



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET

**UTICAJ FAKTORA SREDINE NA ADHEZIJU  
KVASACA NA ABIOTIČKE POVRŠINE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Siniša Dodić

Prof. dr Peter Raspor

Kandidat:

MSc Ružica Tomičić

Novi Sad, 2018

### **Zahvalnica**

*Iskreno se zahvaljujem mentorima Prof. dr Siniši Dodić i Prof. dr Peteru Raspor na velikoj podršci i pomoći koju su mi pružili tokom razvoja ove doktorske teze, a pre svega sam zahvalna što su me naučili samostalnom radu i važnosti saradnje. Posebno se zahvaljujem mentoru Prof. dr Peteru Raspor koji mi je omogućio rad u mikrobiološkim laboratorijama na Biotehničkom fakultetu u Ljubljani, za stečeno znanje, neprocenljiva iskustva i svu pomoć koju sam dobila tokom doktorskih studija.*

*Predsedniku komisije Prof. dr Jovani Grahovac i članu komisije Prof. dr Dragiši Savić se zahvaljujem na sugestijama koje su doprinele poboljšanju sadržaja doktorske teze.*

*Zahvaljujem se Prof. dr Neži Čadež za sojeve kvasaca iz Zbirke industrijskih mikroorganizama (ZIM), Prof. dr Mihi Humar za drvene diskove, dr Jasni Kovač za biljne ekstrakte i dr Mariji Kurinčič koja mi je pomogla prilikom optimizacije metode kristal violet.*

*Najlepše hvala svim kolegama sa Katedre za biotehnologiju, mikrobiologiju i bezbednost hrane (Biotehnički fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija), za sve lepe trenutke i savete.*

## SADRŽAJ

<b>SADRŽAJ.....</b>	<b>III</b>
<b>SPISAK TABELA.....</b>	<b>VI</b>
<b>SPISAK SLIKA.....</b>	<b>VII</b>
<b>SPISAK PRILOGA.....</b>	<b>IX</b>
<b>SPISAK SKRAĆENICA.....</b>	<b>X</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE.....</b>	<b>2</b>
2.1. Rast i sposobnost formiranja biofilma kod kvasaca.....	3
2.2. Formiranje biofilma.....	6
2.3. Faktori koji utiču na formiranje biofilma kvasaca <i>Candida</i> i <i>Pichia</i> .....	8
2.3.1. <i>Candida</i> vrste/sojevi.....	8
2.3.2. Hidrofobnost površine ćelije (CSH).....	9
2.3.3. Faktori okoline.....	10
2.3.3.1. Temperatura.....	10
2.3.3.2. Medijum.....	10
2.3.3.3. Prisustvo kondicioniranog filma.....	11
2.3.3.4. Supstrat.....	11
2.4. Kontaktne površine.....	11
2.5. Metode određivanja biofilma.....	13
2.6. Suzbijanje formiranja biofilma.....	15
2.6.1. Mehanizmi otpornosti biofilma.....	17
2.6.1.1. Doprinis ekstracelularnog matriksa biofilma.....	17
2.6.1.2. Usporen rast i ograničenje hranljivih materija.....	17
2.6.1.3. Uloga efluks pumpi.....	18
2.6.1.4. Prisustvo "persister" ćelija.....	19
2.6.2. Antimikrobne supstance prirodnog porekla.....	20
2.6.3. Biljni ekstrakti.....	21
2.6.3.1. <i>Humulus lupulus</i> .....	22
2.6.3.2. <i>Alpinia katsumadai</i> .....	23
2.6.3.3. <i>Evodia rutaecarpa</i> .....	23
<b>3. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>24</b>
3.1. Cilj istraživanja.....	24
3.2. Hipoteze istraživanja.....	24

