₆₃₀=1,66 (Prilog 11 i 12).

Testiranje rasta biofilмова u kratkom vremenskom intervalu (6h) bi trebalo da posluži kao brza metoda detekcije potencijala formiranja biofilмова. Testiranje potencijala formiranja biofilмова je urađeno takođe u mikrotitar pločama koristeći LB bujon na temperaturama inkubacije od 37°C i 22°C, u uslovima pH 7 i koncentracije NaCl 1 %. U odnosu na dobijene vrednosti absorbanci na 630 nm i poređenjem sa referentnim sojem *P. aeruginosa* ATCC 27853, izvršena je klasifikacija izolata na sledeće kategorije: nema potencijala za formiranje biofilma, slab, srednji ili visok potencijal za formiranje biofilma. Srednje vrednosti izmerenih absorbanci su prikazane u Prilozima 13 i 14.

Na temperaturi od 37°C 40 % testiranih izolata je okarakterisano da nemaju potencijal za formiranje biofilмова, dok su po 20 % izolata bili niskog i srednjeg potencijala i 10 % visokog potencijala (Grafikon 3).

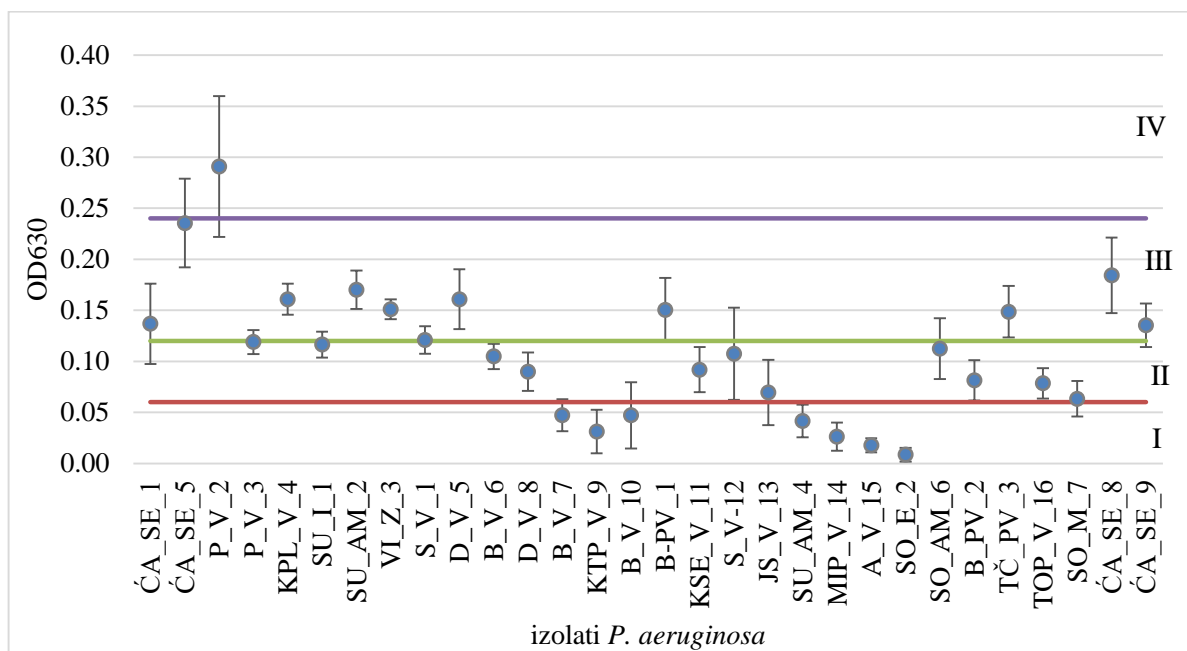


Grafikon 3. Kategorizacija izolata *P. aeruginosa* u odnosu na potencijal formiranja biofilмова na 37°C (pH 7/NaCl 1%) u toku 6 sati u odnosu na srednje vrednosti izmerenih absorbanci na 630 nm; vertikalne linije predstavljaju vrednosti standardne devijacije.

I – nema potencijala; II – nizak potencijal; III – srednji potencijal, IV – visok potencijal

Na temperaturi od 22°C, 20 % izolata je označeno kao nepotencijalni u formiranju biofilмова, 40 % niskog potencijala, 30 % srednjeg i 3 % visokog potencijala u formiranju biofilмова (Grafikon 4).

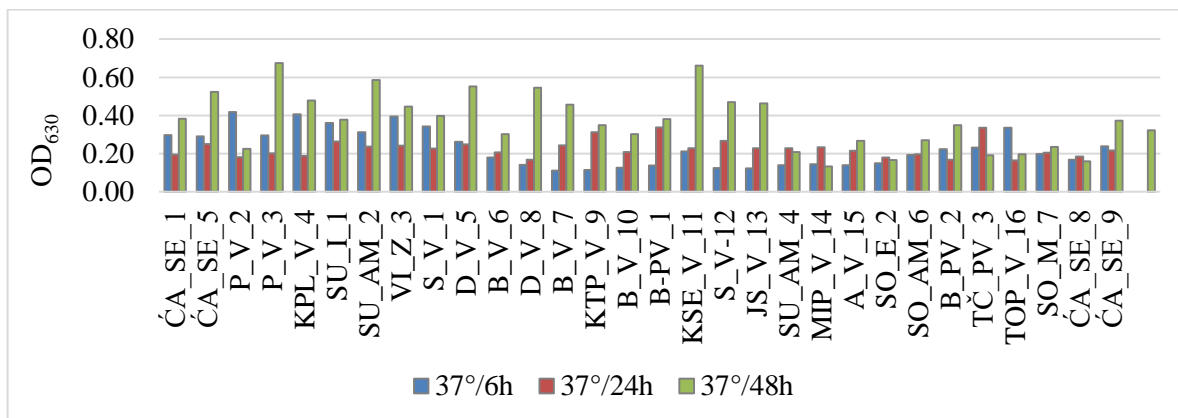
Iako je konstatovan različit potencijal u formiranju biofilмова u odnosu na temperaturu inkubacije, ova razlika nije statistički potvrđena, odnosno ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$, $H = -14,708$) u potencijalu formiranja biofilмова u odnosu na temperaturu.



Grafikon 4. Kategorizacija izolata *P. aeruginosa* u odnosu na potencijal formiranja biofilma na 22°C (pH 7/NaCl 1%) u toku 6 sati u odnosu na srednje vrednosti izmerenih absorbanci na 630 nm; vertikalne linije predstavljaju vrednosti standardne devijacije.

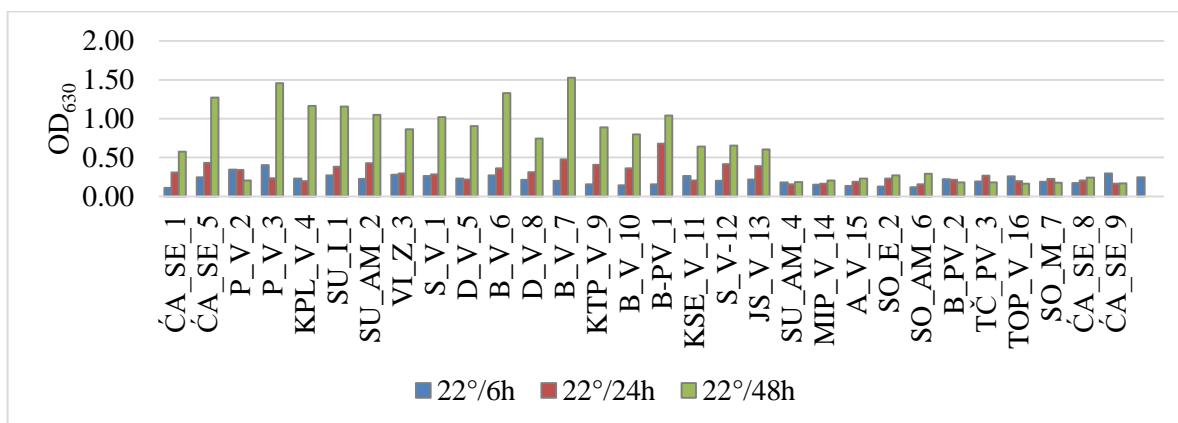
I – nema potencijala; II – nizak potencijal; III – srednji potencijal, IV – visok potencijal

Klasifikacija izolata nakon šestočasovne inkubacije je poređena sa klasifikacijom izolata nakon testa od 24 sata. Bez statističke potvrde, ove klasifikacije se u manjoj (na 37°C) ili većoj meri (22°C) preklapaju. Međutim, produžavanjem inkubacije do 48 h (Prilozi 15 i 16), dobijeni rezultati pokazuju da su biomase biofilma izolata označenih kao visoko potencijalni za formiranje biofilma, nakon 48 h bile iste ili manje, dok je samo za 50 % izolata sa srednjim potencijalom u formiranju biofilma biomasa biofilma bila visoka (duplirana u odnosu na vrednosti nakon 6h merenja)(Grafikoni 5 i 6).



Grafikon 5. Uporedni prikaz potencijala formiranja biofilмова (nakon 6h inkubacije), i formiranih biofilмова nakon 24 i 48 sata na 37°C

Inkubacijom na 22°C je u većoj mjeri konstatovana zakonitost u pogledu formiranja biofilмова. Iako je izolat (P_V_2) okarakterisan kao visokopotencijalni, nakon 48 h formirao značajno manju biomasu biofilma, većina izolata okarakterisanih kao srednjeg ili niskog potencijala su formirali masivnije biofilmove (Grafikon 6). Takođe, samo 2 od 7 izolata okarakterisanih da nemaju potencijala za formiranje biofilмова su formirali diskretne biofilmove nakon 48h.



Grafikon 6. Uporedni prikaz potencijala formiranja biofilмова (nakon 6h inkubacije), i formiranih biofilмова nakon 24 i 48 sata na 22°C

Međutim, značajno je naglasiti, da i izolati koji su okarakterisani niskim potencijalom za formiranje biofilмова, ili da su slabo-biofilm produktivni, ne smeju biti zanemareni. Oni mogu biti veoma značajni u slučajevima polimikrobnih biofilмова, pošto se mogu direktno ugraditi u njih ili reagovati sa drugim vrstama, (Sanchez i sar., 2013).

Potencijal formiranja biofilмова je uveden kao brzi test za otkrivanje karakteristika bakterije i biofilмова radi uspešnijeg odabira biocidnih mera. Formiranje biofilмова je jedna od osobina prilagođavanja bakterija koja joj obezbeđuje preživaljavanje u različitim uslovima, posebno na čvrstim podlogama (Sanchez i sar., 2013). Međutim, rezultati ispitivanja pokazuju da ovaj princip testiranja ne daje jasnu sliku i korelaciju u pogledu formiranja biofilмова (Grafikon 5 i 6), zbog čega je u narednim fazama istraživanja neophodno uraditi kompleksniju multifaktorijalnu analizu svakog izolata.

U odnosu na produkciju biofilмова, među testiranim izolatima nije ustanovljena značajna razlika među sojevima različitog porekla. Slični rezultati su proistekli i iz istraživanja Hošćacka i sar. (2010), koji ukazuju da abiotički faktori prirodnog staništa imaju manje značajnu ulogu u proizvodnji biofilмова u poređenju sa genetskim potencijalom mikroorganizama.

5.3.2. Pokretljivost

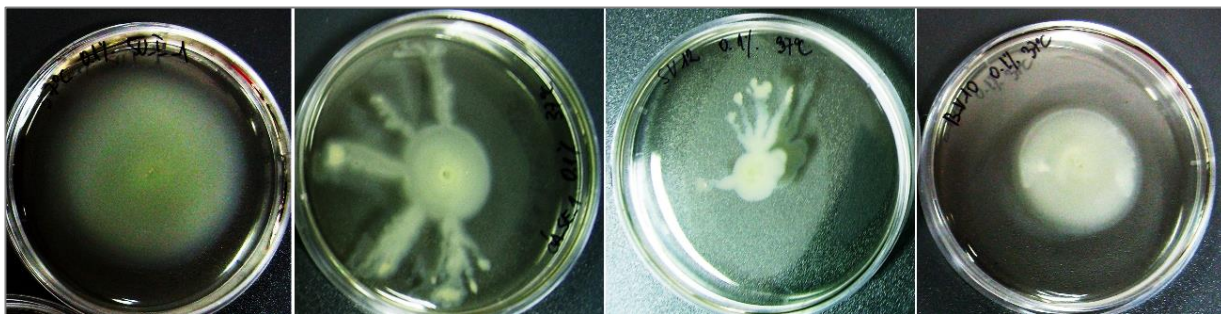
Kao primarna osobina koja dovodi do uspešnog formiranja biofilмова kod *P. aeruginosa*, navodi se osobina translokacije Head i Yu, 2003 ukazuju da je pokretljivost flagelama i pilima tipa IV neophodna za inicijaciju formiranja biofilma, ali da nemaju ulogu u rastu formirane mikrokolonije. Testiranje pokretljivosti zavisne od postojanja flagela, „plivajuća pokretljivost“ (swimming motility) je urađeno na LB medijumu sa 0,1 i 0,3 % agara, pokretljivost „rojenjem“ (swarming motility) na LB i M8 medijumu sa 0,5 % agara i pokretljivost zavisna od postojanja pila tipa IV, „trzajuće kretanje“ (twitching motility) na LB medijumu sa 1 % agara. Svi testovi su urađeni paralelno na temperaturama od 22°C i 37°C i ponovljeni tri puta.

Sve Petri kutije su punjene sa 10 mL otopljenog agara i sušene u laminornoj komori u toku 60 minuta. Naime, u literaturi se navode različiti protokoli koji opisuju pokretljivost *P. aeruginosa*. Pokazano je da „rojenje“ ne zavisi samo od koncentracije agara u medijumu, nego i od dužine sušenja agara pod laminarnim strujanjem vazduha (Tremblay i Deziel, 2008). Duži period sušenja i veći procenat agara inhibira „rojenje“, dok pri nižem % agara i kraćem vremenu sušenja dolazi do formiranja nediferenciranih tendrila. Petri

ploče koje se suše kraće vreme zadržavaju veći procenat dostupne vlage što utiče na različitu kinetiku difuzije biosurfaktanta.

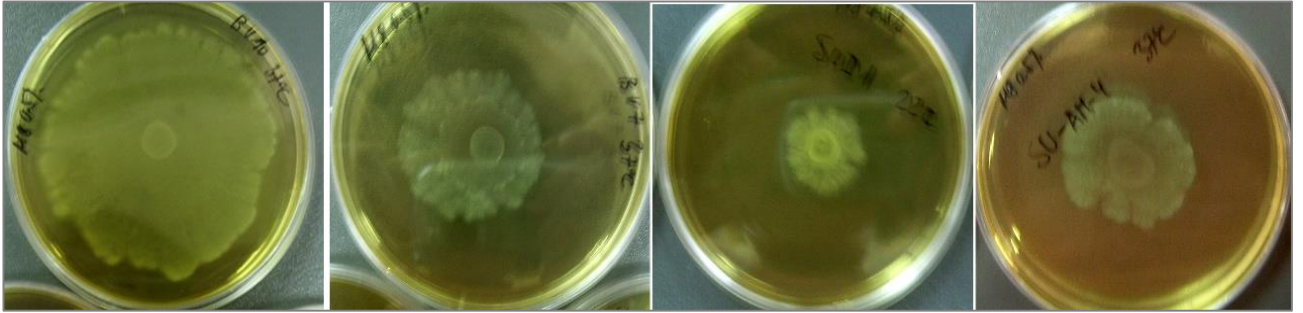
Nakon inkubacije od 24 sata, izmeren je prečnik kolonija i rezultati su izraženi u mm (Prilozi 17 i 18).

Prosečne, srednje vrednosti izmerenih kolonija nastalih flagelarnim kretanjem („plivajućih“) kolonija (Slika 20) je iznosila $\bar{x}(\varnothing) = 83$ mm na 22°C i $\bar{x}(\varnothing) = 90$ mm na temperaturi od 37°C, na medijumu sa 0,1 % agara, dok je srednja veličina kolonija na medijumu sa 0,3 % agara bila $\bar{x}(\varnothing) = 19$ mm na 22°C i $\bar{x}(\varnothing) = 38$ mm na temperaturi od 37°C. Mnogi autori ističu (Murray i sar.,2010) da je kretanje flagelama osnovni način kretanja, i da je postojanje funkcionalnih flagela od velikog značaja za mogućnost „rojenja“.



Slika 20. Pokretljivost *P. aeruginosa* (izolati SU_I_1, ČA_SE_1, S_V_12 i B_V10) flagelama, LB medijum sa 0,1% agara, 37°C

„Rojenje“ je testirano na LB i niskonutritivnom M8 medijumu sa 0,5 % agara. Na obe podloge, testirani sojevi su imali bolju pokretljivost pri višim temperaturama (srednja vrednost prečnika kolonije je iznosila $\bar{x}(\varnothing) = 11$ mm na 22°C, $\bar{x}(\varnothing) = 23$ mm na 37°C na LB podlozi i $\bar{x}(\varnothing) = 45$ mm na 22°C i $\bar{x}(\varnothing) = 73$ mm na 37°C na M8 medijumu), pri čemu je „rojenje“ na M8 medijumu bilo izraženo kod većine testiranih sojeva (Slika 21).



Slika 21. Kolonije *P. aeruginosa* nastale „rojenjem“ izolata B_V_10, B_V_7, SU_I_1 i SU_AM_4 na M8 medijumu sa 0,5% agara, 37°C.

Bakterije koje su inkubirane na nižoj temperaturi imaju nižu metaboličku aktivnost u poređenju sa bakterijama inkubiranim na višim temperaturama, što objašnjava zašto su kolonije nastale rojenjem veće na višim temperaturama, dok se pojava “rojenja” značajno smanjuje na 17 i 22°C (Muray i sar. 2010).

Ispitivanja su pokazala da su se ispitivani izolati kretali gibajućim pokretima formirajući karakteristične kolonije „rojenja“ i tendrila i na podlogama sa nižim procentom agara, nekarakterističnim za ispoljavanje ovih osobina (Slike 20, 22 i 23).

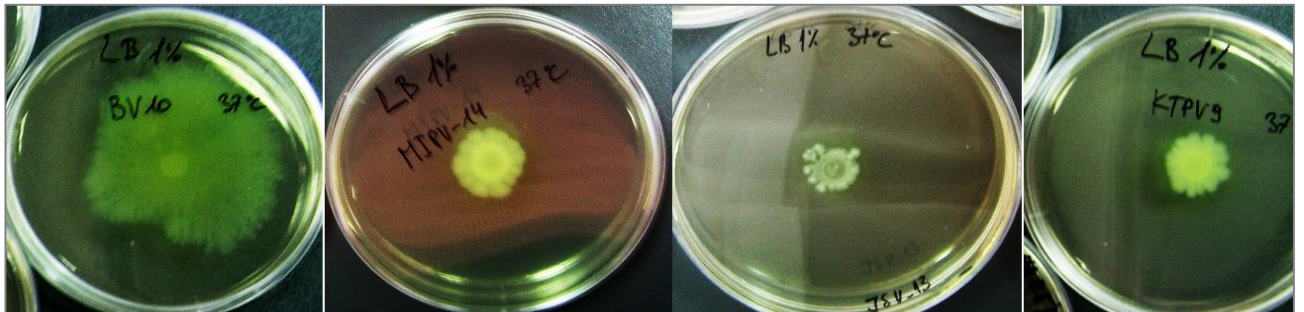


Slika 22. Kolonije *P. aeruginosa* nastale kretanjem izolata BPV_1, KTP_V_9, JS_V_13 i S_V_12 na LB medijumu sa 0,3% agara, 37°C



Slika 23 Kolonije *P. aeruginosa* nastale „rojenjem“ izolata TČ_PV_3, KPL_V_4 i B_V_6 na LB medijumu sa 0,3% agara

Rezultati izmerenog kretanja *P. aeruginosa* koristeći pile tipa IV (“trzajuće kretanje”) (Slika 24) su pokazali da su ispitivani izolati formirali kolonije najmanjih prečnika ovim načinom kretanja. Prosečne vrednosti izmerenih dijametara su iznosile $\bar{x}(\emptyset) = 10$ mm na 22°C i $\bar{x}(\emptyset) = 15$ mm na 37°C (Slika 24).



Slika 24. Kolonije *P. aeruginosa* nastale kretanjem pomoću pile tipa IV izolata B_V_10, MIP_V_14, JS_V_13 i KTP_V_9

Dakle, u ovom istraživanju, najveći je dijametar kolonija sa plivajućim kretanjem, kao i kolonija nastalih „rojenjem“ na niskonutritivnom medijumu. Takođe, testirani izolati su pokazali bolju pokretljivost pri višoj temperaturi inkubacije (37°C) u odnosu na 22°C. Razlike u pokretljivosti “rojenjem” među ispitivanim sojevima su uočene ne samo u veličini zone pokretljivosti, nego i u sposobnosti formiranja tendrila i drugih karakteristika zone rasta (Slike 20, 21, 22 i 23).

U ovom radu je utvrđeno postojanje zavisnosti između različitih tipova bakterijske pokretljivosti, kao i između bakterijske pokretljivosti i formiranja biofilmova.

Testiranjem korelacionog odnosa između sposobnosti kretanja flagelama (testiranog na LB medijumu sa 0,1 i 0,3 % agara) i drugih načina translokacije *P. aeruginosa* na temperaturi od 37°C, dobijeni su sledeći rezultati:

- postoji slaba korelacija ($r=0,3$, $p\leq 0,05$) između kretanja na LB medijumu sa 0,1 % i 0,5 % agara,
- postoji srednja korelacija ($r=0,45$, $p\leq 0,05$) između kretanja na LB medijumu sa 0,3 % agara i LB medijumu sa 1 % agara
- postoji veća korelacija ($r=0,56$, $p\leq 0,05$) između kretanja na LB medijumu sa 0,3 % agara i “rojenja” na M8 medijumu.

Rezultati testiranja ovih odnosa na 22°C su pokazali da:

- postoji slaba korelacija ($r=0,3$, $p\leq 0,05$) između kretanja na LB medijumu sa 0,1 (i 0,3 %) agara i medijumu sa 0,5 % agara;
- postoji srednji stepen korelacije ($r=0,46$, $p\leq 0,05$) između kretanja na LB medijumu sa 0,3 % agara i kretanja trzajuće kretanjem i
- postoji veći stepen korelacije ($r=0,62$, $p\leq 0,05$) između kretanja na LB medijumu sa 0,3 % agara i „rojenja“ na M8.

Proveravajući uticaj kretanja na mogućnost formiranja biofilmova, nađena je:

- slaba korelacija ($r=0,23$, $p\leq 0,05$) između sposobnosti kretanja (na LB medijumu sa 0,3 % agara) i formiranja biofilmova na 22°C,
- slaba korelacija ($r=0,17$, $p\leq 0,05$) između sposobnosti kretanja na LB medijumu sa 0,3 % agara i formiranja biofilma na 37°C,
- slaba korelacija ($r=0,18$, $p\leq 0,05$) između mogućnosti stvaranja biofilmova i veličine „rojenja“ na M8 medijumu na 37°C i
- slaba korelacija ($r=0,14$, $p\leq 0,05$) između kretanja “trzajuće kretanjem” i formiranje biofilmova na 22°C.

Dobijeni rezultati podržavaju stav (Caiazza i sar., 2005, Murray i sar., 2010) o značaju “rojenja” na niskonutritivnim podlogama u formiranju biofilmova, kao i rezultate koji ukazuju na značaj bakterijskih struktura u formiranju biofilmova: flagele obezbeđuju stalnu kolonizaciju, dok pili tipa IV obezbeđuju “trzajuće kretanjem” i virulenciju (O’Toole i sar., 1998, Murray i sar., 2010).

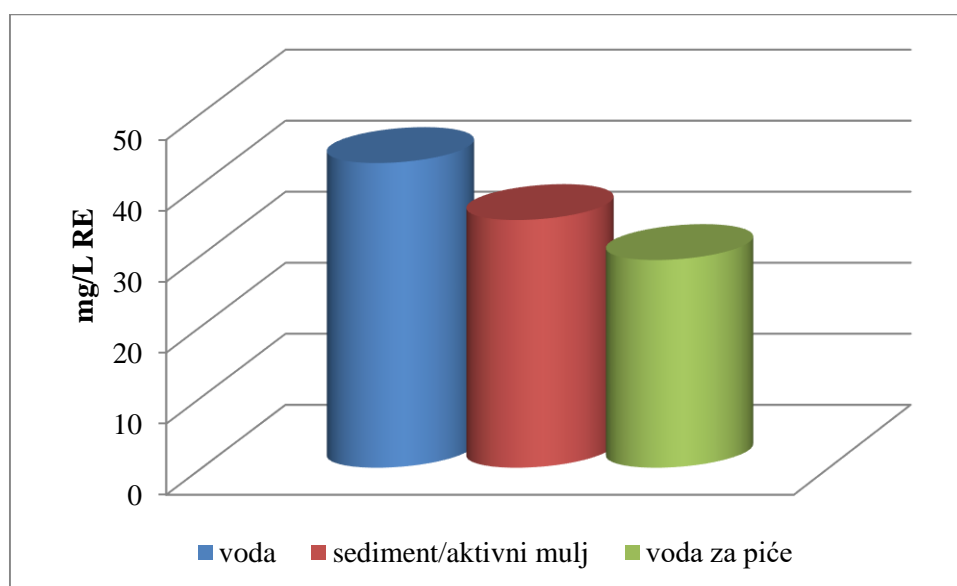
Slični rezultati su dobijeni i u istraživanjima Head i Yung, 2003. Iako nije sporno da je za formiranje biofilmova neophodno postojanje strukturnih dodataka kao što su flagele i pili tipa IV, nije potvrđena kvantitativna korelacija između sposobnosti formiranja biofilmova i kretanja, kako flagelama, tako ni pomoću pila.

5.3.3. *Produkcija ramnolipida*

Izmerene koncentracije ramnolipida kod testiranih sojeva *P.aeruginosa*, su se kretale između 23,8 mg/L (TČ_PV_3) i 68 mg/L (D_V_8), dok je prosečna vrednost za sve testirane isolate iznosila 39,4 mg/L (Tabela 14).

Tabela 14. Koncentracije ramnolipida izolata *P. aeruginosa* (mg/L)

Testirani izolati <i>P. aeruginosa</i>	mg/L RE	Testirani izolati <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	mg/L RE
ĆA_SE_1	30,6	KSE_V_11	48,3
ĆA_SE_5	40,8	S_V_12	23,8
P_V_2	44,2	JS_V_13	40,1
P_V_3	40,1	SU_AM_4	27,2
KPL_V_4	39,1	MIP_V_14	57,8
SU_I_1	44,2	A_V_15	23,8
SU_AM_2	40,8	SO_E_2	44,2
VI_Z_3	34,0	SO_AM_6	40,1
S_V_1	44,2	B_PV_2	40,1
D_V_5	47,6	TČ_PV_3	23,8
B_V_6	34,0	TOP_V_16	44,2
D_V_8	68,0	SO_M_7	30,6
B_V_7	40,1	ĆA_SE_8	27,2
KTP_V_9	47,6	ĆA_SE_9	40,1
B_V_10	40,8		
B_PV_1	23,8	ATCC	37,4



Grafikon 7. Koncentracija ramnolipida *P. aeruginosa* u odnosu na lokalitet izolacije

Na Grafikonu 7 je prikazana razlika u koncentraciji ramnolipida merena među izolatima iz različitih životnih sredina. Statistički je dokazano da ne postoji značajna ($p > 0,05$) razlika u koncentraciji ramnolipida u zavisnosti od staništa sa koga potiče testirani izolat (površinsku vodu i sediment/aktivni mulj $H=3,520$, površinsku vodu i vodu za piće $H=2,586$, sediment/aktivni mulj i voda za piće $H=1,571$).

Ispitujući uticaj ramnolipida na pokretljivost izolata, ustanovljena je slaba korelacija između produkcije ramnolipida i kretanja flagelama ($r=0,17$, $p \leq 0,05$) kao i slaba korelacija između produkcije ramnolipida i „rojenja“ na LB ($r=0,11$, $p \leq 0,05$) i M8 medijumu ($r=0,16$, $p \leq 0,05$) na 22°C . Takođe je konstatovana niska korelacija i na 37°C : $r=0,2$, $p \leq 0,05$ među produkcijom ramnolipida i kretanja na 0,3 % medijumu, i $r=0,19$, $p \leq 0,05$ među produkcijom ramnolipida i „rojenja“ na niskonutritivnom (M8) medijumu.

Rezultati brojnih istraživanja ukazuju na veliki značaj ramnolipida u sposobnosti kretanja bakterija (Croda-Garcia i sar., 2011), međutim slaba korelacija između produkcije ramnolipida i „rojenja“ ukazuje da dok ramnolipidi pomažu pokretljivost, postoje i drugi neopisani faktori koji utiču na razlike u pokretljivosti među sojevima (Morris i sar., 2011).

5.3.4. Produkcija piocijanina

Izmerene koncentracije piocijanina, kod različitih izolata *P. aeruginosa*, su se kretale između $0,92 \mu\text{g/mL}$ (S_V_1) i $6,28$ (JS_V_13) (Tabela 15).

U poređenju sa rezultatima PAO1 kliničkog soja ($5,29 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$), većina izmerenih vrednosti su niže, osim SU_AM_4, MIP_V_14 i TČ_PV_3 (Tabela 15), što ukazuje na potencijalno umerenu, odnosno izraženu patogenost izolata iz životne sredine (Grosso-Becerra, 2014).

Naime, ovi rezultati potvrđuju da svi izolati *P. aeruginosa* (nezavisno od toga da li potiču iz prirode ili su izolovani iz obolelih pacijenata) imaju osobine koje ukazuju na njihovu virulentnost i potencijalnu patogenost, budući da je piocijanin indikovao u literaturi kao jedan od faktora virulencije (Grosso-Becerra, 2014). Ipak, za ispitivanje patogenosti izolata iz životne sredine će u budućim istraživanjima biti primenjene i druge metode,

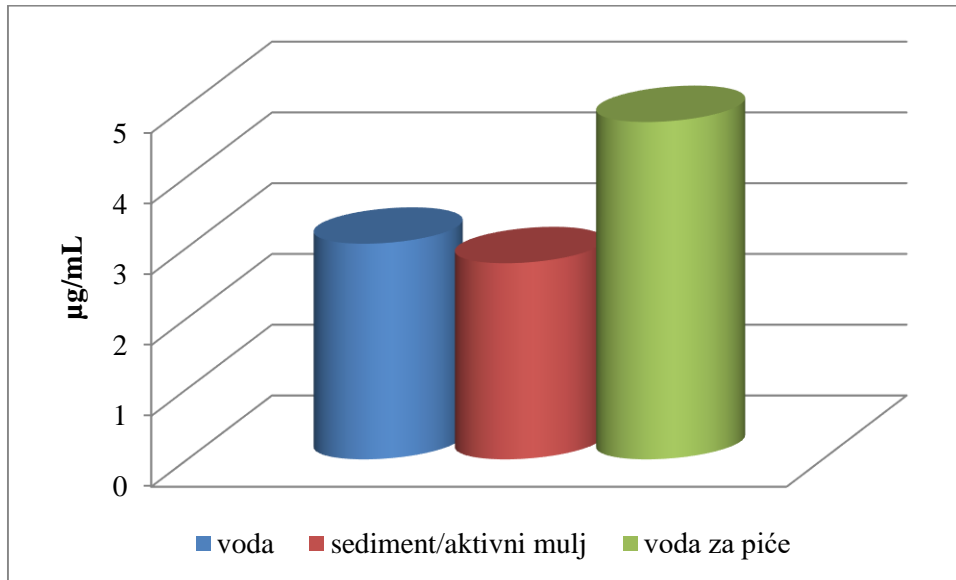
uključujući testiranje rezistentnosti izolata na antibiotike i analizu efektivnih proteina povezanih sa virulencijom (ExoS, ExoU, ExoT) (Shaver i Hauser, 2004).

Tabela 15. Koncentracije piocijanina izolata *P. aeruginosa* ($\mu\text{g/mL}$)

Testirani izolati <i>P. aeruginosa</i>	μg piocijanina/mL	Testirani izolati <i>P. aeruginosa</i>	μg piocijanina/mL
ĆA_SE_1	1,2	KSE_V_11	4,0
ĆA_SE_5	1,9	S_V_12	2,2
P_V_2	2,3	JS_V_13	3,2
P_V_3	2,9	SU_AM_4	6,3
KPL_V_4	2,6	MIP_V_14	5,9
SU_I_1	3,9	A_V_15	3,0
SU_AM_2	3,3	SO_E_2	3,1
VI_Z_3	1,5	SO_AM_6	2,8
S_V_1	1,7	B_PV_2	4,0
D_V_5	0,9	TČ_PV_3	5,5
B_V_6	1,6	TOP_V_16	3,8
D_V_8	4,2	SO_M_7	3,0
B_V_7	3,2	ĆA_SE_8	2,5
KTP_V_9	3,4	ĆA_SE_9	2,5
B_V_10	2,9		
B_PV_1	4,8	ATCC	2,4

Niska korelacija ($r=0,25$, $p\leq 0,05$) je utvrđena između produkcije piocijanina i sposobnosti formiranja biofilma na 37°C , dok je odnos između produkcije piocijanina i formiranja biofilma na 22°C bio u negativnoj korelaciji ($r=-0,06$, $p\leq 0,05$).

Na Grafikonu 8 su prikazane prosečne vrednosti izmerenih koncentracija piocijanina u odnosu na stanište izolata. Statistički je pokazano da ne postoji značajna razlika ($p>0,05$) u produkciji piocijanina među izolatima koji su poreklom iz različitih sredina prirode (za poređenje razlika među izolatima iz površinske vode i sedimenta $H=1,167$, za poređenje izolata iz površinske vode i vode za piće $H=2,586$, dok za poređenje izolata iz sedimenta/aktivnog mulja i vode za piće je iznosila $H=3,769$).



Grafikon 8. Produkcija piocijanina *P. aeruginosa* u odnosu na lokalitet izolacije

5.4. ISPITIVANJE SVOJSTAVA BIOFILMOVA RAMAN SPEKTROSKOPIJOM

Upotreba Raman mikroskopije (RM) poslednjih godina zadobija sve veću pažnju i primenu u istraživanju bioloških sistema, uključujući ispitivanja biofilмова, ispitivanja vegetativnih ćelija bakterija i spora, otpornost bakterija ili njihovu osetljivost na antibiotike (Lu i sar., 2011). RM je nedestruktivna spektroskopska analitička tehnika koja se zasniva na efektu asimetričnog rasejanja svetlosti na molekulima. Naime, svi organski makromolekuli kao što su proteini, nukleinske kiseline, ugljeni hidrati i lipidi ispoljavaju različite spektralne karakteristike. Zbog jednostavne pripreme sa jedne strane i potencijalno visoke informativnosti, RM se poslednjih godina intenzivno razvija kao bioanalitička metoda, kako paralelno uz druge spektroskopske ili fizičko-hemijske metode, tako i samostalno. RM se uspešno koristi sa ciljem brze identifikacije mikroorganizama ili identifikovanja molekularnih kompleksa bioloških uzoraka.