<b>4. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>25</b>
4.1. Šema rada.....	25
4.2. Materijal.....	26
4.2.1. Kulture mikroorganizama.....	26
4.2.2. Mikrobiološki medijumi.....	27
4.2.3. Reagensi i rastvori za rad sa kvascima.....	28
4.2.4. Biljni ekstrakti.....	29
4.2.5. Kontaktni materijali.....	29
4.2.5.1. Nerđajući čelik.....	29
4.2.5.2. Drvo.....	30
4.2.6. Laboratorijski materijal i oprema.....	30
4.3. Metode.....	32
4.3.1. Revitalizacija kvasaca.....	32
4.3.2. Priprema inokuluma.....	32
4.3.3. Određivanje hidrofobnosti površine ćelije kvasaca <i>Candida</i> i <i>Pichia</i> – MATH test.....	33
4.3.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) biljnih ekstrakata.....	34
4.3.5. Određivanje sposobnosti adhezije kvasaca <i>Candida</i> i <i>Pichia</i> na polistiren površinu metodom kristal violet.....	35
4.3.6. Određivanje sposobnosti adhezije kvasaca <i>Candida</i> i <i>Pichia</i> na diskovima od nerđajućeg čelika metodom kristal violet.....	36
4.3.7. Uticaj biljnih ekstrakata na inicijalnu adheziju i formirani biofilm kvasaca <i>Candida</i> i <i>Pichia</i> na površini od nerđajućeg čelika.....	37
4.3.8. Određivanje sposobnosti adhezije kvasaca <i>Candida</i> i <i>Pichia</i> na drvenim površinama automatskim brojanjem vijabilnih ćelija.....	38
4.3.9. Statistička obrada rezultata.....	38
<b>5. REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>	<b>40</b>
5.1. Hidrofobnost kvasaca ( <i>Candida</i> spp., <i>Pichia</i> spp.) određuje sposobnost adhezije na abiotičke površine.....	40
5.1.1. Korelacija između hidrofobnosti površine ćelije sojeva kvasaca <i>Candida</i> i <i>Pichia</i> i adhezije na polistiren površinu.....	40
5.2. Stepen hrapavosti kontaktnih površina (nerđajućeg čelika i drveta) utiče na adheziju kvasaca.....	43
5.2.1. Uticaj hrapavosti površine nerđajućeg čelika na adheziju sojeva kvasaca <i>Candida</i> i <i>Pichia</i> .....	43
5.2.2. Uticaj hrapavosti površine drveta na adheziju sojeva kvasaca <i>Candida</i> i <i>Pichia</i> .....	47

5.3. Promena temperature i medijuma utiče na adheziju ćelija kvasaca.....	49
5.3.1. Uticaj medijuma za rast i temperature na adheziju sojeva kvasaca <i>Candida</i> .....	50
5.3.2. Uticaj medijuma za rast i temperature na adheziju sojeva kvasaca <i>Pichia</i> .....	52
5.4. Aplikacija biljnih ekstrakata utiče na adheziju kvasaca ( <i>Candida</i> spp., <i>Pichia</i> spp.) na površini od nerđajućeg čelika.....	55
5.4.1. Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata.....	55
5.4.2. Uticaj biljnih ekstrakata na biofilmove kvasaca <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> i <i>P.</i> <i>membranifaciens</i> .....	57
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>61</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>63</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>79</b>

## SPISAK TABELA

Tabela 1. Sojevi iz rodova <i>Candida</i> i <i>Pichia</i> korišćeni u ispitivanju, njihova oznaka i poreklo.....	26
Tabela 2. Čvrsti i tečni medijumi korišćeni za eksperimentalni rad sa kvascima.....	27
Tabela 3. Reagensi i rastvori korišćeni za eksperimentalni rad sa kvascima.....	28
Tabela 4. Hrapavost površine svakog tipa diska od nerđajućeg čelika.....	29
Tabela 5. Laboratorijski materijal korišćen u eksperimentalnom radu.....	30
Tabela 6. Laboratorijska oprema korišćena u eksperimentalnom radu.....	31