Ekstracelularna polimerna supstancija (EPS) bakterijskih biofilмова je izgrađena iz polisaharida, proteina, nukleinskih kiselina i lipida. U zavisnosti od bakterije, u građi biofilмова EPS učestvuje sa preko 90 % mase. Informacija o hemijskom sastavu i strukturi EPS-a je od velikog značaja u izučavanju biofilмова, kako za optimizaciju primene biocida, tako za strategiju uklanjanja (Ivleva i sar., 2008), a RM se nameće kao

pogodna metoda za hemijsku karakterizaciju kako bakterija, tako i EPS biofilma. Naime, dokazano je da RM može da registruje varijacije u hemijskom sastavu EPS-a i na taj način posluži kao metoda u definisanju konstituenata kompleksnog matriksa biofilma (Ivleva i sar., 2008).

U testovima je korišteno 11 izolata (SU_I_1, S_V_12, SU_AM_2, KSE_V_11, ĆA_SE_5, ĆA_SE_8, ĆA_SE_1, JS_V_13, B_V_7, B_PV_1 i B_V_6) i jedan referentni soj (ATCC 27853) *P. aeruginosa*. Izolati za testiranje su izabrani na osnovu predhodnih testova o uspešnosti formiranja biofilmova.

Svi formirani biofilmovi su snimljeni na većem broju tačaka (oko 30) a prezentovani rezultati predstavljaju srednje vrednosti dobijenih spektara. U ovom radu su dobijeni spektri predstavljeni grafički (Prilozi 19 - 30), na način da je za svaki testirani izolat paralelno predstavljen spektar dobijen pri različitim uslovima rasta, a analiza rezultata je bazirana na tumačenju kvalitativnog sastava biofilmova u odnosu na položaj karakterističnih pikova i dostupnih baza podataka i tabela (Jung i sar., 2014, Wagner i sar., 2009). Kvantitativni sastav identifikovanih molekula u biofilmovima je procenjen na osnovu visine pikova.

Spektri svih izolata (osim B_PV_1) imaju četiri karakteristična pika: na oko 1.571 - 1.580 cm^{-1} koji označava nukleinske kiseline A, G, proteine amide i ugljene hidrate, a koji potiču iz hromatina, zatim pik na oko 1.294-1.306 cm^{-1} koji označava C - H veze i odosi se na lipide i ugljene hidrate verovatno iz ćelijske membrane, pik na oko 1.110 - 1.122 cm^{-1} specifičan za glikozidnu vezu i pik na oko 735 - 743 cm^{-1} koji takođe označava adenin i ugljene hidrate poreklom iz nukleusnog dela (Jung i sar., 2014) (Tabela 16). Pik u zoni oko 1.124 cm^{-1} se pretpostavlja da označava vibraciju usled istežanja simetrične glikozidne veze C - O - C, oscilacije prstena kod polisaharida ili vibraciju usled C - C istežanja. Polisaharidi, posebno polianjonski makromolekuli su tipično predominantni među pikovima Ramanovog spektra biofilma (Jung i sar., 2014).

Izgled spektara (Prilozi 19-30), raspored i intenzitet dobijenih Ramanovih pikova navode na pretpostavku da su biofilmovi ispitivanih izolata među sobom kvalitativno slični, kao

i da nema razlika u kvalitetu filmova u zavisnosti od uslova sredine u kojima su bakterije gajene. Pikovi zajednički svim testiranim izolatima se odnose na deformciju C - H i nalaze se oko 3.037 cm^{-1} , 2.935 cm^{-1} i 1.449 cm^{-1} . Zbog nespecificnosti veze, ovi pikovi mogu ukazivati na polisaharide, lipide ili proteine, i smatra se da su ovi pikovi karakteristični za ćelijsku membranu (Jung i sar., 2014).

Istaknuti Ramanovi signali u biofilmu potiču od proteina: 1.002 cm^{-1} (fenilalanin), 1.243 cm^{-1} (amid III) i 1.658 cm^{-1} (amid I) (Jung i sar., 2014). Na proteinske komponente, amid III, fenilalanin i triptofan ukazuje i pik na 1.207 cm^{-1} i 1.169 cm^{-1} (uz tirozin i fenilalanin, ukazuje i na C - H). Iako registrovani (Tabela 16), pikovi na ovim pozicijama su vrlo slabog intenziteta (znatno niži od pikova koji se odnose na gradivne elemente ćelije) (Prilozi 19 - 30) što može ukazivati na kvantitativno mali sadržaj ovih molekula u biofilmu.

Masyuko i sar., 2014 navode da intenzivniji pikovi koji označavaju nukleinske kiseline se javljaju u slučajevima kada je biofilm formiran kratko, zbog čega je relativno tanak, pa se intenzivno registruju delovi ćelije a ne molekuli EPS-a, što je verovatno bio slučaj prilikom izvođenja ovih analiza.

U biofilmu B_PV_1 je registrovan pik na 1.553 cm^{-1} (Prilog 20) a u biofilmu KSE_V_11 na 1.520 cm^{-1} (Prilog 28). Pik na ovim položajima potiče od istezanja C = C veze (Jung i sar., 2004; Puviarasan i sar., 2000) i može biti povezan sa prisustvom karotenoida.

Kod KSE_V_11 je pik na ovom položaju prisutan samo prilikom gajenja bakterija u uslovima povišene koncentracije NaCl, što može biti jedna od korisnih informacija za buduća istraživanja.

Tabela 16. Položaj Ramanovih pikova (Jung i sar.,2014, Wagner i sar., 2009)

PIK cm ⁻¹	DNK/ RNK	PROTEINI	LIPIDI	UGLJENI HIDRATI	KAROTE NOIDI	ATCC	BPV1	BV6	BV7	ĆASE1	ĆASE5	ĆASE8	JSV13	KSEV11	SUAM2	SUI1	SV12
3037		C-H				3037	3045	3045	3045	3045	3045	3045	3045	3045	3045	3045	3045
2935		C-H				2926	2925	2925	2925	2925	2925	2925	2925	2925	2925	2925	2925
1658		AMID I				1656			1656	1658	1653			1655	1652	1651	1654
1646		AMID I					1644	1647				1647	1640				
1574	G, A	AMID II		COO-		1580		1572	1577	1575	1577	1568	1572	1572	1580	1571	1571
1553					C=C		1553										
1530					C=C									1525			
1449	G, A	C-H, CH ₂ , CH ₃	C-H	C-H		1443	1434	1431	1443	1441	1443	1435	1431	1435	1443	1438	1441
1368			CH ₃ - FOSFOLIPIDI					1380									
1340	PIROL	PIROLNI PRSTEN							1331								
1313			C-H	C-H		1306	1315	1294		1300	1306	1297	1286	1302	1299	1294	1304
1207		AMID III, C-C ₆ H ₅ FENILALANIN, TRIPTOFAN						1214		1217	1219	1214	1211			1218	
1240	A, T	C-C, C-N, AMID III				1226	1232							1226	1223		1221
1169	G, C	C-H TIROZIN FENILALANIN				1169			1169						1166		
1155								1157		1163	1165	1157		1165		1160	1160
1124				C-C, C-C, glikozidna veza sa saharidima		1122		1110	1118	1116	1122	1113	1106	1114	1119	1121	1117
1002		FENILALANIN				996	987	987	996	994	992	987	976	992	1000	987	987
726	A			COO-, CH ₂ -		743		735	743	737	742	735	720	736	740	735	735

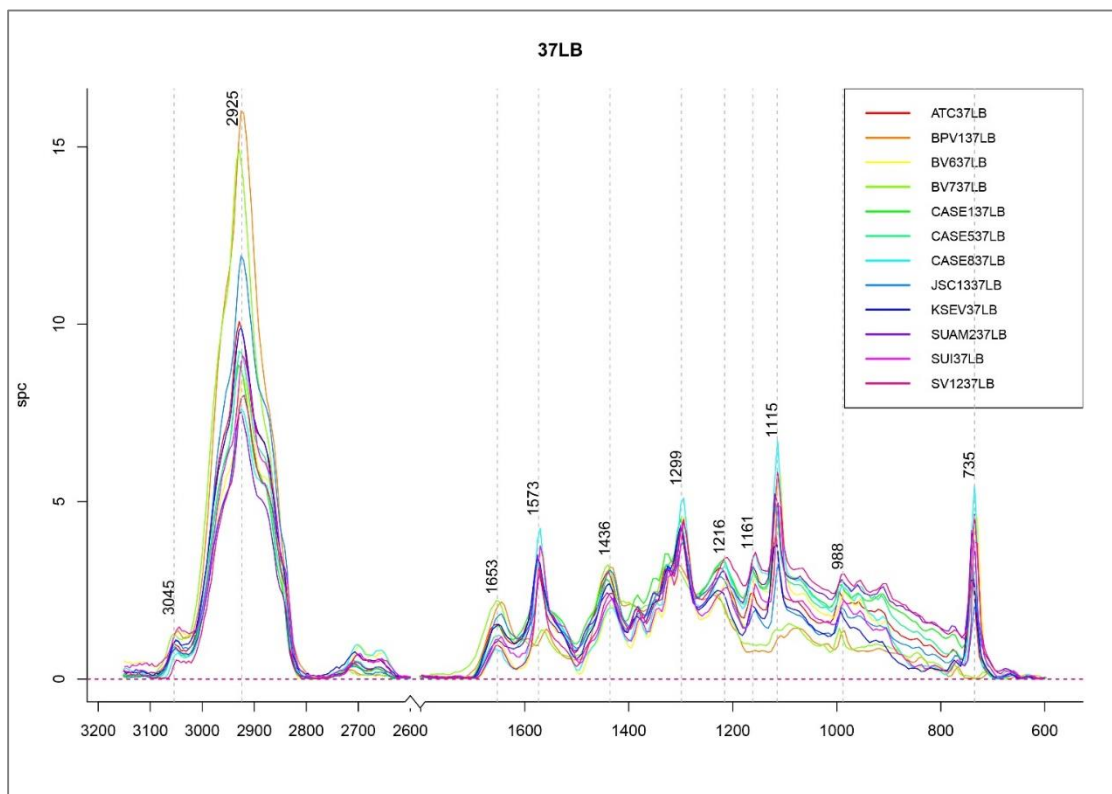
Kod izolata B_V_6 je registrovan pik na poziciji 1.380 cm^{-1} (Prilog 21). Pik u blizini ovog područja označava CH_3 vezu i fosfolipide (Tabela 16), koje iako nije teško dovesti u vezu sa bakterijskom ćelijom, navodi na razmišljanje zbog pojedinačne pojave ovog pika u ovom istraživanju.

Registrovani pik na poziciji 1331 cm^{-1} kod izolata B_V_7 (Prilog 22) ukazuje na prisustvo pirolnog prstena (Tabela 16). Iako je pirolni prsten čest u jedinjenjima živih sistema, u bakterijskoj ćeliji bi mogao biti povezan sa prisustvom nekih pigmenata ili indola (aminokiselina triptofan). Intersantno je da je intenzitet pika veći pri pH 6, što može ukazivati da niže pH vrednosti destruktivno deluju na formiranje proteina biofilma kod ovog izolata, zbog čega dolazi do razgradnje aminokiselina uz oslobađanje indola, ali se ovakve pretpostavke moraju testirati u budućim istraživanjima.

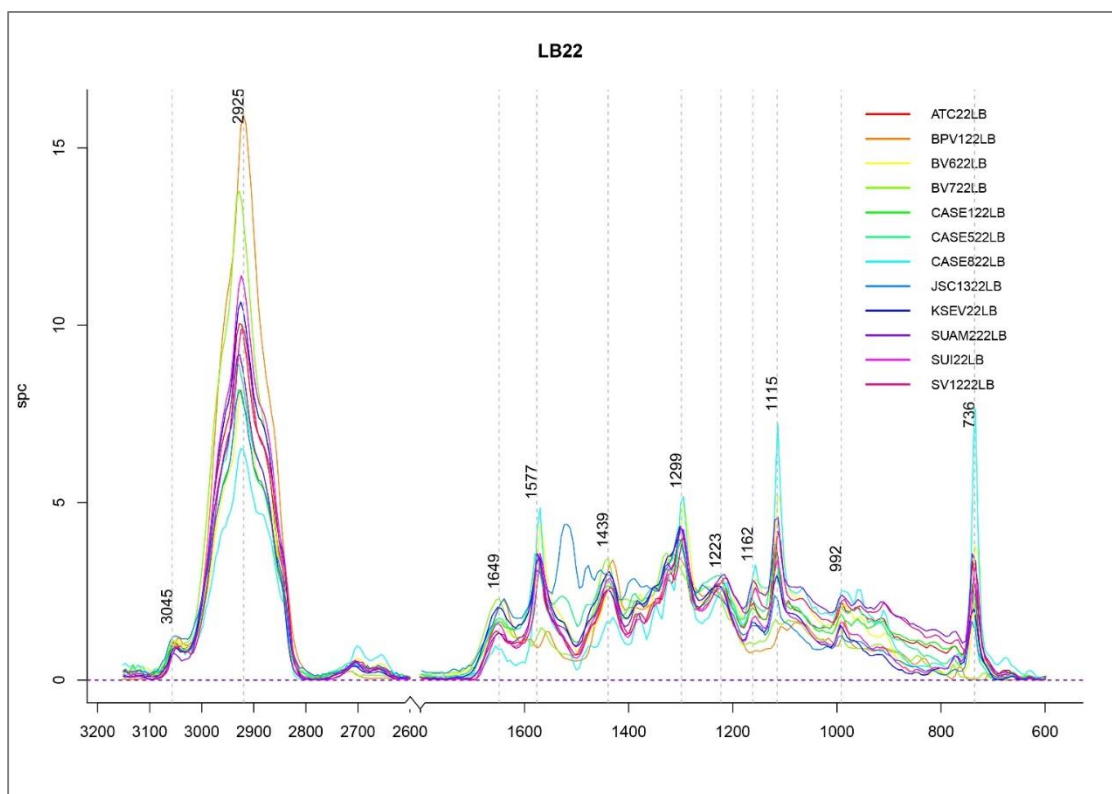
U karakterizaciji biofilmova, značajni su pikovi u regionu koji označava ugljene hidrate: 1.030 cm^{-1} (istezanje C - O), 1.068 cm^{-1} (istezanje C - O i C - C), 1.095 cm^{-1} (vibriranje glikozidne veze) i 1155 cm^{-1} (vibriranje C - C i C - O). Masyuko i sar. (2014) navode da u kontekstu biofilmova *P. aeruginosa*, ovi pikovi odgovaraju prisustvu ramnolipida, specifične grupe glikolipida, karakterističnih za formiranje biofilmova.

Izgled spektra B_PV_1 se izdvaja među ostalima (Prilog 20) uglavnom zbog ujednačenih intenziteta signala i odustva oštrih Raman pikova. Takođe, spektri biofilmova gajenih pod različitim uslovima se kod ovog izolata savršeno preklapaju, što nije slučaj sa spektrima dobijenim snimanjem ostalih biofilmova. Iako se razlike čine male (Prilozi 19 - 30), tek dodatna analiza uz kompleksnu statističku obradu će ponuditi odgovore o prisutnim razlikama i njihovom kvantitetu.

Na Slikama 25 i 26 je dat paralelan prikaz signala testiranih izolata pri istim uslovima.



Slika 25. Ramanovi signali biofilmova testiranih izolata gajeni u LB bujonu na 37°C



Slika 26. Ramanovi signali biofilmova testiranih izolata gajeni u LB bujonu na 22°C

Karakterizacija bioloških sistema Raman spektroskopijom je na početku razvoja. Iako mnogi (Silge i sar., 2014, Samek i sar., 2010, Ivleva i sar., 2008) navode ovu metodu kao pogodnu, brzu i preciznu za istraživanja u biologiji, naglašen je i značaj primene ove metode samo uz druge analitičke tehnike (Wagner i sar., 2009, Schwartz i sar., 2009).

Rezultati dobijeni u ovom radu ne odstupaju od rezultata dobijenih u drugim laboratorijama kada je u pitanju kvalitativni sastav biofilmova (Jung i sar., 2014, Masyuko i sar., 2014), ali navode na zaključak da su biofilmovi u većoj meri sastavljeni od bakterijskih ćelija, u odnosu na EPS, pa bi pripremu uzorka za snimanje trebalo modifikovati tako da se ostavi više vremena za formiranje biofilma.

Uočene razlike u spektrima različitih izolata daju nadu da se ovom metodom mogu razlikovati sojevi, ali je potrebna dalja statistička analiza radi utvrđivanja pouzdanosti.

Rast u različitim uslovima ne utiče bitno na izgled spektra osim u nekoliko slučajeva što može ukazati na specifičnost soja, tj njegovu mogućnost da odgovori na određeni faktor iz spoljne sredine.

Ovo su prvi rezultati snimljenih biofilmova populacije *P. aeruginosa* u Srbiji dobijeni na Ramanu. Oni mogu poslužiti kao polazna osnova kako za modifikaciju i prilagođavanje metode i tehnike pripreme uzoraka, tako i za dalja istraživanja koja se odnose na primenu različitih biocidnih sredstava, antibiotika ili dodatni alat za klasifikaciju sojeva *P. aeruginosa*.

5.5. IZOLACIJA BAKTERIOFAGA

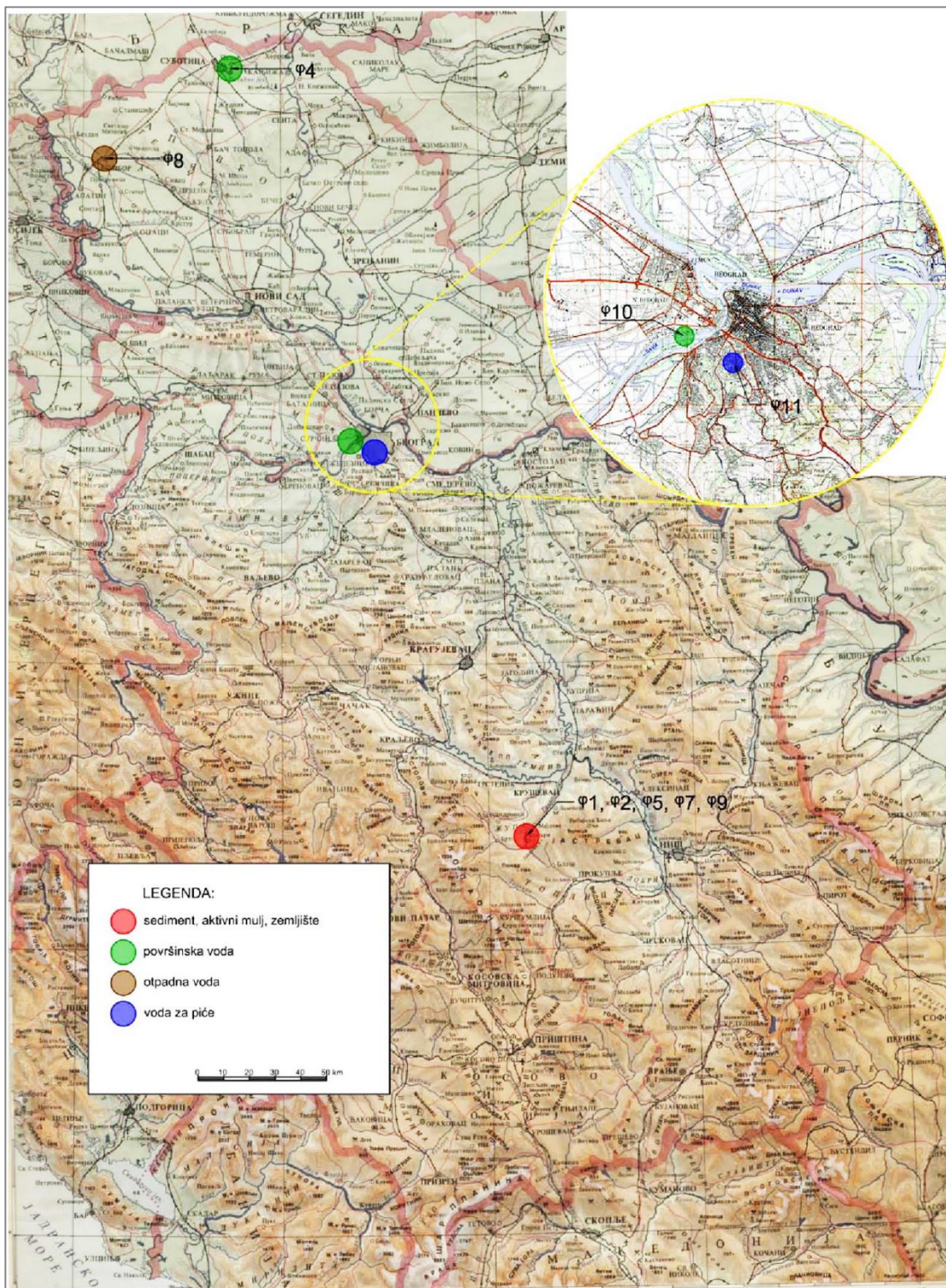
Bakteriofagi su u velikom broju prisutni u vodenim ekosistemima (Madigan i sar., 2009), a zbog bogatstva mikrobnih populacija, visokog nivoa nutrijenata i velike površine na kojima se mogu formirati biofilmovi, otpadne vode su veliki rezervoar bakteriofaga (Sepulveda-Robles i sar., 2012). Bakteriofagima se kao antimikrobnim agensima u poslednje vreme posvećuje sve veća pažnja zbog sve prisutnije rezistencije bakterija na antibiotike, posebno fagima *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* je bakterija koja luči nekoliko faktora virulencije, uspešno kolonizuje različita staništa uključujući tkiva živih organizama (Karumidze i sar., 2012), a zahvaljujući ekstracelularnim polimerima zaštićena je od delovanja različitih antimikrobnih agenasa. Interesovanje za istraživanjem

P. aeruginosa, kao i bakteriofaga ove bakterije je velik, a podaci ukazuju da je do 2011 godine od ukupnog broja deponovanih sekvenciranih genoma faga, čak 10 % bilo genoma faga *P. aeruginosa* (Garbe i sar. ,2011).

U ovom radu izvršena je izolacija faga iz različitih životnih sredina i različitih lokacija i u dalja istraživanja je uključeno 9 bakteriofaga. Uzorci su sakupljeni tokom 2014 i 2015 godine. Uzimanje uzoraka je izvršeno pod aseptičnim uslovima. Izolovani bakteriofagi potiču iz uzoraka sedimenta (5 izolata), površinske vode (2 izolata), otpadne vode (1 izolat) i vode za piće (1 izolat). Za izolaciju bakteriofaga je kao bakterija-domaćin korišteno 5 izolata bakterije *P. aeruginosa* (Tabela 17). Lokacija izolacije na kojima su izolovani bakteriofagi su prikazane na Slici 27.

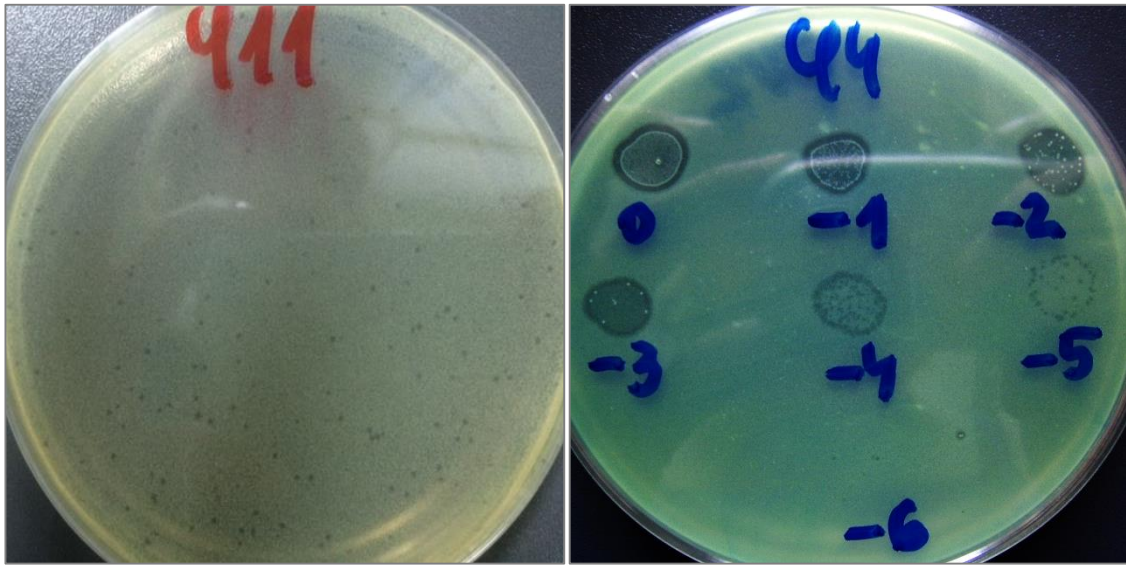
Tabela 17. Izolovani bakteriofagi, njihovo poreklo i bakterije-domaćini

	Naziv faga	Poreklo faga	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -domaćin
1.	φ 1	sediment	ĆA_SE_8
2.	φ 2	sediment	ĆA_SE_8
3.	φ 4	površinska voda	P_V_2
4.	φ 5	sediment	ĆA_SE_8
5.	φ 7	sediment	ĆA_SE_8
6.	φ 8	otpadni mulj PPOV-a	ĆA_SE_9
7.	φ 9	sediment	ĆA_SE_9
8.	φ10	površinska voda	TOP_V_16
9.	φ11	voda za piće	TČ_PV_3



Slika 27. Lokacije uzimanja uzoraka za bakteriofage

Potvrda prisustva bakteriofaga u ispitivanim uzorcima je izvršena nakon zasejavanja uzoraka metodom dvostrukog agara i pojave prosvetljenih zona „plakova“ nakon inkubacije od 24 h na 37°C (Slika 28, levo). U cilju dobijanja čistog izolata bakteriofaga, izvršena je reizolacija pojedinačnog plaka. Nakon tri uzastopne reizolacije pojedinačnog plaka se smatra da su na petri kutiji prisutni fagi koji pripadaju istoj vrsti.



Slika 28. Potvrda prisustva faga u uzorku metodom „dvostrukog agara“ i provera titra bakteriofaga metodom „spot testa“

5.6. PROPAGACIJA, PREČIŠĆAVANJE I KONCENTROVANJE IZOLOVANIH BAKTERIOFAGA

U cilju ispitivanja litičkog spektra izolovanih bakteriofaga, čista kultura bakteriofaga je umnožena i koncentrovana u rastvoru PEG8000, dok je za detaljnu karakterizaciju bakteriofaga izvršeno dodatno prečišćavanje faga ultracentrifugiranjem u gradijentu gustine CsCl.

5.6.1. *Određivanje brojnosti faga*

Broj, odnosno koncentracija faga je određena “spot testom” metodom dvostrukog agara (Slika 28, desno). U eksperimentalnom radu, kao i za karakterizaciju bakteriofaga je

korištena suspenzija faga u obogaćenom Tripton bujonu ili SM puferu koja sadrži 10^8 - 10^{10} pfu/mL. Suspenzija faga je čuvana u frižideru na 4°C , zaštićena od svetlosti.

5.7. ISPITIVANJE LITIČKOG SPEKTRA IZOLOVANIH FAGA

Testiranje litičke sposobnosti bakteriofaga je urađeno “spot testom” na Tripton agaru, inkubacijom 24 sata na 37°C . U slučaju da fag ima sposobnost infekcije bakterije, stvara se prosvetljena (mutna ili bistra) zona lize bakterije domaćina.

Tabela 18. Litička sposobnost izolovanih bakteriofaga

		Φ1	Φ2	Φ4	Φ5	Φ7	Φ8	Φ9	Φ10	Φ11
1.	ČA_SE_1	+	+	++	+	0	++	++	++	++
2.	ČA_SE_5	++	++	0	++	++	0	0	++	++
3.	P_V_2	0	0	++	++	++	++	++	++	++
4.	P_V_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.	KPL_V_4	+	+	0	+	+	0	+	+	+
6.	SU_I_1	+	0	0	+	0	+	+	+	0
7.	SU_AM_2	++	++	++	++	++	++	++	++	++
8.	VI_Z_3	0	0	0	+	0	0	0	+	+
9.	S_V_1	0	0	0	+	0	0	0	0	0
10.	D_V_5	++	++	+	++	++	+	+	+	++
11.	B_V_6	0	+	0	0	0	0	0	0	0
12.	D_V_8	0	0	0	+	0	0	0	0	0
13.	B_V_7	++	++	++	0	++	++	++	++	++
14.	KTP_V_9	+	0	+	0	+	+	+	+	+
15.	B_V_10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16.	B_PV_1	++	++	++	++	++	++	+	++	++
17.	KSE_V_11	0	0	0	0	0	+	0	0	0
18.	S_V_12	+	0	0	+	0	0	0	0	0
19.	JS_V_13	0	0	0	0	0	++	0	0	0
20.	SU_AM_4	++	++	++	++	++	++	+	+	++
21.	MIP_V_14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22.	A_V_15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23.	SO_E_2	+	+	+	0	0	0	0	0	0
24.	SO_AM_6	+	+	0	0	+	0	0	0	0
25.	B_PV_2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26.	TČ_PV_3	+	+	+	+	+	+	0	+	++
27.	TOP_V_16	++	+	++	+	+	++	+	+	++
28.	SO_M_7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29.	ČA_SE_8	++	++	++	++	++	++	+	++	++
30.	ČA_SE_9	++	++	++	++	++	++	++	++	++
31.	ATCC	++	++	+	++	++	0	0	0	++

Testirani su svi izolovani fagi, a kao bakterije domaćini su korišteni izolati *P. aeruginosa*: 30 izolata iz životne sredine i referentni soj ATCC 27853. Dobijeni rezultati su predstavljeni u odnosu na izgled plaka: ++ bistra zona lize, + mutna zona lize, 0 nije došlo do liziranja (Tabela 18).

Dobijeni rezultati ukazuju da svi izolovani fagi imaju sposobnost litičkog delovanja na većem broju izolata *P. aeruginosa*, odnosno testirani fagi su bili infektivni za 40 – 60 % testiranih izolata *P. aeruginosa*. Najširi litički potencijal su pokazali fagi $\phi 1$ i $\phi 5$, koji su pokazali sposobnost lize 18/31 testiranih izolata *P. aeruginosa*, dok su najmanji potencijal pokazali fagi $\phi 4$ i $\phi 9$ koji su pokazali sposobnost da inficiraju 13/31 domaćina. Šest testiranih izolata *P. aeruginosa* (oko 20 %) nije pokazalo osetljivost ni prema jednom testiranom fagu (Tabela 18).

Dobijeni rezultati potvrđuju vrlo usku specifičnost faga koja nije potpuna ni u okviru iste bakterijske vrste. Takođe, dobijeni rezultati su u korelaciji sa velikim brojem saopštenja koja su testirala litičku aktivnost faga. Karumitze i sar. (2012) su opisali dva litička faga, označena kao vB_Paae_Kakheti25 (forma sifovirusa) i vB_Pae_TbilisiM32 (forma podovirusa) koji su oba formirali sitne plakove sa prozirnim centrom i oba su pokazivala litičko delovanje prema širem spektru domaćina: oba su bila u mogućnosti da inficiraju 70 % od testiranih sojeva *P. aeruginosa*, dok ih je 10 % bilo rezistentno na njihovo delovanje. Takođe, ovi fagi (vB_Paae_Kakheti25 i vB_Pae_TbilisiM32) nisu imali sposobnost infekcije bakterija iz rodova *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* i *Streptococcus*, kao ni *E.coli*. Osim ovih i rezultati Knežević i sar. (2009) opisuju fage δ i 001A sposobne da inficiraju 72,7 odnosno 75,8 % testiranih izolata *P. aeruginosa*.

Osetljivost bakterije na delovanje faga određuje prisustvo receptora na površini bakterijske ćelije. Fagi *P. aeruginosa* uglavnom koriste EPS, O-antigen, tj. oligosaharidno jezgro LPS-a (lipopolisaharidne supstance) i/ili pile ćelije kao receptore (Knežević i sar., 2011). U gradnji EPS-a, odnosno pojedinih delova LPS-a učestvuju različiti molekuli ugljenih hidrata (kao što su D-manoza, L-ramnoza, D-glukozamin), dok su pili proteinske strukture, tako da specifičnost vezivanja faga određuje karakteristični molekularni sastav na površini ćelije.

5.8. KARAKTERIZACIJA BAKTERIOFAGA

Istraživanja Li i sar. (2010) u kojima su koristili restrikcionu analizu genoma faga, nasumičnu amplifikaciju polimorfne DNK (RAPD), TEM morfologiju, i analizu spektra domaćina, su pokazala da je kombinacija ovih metoda pogodnija za klasifikaciju bakteriofaga, od bilo koje pojedinačne metode. Da bi se razumeo izuzetno velik biodiverzitet bakteriofaga, neophodno je primenjivati različite metode, uključujući genomiku i proteomiku (Nelson, 2004; Ackermann 2009).

Većina opisanih bakteriofaga kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosae* pripadaju rodu *Caudovirales*, odnosno imaju morfologiju glava-i-rep i sadrže dvostruku-DNK (dsDNA). Moguće je da postoji neka forma endemizacije a da bi se otkrila puna raznolikost faga potrebna su nova istraživanja (Sepúlveda-Robles i sar., 2012).

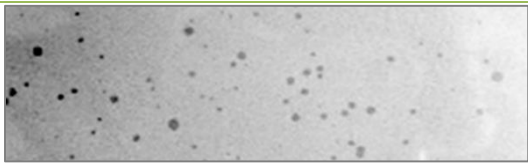
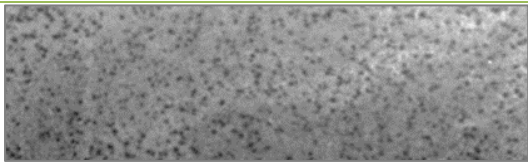
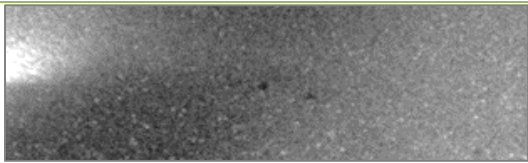
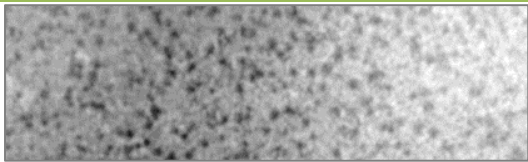
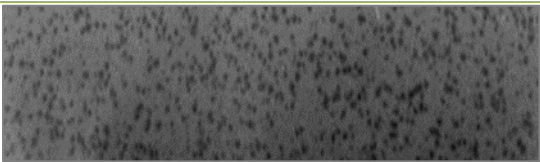
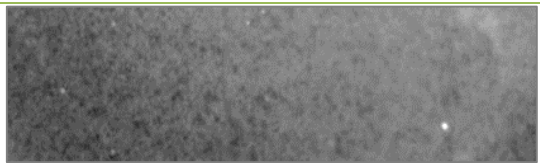


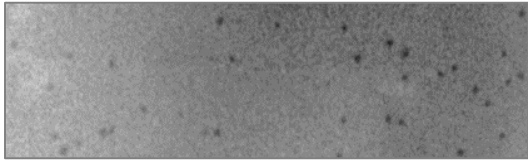
5.8.1. Morfologija plakova

Morfologija plakova je određena na Trypton agaru, metodom dvostrukog agara, odnosno pregledom pojedinačnih plakova. Ispitivani bakteriofagi su imali ujednačenu morfologiju plakova (Tabela 19). Plakovi su sitni, dijametra između 1-3 mm. Od devet ispitivanih bakteriofaga, 8 faga (ϕ 1, ϕ 2, ϕ 4, ϕ 5, ϕ 7, ϕ 9, ϕ 10, ϕ 11) je imalo prozirne plakove, dok je samo 1 (označen kao ϕ 8) imao mutnu formu plaka (Tabela 19).

Pretpostavlja se da su veliki bistri plakovi karakteristika virulentnih (litičkih) faga (Kumari i sar., 2009) i da većina faga *P. aeruginosa* proizvodi jasne, prozirne plake u rasponu od 0,5 do 5 mm, dok samo mali broj stvara mutne plake (Sepúlveda-Robles i sar., 2012).

U pogledu morfologije plakova, podaci u literaturi ukazuju da su plakovi bakteriofaga izolovanih na *P. aeruginosa* su sitni, veličine 1-4 mm, bistri i bez prisustva oreola (Pires i sar., 2011; Karumitze i sar., 2012; Han i sar., 2014).

Tabela 19. Morfološke karakteristike izolovanih bakteriofaga

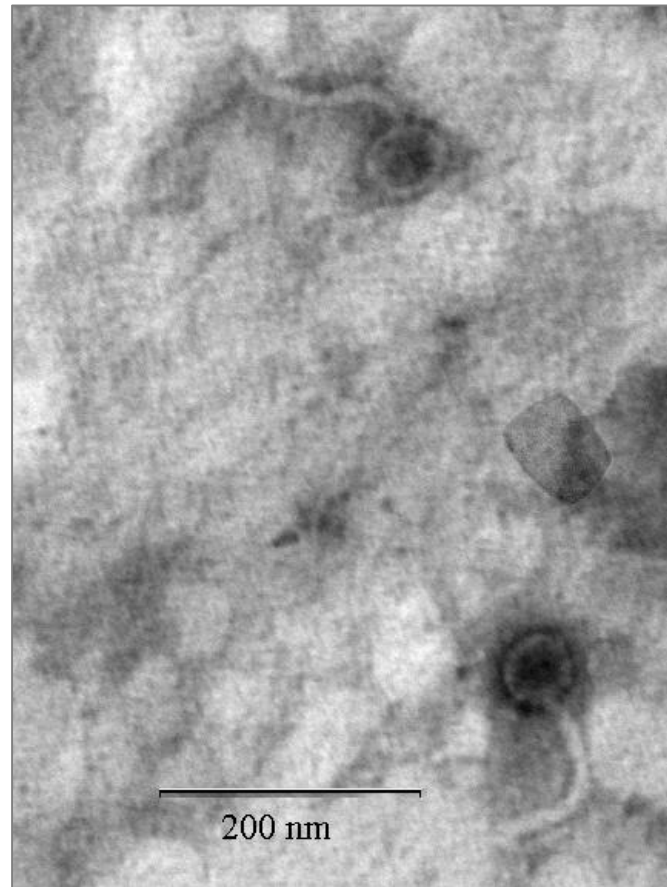
Oznaka	Dijametar		Prisustvo		Izgled plakova na Trypton agaru
	plaka	prozračnost	oreola		
Φ1	2	Bistar	Bez		
Φ2	2	Bistar	Bez		
Φ4	2	Bistrar	Bez		
Φ5	2,5	Bistar	Bez		
Φ7	2	Bistar	Bez		
Φ8	3	Mutan	Bez		
Φ9	2,5	Bistar	Bez		
Φ10	2	Bistar	Bez		
Φ11	2,5	bistar	bez		

5.8.2. Izgled odabranih bakteriofaga na elektronskom mikroskopu

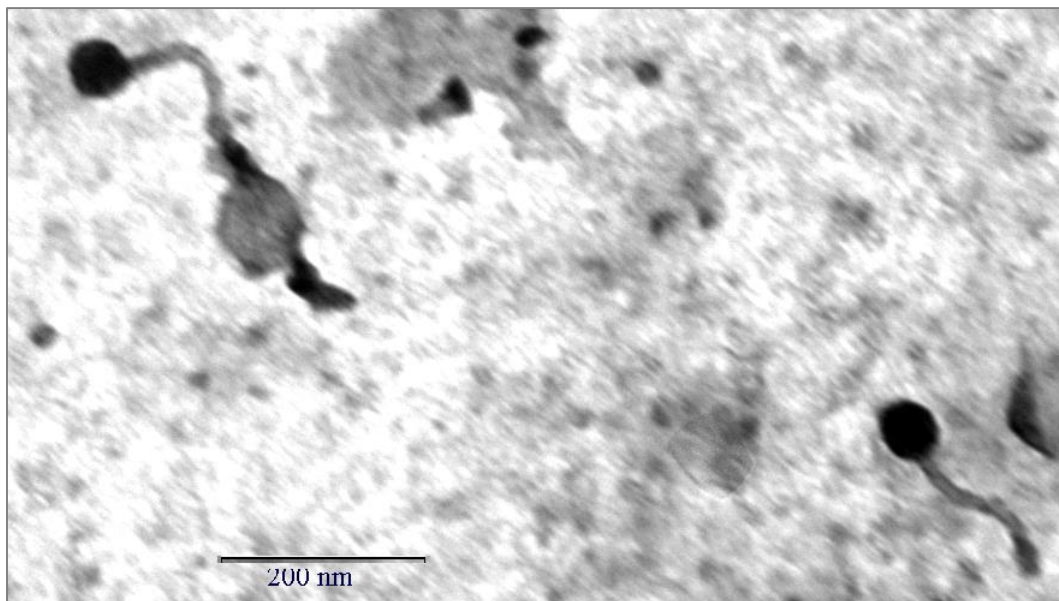
Transmisiona elektronska mikroskopija je prihvaćena kao osnovna metoda za dobijanje bazičnih podataka u klasifikaciji faga. Taksonomska pripadnost posmatranih faga je određena na osnovu klasifikacije koju je predložio Bradly (1967), odnosno dopunjene klasifikacije Ackermann i DuBow, 1987. Snimljeni fagi su imali ikozaedarnu glavu i dugačak rep što ih svrstava u Morfotip B u okviru familije *Siphoviridae* (red *Caudovirales*) koja objedinjuje fage sa dugačkim fleksibilnim, ali nekontraktilnim repom (Slike 29 i 30)..

Fagi sa repom su raspoređeni u okviru tri familije: *Myoviridae*, *Siphoviridae* i *Podoviridae*. Dokazano je da oko 96 % istraživanih faga pripada grupi faga sa repom. Do 2014. godine opisano je oko 499 *P. aeruginosa* faga sa repom, od toga 139 (36 %) iz familije *Myoviridae* (Garbe i sar., 2011), 36 % *Siphoviridae* i 28 % *Podoviridae* (Han i sar., 2014).

Na osnovu fotografija snimljenih TEM-om je procenjena veličina kapsida faga koja iznosi približno 48 nm za $\phi 4$ i oko 64 nm za $\phi 5$.



Slika 29. Transmisiona elektron mikrografija faga $\phi 4$

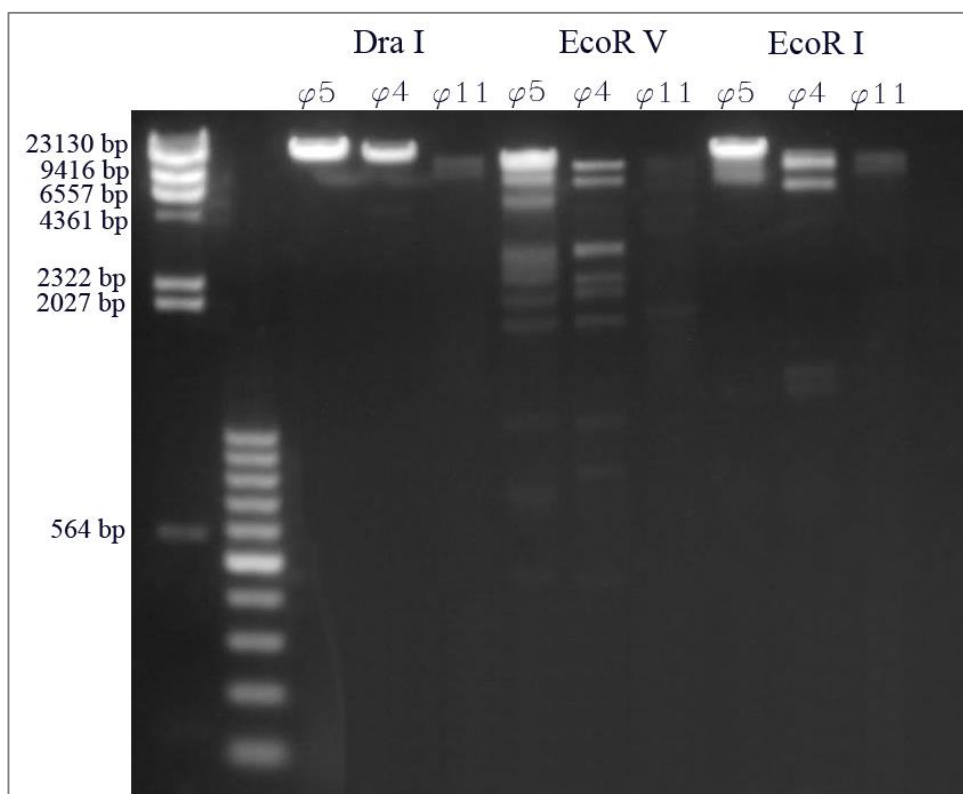


Slika 30. Transmisiona elektron mikrografija faga $\phi 5$

5.8.3. Određivanje karakteristika genoma odabranih bakteriofaga

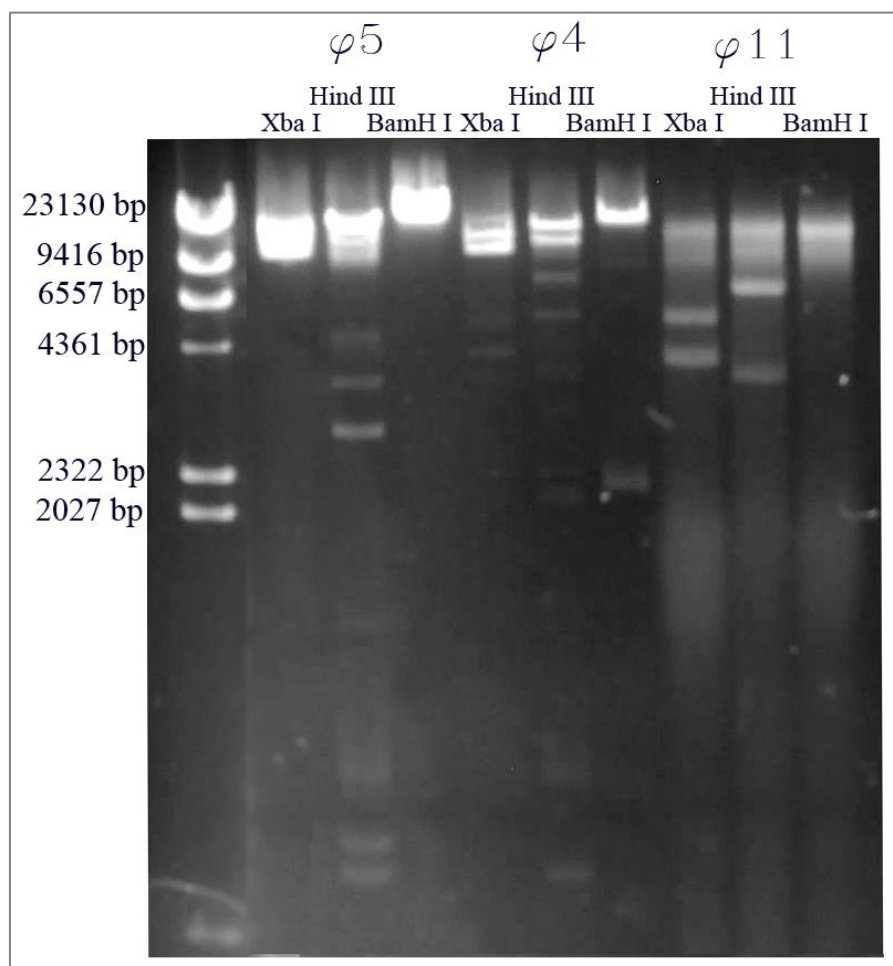
Rezultati restrikcione digestije nukleinskih kiselina bakteriofaga su pokazali da ispitivani fagi $\phi 5$, $\phi 4$ i $\phi 11$ imaju genom sačinjen od dvostrukog molekula DNK, te procenjenu masu genoma >40 kb, što odgovara rezultatima dobijenim elektronskom mikroskopijom i ukazuje na pripadnost testiranih faga porodici *Siphoviridae*. Analizirani fagi su međusobno morfološki slični, ali je analiza genoma pokazala da se genetski razlikuju, odnosno da su klonalno različiti.

Enzim Dra I nije restrikciono delovao na DNK ni jednog od testiranih faga. Primena enzima EcoR V je dovela do restrikcije DNK na veći broj fragmenata različitih dužina. Broj i dužina fragmenata su različiti kod testiranih faga, što ukazuje na razlike u njihovim genomima (Slika 31). Enzim EcoR I je sekao DNK $\phi 5$ na jednom mestu, $\phi 4$ na tri mesta, dok na DNK faga $\phi 11$ nije izazvao digestiju.



Slika 31. Restrikciona mapa testiranih faga za endonukleaze Dra I, EcoR V i EcoR I

Analize su pokazale da su testirane DNK faga $\phi 5$ i $\phi 8$ bile rezistentne na delovanje enzima BamH I, dok je na $\phi 4$ došlo do digestije (Slika 32). Razlike u genomu su potvrđene i rezultatima digestije DNK enzimima Xba I i Hind III. Delovanjem ovih enzima DNK faga je isečena na veći broj fragmenata: Xba I je dao sa DNK faga $\phi 5$ dva fragmenta bliskih veličina, $\phi 11$ tri uočljiva fragmenta, a $\phi 4$ više od 4 fragmenta; dok je nakon digestije Hind III enzima na gelu uočeno najmanje 7 traka na DNK $\phi 5$ faga, najmanje 8 traka na $\phi 4$ i najmanje tri trake na $\phi 11$. Dužina dobijenih fragmenata DNK nije ista, što je još jedan od dokaza različitosti na genetskom nivou među testiranim fagima (Slika 32). Analizirani fagi su izolovani iz različitih životnih sredina, kao i na različitim domaćinima.



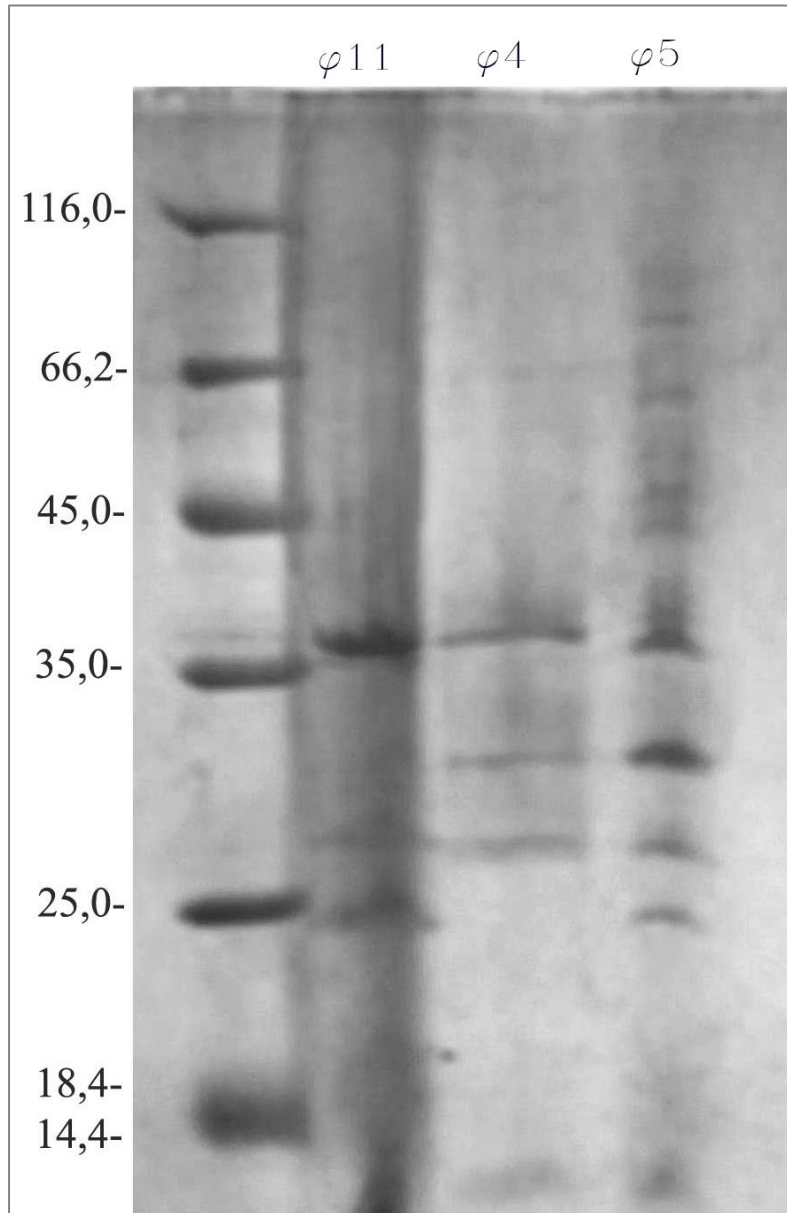
Slika 32. Restrikciona mapa testiranih faga za endonukleaze Xba I, Hind III i BamH I

5.8.4. Određivanje proteinskog profila odabranih faga

Rezultati ispitivanja proteinskog profila faga su u skladu sa ranijim ispitivanjima morfoloških karakteristika i veličine genoma faga. Testirani fagi poseduju glavni protein kapsida koji odgovara molekulskoj masi kapsida familije *Siphoviridae* i iznosi 36 kDa.

Na elektroforegramu virusi $\phi 11$ i $\phi 4$ imali su najmanje tri uočljiva strukturalna proteina, dok u sastav virona $\phi 5$ ulazi najmanje 10 proteina (Slika 33). Iako se proteinski profili analiziranih faga razlikuju, uočava se prisustvo proteina iste molekulske mase kod svih faga. Ovaj rezultat ukazuje da i pored postojanja razlika među testiranim fagima na genetskom nivou, oni su među sobom fenotipski veoma slični. Takođe ne treba zanemariti ni činjenicu da u koncentracije proteina u uzorcima bile različite, zbog čega neke trake mogu da nedostaju, ako je protein ponovljen u manjem broju kopija u virionu.

Iako morfološke karakteristike, kao i proteinski profil ukazuju na veliku sličnost među testiranim fagima, dobijeni rezultati ukazuju da se oni ipak među sobom razlikuju na genetskom nivou.

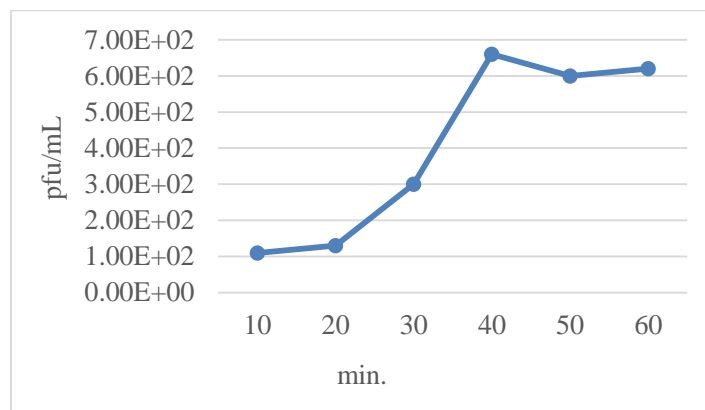


Slika 33. Proteinski profil faga $\phi 11$, $\phi 4$ i $\phi 5$

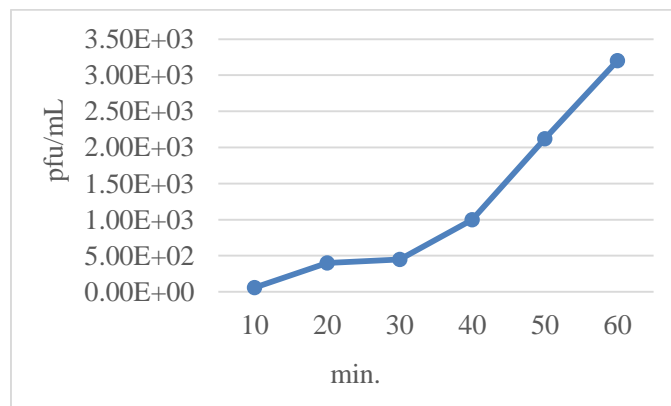
5.9. KRIVE RASTA ODABRANIH BAKTERIOFAGA

Kriva rasta bakteriofaga predstavlja ciklus umnožavanja faga. U ovom radu je urađeno merenje trajanja pojedinih faza životnog ciklusa za 8 bakteriofaga u trajanju od 60 minuta. Merenja su urađena u dva ponavljanja, a prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti dobijenih merenja. Rezultati su pokazali da su svi testirani fagi imali kratak latentni period i da su se prve virusne čestice oslobođene iz inficiranih bakterija

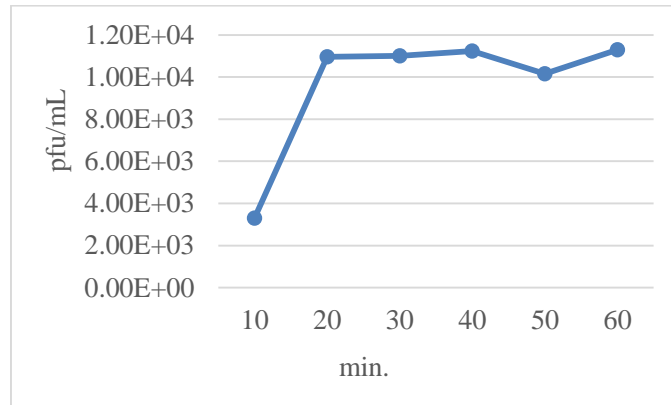
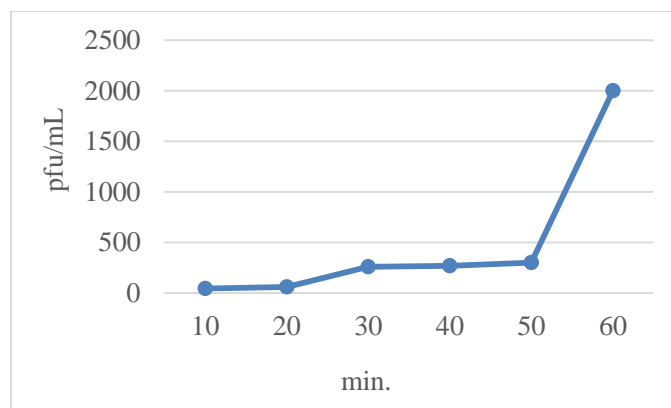
pojavljivale već nakon 10 – 20 minuta inkubacije (Grafikoni 9 - 12). Broj oslobođenih čestica nakon 10 minuta inkubacije je varirao od 44 pfu/mL (ϕ 11) i 60 pfu/mL (ϕ 8) do 3300pfu/mL (ϕ 10) i 4560 pfu/mL (ϕ 4). Takođe, period rasta, tj. period povećavanja broja virusnih čestica nakon njihovog oslobađanja iz bakterija među testiranim fagima je varirao. Najkraći životni ciklus je ustanovljen kod ϕ 9, 30 minuta, dok je kod većine testiranih faga ciklus trajao 40 minuta (ϕ 1, ϕ 2, ϕ 10) uz ukupan broj oslobođenih virusa od 4000 pfu/mL (ϕ 1), 660 pfu/mL ϕ 2 i 11240 pfu/mL ϕ 10. Fagi ϕ 4, ϕ 8 i ϕ 11 imaju životni ciklus duži od 60 minuta (Grafikoni 10 i 12).



Grafikon 9. Kriva rasta bakteriofaga ϕ 2



Grafikon 10. Kriva rasta bakteriofaga ϕ 8


 Grafikon 11. Kriva rasta bakteriofaga $\phi 10$

 Grafikon 12 Kriva rasta bakteriofaga $\phi 11$

Han i sar. (2014) su opisali rezultate krive rasta izolovanog *P. aeruginosa* faga $\phi PA-HF17$ iz familije *Podoviridae* koji je imao kratak latentni period (10 minuta) uz 200 pfu/inficiranoj ćeliji. Dužina latentnog perioda varira kod različitih faga, i prema do sada publikovanim rezultatima kreće se od 13 minuta za kolifag T1, 25 minuta za fag $\phi Ye03-12$ (iz familije *Podoviridae*), 70 minuta za A511 (familija *Siphoviridae*), pa i do 17 časova fag bakterije *Halobacterium salinarum* (Calendar i Inman, 2005). Rezultati koji se odnose na fage *P. aeruginosa* su takođe različiti: latentni period faga LDK 16 traje 25 minuta uz oslobađanje 120 novih viriona po bakterijskoj ćeliji, za fag ϕKMV traje 35 minuta i oslobađa se 55 novih viriona, dok fag LKA1 produkuje 225 viriona, pri čemu je latentni period trajao 40 minuta (Ceyssens i sar., 2006).

Parametri krive rasta faga se smatraju bitnim kada je u pitanju veličina plaka, koja je direktno proporcionalna broju viriona koji se oslobađaju po jednom ciklusu, adsorpcionoj

konstanti i brzini difuzije faga u medijumu, a obrnuto proporcionalna dužini latentnog perioda (Abendon i Culler, 2007). Ovi parametri se smatraju važnim pokazateljima litičke efikasnosti faga, i sa tog aspekta je poželjno da fag ima što kraći latentni period, a da se oslobađa što veći broj viriona po ciklusu. Na trajanje pojedinih faza u velikoj meri utiče i fiziološko stanje ćelije, a takođe je eksperimentalno pokazano da veličina plaka, a samim tim i parametri krive rasta nemaju presudan značaj u efikasnosti lize (Kutter i Sulakvelidze, 2005).

Iako značajni, parametri krive rasta nemaju presudan značaj u litičkom potencijalu faga. Proces lize je složen i uključuje veliki broj faktora, a prihvatljiv matematički model koji bi povezoao sve parameter sa litičkom efiksanošću faga još uvek ne postoji (Knežević, 2009).

5.10. ISPITIVANJE DELOVANJA BAKTERIOFAGA NA FORMIRANJE BIOFILMOVA

Biofilmovi *P. aeruginosa* obezbeđuju ovoj bakteriji opstanak pod različitim uslovima sredine kao i otpornost na delovanje različitih biocida, uključujući antibiotike. Istraživanja sprovedena u ovom radu su pokazala da izolati *P. aeruginosa* mogu formirati filmove u različitim uslovima životne sredine (podpoglavlje 5.3.1) kao i da su, na osnovu Ramanovih pikova, ispitivani biofilmovi izolata kvalitativno slični i da nema razlike u kvalitetu biofilмова u zavisnosti od uslova sredine (Prilozi 19 - 30). Ne postoji jedinstvena teorija koja objašnjava formiranje biofilмова, što otežava njihovo uklanjanje primenom anti-biofilm jedinjenja koja deluju na nivou regulatora formiranja biofilмова, ili sprečavanjem fenotipskih manifestacija koja dovode do njegovog formiranja (sprečavanje kretanja ili produkcije ramnolipida ili piocijanina). Primena bakteriofaga u kontroli rasta i formiranja biofilмова je jedan od mogućih načina biocidnog delovanja na *P. aeruginosa*. Veliki broj radova upućuje na mogućnost delovanja faga na biofilmove (Hanlon i sar., 2001; Knežević i sar., 2008; Pires i sar., 2011), ali dosadašnja znanja ne omogućavaju primenu bakteriofaga kao jedinstveno i uniformno rešenje u rešavanju problema biofilмова. Eksperimentalni podaci (Sharp i sar., 2003) su pokazali da

bakteriofagi uspešno rastu u biofilmu *P. aeruginosa*, posebno u tek formiranim biofilmovima, dok su Ceri i sar. (1999) koristeći biofilmove stare dva dana, pokazali da 17 sojeva *P. aeruginosa*, koji su pokazali osetljivost na fage “spot testom”, nije bilo osetljivo na delovanje faga u biofilmu.

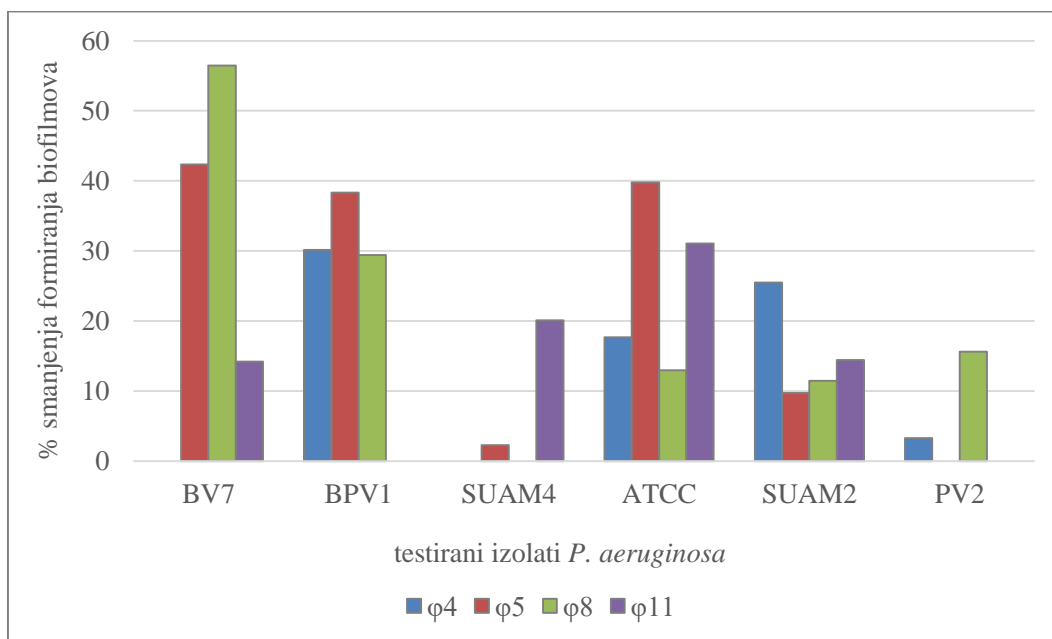
U radu je ispitivanje delovanja faga na formiranje biofilмова testirano kolorimetrijskom metodom u mikrotitar pločama u trajanju od 24 sata na 22°C i 37°C. U testovima su korišteni fagi $\phi 4$, $\phi 5$, $\phi 8$ i $\phi 11$, izolovani iz različitih uzoraka koristeći različite izolate *P. aeruginosa* kao domačine (Tabela 17, Slika 27). Za eksperimente su korišteni izolati *P. aeruginosa*: B_V_7, P_V_2 poreklom iz površinske vode, B_PV_1, poreklom iz vode za piće i SU_AM_4 i SU_AM_2 poreklom iz aktivnog mulja, kao i referentni soj *P. aeruginosa* ATCC 27853. Izbor izolata koji će biti uključeni u eksperiment je izvršena na osnovu prethodno dobijenih rezultata o potencijalu formiranja biofilмова (Podpoglavlje 5.3.1.): B_V_7, B_PV_1 i SU_AM_2 su okarakterisani kao srednje ili visoko biofilm-produkujući izolati, dok su SU_AM_4 i P_V_2 slabo biofilm-produkujući izolati, kao i pokazane osetljivosti ovih izolata na delovanje faga provereno “spot testom” (Tabela 18). Pre izvođenja eksperimenata dodatno je proverena osetljivost bakterija na delovanje bakteriofaga, nakon čega su sojevi SU_AM_4 i ATCC 27853 isključeni iz eksperimenta sa fagom $\phi 11$ na 22°C, jer je konstatovana njihova neosetljivost na ovoj temperaturi.

Rezultati delovanja bakteriofaga na formiranje biofilma su prikazani u procentima smanjenja biomase formiranog biofilma u odnosu na kontrolne biofilmove. Tabela prikaz srednjih vrednosti izmerenih OD₆₃₀ su dati u Prilozima 31 - 35.

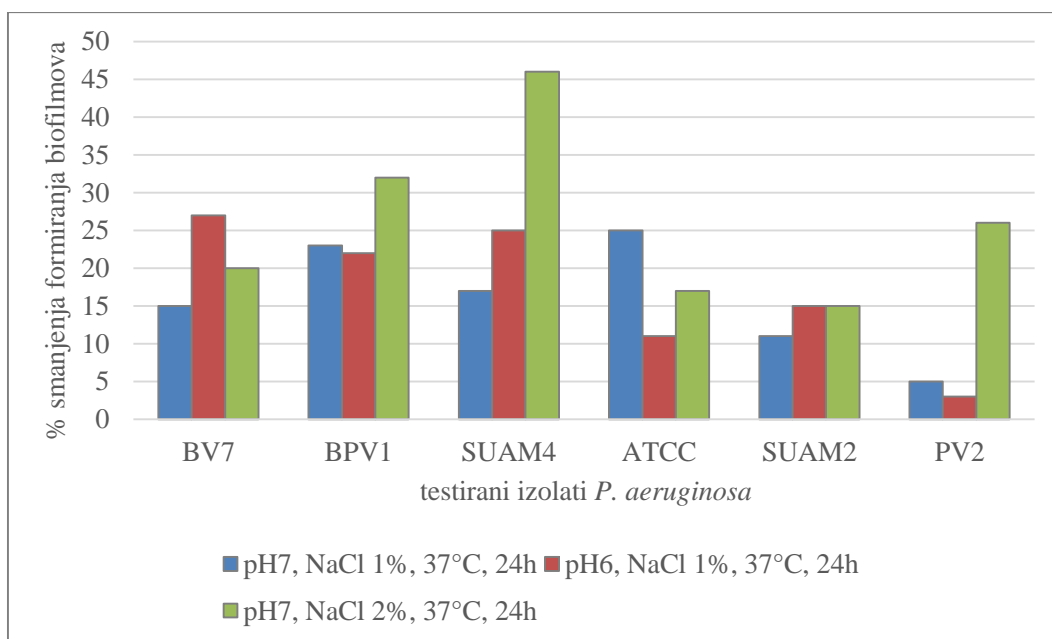
Inhibitorno delovanje testiranih faga na formiranje biofilмова izraženo u procentima umanjnja, na temperaturi inkubacije od 37°C je prikazana na Grafikonu 13.

Izolati *P. aeruginosa* su pokazali različitu osetljivost na delovanje faga (Grafikon 13). Prosečne vrednosti umanjnja biomase formiranih biofilмова u odnosu na kontrolne biofilmove, ukazuju na ujednačen uticaj $\phi 5$ i $\phi 8$ (oko 20 % umanjnja), i niži uticaj $\phi 4$ i $\phi 11$ od oko 12 %. Delovanje faga $\phi 4$ nije dovelo do smanjenja formiranja biofilмова izolata B_V_7 i SU_AM_4, dok je efekat umanjnja biofilma izolata P_V_2 iznosio samo 3 %. Najbolji efekat delovanja $\phi 4$ je pokazan na izolatu B_PV_1 gde je došlo do 30 % smanjenja formiranja biofilma. Fag $\phi 5$ je uticao na formiranje biofilмова izolata B_V_7,

B_PV_1 i ATCC 27853 kod kojih je izmerena manja biomasa biofilмова u odnosu na kontrolu za oko 40 %, dok je delovanje na ostale ispitivane izolate bilo nisko, ili je potpuno izostalo (P_V_2).



Grafikon 13. Uticaj bakteriofaga na formiranje biofilмова na 37°C



Grafikon 14. Uticaj bakteriofaga φ11 na formiranje biofilмова na 37°C pri izmenjenim uslovima životne sredine

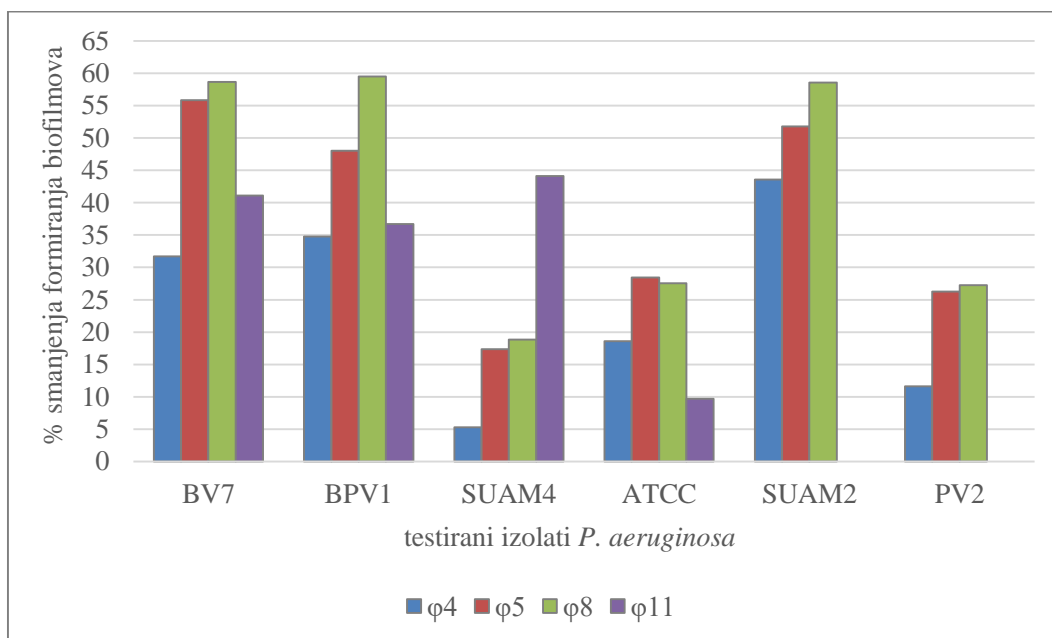
Najbolji efekat umanjena formiranja biofilma je postignut delovanjem faga $\phi 8$ na izolat B_V_7 od 56 %, dok je na izolatu B_PV_1 postignuto umanjeno od 30 %. Izolat SU_AM_4 nije pokazao osetljivost na delovanje ovog faga, dok je kod izolata SU_AM_4, P_V_2 i korištenog referentnog soja došlo do oko 10 % smanjenja formiranja biofilma.

Delovanje faga $\phi 11$ je dovelo do smanjenja u formiranju biofilma izolata SU_AM_4 (20 %), B_V_7 i SU_AM_2 oko 10 %, dok su izolati B_PV_1 i P_V_2 bili neosetljivi na delovanje ovog faga. Uticaj $\phi 11$ na ATCC 27853 je iznosio oko 30 % umanjena formiranja biofilma.

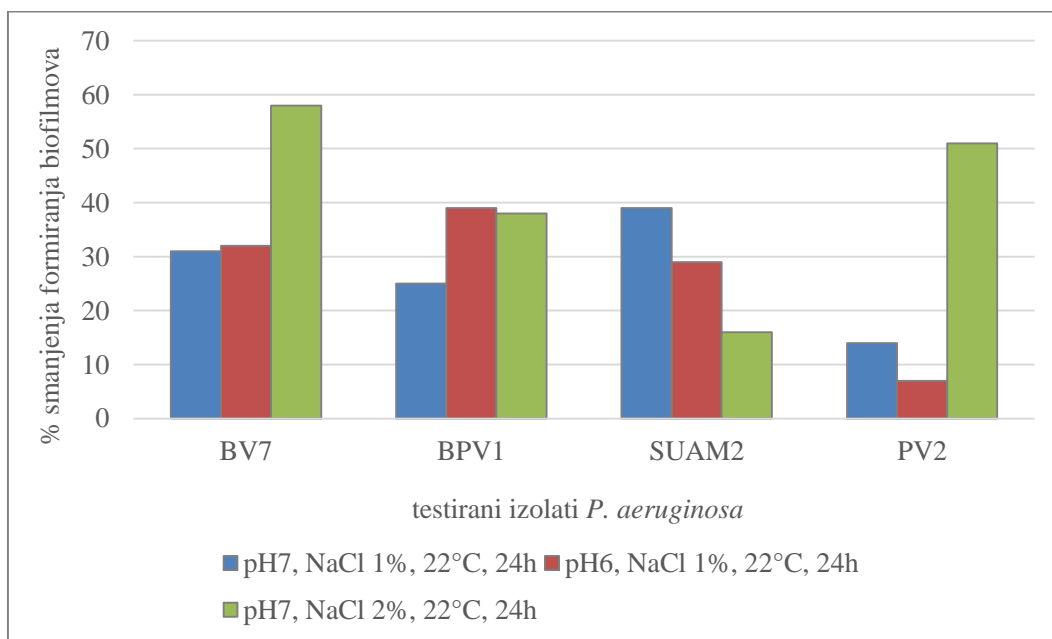
Uticaj bakteriofaga $\phi 11$ na formiranje biofilmova je testirano i pod različitim uslovima sredine u pogledu pH i koncentracije NaCl. Na svim testiranim izolatima, i pod svim testiranim uslovima je postignut efekat umanjena biomase formiranih biofilmova u odnosu na kontrolne biofilmove (Grafikon 14, Prilog 34). U uslovima pH 7, NaCl 1 %, delovanjem faga je konstatovana manja biomasa biofilma između 5 i 25 % (Grafikon 14), u uslovima snižene pH vrednosti, umanjeno je iznosilo od 3 do 27 %, dok je pri povišenoj koncentraciji NaCl (2 %) iznosilo između 15 i 46 %. Procentualno je najmanje umanjeno biofilma postignuto kod izolata P_V_2 (3 % pri pH 6/NaCl 1 % i 5 % pri pH 7/NaCl 1 %), dok je najveće kod izolata SU_AM_4 u uslovima pH 7/NaCl 2 %, 46 %. Prosečne vrednosti umanjena biomase pri uslovima pH 6 i pH 7/NaCl 1 % su ujednačene, i iznose 16 %, odnosno 17 %, dok dobijeni rezultati upućuju da je povećana koncentracija NaCl bila stimulatívna sredina za litičko delovanje faga, pa je pri ovim uslovima postignuto smanjenje biomase biofilma, u proseku, za 26 %.

Raniji rezultati (Sekcija 5.3.1.) su pokazali da je niža temperatura (22°C) favorizovala rast biofilmova. Procentualno umanjeno formiranja biofilmova dodavanjem faga u bakterijsku suspenziju je prikazano na Grafikonu 15, dok su u Prilozima 31, 32, 33 i 35 date srednje vrednosti izmerenih OD₆₃₀. Svi testirani bakteriofagi su pokazali delovanje na formiranje biofilmova testiranih izolata pri sniženoj vrednosti temperature. Prosečne vrednosti umanjena biofilmova delovanja faga $\phi 5$, $\phi 8$ i $\phi 11$ su bile ujednačene i iznosile približno 40%, dok je prosečno umanjeno delovanjem faga $\phi 4$ iznosilo 24%. Najbolji efekat umanjena formiranja biofilmova je postignut delovanjem faga $\phi 8$ na izolatima B_V_7, B_PV_1 i SU_AM_2 od približno 60 % umanjena dok je umanjeno biofilmova

na ovim izolatima delovanjem faga $\phi 5$ bilo oko 50 %. Delovanje faga $\phi 11$ je dovelo do smanjenog formiranja biofilmova za oko 40 % izolata B_V_7, B_PV_1 i SU_AM_4, dok je uticaj na ATCC 27853 iznosio samo 10 % uamanjenja formiranja biofilma u odnosu na kontrolu.



Grafikon 15. Uticaj bakteriofaga na formiranje biofilmova na 22°C



Grafikon 16. Uticaj bakteriofaga $\phi 11$ na formiranje biofilmova na 22°C pri izmenjenim uslovima životne sredine

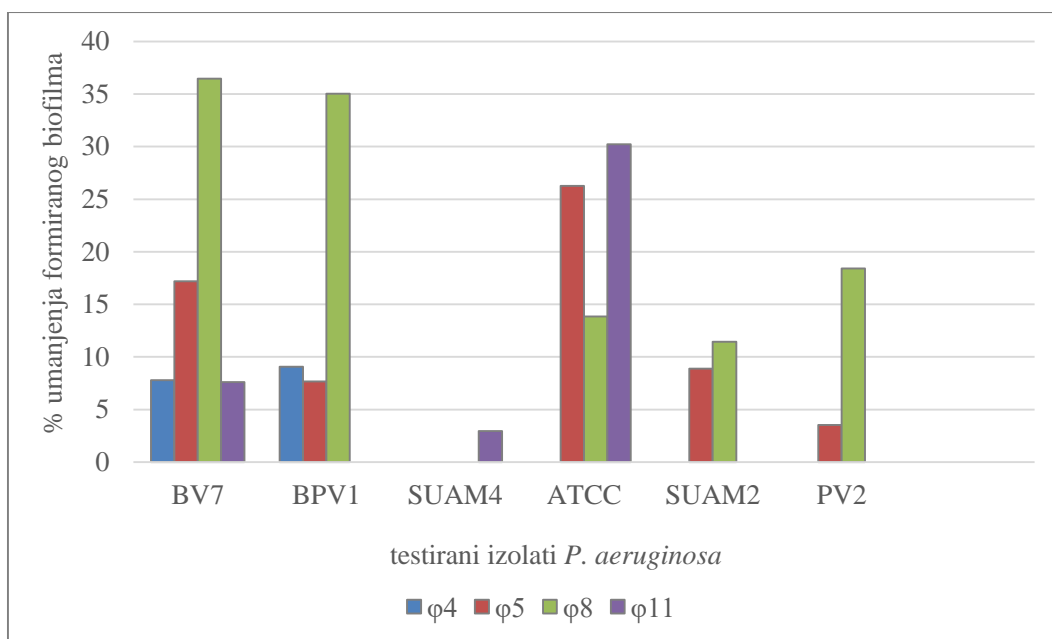
Testiranje uticaja $\phi 11$ na SU_AM_2 i P_V_2 nije urađeno pošto ovi izolati nisu pokazali osetljivost na delovanje ovog faga u ovim uslovima temperature predhodno sprovedenim "spot testom". Smanjenje biofilma delovanjem faga $\phi 4$ na izolat SU_AM_2 je iznosilo 43 %, dok je efekat na B_PV_1 i B_V_7 bio nešto niži, 35 % odnosno 32 %. Najniži efekat na formiranje biofilma (5 % smanjenja) je konstatovan delovanjem faga $\phi 4$ na SU_AM_4.

Delovanje $\phi 11$ je izmereno i pri izmenjenim uslovima spoljašnje sredine. Pri uslovima pH 7, NaCl 1 % smanjenje biofilma je iznosilo između 14 i 39 %. U uslovima snižene pH vrednosti, umanjnje je iznosilo između 7 i 38 %, dok je pri povišenim vrednostima NaCl iznosilo između 16 i 58 %. Prosečne vrednosti za % umanjnja biofilma su iznosile 17 % u uslovima NaCl 1 %, i 41 % pri NaCl 2 %. U uslovima povećane koncentracije NaCl, % umanjnja biofilmova je iznosio i preko 50 %: 58 % B_V_7 i 51 % P_V_2 (Grafikon 16).

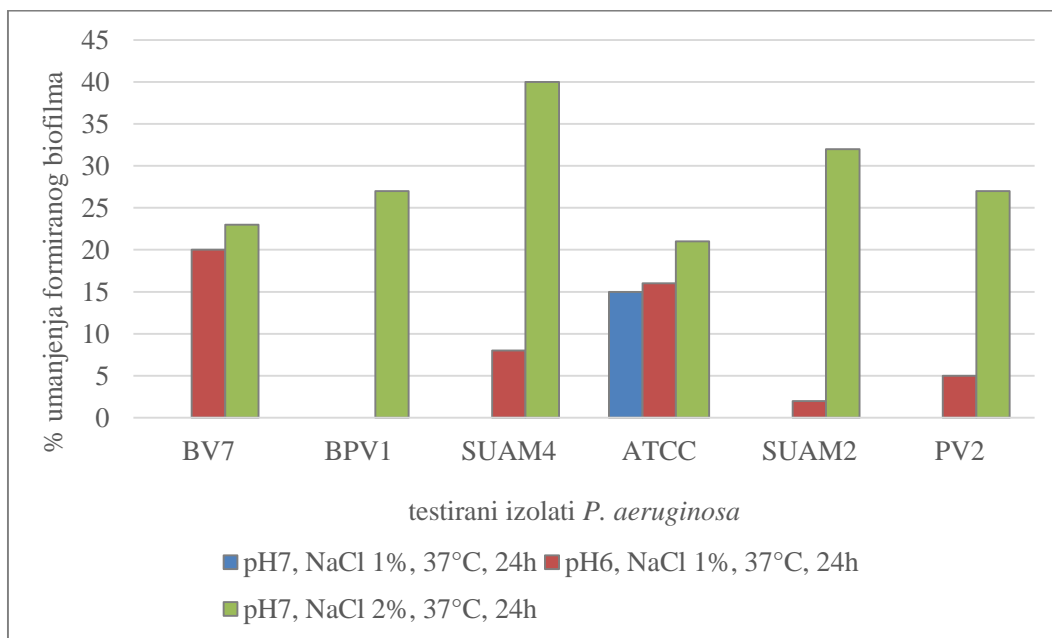
Uticaj bakteriofaga na formirane dvadesetčetvoro časovne biofilmove u smislu smanjenja biomase biofilmova je prikazana u procentima na Grafikonu 17, dok su srednje vrednosti izmerenih OD₆₃₀ date u Prilozima 31 – 35. Najbolji efekat umanjnja biomase formiranih biofilmova je pokazao fag $\phi 8$ čijim delovanjem je smanjen biofilm izolata B_V_7 i B_PV_1 za oko 35 %, P_V_2 za 18 %, ATCC 27853 i SU_AM_2 za oko 13 %. Takođe, $\phi 8$ je uz $\phi 5$ doveo do umanjnja biomase biofilmova na 5 od 6 testiranih izolata *P. aeruginosa*. $\Phi 5$ je doveo do umanjnja biofilma ATCC 27853 za 26 %, B_V_7 za 17 %, dok je na izolatima B_PV_1, SU_AM_2 i P_V_2 formirana biomasa umanjena za manje od 10 %.

Fag $\phi 11$ je delovao na tri od šest testiranih izolata *P. aeruginosa*, a najbolji efekat je postignut na ATCC 27853 30 %, dok je biofilm izolata B_V_7 umanjnjen za 7 %, a SU_AM_4 za 3 %. Ujedno, ovaj fag je jedini pokazao delovanje na biofilm izolata SU_AM_4. Fag $\phi 4$ je delovao na biofilmove B_V_7 i B_PV_1, a efekat umanjnja je bio manji od 10 % (Grafikon 17). Delovanje faga $\phi 11$ je testirano i u uslovima izmenjene pH vrednosti i NaCl. Prosečne vrednosti izmerenih OD₆₃₀ su prikazane u Prilogu 34, dok je na Grafikonu 18 prikazano umanjnje formiranog biofilma u procentima. U uslovima pH 7/NaCl 1 % je došlo do smanjenja biofilma samo referentnog soja *Pseudomonas aeruginos* za 15 %. Takođe, smanjenje biofilma u uslovima pH 6/NaCl 1 % je zabeleženo

na sojevima B_V_7 (20 %) i ATCC 27853 16 %, dok je na izolatima SU_AM_2 i P_V_2 bilo vrlo niskog procenta (Grafikon 18).



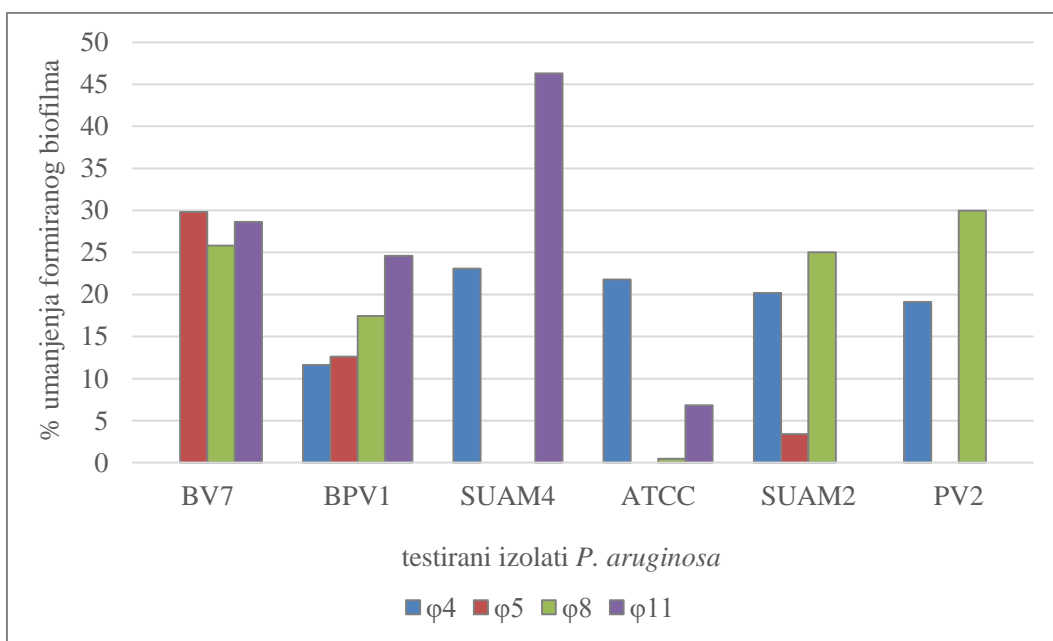
Grafikon 17. Uticaj bakteriofaga na formirane dvadesetčetvoročasovne biofilme na 37°C



Grafikon 18. Uticaj bakteriofaga φ11 na formirani biofilm na 37°C pri izmenjenim uslovima sredine

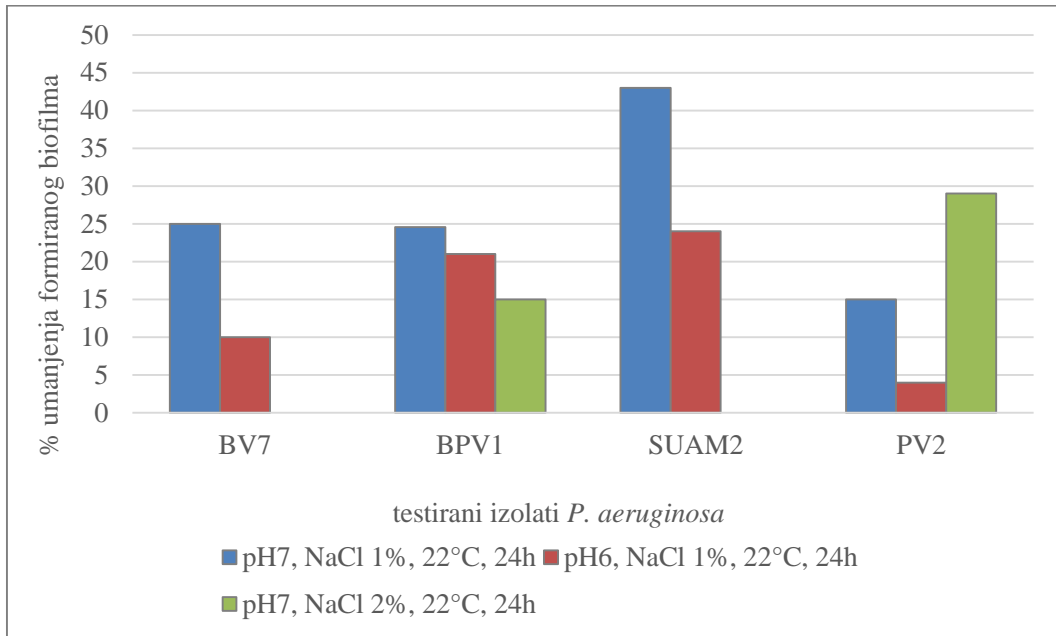
Najveći procenat smanjenja je postignut u uslovima povećanog saliniteta, gde su svi formirani biofilmovi pokazali veću osetljivost na primenjeni fag, i umanjeње biomase filmova je bilo u proseku za 28 % (SU_AM_4, 40 %).

Najbolji rezultati smanjenja formiranog biofilma na nižoj temperaturi je postignut delovanjem faga $\phi 11$ na izolat SU_AM_4 od 46%, dok je istovremeno delovanjem ovog faga biofilm B_V_7 umanjen za 28 %, B_PV_1 za 24 % a ATCC 27853 za 7 % (Grafikon 19, Prilozi 31, 32, 33 i 35).



Grafikon 19. Uticaj bakteriofaga na formirani biofilm na 22°C

Uticaj faga $\phi 11$ pri izmenjenim uslovima pH sredine i koncentracije NaCl na 22°C su prikazani na Grafikonu 20 i Prilogu 35. Najbolji efekti su postignuti pri uslovima pH 7/1 % NaCl kad je postignuto smanjenje biofilma za 15 - 43 % (prosek 27 %), zatim u uslovima pH 6/1 % NaCl 4 - 24 %. Samo pri uslovima povećanog saliniteta, kod izolata B_V_7 i SU_AM_2 nije došlo do redukcije formiranog biofilma, dok je kod izolata P_V_2 postignuto smanjenje biofilma za 29 %.



Grafikon 20. Uticaj bakteriofaga ϕ 11 na formirani biofilm na 22°C pri izmenjenim uslovima sredine

Dobijene vrednosti su niže od vrednosti dobijenih od strane drugih naučnika. Tako, rezultati Zhang i Hu, 2013 ukazuju na uspešnu primenu bakteriofaga u zaustavljanju rasta ili uklanjanju biofilma, pri čemu je inhibicija rasta biofilma rasla sa povećanjem broja primenjenih faga, od 45 ± 15 % do 73 ± 8 %, pri povećanju broja faga od 400 do $4,0 \times 10^7$ pfu/mL. Slični rezultati su dobijeni i pri primeni faga za uklanjanje predhodno stvorenih biofilma: efikasnost uklanjanja je rasla sa 45 ± 9 % do 75 ± 5 % pri povećanju broja faga sa 6.000 na 6×10^7 pfu/mL. Opisani δ fag iz familije *Podoviridae* (Knežević i sar., 2011) se pokazao kao veoma efikasan u delovanju na planktonske ćelije, ali i na sprečavanje formiranja biofilma, pokazujući redukciju od preko 95 %.

Mehanizam delovanja bakteriofaga na formiranje biofilma je do danas objašnjen u literaturi. Infekcijom bakterija, smanjuje se njihov broj, zbog čega izostaje QS, što dovodi do izostanka adhezije bakterija na površinu i stvaranja biofilma, a takođe stvoreni biofilmi nemaju odgovarajuću čvrstinu i stabilnost i lako se dezintegrišu. Poznato je da su najčešći primarni receptori fagima *P. aeruginosa* lipopolisaharidi ćelijskog zida. Istovremenom aplikacijom suspenzije bakterija i bakteriofaga, oni vrlo lako ostvaruju kontakt sa receptorom i dovode do infekcije bakterijske ćelije. Takođe, mogući receptori fagima mogu biti na flagelama ili na površini pila, zbog čega bakterije bivaju

onemogućene da se kreću, a rezultati ovih istraživanja, kao i istraživanja drugih autora ukazuju da je bakterijsko kretanje veoma bitno u procesu formiranja biofilmova (Caiazza i sar., 2007; Butler i sar., 2010; Bala i sar., 2011). Razlozi skromnijih rezultata delovanja bakteriofaga na formiranje biofilmova mogu biti različiti: mali broj virusnih čestica, manji broj receptora na ćelijama, inaktivacija faga EPS-ima, kao i moguća umerena priroda korištenih faga. Naime, elektronskom mikroskopijom je ustanovljeno da korišteni fagi $\phi 4$ i $\phi 5$ pripadaju porodici *Siphoviridae*, dok analiza proteinskog profila ukazuje da je i fag $\phi 11$ veoma sličan. Do sada nije poznat ni jedan litički fag *P. aeruginosa* iz ove porodice, pa se sa izvesnom sigurnošću može pretpostaviti da su i fagi korišteni u ovim eksperimentima umereni (Kropinski, 2000; Kim i sar., 2012).

Rezultati delovanja bakteriofaga na formirani dvadesetčetvoročasovni biofilm ukazuju na slabiju efikasnost faga u ovom slučaju. I pored velikog broja istraživanja o uticaju faktora sredine, gustine populacije ili drugih, novija istraživanja ističu da uspeh antimikrobnog delovanja faga u najvećoj meri zavisi od prisustva specifičnih receptora, iako je mehanizam delovanja i dalje nerazjašnjen. Poznato je da kao receptor fagima iz porodice *Podoviridae* (i drugi iz reda *Caudovirales*) služi EPS biofilma što je značajno jer je EPS odgovoran za bakterijsku rezistenciju na antibiotike, inaktivaciju antibiotika i ćelijsku nepropustljivost (Knežević i sar., 2011). Istraživanja Hanlon i sar. (2001) sa fagima *P. aeruginosa* pokazuju da se uticaj na biofilm dešava direktnom degradacijom alginata, odnosno enzimskim sistemom bakteriofaga, navodeći da je enzimski sistem za degradaciju EPS-a neophodan za delovanje faga u biofilmu (Cornelissen i sar., 2011). Nasuprot tome, Sillankorva i sar. 2011 su pokazali da uništavanje biofilmova dolazi sa bakteriofagama koji nemaju gene za enzim polisaharid depolimerazu. Kompleksnost mehanizma formiranja biofilmova, struktura formiranog biofilma, kao i promene u metaboličkom statusu ćelija koje se nalaze u sastavu biofilma upućuje da je interakcija koju fagi potencijalno ostvaruju i koja dovodi do uništavanja strukture biofilma složena i zahteva predhodno testiranje u svakom pojedinačnom slučaju.

Jedna od prednosti primene bakteriofaga kao antibakterijskih agenasa je njihova mogućnost da povećavaju brojnost tokom procesa infekcije (Kumari i sar., 2009), što implicira da dobijeni rezultati redukcije biofilmova nisu konačni: produžavanjem

inkubacije bi i uspeh bio veći. Međutim, rezultati nekih istraživanja upozoravaju na brzo razvijanje rezistentnosti kod bakterija. Pires i sar. (2011) su opisali delovanje faga na biofilmove *P. aeruginosa* ATCC 10145 i PAO1. Rezultati su pokazali da iako je fag phiIBB-PAA21 smanjio broj ćelija biofilma već nakon 2h, tokom narednih 6 i 24h je došlo do njegovog ponovnog povećanja, što ukazuje na mogućnost razvijanja rezistencije bakterije na primenjeni fag. Primenom “koktela faga” se pokušava premostiti nedostaci primene faga u pogledu njihove uske specifičnosti delovanja, i brzog razvijanja rezistencije kod bakterija. Nekada se ovom načinu poklanjao veliki značaj kao mogućnosti stvaranja suspenzije bakteriofaga širokog spektra, ali danas sve veći broj autora negira postojanje značajne razlike u veličini litičkog spektra delovanja pojedinačnog faga u odnosu na primenjeni koktel (Harper i sar., 2014).

Tokom istraživanja uticaja bakteriofaga na biofilm *P. aeruginosa*, eksperimentalni uslovi su bili u okvirima koji ne ometaju rast niti bakterija niti faga. Poznato je da je ekologija bakteriofaga u skladu sa njihovim domaćinom, kada su u pitanju abiotički faktori. *P. aeruginosa*, kao euritermni organizam, raste u opsegu temperature od 10 do 44°C, sa optimumom oko 35°C, pa je očekivano da je i najbolja adsorpcija faga u ovim temperaturnim okvirima. Za porodice *Podoviridae* i *Siphoviridae* je takođe karakteristična široka temperaturna valenca adhezije od 7 do 37°C uz naglašeno dobro preživaljavanje u uslovima visokih temperature i veoma niske vlažnosti (Knežević, 2009; Jonzyk i sar., 2011). Dobijeni rezultati ukazuju na bolju efikasnost primene ispitivanih bakteriofaga u uslovima niže temperature, kako u sprečavanju stvaranju filmova, tako i u dezintegraciji već formiranih biofilmova.

Takođe, postoji veliki broj istraživanja koja se bave uticajem pH sredine na vijabilnost bakteriofaga. Han i sar., 2014 navode da testirani fag iz familije *Podoviridae* potpuno gubi aktivnost na pH manjoj od 3 i većoj od 11, dok je njihova maksimalna stabilnost na pH 5, 6, 7, 8 i 9. Jonzyk i sar. (2011) navode da *Podoviridae* uspešnije opstaju u alkalnim sredinama, te da *Siphoviridae* uspešno opstaju u uslovima pH 3 – 11.

Ipak, u ovom radu su konstatovane razlike u delovanju faga na biofilmove u uslovima promenjenih vrednosti pH i koncentracije NaCl. Pokazno je da je najefikasnije uklanjanje

biofilmova pri nešto povišenoj koncentraciji NaCl (2 %) što ukazuje na mogućnost upotrebe bakteriofaga i u ekstremnijim uslovima sredine. Povišena koncentracija soli je, istovremeno, bila stimulativna za razvoj biofilmova, a u eksperimentima na 37°C je zabeležena statistički značajna razlika u odnosu na biomasu biofilmova gajenih na 1 % NaCl. Ispitivanja o uspešnom delovanju faga u ovim uslovima nije posvećeno dovoljno pažnje u literaturi, i ne mogu se naći slični eksperimentalni rezultati. Neki navode da povećana koncentracija NaCl deluje baktericidno i virucidno (Kwong i sar. 2007), dok je u ovom radu pokazano da koncentracije NaCl od 1 % i 2 % nemaju ovakav efekat. Takođe, umereno kisele pH vrednosti su negativno uticale na delovanje faga na biofilme.

Ova istraživanja ukazuju da primena bakteriofaga *P. aeruginosa* može predstavljati alternativni metod u kontroli biofilmova, ali zahteva dalja istraživanja, pre svega formiranje kolekcije faga, fiziološki i molekularno okarakterisanih, čija litička efikasnost *in vitro* će se proveravati za svaki poseban sistem fag-domaćin, uzimajući u obzir sve ekološke uslove. To može doprineti aplikaciji faga kao biokontrolnih agenasa u kontroli biofilmova. Za razjašnjenje ovih složenih interakcija i mehanizama može poslužiti i filogenetska analiza populacija *P. aeruginosa*. Prema ovoj analizi se naslutila mogućnost grupisanja bakterija po staništu, što bi mogao biti korak ka grupisanju srodnih *P. aeruginosa*, njihovih specifičnih receptora i faga sa sposobnošću infekcije.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu eksperimentalnih rezultata dobijenih tokom ovih istraživanja moguće je izvesti sledeće zaključke:

- 1) Bakteriofagi ϕ 5 i ϕ 8 su doveli do umanjenja biomase biofilmova u formiranju za prosečno 20 %, dok je fag ϕ 4 doveo do umanjenja biomase za, u proseku, 14 % na temperaturi od 37°C. Testirani fagi su doveli do umanjenja biomase biofilmova na 50 % testiranih izolata *P. aeruginosa*. Najbolji efekat umanjenja je postignut delovanjem faga ϕ 8 na izolat B_V_7 od 56 %. Efekat umanjenja biofilmova na temperaturi inkubacije od 22°C je bio bolji. Fagima ϕ 5 i ϕ 8 je postignut efekat smanjenja formiranja biofilma za prosečno 40 %, dok je delovanje faga ϕ 4 dovelo do umanjenja biofilma za prosečno 24 %. Najbolji efekti su postignuti delovanjem fagima ϕ 8 na izolate B_V_7, B_PV_1 i SU_AM_2 od 60 % umanjenja, dok je fagom ϕ 5 na ovim izolatima postignuto umanjenje biofilma za 50 %.
- 2) Bakteriofaga ϕ 11 je uticao na umanjenje biomase pri formiranju biofilmova u odnosu na kontrolu na svim testiranim izolatima *P. aeruginosa* (B_V_7, B_PV_1, SU_AM_4, SU_AM_2, P_V_2 i ATCC 27853), i pod svim testiranim uslovima sredine u pogledu temperature, pH i koncentracije NaCl. Tako je pri temperaturi od 37°C, u uslovima pH 7/NaCl 1 %, delovanjem faga konstatovana manja biomasa biofilma od 5 – 25 %. U uslovima snižene pH vrednosti, umanjenje je iznosilo do 27 %, dok je pri povišenoj koncentraciji NaCl iznosilo između 15 i 46 %. Na 22°C, pri uslovima pH 7/NaCl 1 % smanjenje biofilma je iznosilo između 14 i 39 %, u uslovima snižene pH vrednosti, umanjenje je iznosilo između 7 i 38 %, dok je pri povišenim vrednostima NaCl iznosilo do 58 %.
- 3) Ova istraživanja, kao i istraživanja drugih istraživača ukazuju da primena bakteriofaga može predstavljati alternativni metod u kontroli formiranja biofilmova kod *P. aeruginosa*. Rezultati ukazuju da je primena faga u kontroli

formiranja biofilмова soj – specifična, kao i da je za primenu faga neophodna *in vitro* provera u svakom pojedinačnom slučaju, te da se uslovi spoljašnje sredine utiču na efikasnost ove interakcije.

- 4) Najbolji rezultati umanjenja biomase formiranih biofilмова na 37°C su zabeleženi primenom faga $\phi 5$ i $\phi 8$, čijim delovanjem je došlo do smanjenja biomase biofilмова 5 od 6 testiranih izolata. Najbolji rezultati su konstatovani na izolatima B_V_7 i B_PV_1 gde je zabeleženo umanjenje biofilмова za približno 35 %. Primena faga $\phi 4$ je dovela do umanjenja biofilмова samo pri uslovima niže temperature, gde je smanjenje biofilma zabeleženo na 5 od 6 testiranih izolata za 20 %, tj. 11 % umanjenja na jednom testiranom izolatu. Efekat primene i faga $\phi 5$ i $\phi 8$ je bio ujednačen na nižoj temperaturi i iznostio u proseku 20 %. Ova istraživanja ukazuju da temperatura sredine utiče na mogućnosti adhezija faga na ćelije u biofilmu, što se može objasniti i promenama osobinama polisaharida pri nižim temperaturama.
- 5) Delovanjem bakteriofaga $\phi 11$ na već formirani biofilm pri temperaturi od 37°C, u uslovima pH 7/NaCl 1 % smanjena je biomasa biofilma referentnog soja *Pseudomonas aeruginos* za 15 %, dok je smanjenje biofilma u uslovima pH 6/NaCl 1 % B_V_7 i *P. aeruginosa* ATCC 27853 soja iznosilo 20 %, odnosno 16 %. Smanjenje formiranih biofilмова izolata SU_AM_2 i P_V_2 je vrlo niskog procenta. Ovi rezultati ukazuju da je ispitivani bakteriofag $\phi 11$ različito uticao na testirane izolate i u upućuje na zaključak da je zbog složenih interakcijskih odnosa, neophodna provera uticaja za svaki poseban sistem fag-domaćin.
- 6) Dobijeni rezultati o smanjenju biomase već formiranih biofilмова pod uticajem bakteriofaga $\phi 11$ u uslovima povećanog saliniteta, kod svih formiranih biofilмова, gde je smanjenje iznosilo u proseku 28 % (SU_AM_4, 40 %), ukazuju da na ove interakcijske odnose utiču ekološki faktori, kao što je sadržaj NaCl.

- 7) Rezultati dobijeni tokom istraživanja su pokazali da su biofilmovi formirani u toku 24 sata na 22°C bili osetljiviji na primenu faga a najveći efekti su postignuti pri uslovima pH 7/1 % NaCl kada je smanjenje biomase biofilma iznosilo do 43 %. Ovi dobijeni rezultati ukazuju da se optimizacijom uslova može uticati na efikasnost uklanjanja već formiranih biofilmova.
- 8) U ovim istraživanjima formirana je kolekcija od 30 izolata *Pseudomonas aeruginosa* iz životne sredine sa različitih lokaliteta (sedimenta, aktivnog mulja, površinske vode, vode za piće i zemljišta). Ovi izolati, sa preciznošću od 95,8 – 99,9 % (očitanjem na API WEB-u) pripadaju vrsti *Pseudomonas aeruginosa*.
- 9) Dobijeni visoki sadržaj G+C parova, od 63,6 % (*ppsA*) do 67,2 % (*acsA*) je u saglasnosti sa istraživanjima koja ističu da je genom *P. aeruginosa* bogat G+C nukleotidima. Broj polimorfnih mesta se kretao od 14 % do 21,5 %, dok za objedinjenu sekvencu iznosi 12,9 %.
- 10) Ispitivani izolati su grupisani u PA14 kompleks, PAO1 kompleks, dok izolati SO_M_7, SO_AM_6, B_V_6, VI_Z_3, KTP_V_9, S_V_1, SU_I_1 i B_V_7 čine zasebnu grupu, a preostale tri grupe uključuju sledeće članove: 1) KSE_V_11 i B_V_10, 2) S_V_12 i SO_E_2 i 3) B_PV_1. Na filogenetskom stablu predstavljenom kao kladogram se sugeriše visoka sličnost nukleotidnih sekvenci izolata iz životne sredine poreklom iz Srbije sa izbranim referentnim sojevima. Uključivanjem većeg broja izolata iz životne sredine iz Srbije kao i uključivanjem više referentnih sojeva doprinelo bi preciznijem određivanju i boljem razumevanju sličnosti izolata a dobijeni rezultati postavili su dobru bazu za nastavak istraživanja.
- 11) U radu je kreirano pet filogenetskih stabala na osnovu pojedinačnih genskih sekvenci i tri stabla koristeći objedinjene podatke svih sekvenci. Dobijeni rezultati filogenetske analize se mogu posmatrati sa aspekta staništa i geografskog porekla *P. aeruginosa* izolata. Rezultati ove analize sugerišu da se dostupne sekvence izolata iz životne sredine, kao i referentni klinički izolati, grupišu bez pravila u

filogenetskom stablu. Uočava se odsustvo grupisanja ispitivanih izolata na osnovu mikro ili makro geografskog položaja, kao i dokazane virulentnosti. Takođe, ne može se jasno utvrditi uticaj staništa na međusobni odnos testiranih izolata, osim u slučaju izolata iz sedimenta, koji se zajedno grupišu.

- 12) Na osnovu ispitivanja može se zaključiti da se izolati *P. aeruginosa* razlikuju u sposobnosti produkcije biofilмова i da se 30 testiranih izolata može grupisati u više grupa. Najveći broj izolata pripada grupi slabo-produkujućih (67 %) dok 13 % testiranih izolata je srednje produkujuće a 20 % su biofilm neprodukujući izolati. Ni jedan izolat pri temperaturi od 37°C nije imao visoku produkciju biofilma, dok je pri temperaturi od 22°C jedan izolat svrstan u grupu visoko produkujućih, a u ovim temperaturnim uslovima više izolata je pripadalo grupi srednje produkujućih (30 %). Ovi rezultati ukazuju da pri kategorizaciji izolata prema sposobnosti produkcije biofilмова potrebno istaći temperaturne uslove na kojima su se formirali.
- 13) Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između biomase biofilмова formiranih na 37°C i 22°C, odnosno da je temperatura značajan faktor u formiranju biofilмова, međutim pokazalo se da temperature od 37°C i 22°C nisu statistički značajno uticale na sposobnost formiranja biofilмова pri pH 6 ($p > 0,05$) što sve ukazuje da je prilikom ispitivanja sposobnosti formiranja biofilмова uticaj ekoloških faktora potrebno posmatrati kompleksno.
- 14) Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u produkciji biofilмова ($p > 0,05$) na 37°C i 22°C među izolatima *P. aeruginosa* koji potiču iz različitih sredina, što ukazuje da stanište nema značajnu ulogu u produkciji biofilмова.
- 15) Testirajući hipotezu da je vreme od 6 sati pouzdan parametar za procenu potencijala izolata u formiranju biofilмова, a u cilju efekasnijeg uklanjanja, pokazalo se da se na osnovu ovog vremena ne može proceniti potencijal u formiranju biofilмова

- 16) Testiranjem korelacionog odnosa između sposobnosti kretanja flagelama (testiranog na LB medijumu sa 0,1 i 0,3 % agara) i drugih načina translokacije *P.aeruginosa* na temperaturi od 22°C, dobijeni su sledeći rezultati:
- postoji slaba korelacija ($r=0,3$, $p\leq 0,05$) između kretanja na LB medijumu sa 0,1 (i 0,3 %) agara i medijumu sa 0,5 % agara;
 - postoji srednji stepen korelacije ($r=0,46$, $p\leq 0,05$) između kretanja na LB medijumu sa 0,3 % agara i „*twitching*“ kretanja i
 - postoji veći stepen korelacije ($r=0,62$, $p\leq 0,05$) između kretanja na LB medijumu sa 0,3% agara i „rojenja“ na M8.
- 17) Proveravajući uticaj kretanja na mogućnost formiranja biofilmova, nađena je:
- slaba korelacija ($r=0,23$, $p\leq 0,05$) između sposobnosti kretanja (na LB medijumu sa 0,3% agara) i formiranja biofilmova na 22°C,
 - slaba korelacija ($r=0,17$, $p\leq 0,05$) između sposobnosti kretanja na LB medijumu sa 0,3% agara i formiranja biofilma na 37°C,
 - slaba korelacija ($r=0,18$, $p\leq 0,05$) između mogućnosti stvaranja biofilmova i veličine „rojenja“ na M8 medijumuna 37°C i
 - slaba korelacija ($r=0,14$, $p\leq 0,05$) između “trzajućeg kretanja” i formiranja biofilmova na 22°C.
- 18) Ispitivani izolati *P.aeruginosa* se razlikuju u produkciji ramnolipida (23,8 mg/l do 68 mg/l) a literaturni podaci ukazuju da ramnolipidi koje produkuje *P. aeruginosa* imaju potencijal za aplikaciju u biotehnološkim procesima, što ukazuje da formirana kolekcija izolata *P. aeruginosa* poreklom iz životne sredine ima potencijal za dalja istraživanja.
- 19) Koncentracija piocijanina kod izolata *P. aeruginosa* iznosila je od 6,28 µg/ml kod izolata JS_V_13, do 0,92 µg/ml kod izolata S_V_1. Dobijeni rezultati mogu ukazati na potencijalnu patogenost ispitivanih izolati iz životne sredine.
- 20) Izgled spektara, raspored i intenzitet dobijenih Ramanovih pikova navode na pretpostavku da su biofilmovi ispitivanih izolata među sobom kvalitativno

slični, kao i da nema razlika u kvalitetu biofilmova u zavisnosti od uslova sredine u kojima se formiraju. Primena ove tehnike u analizi biofilmova može poslužiti za brzu procenu kvaliteta biofilmova kod *P. aeruginosa* ali i poređenje sa drugim analitičkim tehnikama.

- 21) Na pet izolata *P. aeruginosa* (ĆA_SE_8, ĆA_SE_9, P_V_2, TČ_PV_3 i TOP_V_16) izolovano je 9 bakteriofaga (ϕ 1, ϕ 2, ϕ 4, ϕ 5, ϕ 7, ϕ 8, ϕ 9, ϕ 10 i ϕ 11). Ispitivani bakteriofagi su imali ujednačenu morfologiju plakova. Plakovi su sitni, dijametra između 1 - 3 mm, pri čemu je 8 bakteriofaga imalo prozračne plakove (ϕ 1, ϕ 2, ϕ 4, ϕ 5, ϕ 7, ϕ 9, ϕ 10, ϕ 11), dok je samo 1 imao mutnu formu plaka (ϕ 8).
- 22) Svi izolovani fagi imaju sposobnost litičkog delovanja na većem broju domaćina, a uspešnost infekcije je iznosila od 40 – 60 %. Najširi litički potencijal imali su fagi ϕ 1 i ϕ 5, koji su pokazali sposobnost lize 18/31 testiranih izolata *P. aeruginosa*, dok su najmanji potencijal imali fagi ϕ 4 i ϕ 9 sa sposobnošću da inficiraju 13/31 domaćina. Šest testiranih izolata *P. aeruginosa* (oko 20 %) nije pokazalo osetljivost ni prema jednom testiranom fagu. Dobijeni rezultati su potvrdili usku specifičnost faga u pogledu sposobnosti infekcije bakterija, tj. da fagi nisu bili uspešni u infekciji ni svih sojeva bakterija jedne vrste.
- 23) Determinacija proteinskog profila faga ϕ 4, ϕ 5 i ϕ 11 je ukazala sličan proteinski sastav kapsida, istu molekulsku masu glavnog proteina (oko 36 kDa), tj. na veliku fenotipsku sličnost među testiranim fagima. Elektronskom mikroskopijom su fagi ϕ 4 i ϕ 5 okarakterisani kao pripadnici familije *Siphoviridae* iz reda *Caudovirales*.
- 24) Veličina genoma faga ϕ 4, ϕ 5 i ϕ 11 iznosi >40 kbp. Restrikcijom digestijom je utvrđena razlika na genetskom nivou među fagima. Restrikcijom enzima EcoR I, EcoR V, Xba I i Hind III ukazuje da su ispitivani fagi među sobom genetski različiti te da pripadaju različitim sojevima virusa.

Dobijeni rezultati daju detaljan opis fenotipskih karakteristika izolovanih bakterija, a molekularno filogenetske analize i tipizacija na genetskom nivou precizno opisuju strukturu populacije i određuje njihovo mesto u odnosu na globalnu populaciju *P.aeruginosa*. Rezultati dobijeni u ovom radu po prvi put opisuju populacije *P. aeruginosa* u Srbiji i govore u prilog panmiktičnoj strukturi populacije. Takođe, istraživanja u okviru ove doktorske disertacije ukazuju da je moguća primena bakteriofaga u kontroli formiranja biofilmova kod *P. aeruginosa*, što predstavlja veliki biotehnološki izazov koji zahteva nastavak istraživanja.

7. LITERATURA

- Abdel-Mawgoud, A.M., Lepine, F., Deziel, E. (2010): Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology Biotechnology*, 86, 1323-1336.
- Abedon, S.T., Culler, R., R. (2007): Optimizing bacteriophage plaque fecundity. *J.Theoret.Biology*, 249: 582-592.
- Abedon, S.T., Thomas-Abedon, C. (2010): Phage therapy pharmacology. *Curr.Pharm.Biotechnol.*, 11, 28-47.
- Abedon, S.T. (2011): Lysis from without. *Bacteriophage*, 1, 46-49.
- Ackermann, H. W. (2006): Classification of bacteriophages, In R. L. 301 Calendar and S. T. Abedon (ed.), *The Bacteriophages. Oxford University 302 Press, Inc, New York, USA.* pp. 8-16.
- Ackermann, H.W. (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol.* 152: 227-243.
- Adams, M. H. (1959), *Bacteriophages.* New York : Interscience Publisher Inc.
- Allison, D.G. (1993): Biofilm associated exopolysaccharides. *Microbiol Eur.* NovJDec., 16-19.
- Annapoorani A., Umamageswaran V., Parameswari R., Pandian S. K., Ravi A. V. (2012): Computational discovery of putative quorum sensing inhibitors against LasR and RhIR receptor proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design.* 26(9):1067–1077.
- Aoi, Y., Nakata, H., Kida, H.(2000): Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from Ushubetsu River water in Hokkaido, Japan. *Jpn. J. Vet. Res.* 48:29–34.
- Aspe, M., Jensen, L., Melegrito, J., Sun, M. (2012): The role of alginate and extracellular DNA in biofilm-mediated *Pseudomonas aeruginosa* gentamicin resistance. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*, Vol. 16: 42 – 48.
- Atterbury, R.J., Van Bergen, M.A.P., Ortiz, F., Lovell, M.A., Harris, J.A., De Boer, A., Wagenaar, J.A., Allen, V.M., Barrow, P.A. (2007): Bacteriophage Therapy To Reduce *Salmonella* Colonization of Broiler Chickens, *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 14, pp. 4543-4549.

- Bala, A., Kumar, R., Harjai, K. (2011): Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by azithromycin and its effectiveness in urinary tract infections. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 3, 300-306.
- Balogh, B. (2006): Characterization and use of bacteriophages associated with citrus bacterial pathogens for disease control. PhD thesis. University of Florida. Florida, USA.
- Barbosa dos Reis Teixeira, W i F., Pereira Silva, E., Farias Alves, V., Pereira De Martinis, E.C. (2014): Untraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology Lizziane Kretli. *Microb Ecol.*, 68:35–46.
- Beleites, C. i Sergio, V. (2014): 'hyperSpec': a package to handle hyperspectral data sets in R.
- Belas, R., Suvanasuthi, R. (2005): The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. *J. Bacteriol.*, 187: 6789-6803.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A., Wheeler, D.L.(2000): GenBank. *Nucleic Acids Res.* 28:15–18.
- Berlutti, F., Morea, C., Battistoni, A., Sarli, S., Cipriani, P., Superti, F., Ammendolia, M. G., Valenti, P. (2005): Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 18 (4): 661-70.
- Bhawsar, N., A., Singh, M. (2014): Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from waste soybean oil as biosurfactants which engances biodegradation of industrial waste with special reference to Kosmi Dam, Betul District, (M.P). *International Journal of Advanced Research*, 2, 6, 778-783.
- Boles, B.R., Thoendel, M., Singh, P.K.(2005): Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol.Microbiol.*, 57, 1210-1223.
- Botstein, D. i Herskowitz, I. (1974) Properties of hybrids between *Salmonella* phage P22 and coliphage lambda. *Nature*, 251: 585-589.
- Botzenhardt, K., Doring, G. (1993): *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. Ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, 1-7.

- Bozzola, J. J., Russell, L. D. (1998): *Electron Microscopy - Principles and Techniques for Biology*. 2nd Ed. Jones and Bartlett Publishers, Sundbury, Massachusetts, 670.
- Boylea, B., Fernandezb, L., Larochea, J., Kukavica-Ibrulja, I., Mendesc, C. M. F., Hancockb, R. W., Levesquea, R. C. (2012): Complete Genome Sequences of Three *Pseudomonas aeruginosa* Isolates with Phenotypes of Polymyxin B Adaptation and Inducible Resistance, *Jornal of Bacteriology*, 194, 2: 529-530.
- Brencic, A., Lory, S. (2009): Determination of the regulation and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Molecular Microbiology*, vol. 72, No. 3, pp. 612-632.
- Brencic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R. et al. (2009): The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Molecular Microbiology*, vol. 73, No. 3, pp. 434-445.
- Butler, M.T., Wang, Q., Harshey, R.M. (2010): Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 3776-3781.
- Caiazza, N.C., Shanks, R.M., O'Toole, G.A. (2005): Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.*, 187, 7351-7361.
- Caiazza, N.C., Merritt, J.H., Brothers, K.M., O'Toole, G.A.(2007): Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbiology*, 157: 430-437.
- Cairns, J., Stent, G.S., Watson, J.D. (1992): *Phage and the origins of molecular biology*, expanded ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
- Carlson, K. (2005): Appendix: Working with Bacteriophages: Common Techniques and Methodological Approaches, In: *Bacteriophages Biology and Applications*, ed. Kutter E., Sulakvelidze, A. *CRC Press*.
- Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M.L., Marvin-Guy, L., Rami-Shojaei, S., i Brüssow, H. (2004): *Lactobacillus plantarum* bacteriophage LP65: a new member of the SPO1-like genus of the family *Myoviridae*. *J Bacteriol.* 186: 7069-7083.

- Claverie, J.M., Ogata, H. (2009): Ten good reasons not to exclude viruses from the evolutionary picture. *Nat Rev Microbiol.* 7: 615.
- Coenye, T., i Nelis, H. J. (2010). In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 83, 89-105.
- Costerton, W., Anwar, H. (1994): The Microbe and Pathogen. *Pseudomonas aeruginosa* Infections and Treatment, *Pseudomonas aeruginosa*, 1-17.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999): Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., Dowson, C.G. (2004): Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*. pp. 5644-5649.
- Danovaro, R., Dell'Anno, A., Trucco, A., Serresi, M. and Vanucci, S. (2001): Determination of virus abundance in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1384–1387.
- David R.Harper, Helena M.R.T.Parracho, James Walker, Richard Sharp, Gavin Hughes, Maria Werthen, Susan Lehman, Sandra Morales (2014): Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics*, 3, 270-284.
- Denamur, E., Picard, B., Decoux, G., Denis, J.B., Elion, J. (1993): The absence of correlation between allozyme and *rrn* RFLP analysis indicates a high gene flow rate within human clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 110: 275–280.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., Villemus, R. (2003): *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*, 149, 2005-2013.
- Ding X., Yin B., Qian L., et al. (2011): Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Medical Microbiology*. 60(part 12):1827–1834.
- Donlan, R.M. (2009): Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol*, 17:66–72.

- Driscoll, J.A., Brody, S.L., Kollef, M.H. 2007: The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67 (3): 351-68.
- Earnshaw, W.C., i Harrison, S.C. (1977): DNA arrangement in isometric phage heads. *Nature*, 268: 598-602.
- Eckhart L., Fischer H., Barken K. B., Tolker-Nielsen T., Tschachler E. (2007): Dnase1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Dermatology*. 156(6):1342–1345.
- Essoh, C., Blouin, Y., Loukou, G., Cablanmian, A., Lathro, S., Kutter, E., Vu Thien, H., Vergnaud, G., Pourcel, C. (2013):The Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Cystic Fibrosis Patients to Bacteriophages. *PLOS One*, e60575.
- Fang, X, Wang, Q., Shuler, P., Bai, B. (2005): Bio-Engineering High Performance Microbial Strains for MEOR by Directed Protein Evolution Technology. California Institute of Technology. DOI: DE-FC26-04NT15525.
- Garbe, J., Bunk, B., Rohde, M., Schobert, M. (2011): Sequencing and Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage JG004. *BMC Microiology*, 11:102.
- Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z. (2008): Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Natural Science*. 18: 1049-1056.
- Garvey, M., Rabbitt, D., Stocca, A., Rowan, A. (2015): Pulsed ultraviolet light inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Water and Environment Journal*, 29, 36–42.
- Gellatly, S.L, Hancock, R.E.W. 2013: *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defences. *Pathogens and Disease*, 67 (3): 159-173.
- Geske G. D., Wezeman R. J., Siegel A. P., Blackwell H. E. (2005): Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Journal of the American Chemical Society*. 127(37):12762–12763.
- Gilardi, G. (1985): Nonfermenting Gram-negative rods, Cultural and biochemical aspects for identifiacation of glucose nonfermenting Gram-negative rods, 17-24.
- Glaser, N. i Stopper, H. (2012): Patulin: mechanism of genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 5, 1796-1801.

- Glick, R., i sar. (2010): Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 192, 2973-2980.
- Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S., Lory, S. (2004): A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental Cell*, vol. 7, No. 5, pp. 745-754.
- Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., Lory, S. (2009): Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes and Development*, vol. 23, No. 2, pp. 249-259.
- Gonçalves, G.A.M., Donato, T.C., Sampaio Baptista, A.A., Mainieri de oliveira Corrêa, I., Dutka Garcia, K.C.O., Filho, R.L.A. (2014): Bacteriophage-induced reduction in *Salmonella enteritidis* counts in the crop of broiler chickens undergoing preslaughter feed withdrawa, *Poultry Science* 93(1): 216-220.
- Goldberg, J. (2002): Biofilms and antibiotic resistance: a genetic linkage. *Trends Microbiol.*, 10, p. 264.
- Grosso-Becerra, M.V., Santos-Medellin, C., Gonzales-Valdez, A., Delgado, G., Morales Espinosa, R., Servin-Gonzalez, L., Alcaraz, L.D., Soberon-Chavez, G. 2014: *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phnotypic diversity. *BMC Genomics*, 15:318.
- Grundmann, H., Kropec, A., Hartung, d., Daschner, F.D., Pitt, T.L. (1995): Discriminatory power of three DNA-based typing tehniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Clin.Microbiol.* 33:528-534.
- Guttman, B., Raya, R., i Kutter, E. (2005): Basic Phage Biology. In: *Bacteriophages: Biology and Applications*, *CRC Press*, pp. 29-63.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. (2002): Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol*, 13:228-33.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. (2004): Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2(2):95-108.

- Han, F., Li, J., Lu, Y., Wen, J., Zhang, Z., Sun, Y. (2014): Isolation and Characterization of a virulent bacteriophage ϕ PA-HF17 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int.J.Bioautomation*, 18(3), 241-250.
- Haney, C., Rowe, J.J., Robinson, J.B. (2012): Spions increase biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 3, 508-518.
- Harjai, K., Khandwaha, R.K., Mittal, R., Yadav, V., Gupta, V., Sharma, S. (2005): Effect of pH on production of virulence factors by biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiol.* 50, 99–102.
- Hartmann A., Rothballer M., Hense B. A., Schröder P. (2014): Bacterial quorum sensing compounds are important modulators of microbe-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*. 14, 5.
- Hassani, H.H., Hasan, H.M., Al-Saadi, A., Ali, A.M., Muhammad, M.H.(2012): A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Experimental Biology*, 2 (5): 1389-1394.
- Head, N.E., Yu, H. (2004): Cross-Sectional Analysis of Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Biofilm Formation, Virulence, and Genome Diversity. *Infection and Immunity*, 133-144.
- Hentzer M., Wu H., Andersen J. B., et al. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO Journal*. 22(15):3803–3815.
- Hengge, R. (2009): Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 7, No. 4, pp. 263-273.
- Herals, P. J, Zottola, E. A. (1988): Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and Ph values. *J Food Sci*, 53: 1549-52.
- Hickman, J. W., Tifrea, D. F., Harwood, C. S. (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings of the national Academy of Science of the United States of America*, vol. 102, No. 40, pp. 14422-14427.

- Hostacka, I., Čížnara, M., Štefkovičova (2010): Temperature and pH Affect the Production of Bacterial Biofilm. *Folia Microbiol.* 55 (1), 75–78.
- Huigens R. W., III, Richards J. J., Parise G., et al. (2007): Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation with bromoageliferin analogues. *Journal of the American Chemical Society.* 129(22):6966–6967.
- Husain F. M., Ahmad I., Asif M., Tahseen Q. (2013): Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Biosciences.* 38(5):835–844.
- Huw, D.W., Volker, B., Jacob, G.B., Ben, R., James, E.A. (2010): Hypertonic saline therapy in cystic fibrosis: do population shifts caused by the osmotic sensitivity of infecting bacteria explain the effectiveness of this treatment. *Frontier in Microbiology.*1:1-5.
- Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A. N., Wozniak, D. J., Romeo, T., Parsek, M. R. (2010): *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Molecular Microbiology*, vol. 78, No. 1, pp. 158-172.
- Ishida T., Ikeda T., Takiguchi N., Kuroda A., Ohtake H., Kato J. (2007). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by *N*-acyl cyclopentylamides. *Applied and Environmental Microbiology.* 73(10):3183–3188.
- Ivleva, N.P., Wagner, M., Horn, H., Niessner, R., Haish, C. (2008): In Situ Surface-Enhanced Raman Scattering Analysis of Biofilm. *Anal.Chem.* 80, 8538-8544.
- Jakobsen T. H., van Gennip M., Phipps R. K., et al. (2012): Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 56(5):2314–2325.
- Jessup CM, Forde SE. (2008): Ecology and evolution in microbial systems: the generation and maintenance of diversity in phage-host interactions. *Res. Microbiol.* 159:382–389.
- Jeukens, J., Boyle, B., Kukavica-Ibrulj, I., Ouellet, M. M., Aaron, S. D., Charette, S. J., Fothergill, J. L., Tucker, N. P., Winstanley, C., Levesque, R. C. (2014): Comparative Genomics of Isolates of a *Pseudomonas aeruginosa* Epidemic Strain

- Associated with Chronic Lung Infections of Cystic Fibrosis Patients, *PLoS ONE* 9(2): e87611.
- Kay, E., Humair, B., Denervaud, V. et al. (2006): Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, vol. 188, No. 16, pp. 6026-6033.
 - Karumidze, N., Thomas, J.A., Kvatadze, N., Goderdzishvili, M., Hakala, K.W., Wintraub, S.T., Alavidze, Z., Hardies, S.C. (2012): Characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages via biological properties and genomic sequences. *Appl. Microbiology and Biotechnology.*, 94:1609-1617.
 - Kerr, J. R., Taylor, G. W., Rutman, A., Høiby, N., Cole, P. J., Wilson, R. (1999): *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J Clin Pathol*, 52:385-387.
 - Khan, N.H., Ashan, M., Yoshizawa, S., Hosoya, S., Yokota, A., Kogure, K. (2008): Multilocus Sequence Typing and Phylogenetic Analyses of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 20: 6194-6205.
 - Kiewitz, C., TummLer, B. (2000): Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol*, 182: 3125–3135.
 - Kim, S., Rahman, M., Seol, S.Y., Kim, J. (2012): *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage PA1Ø Requires Type IV Pili for Infection and Shows Broad Bactericidal and Biofilm Removal Activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (17): 6380 - 6385.
 - Kim H.-S., Park H.-D. (2013): Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *PLoS ONE*. 8(9).
 - Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F., Burkhard, T. (2011): *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front. Microbio.* 2:150.
 - Knežević, P., Petrović, O. (2008): A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Microbiological methods*. 74 (2-3), pp.114-118.

- Knežević, P., Kostanjšek, R., Obreht, D., Petrović, O. (2009): Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* specific phages with broad activity spectra. *Current Microbiology*. 59(2), pp.173-180.
- Knežević, P., Obreht, D., Curcin, S., Aleksić, V., Kostanjšek, R., Petrović, O. (2011): Phages of *Pseudomonas aeruginosa*: response to environmental factors and in vitro ability to inhibit bacterial growth and biofilm formation. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 245-254.
- Knežević, P. (2012): Bakteriofagi-alternativni antimikrobni agensi. Zadužbina Andrejević, Beograd.
- Kohler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., Pechere, J.C. (2000): Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.*, 182, 5990-5996.
- Kokare, C.R., Chakraborty, S., Khopade, A.N., Mahadik, K.R. (2009): Biofilm: importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 159-168.
- Koonin, E.V. (2005): Virology: Gulliver among the Lilliputians. *Curr Biol*. 15: R167-169.
- Koonin, E.V., Senkevich, T.G., Dolja, V.V. (2009): Compelling reasons why viruses are relevant for the origin of cells. *Nat Rev Microbiol*, 7: 615.
- Kropinski, A. (2000): Sequence of the Genome of the Temperate, Serotype-Converting, *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage D3. *Journal of Bacteriology*, 182 (21): 6066 – 6074.
- Krupovic, M. i Bamford, D.H. (2008) Virus evolution: how far does the double beta-barrel viral lineage extend? *Nat Rev Microbiol.*, 6: 941-948.
- Kumar L., Chhibber S., Harjai K. (2013): Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Fitoterapia*. 90:73–78.
- Kumari, S., Harjai, K., Chhibber, S. (2009): Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO Specific Bacteriophages Isolated from Sewage Samples. *American Journal of Biomedical Sciences*, 1(2), 91-102.
- Kutter, E., Sulakvelidze, A. (2005): Bacteriophages-Biology and Applications. *CRC Press*.

- Kwan, T., Liu, J., Dubow, M., Gros, P. i Pelletier, J. (2006): Comparative 378 genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *J Bacteriol*, 379 188:1184-1187.
- Kwiatek, M., Mizak, L., Parasion, S., Gryko, R., Olender, A., Niemcewicz, M. (2015): Characterization of five newly isolated bacteriophages active against *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Folia Microbiol.*, 60:7-14.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- LaSarre B., Federle M. J. (2013): Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 77(1):73–111.
- La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J.M., Raoult, D. (2003): A giant virus in amoebae. *Science*, 299: 2033.
- Lavigne, R., Seto, D., Mahadevan, P., Ackermann, H.-W. i Kropinski, A.M. (2008): Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the *Podoviridae* using BLASTP-based tools. *Res Microbiol*. 159: 406-414.
- Lederberg, J. (2000): *Pseudomonas*. *Encyclopedia of Microbiology*, Second Edition, Volume 3, San Diego, 876-891.
- Leiman, P.G., Chipman, P.R., Kostyuchenko, V. A., Mesyanzhinov, V. V., Rossmann, M. G. (2004): Three-dimensional rearrangement of proteins in tail of bacteriophage T4 on infection of its host. *Cell*. 118, 419-429.
- Lewis, K., Ausubel, F.M. (2006): Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature Biotechnol*, 24:1504–1507.
- Li, Y. (2001): Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.*, 183:6875-84.
- Liu, Y., Yang, S., Xu, H., et al. (2004): The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *J. Biotechnol*, 110:251-6.
- Lu, X., Al-Qadiri, H.M., Lin, M., Rasco, B.A. (2011): Application of Mid-infrared and Raman Spectroscopy to the Study of Bacteria. *Food Bioprocess Technol.*, 4:919-935.
- Ludmir, E.B., Enquist, L.W. (2009): Viral genomes are part of the phylogenetic tree of life. *Nat Rev Microbiol*. 7: 615.

- Maatallah, M., Cheriaa, J., Backhrouf, A., Iversen, A., Grundmann, H., Do, T., Lanotte, P., Mastouri, M., Salem Elghmati, M., Rojo, F., Mejdí, S., Giske, G (2011): Population Structure of *Pseudomonas aeruginosa* from Five Mediterranean Countries: Evidence for Frequent Recombination and Epidemic Occurrence of CC235. *PLoS ONE* 6(10).
- Meliani i Bensoltane (2015): Review of *Pseudomonas* Attachment and Biofilm Formation in Food Industry Poulť Fish. *Wildl Sci*, 3:1,2-7.
- Merighi, M., Lee, V. T., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Lory, S. (2007): The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, vol. 65, No. 4, pp. 876-895.
- Merritt, J.H., Brothers, K.M., Kuchma, S.L., O'Toole, G.A. (2007): SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J. Bacteriol.*, 189: 8154-8164.
- Mesyanzhinov, V.V. (2004) Bacteriophage T4: structure, assembly, and initiation infection studied in three dimensions. *Adv Virus Res.* 63: 287-352.
- Momba, M.N.B., Kfir, R., Venter, S.N. and Cloete, T.E. (2000) An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. *Water SA*, 26 (1), 59–66.
- Moreira, D., Lopez-Garcia, P. (2009): Ten reasons to exclude viruses from the tree of life. *Nat Rev Microbiol.* 7:306-311.
- Morháč, M. i sar.. (1997). "Background elimination methods for multidimensional coincidence γ -ray spectra." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment 401(1): 113-132.
- Morris, J., D., Hewwitt, J., L., Wolfe, L., G., Kamatkar, N., G., Champman, S., M., Diener, J., M., Courtney, A., J., Leevy, W., M., Shrout, J., D. (2011): Imagination and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* swarming and rhamnolipid production. *Applied and Environmental Microbiology*, 8310-8317.

- Mulcahy, H., Charron-Maznod, L., Lewenza, S. (2010): *Pseudomonas aeruginosa* produces extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environmental Microbiology*, 12, 6, 1621-1629.
- Mulcahy, H., Lewenza, S. (2011): Magnesium limitation is an environmental trigger of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifestyle. *Plos One*, 6, 8, e23307.
- Murray, T.S., Ledizet, M., Kazmierczak, B.I. (2010): Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 511-520.
- Musk, D. J., Banko, D. A., Hergenrother, P. J. (2005): Iron Salts Perturb Biofilm Formation and Disrupt Existing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. Published by Elsevier Inc.
- Nordeen, R.O., Morgan, M.K., Currier, T.C. (1983): Isolation and partial characterization of bacteriophages of the phytopathogen *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environ. Microbiol.*, 45(6), 1890-1898.
- Nozawa, T. i sar. (2007): Rhamnolipid-dependent spreading growth of *Pseudomonas aeruginosa* on a high-agar medium: marked enhancement under CO₂-rich anaerobic conditions. *Micobiol. Immun.*, 51, 703-712.
- Ochsner, U.A., Koch, A.K., Fiechter, A., Reiser, J. (1994): Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 176, 2044-2054.
- Oliveira, R. melo L., Oliveira, A, et al. (1994): Polysaccharide production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*: effects of pH and surface material. *Colloids Surf B: Biointerf.*, 2:41-6.
- Orgaz, B., Kives, J., Pedregosa, A. M., Monistrol, I. F., Laborda, F., i SanJose, C. (2006): Bacterial biofilm removal using fungal enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 51e56.
- Overhage, J., Bains, M., Brazas, M.D., Hancock, R.E. (2008): Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J. Bacteriol.*, 190: 2671-2679.

- Ozer, E. A., Allen, J. P., Hauser, A. R. (2014): Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics*, 15(1): 737.
- Pace, N. T., D. A. Stahl, D. J. Lane, and G. J. Olsen. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* 9:1–55.
- Park J., Kaufmann G. F., Bowen J. P., Arbiser J. L., Janda K. D. (2008): Solenopsin A, a venom alkaloid from the fire ant *Solenopsis invicta*, inhibits quorum-sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infectious Diseases*. 198(8):1198–1201.
- Parkins, M. D., Ceri, H., Storey, D.G. (2001): *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Molecular Microbiology*, vol. 40, No. 5, pp. 1215-1226.
- Parka, H., Park , H. J., Kim, J. A., Lee, S. H., Kim, J. H., Yoon, J., Park, T. H. (2011): Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms by hyperthermia using supermagnetic nanoparticles. *Journal of Microbiological Methods*, 84, 1, 41-45.
- Paul, J.H., Sullivan, M.B., Segall, A.M., Rohwer, F. (2002): Marine phage genomics. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 133: 463-476.
- Pechere, J. C. (2001): Azithromycin reduces the production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum sensing. *Japanese Journal of Antibiotics*. 54, 87-89.
- Perez, L.R.R., Costa, M.C.N., Freitas, A.L.P., Barth, A.L. (2011): Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystis fibrosis patients, *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 476-479.
- Perez-Martinez, I. i Haas, D. (2011): Azithromycin inhibits espresion of the GacA-dependent small RNAs RsmY and RsmZ in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agnets and Chemotherapy*, 55,7,3399-3405.
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z. et al. (2002): The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology*, vol. 183, No. 22, pp. 6676-6683.

- Picard, B., Denamur, E., Barakat, A., Elion, J., Goulet, P. (1994): Genetic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates revealed by esterase electrophoretic polymorphism and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA gene region. *J Med Microbiol*, 40: 313–322.
- Pieper, D., Stadler-Fritzche, K., Scholomann, M. and Knackmuss, H. (1992): Metabolism of 2-Chloro-4-Methylphenoxyacetate by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134: Implications for the Degradation of Chloro- and Methyl-Substituted Aromatics via ortho Cleavage. *Pseudomonas Molecular Biology and Biotechnology*. pp. 268-272.
- Pirnay, J. P., Matthijs, S., Colak, H., Chablain, P., Bilocq, F., Eldere, V., Vos, D.D., Zizi, M., Triest, L., Cornelis, P. (2005): Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ. Microbiol.* 7:969– 980.
- Puviarasan, N., Arjunan, V., Mohan, S. (2002): FT-IR and FT-Raman Studies on 3-Aminophthalhydrazide and N-Aminophthalimide. *Turk J Chem* 26, 323 – 333.
- R Development Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.
- Raoult, D., Forterre, P. (2008): Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nat Rev Microbiol.* 6: 315-319.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., ElJaziri, M. (2015): The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International*, Hindawi Publishing Corporation, Volume 2015, Article ID 759348.
- Rashedi, H., Assadi, M.M., Jamshidi, E., Bonakdarpour, B. (2006): Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on carbon source. *International Journal of Environment Science and Technology*, 3, (3): 297-303.
- Rasmussen, T. B., Skindersoe, M. E., Bjarnsholt, T. et al. (2005): Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology*, 151, 5 1325-1340.
- Read, R.C. i sar. (1992): Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J. Appl. Physiol.*, 72, 2271-2277.

- Records, A. R., Gross, D. C. (2010): Sensor kinases RetS and LadS regulate *Pseudomonas syringae* type VI secretion and virulence factors. *Journal of Bacteriology*, vol. 192, No. 14, pp. 3584-3596.
- Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A. i sar. (1997): The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide and lipase. *Molecular Microbiology*, vol. 24, No. 2, pp. 309-319.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V. Foglino, M. (2000): *Two-component systems in Pseudomonas aeruginosa: why so many?*. Trends in Microbiology, vol. 8, No. 11, pp. 498-504.
- Rohwer, F., Edwards, R. (2002): The Phage Proteomic Tree: a Genome-Based Taxonomy for Phage, *Journal of Bactriology*, 184, No. 16,. 4529–4535.
- Rohwer F (2003): Global phage diversity. *Cell*, 113(2):141.
- Roy, P. H., Tetu, S. G., Larouche, A., Elbourne, L., Trembay, S., Ren, Q., Dodson, R., Hrkins, D., Shay, R., Watkins, K., Mahamoud, Y., Paulsen, I. T. (2010): Complete Genome Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. PlosONE, 22; 5 (1).
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001): Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Samek, O., Al-Marashi, J.F.M., Telle, H.H. (2010): The potential of Raman spectroscopy for the identification of biofilm formation by *Stapylococcus epidermis*. *Laser Phys.Lett.*, 7, 5, 378-383.
- Sanchez, C.J., Mende, K., Beckius, M.L., Akers, K.S., Romano, D.R., Wenke, J.C., Murray, C.K. (2013): Biofilm formation by clinical isolates and the implication in chronic infections. *BMS Infectious Diseases*, 13:47.
- Sanchez, D., Gomila, M., Bennasar, A., Lalucat, J., Garcia-Valdes, E. (2014): Genome Analysis of Environmental and Cilnical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Sequence Type-1146. PLoS ONE 9(10): e107754.
- Schmidt, K.D., TummLer, B., RomLing, U. (1996): Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs

- to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J.Bacteriol.* 178:85-93.
- Schwartz, T., Jungfer, C., Hibler, S., Friedrich, F., Faubel, W., Obst, U. (2009): Combined use of molecular biology taxonomy, Raman spectrometry, and ESEM imaging to study natural biofilms grown on filter materials at waterworks. *Chemosphere*, 77, 249-257.
 - Segata, N., Ballarini, A., Jousson, O. (2013): Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA45, a Highly Virulent Strain Isolated from a Patient with Bloodstream Infection. *Genome Announc*, 23; 1 (3).
 - Sepúlveda-Robles, O., Kameyama, L., Guarneros, G. (2012): High Diversity and Novel Species of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages, *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 12, 4510-4515.
 - Serwer, P., Hayes, S.J., Zaman, S., Lieman, K., Rolando, M., and Hardies, S.C. (2004): Undersampled bacteriophages: finding of distant terminase genes. *Virology*, 329: 412-424.
 - Shaver, C.M., Hause, A.R. (2004): Relative Contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to Virulence in the Lung. *Infection and Immunity*, 72(12): 6969–6977.
 - Shih, P.C., Huang, C.T. (2002): Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 309-314.
 - Shrout, R.C. et al. (2006): The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol. Microbiol.*, 62, 1264-1277.
 - Sillakorva, S., Neubauer, P., Azaredo, J. (2011): Use of Bacteriophages to Control Biofilms. LAP Lambert Academic Publishing: Saarbrücken, Germany.
 - Silge, A., Schumacher, W., Rosch, P., Da Costa Filho, P.A., Gerard, C., Popp, J. (2014): Identification of water-conditioned *Pseudomonas aeruginosa* by Raman microspectroscopy on a single cell level. *Systematic and Applied Microbiology*, 37, 360-367.

- Silo-Suh, L. A., Suh, S. J., Ohman, D. E., Wozniak, D. J., Pridgeon, J. W. (2015): Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Mucoïd Strain FRD1, Isolated from a Cystic Fibrosis Patient, *Genome Announcements*, 3, 2.
- Skindersoe, M. E., Alhede, M., Phipps, R. et al. (2008): Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 10, 3648-3663.
- Skindersoe, M. E., Ettinger-Epstein, P., Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., de Nys, R., Givskov, M. (2008): Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Marine Biotechnology*, 10, 1, 56-63.
- Smith K. M., Bu Y., Suga H. (2003): Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *Chemistry and Biology*. 10(6):563–571.
- Spencer, D.H. Kas, A., Smith, E.E., Raymond, C.K., Sims, E.H., Hastings, M., Burns, J.L., Kaul, R., Olson, M.V. (2003): Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185: 1316-1325.
- Stepanović, S., Cirković, I., Mijac, V., Svabic-Vlahovic, M. (2003): Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol* 20:339–343.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukiv, S., Cirković, I., Ruzicka, F. (2007): Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 15, 891-899.
- Stier, R.F. (2005): Beating back biofilms in food processing. *Food Safety Magazine*, 11(1):31–34.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., Olson, M.V. (2000): Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799):959-64.

- Sudhakar, T., Karpagam, S., Premkumar, J.(2015): Biosynthesis, antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* SU1. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3): 921-924.
- Summers, W.C (2005): Bacteriophage Research: Early History In Bacteriophages Biology and Application, ed. E. Kutter i A. Sulakvelidze. *CRC Press*.
- Suttle, C.A. (2007): Marine viruses-major players in the global ecosystem. *Nat. Rev Microbiol.* 5: 801-812.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725-2729.
- Ta C. A., Freundorfer M., Mah T. F., et al. (2014): Inhibition of bacterial quorum sensing and biofilm formation by extracts of neotropical rainforest plants. *Planta Medica*. 80(4):343–350.
- Tamilvanan, S., Venkateshan, N., Ludwig, A. (2008): The potential of lipid-and polymer-based drug delivery carriers for eradicating biofilm consortia on device-related nosocomial infections. *J Control Release*. 22;128(1):2-22.
- Tan, Y., Zhang, K., Rao, X., Jin, X., Huang, J., Zhu, J., Chen, Z., Hu, X., Shen, X., Wang, L., Hu, F. (2007): Whole genome sequencing of a novel temperate bacteriophage of *P. aeruginosa*: evidence of tRNA gene mediating integration of the phage genome into the host bacterial chromosome. *Cellular Microbiology*, 9, 2, 479–491.
- Tremblay, J., Deziel, E. (2008): Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 509-515.
- Vallet, I., Diggle, S.P., Stacey, E.R., Ca´mara, M., Ventre, I., Lory, S., Lazdunski, A., Williams, P., Filloux, A. (2004): Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *Journal of bacteriology*, 186, 9, 2880-2890.
- Valpuesta, J.M., Sousa, N., Barthelemy, I., Fern´andez, J.J., Fujisawa, H., Ibarra, B., i Carrascosa, J.L. (2000): Structural analysis of the bacteriophage T3 head-to-tail connector. *J Struct Biol*. 131: 146-155.

- Vasiljević, Z., Jovičić, B., Ćirković, I., Đukić, S. (2014): An Examination of Potential Differences in Biofilm Production among different Genotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biol. Sci.*, 66 (1), 117-121.
- Ventre, I., Goodman, A. L., Vallet-Gely i sar. (2006): Multiple sensors control reciprocal expressions of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, No. 1, pp. 171-176.
- Vivas J, Padilla D, Real F, Bravo J, Grasso V, i sar. (2008) Influence of environmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains. *Vet Microbiol*, 129: 150–155.
- Wagenr, M., Ivleva, N.P., Haisch, C., Niessner, R., Horn, H. (2009): *Water research*, 63-76.
- Wang, P.P., Chu, L., Guttman, D.S. (2004): Complete sequence and evolutionary genomic analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* transposable bacteriophage D3112, *J. Bacteriol.*, 186 , 400.
- Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P. (2007): Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 8101–8106.
- Wilhelm, S.W. i Suttle, C. A. (1999): Viruses and nutrient cycles in the sea. *Bioscience*, 49:781–783.
- Williamson, N.R., Fineran, P.C., Ogawa, W., Woodley, L.R., Salmond, G.P. (2008): Integrated regulation involving quorum sensing, a two-component system, a GGDEF/EAL domain protein and a post-transcriptional regulator controls swarming and RhlA-dependent surfactant biosynthesis in *Serratia*. *Environ. Microbiol.*, 10: 1202-1217.
- Winstanley, C., Langille, M.G., Fothergill, J.L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrin, F., Thomson, N.R., Winsor, G.L., Quail, M.A., Lennard, N., Bignell, A., Clarke, L., Seeger, K., Saunders, D., Harris, D., Parkhill, J., Hancock, R.E., Brinkman, F.S., Levesque R.C. (2008): Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res.* 18:0-0.

- Wommack, K.E., i Colwell, R.R. (2000): Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:69–114.
- Yang, L., Barken, K.B., Skindersoe, M.E., Christensen, A.B., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. (2007): Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153(Pt 5):1318-28.
- Zeng Z., Qian L., Cao L., et al. (2008): Virtual screening for novel quorum sensing inhibitors to eradicate biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79(1):119–126.
- <http://www.pseudomonas.com>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984043>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26578582>
- https://pga.mgh.harvard.edu/Parabiosys/projects/host-pathogen_interactions/sequencing.php
- <http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/pseudomonas.html>
- <http://pubmLst.org/general.shtml>

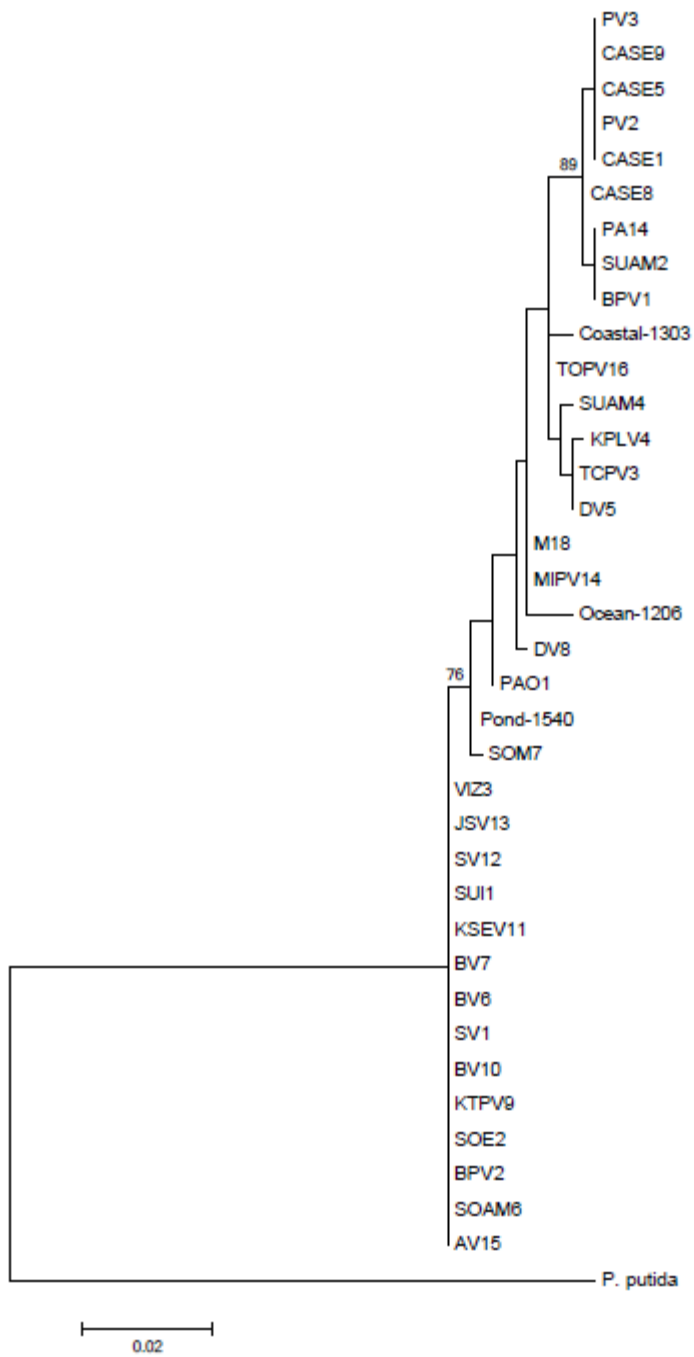
8. PRILOZI

8.1. PRILOG 1 MESTA UZIMANJA UZORAKA, STANIŠTA I OZNAKE

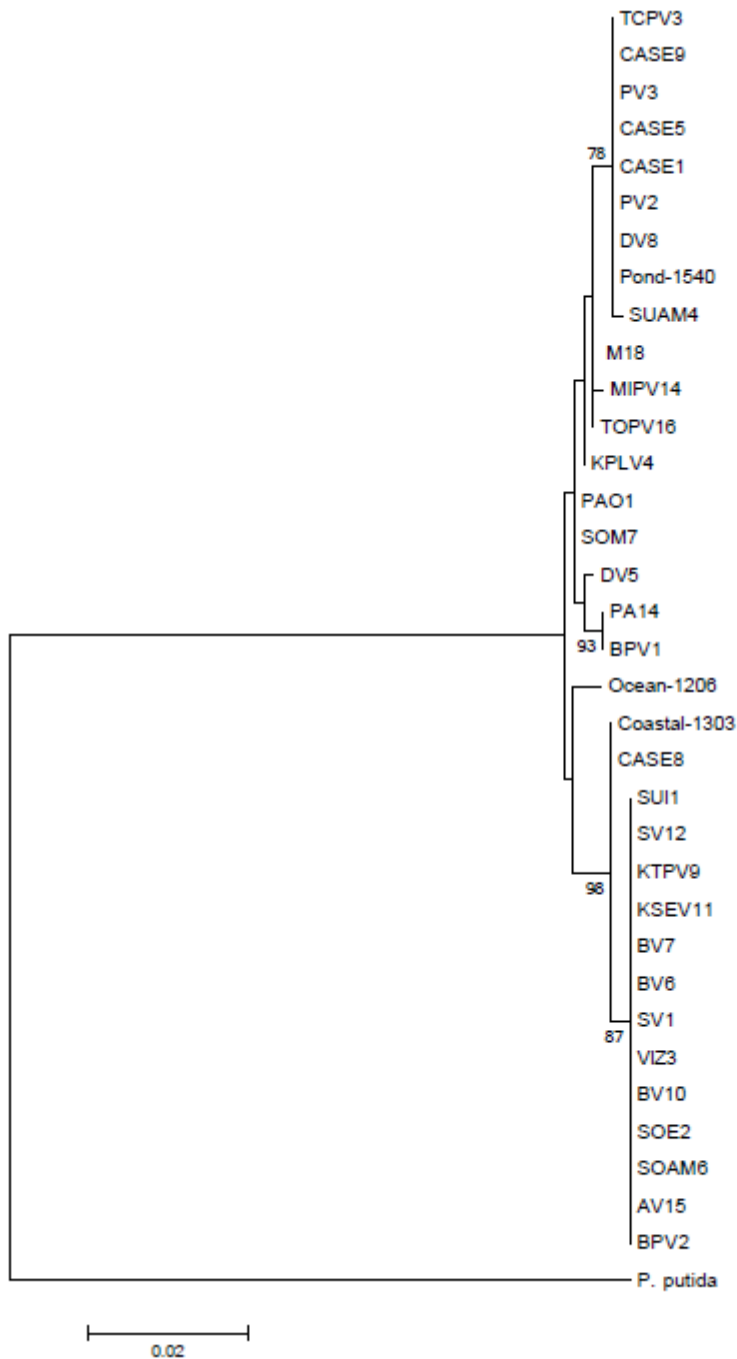
IZOLOVANIH *P. AERUGINOSA*

	OZNAKE UZORAKA	STANIŠTA	MESTO UZIMANJA UZORKA
1	ĆA_SE_1	Sediment	Ćalije
2	ĆA_SE_5	Sediment	Ćalije
3	P_V_2	Pov. voda	Palić
4	P_V_3	Pov. voda	Palić
5	KPL_V_4	Pov. voda	Kanal Palić-Ludaš
6	SU_I_1	Otpadna voda	PPOV Subotica
7	SU_AM_2	Aktivni mulj	PPOV Subotica
8	VI_Z_3	Zemljište	Vitez, BiH
9	S_V_1	Pov. voda	Jezero Skenderovo kod Subotice
10	D_V_5	Pov. voda	Dunav
11	B_V_6	Pov. voda	Kudeljara, Bajmok
12	D_V_8	Pov. voda	Dunav
13	B_V_7	Pov. voda	Kanal Borča
14	KTP_V_9	Pov. voda	Kanal Tisa-Palić
15	B_V_10	Pov. voda	Kanal Borča
16	B_PV_1	Voda iz bunara	Selo Mustajić kod Kučeva
17	KSE_V_11	Pov. voda	Kanal Sebeš, Ovča
18	S_V_12	Pov. voda	Sava kod Ade Ciganlije
19	JS_V_13	Pov. voda	Jezero Skenderovo kod Subotice
20	SU_AM_4	Aktivni mulj	PPOV Subotica
21	MIP_V_14	Pov. voda	Beograd, Mirijevo
22	A_V_15	Pov. voda	Beograd, Ada Ciganlija
23	SO_E_2	Efluent	Sombor, PPOV Somboled
24	SO_AM_6	Aktivni mulj	Sombor, PPOV Somboled
25	B_PV_2	Voda iz bunara	Valjevo
26	TČ_PV_3	Voda sa česme	Beograd, Topčider
27	TOP_V_16	Pov. voda	Beograd, Topčider
28	SO_M_7	mulj	Sombor, PPOV Somboled
29	ĆA_SE_8	Sediment	Ćalije
30	ĆA_SE_9	sediment	Ćalije

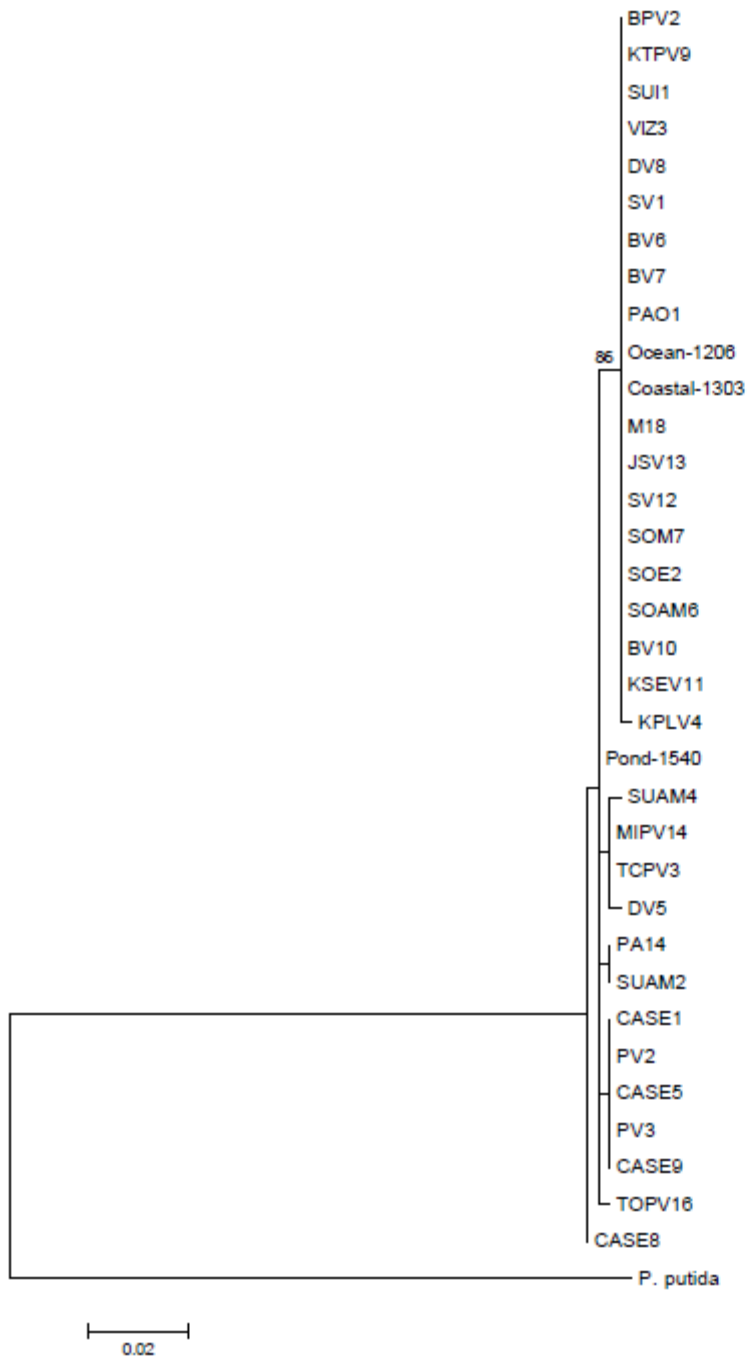
8.2.PRILOG 2: FILOGENETSKO STABLO NA OSNOVU LOKUSA ACSA



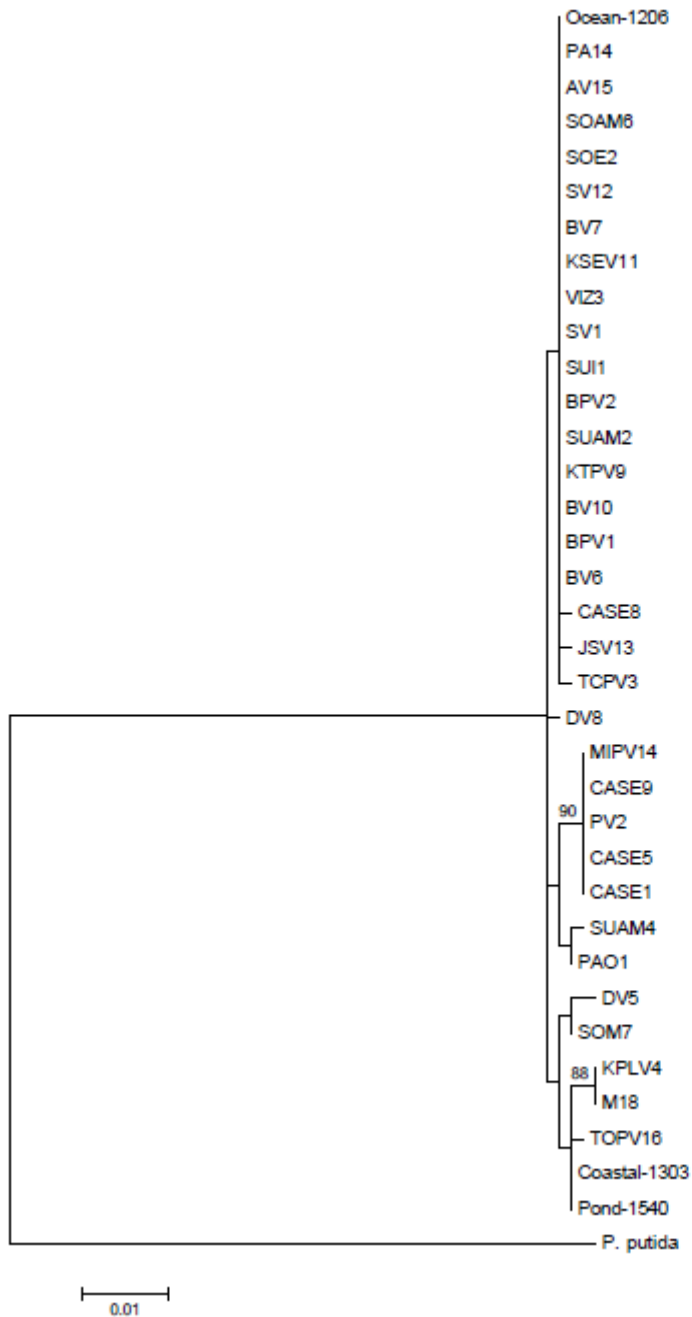
**8.3.PRILOG 3: FILOGENETSKO STABLO KREIRANO NA OSNOVU
LOKUSA GAAA**



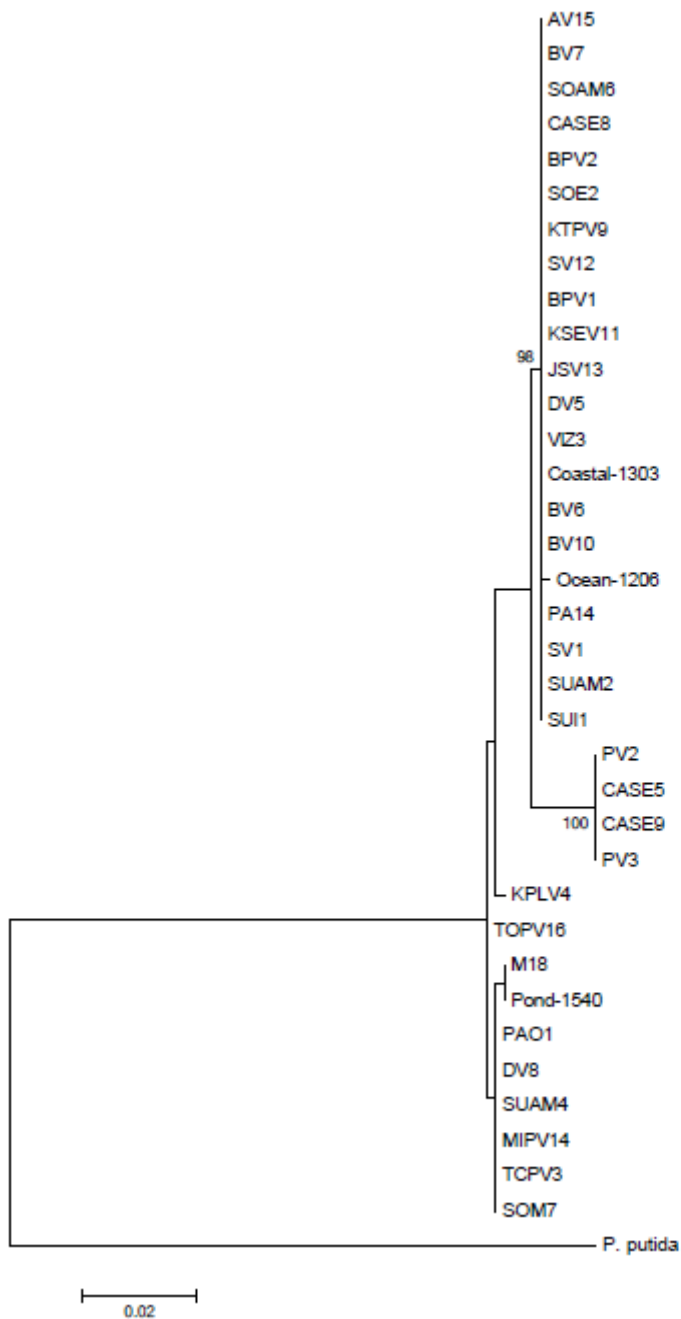
**8.4.PRILOG 4: FILOGENETSKO STABLO KREIRANO NA OSNOVU
LOKUSA MUTL**



**8.5.PRILOG 5: FILOGENETSKO STABLO KREIRANO NA OSNOVU
LOKUSA PPSA**



8.6.PRILOG 6: FILOGENETSKO STABLO KREIRANO NA OSNOVU LOKUSA TRPE



**8.7.PRILOG 7: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD_{630}) 24H NA 37°C, LB
BUJON, PH 7, NaCl 1%**

Redni broj	Uzorak	σ	Min.	Max.	\bar{x}	\bar{x} -Kontrola
	Kontrola	0,013	0,090	0,123	0,103	
1	ĆA_SE_1	0,084	0,126	0,414	0,195	0,10
2	ĆA_SE_5	0,120	0,113	0,448	0,250	0,15
3	P_V_2	0,045	0,116	0,247	0,182	0,08
4	P_V_3	0,081	0,125	0,345	0,201	0,10
5	KPL_V_4	0,037	0,151	0,281	0,188	0,09
6	SU_I_1	0,115	0,126	0,460	0,264	0,16
7	SU_AM_2	0,066	0,156	0,334	0,238	0,14
8	VI_Z_3	0,166	0,123	0,496	0,242	0,14
9	S_V_1	0,084	0,117	0,384	0,227	0,13
10	D_V_5	0,144	0,117	0,620	0,249	0,15
11	B_V_6	0,092	0,121	0,368	0,207	0,11
12	D_V_8	0,043	0,126	0,245	0,168	0,07
13	B_V_7	0,191	0,111	0,761	0,244	0,14
14	KTP_V_9	0,217	0,117	0,762	0,312	0,21
15	B_V_10	0,081	0,106	0,427	0,208	0,11
16	B-PV_1	0,136	0,173	0,554	0,337	0,24
17	KSE_V_11	0,138	0,115	0,433	0,229	0,13
18	S_V-12	0,091	0,150	0,430	0,268	0,17
19	JS_V_13	0,135	0,110	0,445	0,229	0,13
20	SU_AM_4	0,078	0,132	0,334	0,228	0,13
21	MIP_V_14	0,100	0,116	0,389	0,233	0,13
22	A_V_15	0,111	0,104	0,368	0,216	0,12
23	SO_E_2	0,020	0,144	0,207	0,180	0,08
24	SO_AM_6	0,037	0,145	0,258	0,196	0,10
25	B_PV_2	0,042	0,123	0,249	0,168	0,07
26	TČ_PV_3	0,211	0,119	0,643	0,336	0,24
27	TOP_V_16	0,032	0,131	0,213	0,166	0,07
28	SO_M_7	0,098	0,125	0,434	0,204	0,10
29	ĆA_SE_8	0,067	0,122	0,295	0,186	0,09
30	ĆA_SE_9	0,099	0,123	0,392	0,216	0,12
					0,222	0,127
31	ATCC	0,050	0,131	0,289	0,177	0,08

**8.8.PRILOG 8: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD₆₃₀) 24H NA 22°C, LB
BUJON, PH 7, NaCl 1%**

Redni broj	Uzorak	σ	Min.	Max.	\bar{x}	Prosek - Kontrola
	Kontrola	0,006	0,092	0,110	0,101	
1	ĆA_SE_1	0,214	0,119	0,768	0,309	0,21
2	ĆA_SE_5	0,260	0,149	0,734	0,433	0,33
3	P_V_2	0,213	0,143	0,753	0,342	0,24
4	P_V_3	0,175	0,110	0,496	0,233	0,13
5	KPL_V_4	0,036	0,145	0,249	0,198	0,10
6	SU_I_1	0,198	0,145	0,681	0,383	0,28
7	SU_AM_2	0,222	0,158	0,681	0,427	0,33
8	VI_Z_3	0,201	0,121	0,643	0,297	0,20
9	S_V_1	0,198	0,150	0,653	0,281	0,18
10	D_V_5	0,093	0,133	0,386	0,219	0,12
11	B_V_6	0,255	0,150	0,794	0,360	0,26
12	D_V_8	0,134	0,170	0,516	0,314	0,21
13	B_V_7	0,292	0,178	0,942	0,477	0,38
14	KTP_V_9	0,131	0,229	0,594	0,408	0,31
15	B_V_10	0,142	0,184	0,546	0,363	0,26
16	B-PV_1	0,101	0,521	0,847	0,679	0,58
17	KSE_V_11	0,024	0,175	0,245	0,205	0,10
18	S_V-12	0,094	0,290	0,633	0,417	0,32
19	JS_V_13	0,186	0,158	0,602	0,392	0,29
20	SU_AM_4	0,023	0,118	0,195	0,156	0,06
21	MIP_V_14	0,038	0,115	0,232	0,166	0,07
22	A_V_15	0,038	0,146	0,254	0,189	0,09
23	SO_E_2	0,055	0,153	0,317	0,231	0,13
24	SO_AM_6	0,018	0,129	0,179	0,154	0,05
25	B_PV_2	0,032	0,167	0,267	0,215	0,11
26	TČ_PV_3	0,115	0,152	0,442	0,268	0,17
27	TOP_V_16	0,045	0,131	0,282	0,198	0,10
28	SO_M_7	0,054	0,160	0,342	0,226	0,13
29	ĆA_SE_8	0,064	0,134	0,375	0,203	0,10
30	ĆA_SE_9	0,047	0,117	0,277	0,165	0,07
					0,290	0,197
31	ATCC	0,046	0,152	0,303	0,235	0,13

**8.9.PRILOG 9: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD₆₃)24H NA 37°C, LB
BUJON, PH 6, NaCl 1%**

Redni broj	Uzorak	σ	Min.	Max.	\bar{x}	\bar{x} -Kontrola
	kontrola				0.10	
1	ĆA_SE_1	0.011	0.111	0.147	0.12	0.02
2	ĆA_SE_5	0.012	0.104	0.140	0.12	0.02
3	P_V_2	0.057	0.124	0.265	0.19	0.09
4	P_V_3	0.125	0.107	0.510	0.24	0.14
5	KPL_V_4	0.070	0.106	0.272	0.20	0.10
6	SU_I_1	0.123	0.116	0.416	0.29	0.19
7	SU_AM_2	0.409	0.206	1.478	0.93	0.83
8	VI_Z_3	0.100	0.309	0.547	0.45	0.35
9	S_V_1	0.117	0.139	0.414	0.29	0.19
10	D_V_5	0.125	0.122	0.408	0.27	0.17
11	B_V_6	0.105	0.107	0.357	0.22	0.12
12	D_V_8	0.032	0.112	0.197	0.15	0.05
13	B_V_7	0.083	0.123	0.337	0.20	0.10
14	KTP_V_9	0.108	0.165	0.471	0.34	0.24
15	B_V_10	0.218	0.219	0.957	0.51	0.41
16	B-PV_1	0.108	0.114	0.388	0.25	0.15
17	KSE_V_11	0.101	0.350	0.685	0.46	0.36
18	S_V-12	0.191	1.658	2.175	1.86	1.76
19	JS_V_13	0.058	0.140	0.321	0.18	0.08
20	SU_AM_4	0.055	0.147	0.310	0.20	0.10
21	MIP_V_14	0.043	0.113	0.226	0.14	0.04
22	A_V_15	0.094	0.145	0.418	0.22	0.12
23	SO_E_2	0.018	0.112	0.166	0.14	0.04
24	SO_AM_6	0.045	0.123	0.238	0.16	0.06
25	B_PV_2	0.056	0.118	0.285	0.16	0.06
26	TČ_PV_3	0.077	0.121	0.345	0.22	0.12
27	TOP_V_16	0.083	0.172	0.401	0.29	0.19
28	SO_M_7	0.057	0.153	0.347	0.22	0.12
29	ĆA_SE_8	0.116	0.120	0.397	0.30	0.20
30	ĆA_SE_9	0.057	0.146	0.291	0.21	0.11
					0.32	0.22
31	ATCC	0.042	0.172	0.295	0.22	0.12

**8.10. PRILOG 10: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD₆₃₀) 24H NA
22°C, LB BUJON, PH 6, NaCl 1%**

Redni broj	Uzorak	σ	Min.	Max.	\bar{x}	\bar{x} -Kontrola
	kontrola				0.111	
1	ĆA_SE_1	0.446	0.100	0.446	0.571	0.461
2	ĆA_SE_5	0.115	0.005	0.115	0.122	0.012
3	P_V_2	0.344	0.203	0.344	0.661	0.551
4	P_V_3	0.322	0.145	0.322	0.422	0.312
5	KPL_V_4	0.129	0.036	0.129	0.209	0.099
6	SU_I_1	0.122	0.026	0.122	0.145	0.035
7	SU_AM_2	0.248	0.026	0.248	0.307	0.197
8	VI_Z_3	0.454	0.113	0.454	0.626	0.516
9	S_V_1	0.144	0.023	0.144	0.173	0.063
10	D_V_5	0.170	0.026	0.170	0.212	0.102
11	B_V_6	0.157	0.020	0.157	0.178	0.068
12	D_V_8	0.150	0.034	0.150	0.204	0.094
13	B_V_7	0.336	0.062	0.336	0.436	0.326
14	KTP_V_9	0.143	0.054	0.143	0.200	0.090
15	B_V_10	0.371	0.073	0.371	0.463	0.353
16	B-PV_1	0.154	0.026	0.154	0.187	0.077
17	KSE_V_11	0.419	0.238	0.419	0.835	0.725
18	S_V-12	1.441	0.175	1.441	1.681	1.571
19	JS_V_13	0.504	0.082	0.504	0.571	0.461
20	SU_AM_4	0.112	0.009	0.112	0.138	0.028
21	MIP_V_14	0.109	0.043	0.109	0.177	0.067
22	A_V_15	0.128	0.015	0.128	0.148	0.038
23	SO_E_2	0.150	0.030	0.150	0.173	0.063
24	SO_AM_6	0.125	0.022	0.125	0.145	0.035
25	B_PV_2	0.128	0.019	0.128	0.156	0.046
26	TČ_PV_3	0.166	0.073	0.166	0.221	0.111
27	TOP_V_16	0.137	0.021	0.137	0.177	0.067
28	SO_M_7	0.127	0.014	0.127	0.147	0.037
29	ĆA_SE_8	0.123	0.024	0.123	0.161	0.051
30	ĆA_SE_9	0.166	0.009	0.166	0.171	0.061
31	ATCC	0.125	0.054	0.125	0.169	0.059

**8.11. PRILOG 11: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD₆₃₀) 24H NA
37°C, LB BUJON, PH 7, NaCl 2%**

Redni broj	Uzorak	σ	Min.	Max.	\bar{x}	\bar{x} -Kontrola
1	ČA_SE_1	0.233	0.831	1.588	1.217	1.057
2	ČA_SE_5	0.041	0.136	0.259	0.186	0.026
3	P_V_2	0.377	1.396	2.455	1.821	1.661
4	P_V_3	0.715	0.219	1.945	0.748	0.588
5	KPL_V_4	0.080	0.162	0.415	0.208	0.048
6	SU_I_1	0.029	0.162	0.247	0.190	0.030
7	SU_AM_2	0.145	0.25	0.688	0.531	0.371
8	VI_Z_3	0.127	0.125	0.478	0.282	0.122
9	S_V_1	0.056	0.162	0.316	0.217	0.057
10	D_V_5	0.258	0.282	1.024	0.618	0.458
11	B_V_6	0.032	0.155	0.236	0.190	0.030
12	D_V_8	0.076	0.237	0.465	0.372	0.212
13	B_V_7	0.186	0.603	1.149	0.776	0.616
14	KTP_V_9	0.216	0.146	0.8	0.404	0.244
15	B_V_10	0.121	0.2	0.574	0.341	0.181
16	B-PV_1	0.064	0.127	0.321	0.182	0.022
17	KSE_V_11	0.109	0.19	0.541	0.344	0.184
18	S_V-12	0.188	0.215	0.714	0.385	0.225
19	JS_V_13	0.158	0.493	1.004	0.731	0.571
20	SU_AM_4	0.036	0.172	0.288	0.209	0.049
21	MIP_V_14	0.016	0.213	0.265	0.237	0.077
22	A_V_15	0.078	0.182	0.445	0.255	0.095
23	SO_E_2	0.094	0.142	0.431	0.278	0.118
24	SO_AM_6	0.041	0.187	0.309	0.244	0.084
25	B_PV_2	0.034	0.168	0.265	0.223	0.063
26	TČ_PV_3	0.049	0.201	0.363	0.311	0.151
27	TOP_V_16	0.189	0.126	0.772	0.405	0.245
28	SO_M_7	0.102	0.24	0.478	0.328	0.168
29	ČA_SE_8	0.031	0.132	0.231	0.167	0.007
30	ČA_SE_9	0.135	0.264	0.515	0.361	0.201
31	ATCC	0.044	0.156	0.306	0.231	0.071

**8.12. PRILOG 12: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD₆₃₀) 24H NA
22°C, LB BUJON, PH 7, NaCl 2%**

Redni broj	Uzorak	σ	Min.	Max.	\bar{x}	\bar{x} - Kontrola
	kontrola				0.119	
1	ĆA_SE_1	0.652	1.250	0.187	1.051	0.941
2	ĆA_SE_5	0.112	0.396	0.097	0.183	0.073
3	P_V_2	1.208	1.898	0.216	1.610	1.500
4	P_V_3	0.216	0.694	0.182	0.363	0.253
5	KPL_V_4	0.17	0.389	0.074	0.259	0.149
6	SU_I_1	0.196	0.664	0.170	0.386	0.276
7	SU_AM_2	0.385	0.886	0.144	0.713	0.603
8	VI_Z_3	0.156	0.841	0.214	0.635	0.525
9	S_V_1	0.168	0.227	0.018	0.197	0.087
10	D_V_5	0.149	0.374	0.082	0.283	0.173
11	B_V_6	0.231	0.394	0.057	0.322	0.212
12	D_V_8	0.277	0.625	0.118	0.426	0.316
13	B_V_7	0.902	1.842	0.360	1.388	1.278
14	KTP_V_9	0.453	0.831	0.119	0.549	0.439
15	B_V_10	0.665	1.256	0.182	0.841	0.731
16	B-PV_1	0.168	0.348	0.078	0.230	0.120
17	KSE_V_11	0.557	1.060	0.139	0.770	0.660
18	S_V-12	0.533	1.007	0.166	0.782	0.672
19	JS_V_13	1.054	1.968	0.302	1.531	1.421
20	SU_AM_4	0.212	0.388	0.062	0.281	0.171
21	MIP_V_14	0.278	0.448	0.051	0.323	0.213
22	A_V_15	0.189	0.265	0.023	0.243	0.133
23	SO_E_2	0.184	0.289	0.033	0.234	0.124
24	SO_AM_6	0.155	0.217	0.019	0.191	0.081
25	B_PV_2	0.164	0.264	0.031	0.195	0.085
26	TČ_PV_3	0.281	0.371	0.026	0.311	0.201
27	TOP_V_16	0.168	0.238	0.023	0.210	0.100
28	SO_M_7	0.138	0.301	0.056	0.216	0.106
29	ĆA_SE_8	0.219	0.349	0.042	0.272	0.162
30	ĆA_SE_9	0.196	0.561	0.140	0.311	0.201
31	ATCC	0.195	0.255	0.020	0.229	0.119

**8.13. PRILOG 13: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD_{630}) 6H NA 37°C,
LB BUJON, PH 7, NaCl 1%**

Redni broj	Uzorak	σ	Min.	Max.	\bar{x}	\bar{x} -Kontrola
	Kontrola	0,002	0,100	0,105	0,103	
1	ĆA_SE_1	0,037	0,219	0,333	0,297	0,19
2	ĆA_SE_5	0,036	0,237	0,342	0,291	0,19
3	P_V_2	0,062	0,323	0,539	0,418	0,32
4	P_V_3	0,080	0,203	0,455	0,296	0,19
5	KPL_V_4	0,049	0,339	0,469	0,407	0,30
6	SU_I_1	0,052	0,291	0,458	0,361	0,26
7	SU_AM_2	0,102	0,200	0,451	0,313	0,21
8	VI_Z_3	0,089	0,316	0,521	0,395	0,29
9	S_V_1	0,044	0,254	0,388	0,343	0,24
10	D_V_5	0,033	0,208	0,297	0,263	0,16
11	B_V_6	0,016	0,150	0,205	0,180	0,08
12	D_V_8	0,008	0,130	0,156	0,141	0,04
13	B_V_7	0,005	0,106	0,121	0,111	0,01
14	KTP_V_9	0,005	0,109	0,124	0,115	0,01
15	B_V_10	0,013	0,111	0,149	0,126	0,02
16	B-PV_1	0,012	0,123	0,156	0,138	0,04
17	KSE_V_11	0,020	0,188	0,243	0,212	0,11
18	S_V-12	0,010	0,113	0,143	0,125	0,02
19	JS_V_13	0,009	0,109	0,138	0,124	0,02
20	SU_AM_4	0,042	0,104	0,201	0,140	0,04
21	MIP_V_14	0,019	0,124	0,173	0,144	0,04
22	A_V_15	0,023	0,113	0,164	0,139	0,04
23	SO_E_2	0,027	0,113	0,185	0,150	0,05
24	SO_AM_6	0,048	0,145	0,300	0,194	0,09
25	B_PV_2	0,039	0,172	0,275	0,223	0,12
26	TČ_PV_3	0,029	0,179	0,276	0,231	0,13
27	TOP_V_16	0,103	0,170	0,466	0,336	0,23
28	SO_M_7	0,023	0,167	0,234	0,198	0,10
29	ĆA_SE_8	0,029	0,140	0,231	0,168	0,07
30	ĆA_SE_9	0,033	0,185	0,293	0,238	0,14
31	ATCC	0,178	0,07	0,07	0,14	0,28

**8.14. PRILOG 14: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD_{630}) 6H NA 22°C,
LB BUJON, PH 7, NaCl 1%**

Redni broj	Uzorak	σ	Min.	Max.	\bar{x}	\bar{x} - Kontrola
	Kontrola	0,007	0,099	0,120	0,110	0,00
1	ĆA_SE_1	0,038	0,221	0,341	0,247	0,14
2	ĆA_SE_5	0,043	0,278	0,413	0,346	0,24
3	P_V_2	0,065	0,353	0,563	0,401	0,29
4	P_V_3	0,015	0,200	0,255	0,229	0,12
5	KPL_V_4	0,015	0,250	0,295	0,271	0,16
6	SU_I_1	0,012	0,216	0,255	0,226	0,12
7	SU_AM_2	0,018	0,254	0,301	0,280	0,17
8	VI_Z_3	0,009	0,247	0,275	0,261	0,15
9	S_V_1	0,016	0,209	0,257	0,231	0,12
10	D_V_5	0,035	0,232	0,330	0,271	0,16
11	B_V_6	0,012	0,191	0,234	0,215	0,10
12	D_V_8	0,018	0,177	0,234	0,200	0,09
13	B_V_7	0,017	0,129	0,179	0,157	0,05
14	KTP_V_9	0,021	0,122	0,176	0,141	0,03
15	B_V_10	0,031	0,129	0,217	0,157	0,05
16	B-PV_1	0,029	0,214	0,303	0,261	0,15
17	KSE_V_11	0,022	0,160	0,225	0,202	0,09
18	S_V-12	0,043	0,173	0,287	0,217	0,11
19	JS_V_13	0,034	0,135	0,234	0,179	0,07
20	SU_AM_4	0,016	0,129	0,175	0,152	0,04
21	MIP_V_14	0,013	0,118	0,155	0,136	0,03
22	A_V_15	0,007	0,117	0,136	0,128	0,02
23	SO_E_2	0,006	0,107	0,130	0,119	0,01
24	SO_AM_6	0,028	0,187	0,282	0,223	0,11
25	B_PV_2	0,019	0,146	0,205	0,191	0,08
26	TČ_PV_3	0,024	0,231	0,316	0,259	0,15
27	TOP_V_16	0,018	0,159	0,215	0,188	0,08
28	SO_M_7	0,016	0,136	0,192	0,173	0,06
29	ĆA_SE_8	0,039	0,249	0,380	0,294	0,18
30	ĆA_SE_9	0,026	0,204	0,291	0,245	0,14
31	ATCC	0,028	0,132	0,227	0,174	0,06

**8.15. PRILOG 15: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD₆₃₀) 48H NA
37°C, LB BUJON, PH 7, NaCl 1%**

Redni broj	Uzorak	σ	Min.	Max.	\bar{x}	\bar{x} - Kontrola
	Kontrola	0,036	0,130	0,217	0,179	
1	ĆA_SE_1	0,214	0,191	0,714	0,382	0,21
2	ĆA_SE_5	0,215	0,264	0,856	0,525	0,35
3	P_V_2	0,072	0,141	0,344	0,224	0,05
4	P_V_3	0,497	0,292	1,577	0,675	0,50
5	KPL_V_4	0,499	0,133	1,349	0,478	0,31
6	SU_I_1	0,233	0,171	0,753	0,377	0,21
7	SU_AM_2	0,410	0,250	1,616	0,586	0,42
8	VI_Z_3	0,380	0,114	1,028	0,446	0,28
9	S_V_1	0,243	0,117	0,806	0,397	0,23
10	D_V_5	0,402	0,103	1,422	0,553	0,38
11	B_V_6	0,152	0,133	0,618	0,302	0,13
12	D_V_8	0,430	0,130	1,212	0,545	0,38
13	B_V_7	0,324	0,252	1,282	0,457	0,29
14	KTP_V_9	0,257	0,146	0,886	0,349	0,18
15	B_V_10	0,161	0,133	0,576	0,302	0,13
16	B-PV_1	0,171	0,255	0,743	0,382	0,21
17	KSE_V_11	0,401	0,204	1,186	0,662	0,49
18	S_V-12	0,344	0,128	1,001	0,470	0,30
19	JS_V_13	0,191	0,309	0,804	0,464	0,29
20	SU_AM_4	0,143	0,119	0,373	0,208	0,04
21	MIP_V_14	0,026	0,112	0,183	0,133	0,00
22	A_V_15	0,214	0,148	0,829	0,268	0,10
23	SO_E_2	0,018	0,138	0,204	0,167	0,01
24	SO_AM_6	0,113	0,145	0,467	0,271	0,10
25	B_PV_2	0,251	0,186	0,979	0,349	0,18
26	TČ_PV_3	0,031	0,153	0,243	0,192	0,02
27	TOP_V_16	0,063	0,117	0,284	0,197	0,03
28	SO_M_7	0,035	0,191	0,304	0,236	0,07
29	6exp	0,063	0,125	0,306	0,160	0,01
30	2CTR	0,201	0,148	0,676	0,372	0,20
31	ATCC	0,101	0,217	0,541	0,323	0,15

**8.16. PRILOG 16: FORMIRANJE BIOFILMOVA (OD₆₃₀) 48H NA
22°C, LB BUJON, PH 7, NaCl 1%**

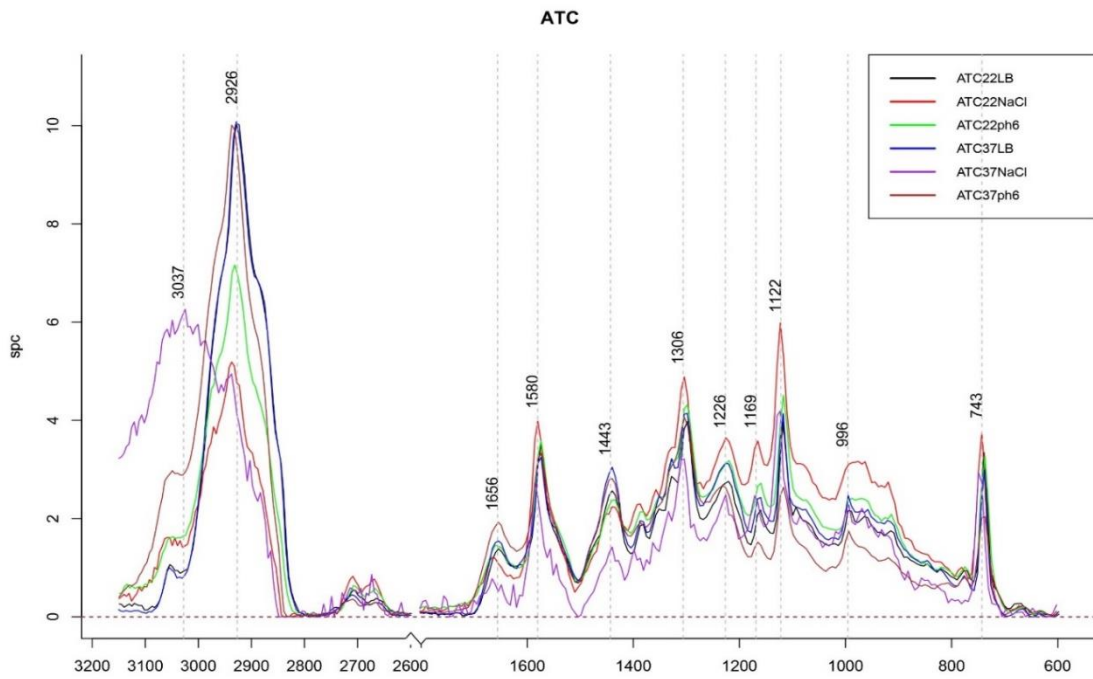
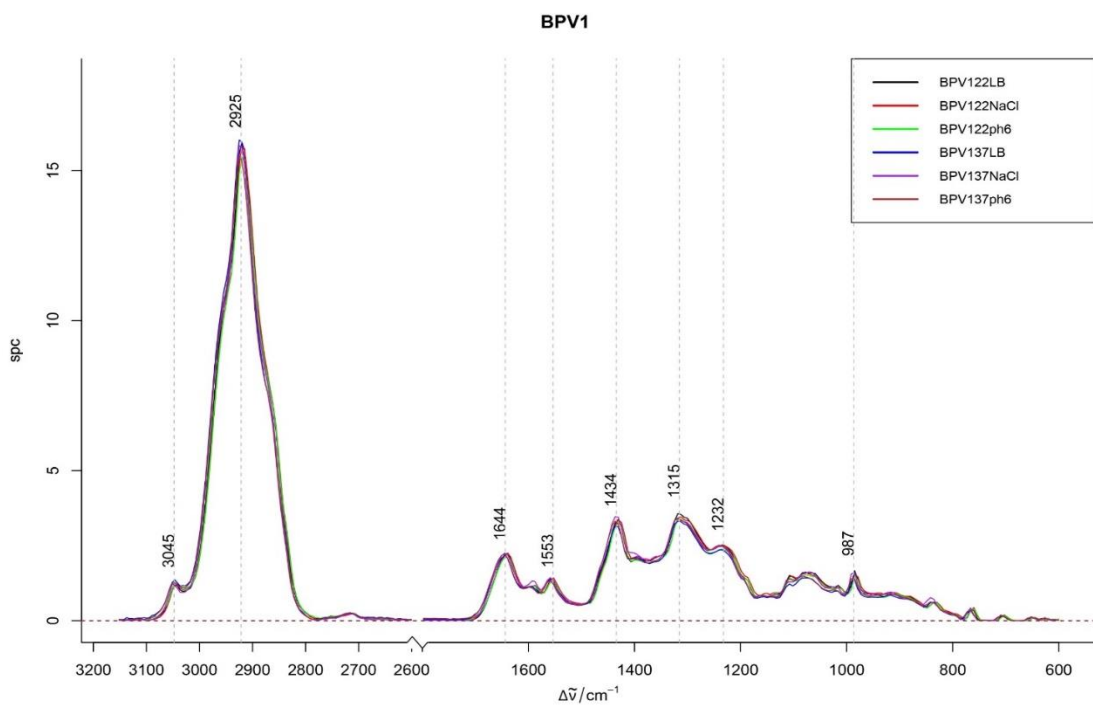
Redni broj	Uzorak	σ	Min.	Max.	\bar{x}	\bar{x} - Kontrola
	Kontrola	0,001	0,112	0,113	0,113	0,00
1	ĆA_SE_1	0,408	0,167	1,175	0,536	0,43
2	ĆA_SE_5	1,411	0,127	3,517	1,148	1,04
3	P_V_2	0,080	0,116	0,351	0,201	0,09
4	P_V_3	1,658	0,127	4,056	1,312	1,20
5	KPL_V_4	1,252	0,195	3,140	1,064	0,95
6	SU_I_1	1,369	0,163	3,781	1,046	0,94
7	SU_AM_2	0,998	0,217	2,785	0,968	0,86
8	VI_Z_3	0,924	0,130	2,517	0,786	0,68
9	S_V_1	1,161	0,130	2,946	0,923	0,81
10	D_V_5	0,956	0,145	2,606	0,828	0,72
11	B_V_6	1,413	0,200	3,278	1,209	1,10
12	D_V_8	0,634	0,166	1,671	0,685	0,57
13	B_V_7	1,276	0,142	3,341	1,374	1,26
14	KTP_V_9	0,966	0,144	2,449	0,806	0,70
15	B_V_10	0,801	0,115	2,066	0,724	0,61
16	B-PV_1	0,817	0,187	2,235	0,949	0,84
17	KSE_V_11	0,560	0,174	1,492	0,641	0,53
18	S_V-12	0,616	0,134	1,558	0,602	0,49
19	JS_V_13	0,575	0,146	1,565	0,552	0,44
20	SU_AM_4	0,036	0,148	0,219	0,184	0,07
21	MIP_V_14	0,031	0,174	0,261	0,205	0,09
22	A_V_15	0,035	0,167	0,280	0,230	0,12
23	SO_E_2	0,091	0,122	0,412	0,254	0,14
24	SO_AM_6	0,119	0,134	0,405	0,273	0,16
25	B_PV_2	0,032	0,121	0,207	0,174	0,06
26	TČ_PV_3	0,099	0,143	0,456	0,211	0,10
27	TOP_V_16	0,050	0,133	0,292	0,178	0,07
28	SO_M_7	0,016	0,165	0,215	0,182	0,07
29	6exp	0,075	0,136	0,332	0,233	0,12
30	2CTR	0,038	0,108	0,227	0,160	0,05
31	ATCC	0,033	0,159	0,260	0,194	0,08

8.17. PRILOG 17: POKRETLJIVOST *P. AERUGINOSA* NA 22°C 24H

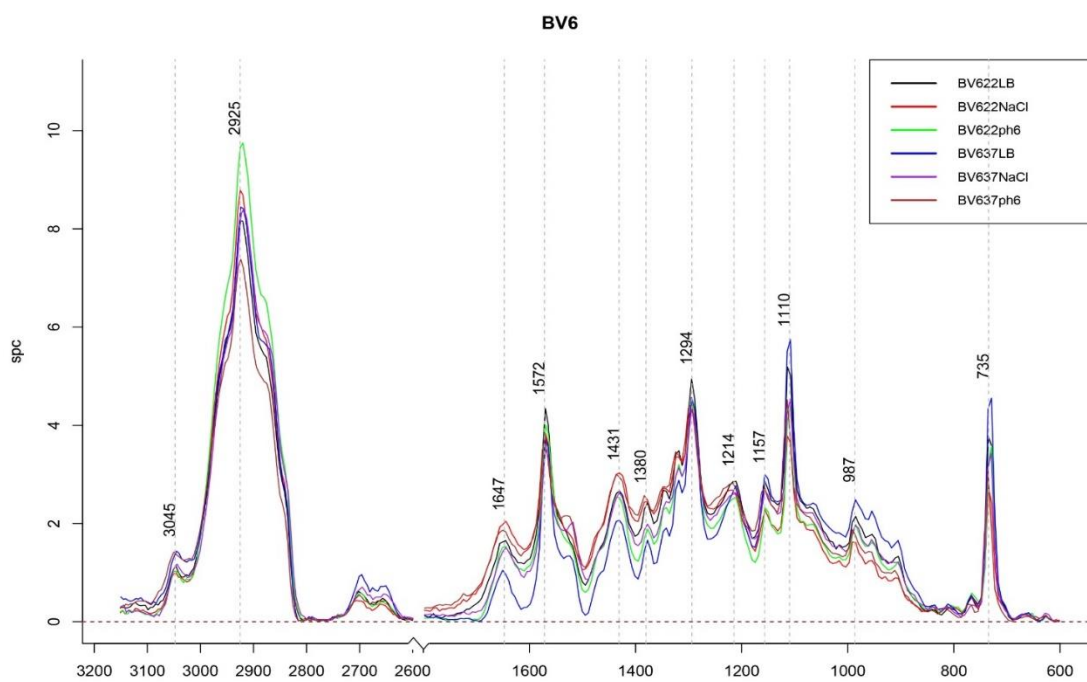
Redni broj	Uzorak	LB 0,1%		LB 0,3%		LB 0,5%		LB 1%		M8 0,5%	
		(mm Ø)		(mm Ø)		(mm Ø)		(mm Ø)		(mm Ø)	
		\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
1	ĆA_SE_1	21,7	4,7	7	1	5,7	1,1	6	1	7	0
2	ĆA_SE_5	17	14,1	14	8	11	1,1	10	1	45	5
3	P_V_2	10	0	7	1	7	0	8	1,1	11	2,1
4	P_V_3	6,5	2,1	6	0	7,3	3,2	6	1,5	7,3	0,6
5	KPL_V_4	15,5	2,1	12	1,5	6,3	0,5	6	0,5	27	9,1
6	SU_I_1	10,5	3,5	9,3	1,1	7,7	2,0	6	0,5	9	1,7
7	SU_AM_2	13	11,3	7,3	0,5	7	0	6	1	8	1,4
8	VI_Z_3	18	11,3	9,7	6,4	7,7	0,5	9	1,1	9	1,4
9	S_V_1	15	14,1	7,3	1,5	7,3	2,5	7	1,5	8	1,4
10	D_V_5	13	8,4	8	2	7,3	0,5	7	0	11	0,7
11	B_V_6	8,5	2,1	10	2,8	7,5	0,7	7	0	7,5	0,7
12	D_V_8	10	5	7,7	0,5	10	4,3	7	0,5	10	0
13	B_V_7	9,33	4	15	5,1	7	1	7	0,5	16	6,6
14	KTP_V_9	17	11,7	9	1	6,3	1,1	8	1,1	9,7	1,5
15	B_V_10	31	0	17	9,2	10	3,6	8	0	21	11,5
16	B-PV_1	19,7	3,7	7	1	5,7	1,1	7	0	8	1,7
17	KSE_V_11	44	33,0	10	0	7,3	1,5	8	0,5	8,5	2,1
18	S_V-12	13,3	1,5	8,3	1,5	7	1	7	0	7,7	0,6
19	JS_V_13	24,5	0,7	19	6,5	7	2,6	10	2,8	27	20
20	SU_AM_4	25,3	4,1	11	1,5	11	0,5	7	0,5	20	2,9
21	MIP_V_14	22,3	6,8	13	1,7	8	0	8	1,1	24	2,6
22	A_V_15	18,7	5,6	5,7	1,1	7,3	0,5	8	0,5	8	1,4
23	SO_E_2	23,3	14,4	6	1,7	7,7	0,5	7	1,1	25	0,7
24	SO_AM_6	37,7	45,6	5,3	0,5	8	1,7	6	1,1	10	2
25	B_PV_2	46,7	40,4	9,3	2,8	10	0	7	0,5	11	3
26	TČ_PV_3	83,3	5,7	6,3	1,1	9	1	10	0,5	10	0
27	TOP_V_16	38	36,4	12	4,1	8	0	7	0	24	4,9
28	SO_M_7	42	17	9	1,7	9,3	1,1	6	0,5	15	2,8
29	ĆA_SE_8	5,67	1,1	5,3	0,5	5	0	5	0	12	2,5
30	ĆA_SE_9	5	0	6,7	1,5	5,7	1,1	8	2,8	6,7	1,5
31	ATCC 27853	80	17,3	10	6,2	7	1,7	6	1,4	10	0

8.18. PRILOG 18: POKRETLJIVOST P. AERUGINOSA NA 37°C, 24H

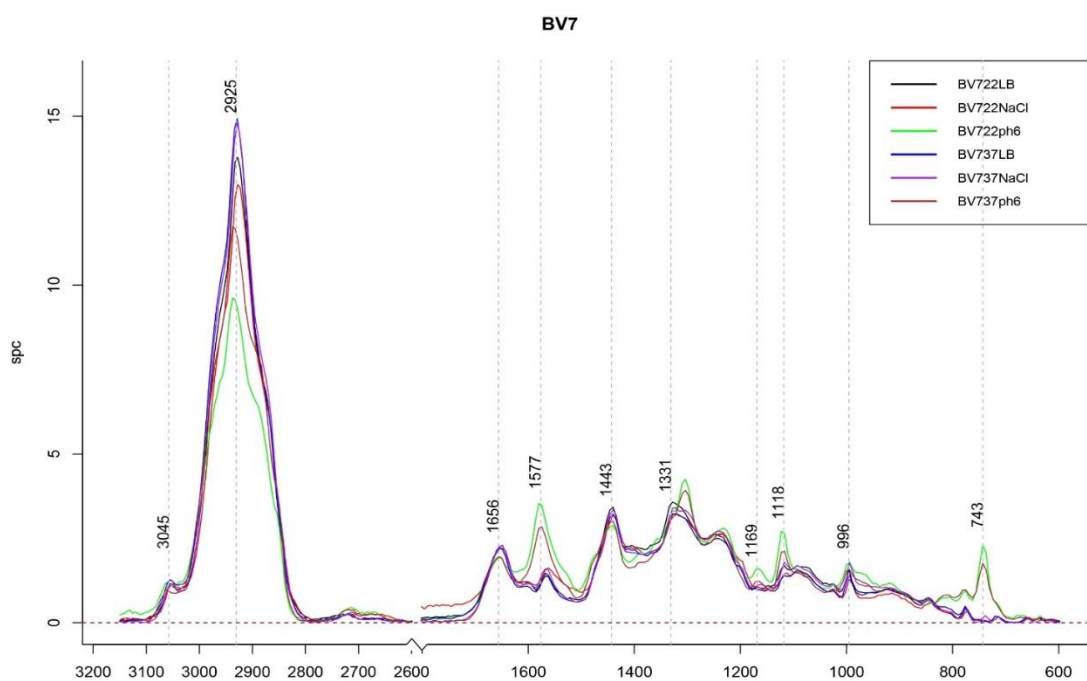
Redni broj	Uzorak	LB 0,1% (mm Ø)		LB 0,3% (mm Ø)		LB 0,5% (mm Ø)		LB 1% (mm Ø)		M8 0,5% (mm Ø)	
		\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
1	ČA_SE_1	22	3,5	11	8,1	7,3	2,5	5,7	1,2	8,33	0,6
2	ČA_SE_5	27,5	3,5	17	17,3	11	4,9	14	1,2	73,3	5,8
3	P_V_2	11,5	2,1	10	1	9,3	1,5	14	1,4	14	3,5
4	P_V_3	21,5	2,1	8,3	2,1	9	1,7	7	1	9,33	3,1
5	KPL_V_4	21,5	0,7	26	5,5	8	0	11	3,1	56	10,1
6	SU_I_1	29	26,9	25	8,5	7,3	2,5	7	1	30	0
7	SU_AM_2	21	11,3	8,7	2,1	9,3	1,5	9,7	2,5	16	1
8	VI_Z_3	19	5,7	13	4,7	12	4,2	9,7	2,1	18	6,6
9	S_V_1	37,5	31,8	9	3,6	11	1,5	9,3	1,5	15,5	6,4
10	D_V_5	20,5	6,4	11	1,4	10	4	7	0	17	8,5
11	B_V_6	12	7,1	17	2,1	16	8,5	10	1,5	12,3	1,2
12	D_V_8	26	25,4	11	3,5	12	1,7	11	1,2	10,5	0,7
13	B_V_7	20,7	3,8	23	5,8	11	3,2	14	6,7	16	6,1
14	KTP_V_9	21,7	4,2	30	10	11	3,1	9,3	1,5	54,3	14,4
15	B_V_10	28	14,1	38	18,9	12	2,1	15	8,0	27,3	13,8
16	B-PV_1	19,5	4,9	16	3,5	8	1	11	1	13	1,7
17	KSE_V_11	9,33	3,2	11	0,7	14	5,5	8,7	1,2	15,7	2,1
18	S_V-12	14	2,6	13	2,6	12	1,2	15	3	16	9,6
19	JS_V_13	32,5	9,2	26	13,6	14	1,7	14	3,6	23,3	15,3
20	SU_AM_4	78,3	20,2	12	2,5	23	3,6	14	2,6	27,7	0,6
21	MIP_V_14	25,7	7,5	27	10,4	14	4,9	10	0,6	38,3	12,7
22	A_V_15	56	30,8	5	0	10	0	8,7	1,2	10,5	0,7
23	SO_E_2	41	42,9	5,7	1,2	13	1,7	6,7	1,2	24	4,2
24	SO_AM_6	22,5	10,6	6,3	2,3	8,7	1,5	6,7	0,6	11,7	2,1
25	B_PV_2	35	47,6	14	4,6	12	7,1	11	0,6	13	0
26	TC_PV_3	90	0	10	3,5	11	3,5	9,7	2,5	17,5	7,8
27	TOP_V_16	90	0	22	9,3	10	2,6	12	1,5	32,5	10,6
28	SO_M_7	19,7	11,7	6	1,7	14	2,1	9	2	19,5	3,5
29	ČA_SE_8	8,67	1,5	11	1	10	0	7,5	3,5	12,3	2,5
30	ČA_SE_9	5	0	7,3	2,5	5	0	8,3	2,9	6,67	2,9
31	ATCC	90	0	15	3,6	5,3	0,6	6	0	16,5	4,9

8.19. PRILOG 19: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT ATCC 27853**8.20. PRILOG 20: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT B_PV_1**

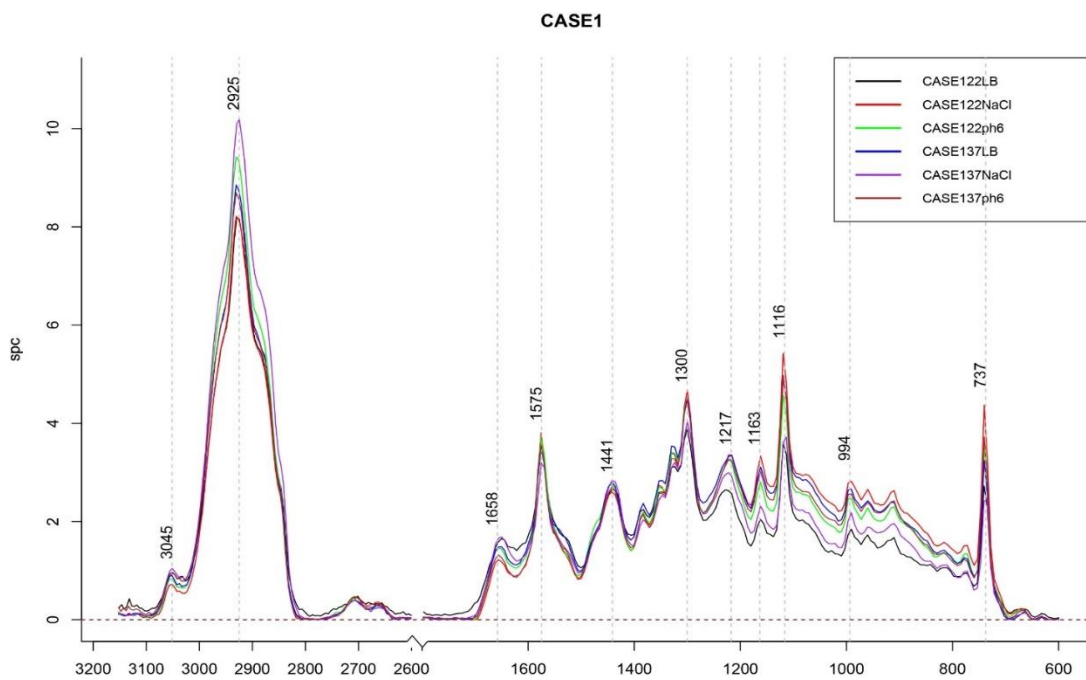
8.21. PRILOG 21: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT B_V_6



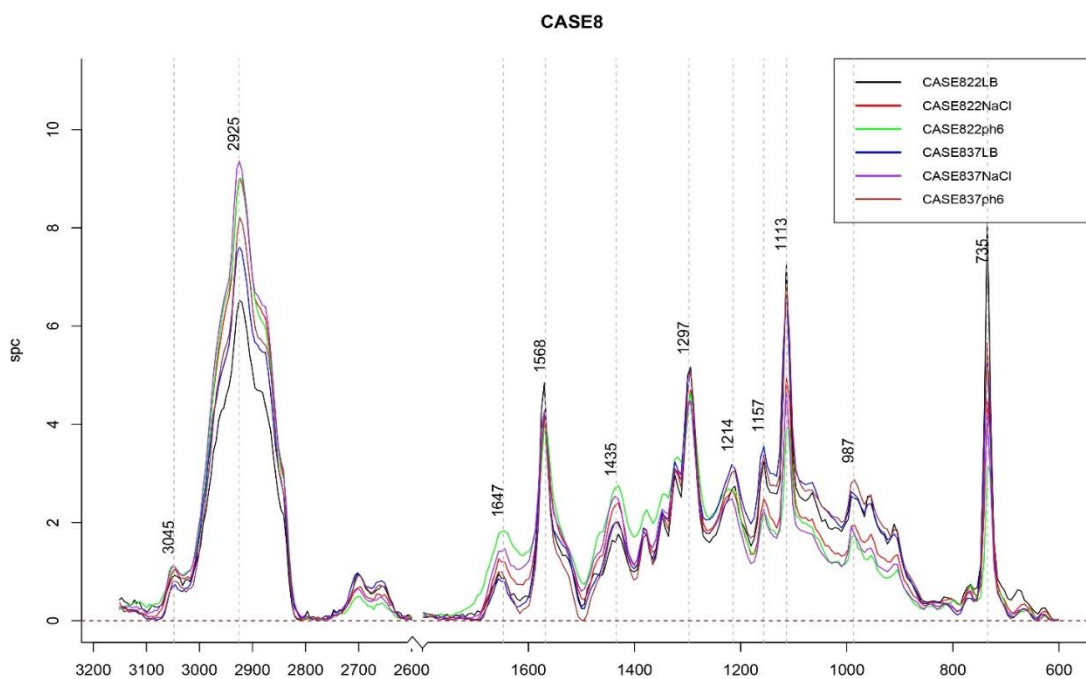
8.22. PRILOG 22: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT B_V_7



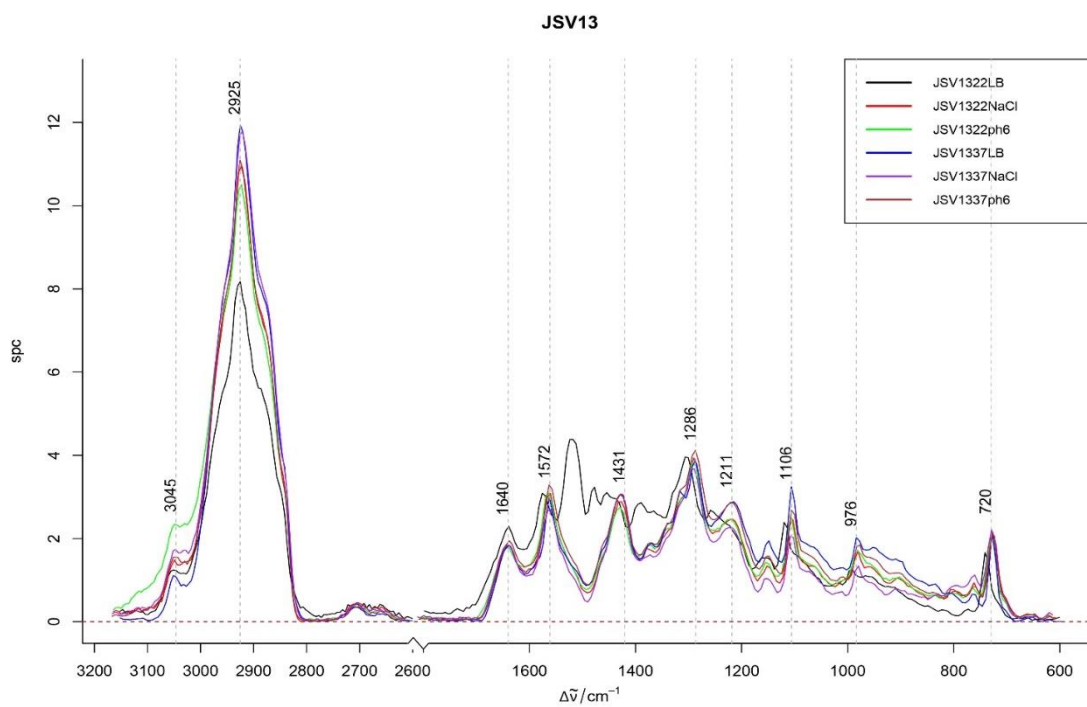
8.23. PRILOG 23: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT ĆA_SE_1



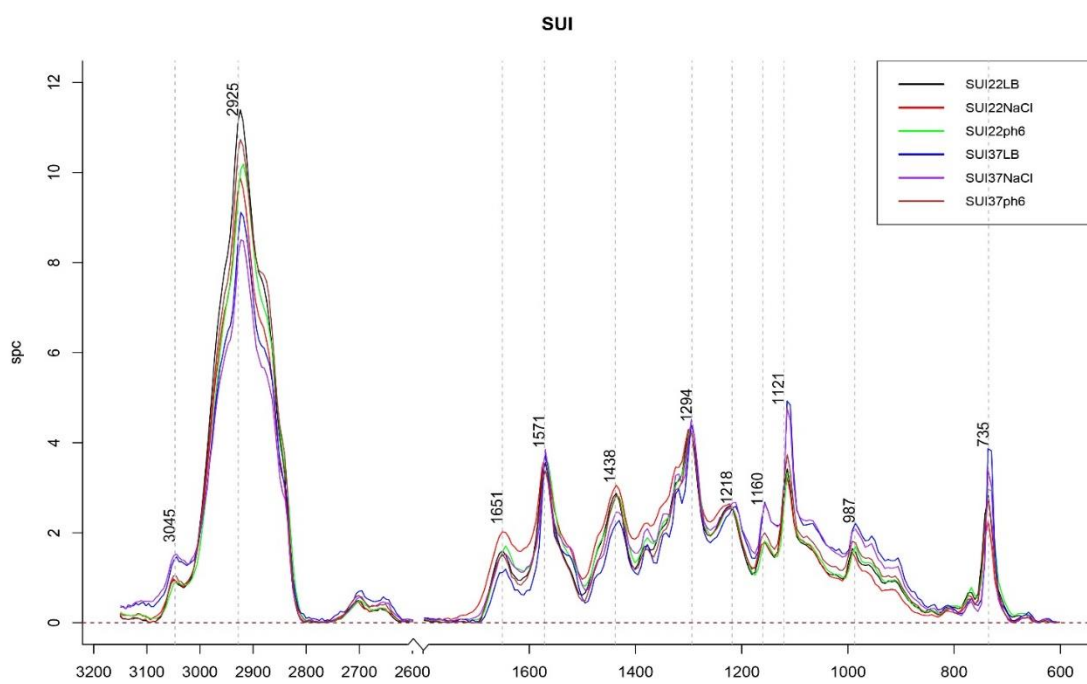
8.24. PRILOG 24: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT ĆA_SE_8

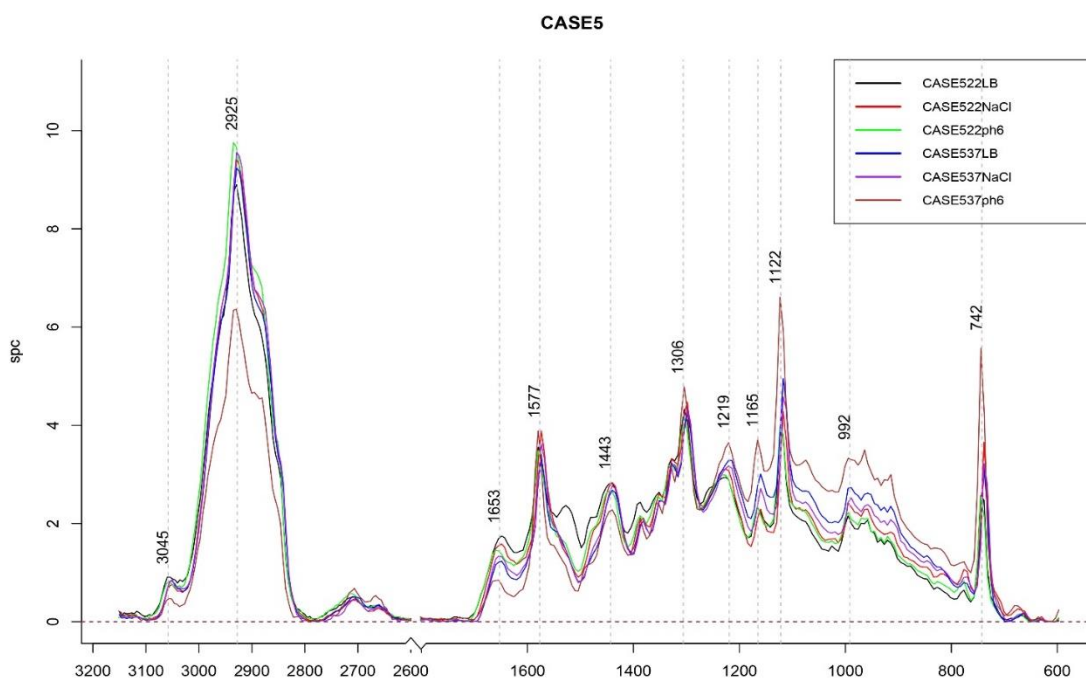
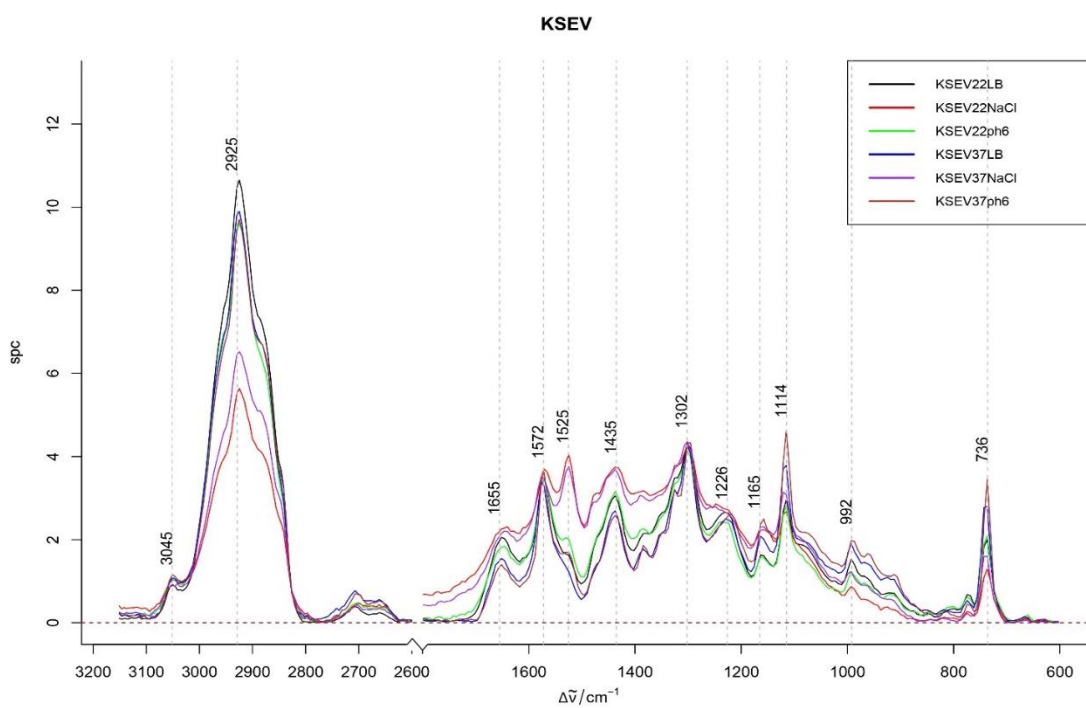


8.25. PRILOG 25: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT JS_V_13

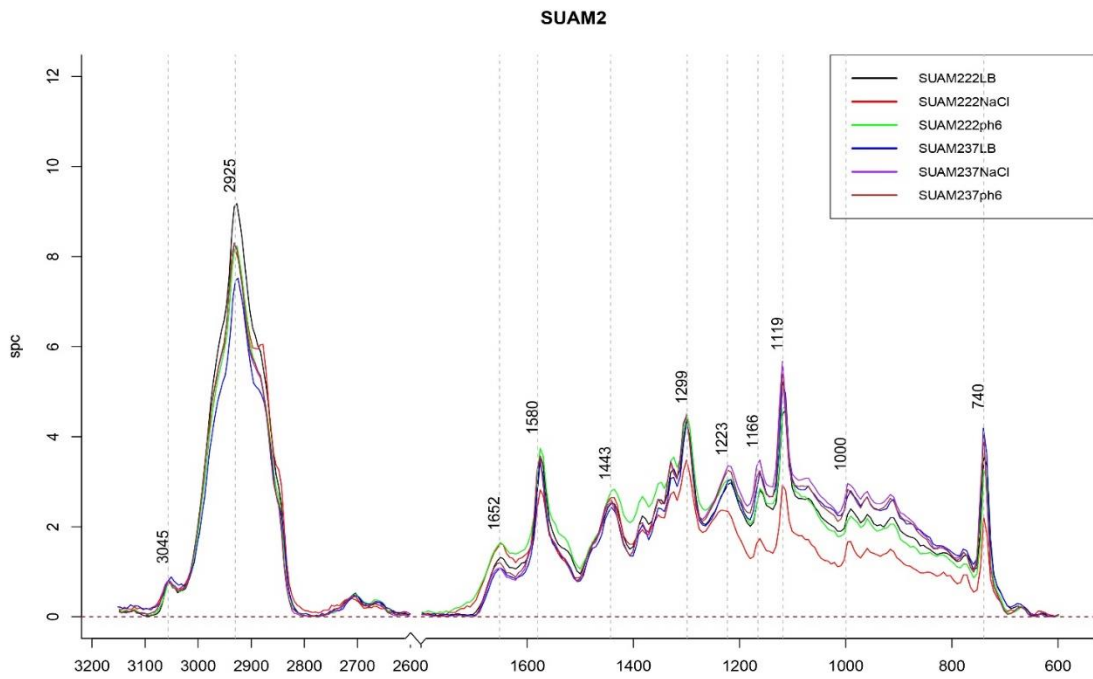


8.26. PRILOG 26: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT SU_I_1

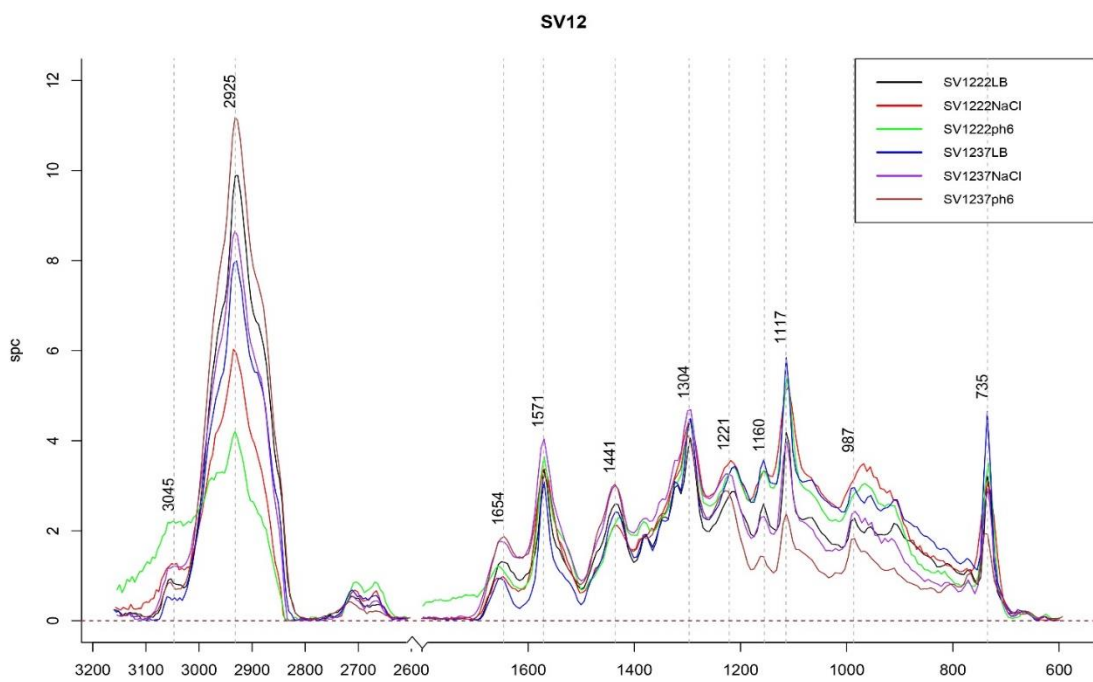


8.27. PRILOG 27: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT ČA_SE_5**8.28. PRILOG 28: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT KSE_V_11**

8.29. PRILOG 29: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT SU_AM_2



8.30. PRILOG 30: RAMANOVI SPEKTRI ZA IZOLAT S_V_12



8.31. PRILOG 31: DELOVANJE BAKTERIOFAGA ϕ 4 NA BIOFILMOVE

Tabela: Delovanje bakteriofaga ϕ 4 na biofilmove u toku 24h na 37°C, pH 7, NaCl 1%

BV7	BPV1	SUAM4	ATCC	SUAM2	PV2
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi					
0,13	0,17	0,07	0,10	0,13	0,10
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon istovremenog dodavanja bakterija i faga					
0,14	0,12	0,08	0,08	0,09	0,09
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon dodavanja faga u 24-oro časovne biofilmove					
0,12	0,15	0,10	0,12	0,13	0,13

Tabela: Delovanje bakteriofaga ϕ 4 na biofilmove u toku 24h na 22°C, pH 7, NaCl 1%

BV7	BPV1	SUAM4	ATCC	SUAM2	PV2
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi					
0,26	0,26	0,17	0,21	0,29	0,18
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon istovremenog dodavanja bakterija i faga					
0,18	0,17	0,16	0,17	0,16	0,16
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon dodavanja faga u 24-oro časovne biofilmove					
0,27	0,23	0,13	0,16	0,23	0,14

8.32. PRILOG 32: DELOVANJE BAKTERIOFAGA $\phi 5$ NA BIOFILMOVE

Tabela: Delovanje bakteriofaga $\phi 5$ na biofilmove u toku 24h na 37°C, pH 7, NaCl 1%

BV7	BPV1	SUAM4	ATCC	SUAM2	PV2
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi					
0,22	0,23	0,09	0,16	0,19	0,10
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon istovremenog dodavanja bakterija i faga					
0,13	0,16	0,09	0,10	0,17	0,10
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon dodavanja faga u 24-oro časovne biofilmove					
0,18	0,24	0,10	0,12	0,17	0,09

Tabela: Delovanje bakteriofaga $\phi 5$ na biofilmove u toku 24h na 22°C, pH 7, NaCl 1%

BV7	BPV1	SUAM4	ATCC	SUAM2	PV2
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi					
0,29	0,33	0,10	0,12	0,29	0,12
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon istovremenog dodavanja bakterija i faga					
0,13	0,17	0,09	0,09	0,14	0,09
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon dodavanja faga u 24-oro časovne biofilmove					
0,21	0,29	0,13	0,15	0,28	0,14

8.33. PRILOG 33: DELOVANJE BAKTERIOFAGA $\phi 8$ NA BIOFILMOVE

Tabela: Delovanje bakteriofaga $\phi 8$ na biofilmove u toku 24h na 37°C, pH 7, NaCl 1%

BV7	BPV1	SUAM4	ATCC	SUAM2	PV2
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi					
0,30	0,29	0,11	0,17	0,21	0,16
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon istovremenog dodavanja bakterija i faga					
0,13	0,20	0,13	0,15	0,18	0,14
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon dodavanja faga u 24-oro časovne biofilmove					
0,19	0,19	0,12	0,15	0,18	0,13

Tabela: Delovanje bakteriofaga $\phi 8$ na biofilmove u toku 24h na 22°C, pH 7, NaCl 1%

BV7	BPV1	SUAM4	ATCC	SUAM2	PV2
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi					
0,36	0,44	0,13	0,14	0,35	0,16
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon istovremenog dodavanja bakterija i faga					
0,15	0,18	0,11	0,10	0,14	0,11
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon dodavanja faga u 24-oro časovne biofilmove					
0,27	0,36	0,14	0,14	0,26	0,11

8.34. PRILOG 34: DELOVANJE BAKTERIOFAGA $\phi 11$ NA BIOFILMOVE NA 37°C

Tabela: Delovanje bakteriofaga $\phi 11$ na biofilme u toku 24h na 37°C, pH 7, NaCl 1%

BV7	BPV1	SUAM4	ATCC	SUAM2	PV2
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi					
0,36	0,56	0,33	0,41	0,39	0,31
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon istovremenog dodavanja bakterija i faga					
0,30	0,43	0,28	0,31	0,34	0,29
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon dodavanja faga u 24-oro časovne biofilme					
0,38	0,60	0,36	0,35	0,45	0,31

Tabela: Delovanje bakteriofaga $\phi 11$ na biofilme u toku 24h na 37°C, pH 6, NaCl 1%

BV7	BPV1	SUAM4	ATCC	SUAM2	PV2
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi					
0,37	0,46	0,35	0,36	0,41	0,31
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon istovremenog dodavanja bakterija i faga					
0,27	0,36	0,27	0,32	0,34	0,30
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon dodavanja faga u 24-oro časovne biofilme					
0,30	0,49	0,32	0,31	0,40	0,30

Tabela: Delovanje bakteriofaga $\phi 11$ na biofilme u toku 24h na 37°C, pH 7, NaCl 2%

BV7	BPV1	SUAM6	ATCC	SUAM2	PV2
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi					
0,42	0,72	0,54	0,47	0,63	0,42
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon istovremenog dodavanja bakterija i faga					
0,33	0,49	0,29	0,39	0,54	0,32
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon dodavanja faga u 24-oro časovne biofilme					
0,32	0,53	0,33	0,37	0,43	0,31

8.35. PRILOG 35: DELOVANJE BAKTERIOFAGA ϕ 11 NA BIOFILMOVE NA 22°C

Tabela: Delovanje bakteriofaga ϕ 11 na biofilme u toku 24h na 22°C, pH 7, NaCl 1%

BV7	BPV1	SUAM2	PV2
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi			
0,74	0,94	0,96	0,52
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon istovremenog dodavanja bakterija i faga			
0,51	0,71	0,58	0,45
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon dodavanja faga u 24-oro časovne biofilme			
0,55	0,70	0,55	0,44

Tabela: Delovanje bakteriofaga ϕ 11 na biofilme u toku 24h na 22°C, pH 6, NaCl 1%

BV7	BPV1	SUAM2	PV2
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi			
0,67	0,78	0,62	0,41
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon istovremenog dodavanja bakterija i faga			
0,46	0,48	0,44	0,38
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon dodavanja faga u 24-oro časovne biofilme			
0,60	0,62	0,47	0,39

Tabela: Delovanje bakteriofaga ϕ 11 na biofilme u toku 24h na 22°C, pH 7, NaCl 2%

BV7	BPV1	SUAM2	PV2
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi			
0,51	0,56	0,46	0,59
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon istovremenog dodavanja bakterija i faga			
0,21	0,34	0,39	0,29
OD ₆₃₀ formirani bakterijski biofilmovi nakon dodavanja faga u 24-oro časovne biofilme			
0,53	0,47	0,48	0,42

9. BIOGRAFIJA

Mr Bojana A. Vujović (rođ. Burger) je rođena 28.08.1977. godine u Subotici (Republika Srbija) gde je završila osnovnu i Srednju Medicinsku školu.

Osnovne studije je završila na Prirodno-matematičkom fakultetu, na Departmanu za biologiju i ekologiju Univerziteta u Novom Sadu, smer Profesor biologije, sa prosečnom ocenom 8,40 (osam/četrdeset) i ocenom 10 (deset) na odbrani diplomskog rada.

Magistarske studije je završila 2010 godine na istom fakultetu, smer Mikrobiologija, sa prosečnom ocenom 9,60 (devet/šesdeset) i ocenom 10 (deset) na odbrani magistarske teze pod nazivom „Biološke analize aktivnog mulja i njihov značaj u upravljanju procesom prečišćavanja otpadnih voda“ i stekla akademsko zvanje Magistra bioloških nauka.

U periodu od 2003-2012 godine je bila zaposlena u JKP „Vodovod i kanalizacija“ u Subotici na poslovima biologa (2003-2007, 2008-2010) i šefa (09/2010-09/2012) u laboratoriji za kontrolu kvaliteta otpadnih i površinskih voda i biologa-mikrobiologa (2007-2008) u laboratoriji za kontrolu kvaliteta vode za piće. Tokom rada se aktivno bavila monitoringom pijaćih i površinskih voda (mikrobiologija, hidrobiologija, analiza toksičnosti), kao i problemima prečišćavanja komunalnih i otpadnih voda industrijskih postrojenja, posebno mikroorganizmima koji učestvuju u ovim procesima (mikroskopskom analizom aktivnog mulja, determinacijom filamentoznih bakterija, utvrđivanjem bioindikatoriskih vrednosti mikroorganizama aktivnog mulja). Autor je većeg broja stručnih i naučnih radova na domaćim i međunarodnim konferencijama i jedan od autora Praktikuma za predmet Biotehnologija u zaštiti životne sredine za studente master studija na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu-Zemunu.

Trenutno je zaposlena na Institutu za vodoprivredu „Jaroslav Černi“ u Beogradu.

Govori engleski i mađarski jezik.

Član je Udruženja mikrobiologa Srbije.

Udata je i ima jedno dete.

10. IZJAVE

10.1. PRILOG 1

Izjava o autorstvu

Potpisana: Bojana A. Vujović

IZJAVLJUJEM

Da je doktorska disertacija pod naslovom **BAKTERIOFAGI KAO
AGENSI U KONTROLI FORMIRANJA BIOFILMOVA
PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova
- da su rezultati korektno navedeni
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 29.01.2016.

10.2. PRILOG 2**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Imer i prezime autora: Vujović A. Bojana

Studijski program: Prehrambena tehnologija

Naslov rada: Bakteriofagi kao agensi u kontoli formiranja biofilmova
Pseudomonas aeruginosa

Mentori: Dr Dragoslava Radin i Dr Vera Raičević

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerzitet u Beogradu. Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 29.01.2016.

10.3. PRILOG 3**Izjava o autorstvu**

Ovlašćujem Univerzitetku biblioteku “Svetozar Marković” da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom “Bakteriofagi kao agensi u kontroli formiranja biofilmova *Pseudomonas aeruginosa*” koja je moje autorsko delo. Disertaciju sa svim priložima sam predala u elektronskom format pogodnom za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo-nekomercijalno
3. Autorstvo-nekomercijalno-bez prerade
4. Autorstvo-nekomercijalno-deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo-bez prerade
6. Autorstvo-deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranta

U Beogradu, 29.01.2016.