## SPISAK SLIKA

Slika 1. Morfološki oblici (A) kvasac, (B) hife i (C) pseudohife (Sudbery, 2011).....	5
Slika 2. Struktura biofilma <i>Candida albicans in vitro</i> i <i>in vivo</i> (Finkel i Mitchell, 2011).....	6
Slika 3. Različite faze razvoja biofilma <i>Candida albicans</i> (Finkel i Mitchell, 2011).....	7
Slika 4. Šematski prikaz mehanizma otpornosti biofilma vrsta roda <i>Candida</i> (Silva i sar., 2017).....	20
Slika 5. Hodogram eksperimenta.....	25
Slika 6. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) biljnih ekstrakata.....	35
Slika 7. Hidrofobnost površine ćelije (cell surface hydrophobicity, CSH) sojeva kvasaca <i>Candida</i> i <i>Pichia</i> (*) merena prema testu mikrobne adhezije na ugljovodonike (MATH). Podaci predstavljaju srednju vrednost $\pm$ standardna devijacija tri nezavisna ponavljanja. Različita slova (a, b, c, d) označavaju značajne razlike između sojeva.....	41
Slika 8. Adhezija sojeva kvasaca <i>Candida</i> i <i>Pichia</i> (*) na polistiren površinu merena korišćenjem kristal violet testa. Eksperimenti su izvedeni sa dvanaest nezavisnih ponavljanja i prikazana je srednja vrednost optičke gustine (OD) sa standardnom devijacijom. Različita slova (a, b, c, d...) označavaju značajne razlike između sojeva.....	42
Slika 9. Adhezija sojeva kvasaca <i>Candida</i> na nerđajući čelik sa različitim stepenom hrapavosti površine (Ra) merena korišćenjem kristal violet testa. Eksperimenti su izvedeni sa dvanaest nezavisnih ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost optičke gustine (OD) sa standardnom devijacijom. Različita slova (a, b, c, d...) označavaju značajne razlike između Ra za svaki soj, dok različita slova (A, B, C, D...) ukazuju na to da postoji značajna razlika između vrsta roda <i>Candida</i> na istoj Ra.....	45
Slika 10. Adhezija sojeva kvasaca <i>Pichia</i> na nerđajući čelik sa različitim stepenom hrapavosti površine (Ra) merena korišćenjem kristal violet testa. Eksperimenti su izvedeni sa dvanaest nezavisnih ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost optičke gustine (OD) sa standardnom devijacijom. Različita slova (a, b, c, d...) označavaju značajne razlike između Ra za svaki soj, dok zvezdice (*) ukazuju na to da postoji značajna razlika između sojeva roda <i>Pichia</i> na istoj Ra.....	46
Slika 11. Adhezija sojeva kvasaca <i>Candida</i> na glatke i hrapave drvene površine. Eksperimenti su izvedeni sa tri nezavisna ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost broja adheriranih ćelija (N) po mm <sup>2</sup> drvene površine sa standardnom devijacijom.....	48
Slika 12. Adhezija sojeva kvasaca <i>Pichia</i> na glatke i hrapave drvene površine. Eksperimenti su izvedeni sa tri nezavisna ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost broja adheriranih ćelija (N) po mm <sup>2</sup> drvene površine sa standardnom devijacijom.....	49

- Slika 13. Uticaj medijuma za rast i temperature na adheziju sojeva iz roda *Candida* na površine nerđajućeg čelika sa različitim stepenom hrapavosti površine (Ra). Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između temperatura na istoj Ra i medijumu, dok različita slova (a, b, c, d ...) označavaju značajne razlike između Ra na istoj temperaturi i medijumu za svaki soj. Različita slova (A, B, C, D...) ukazuju da postoji značajna razlika između vrsta na istoj Ra, temperaturi i medijumu ( $P < 0.05$ ). Neoznačeni izrazi nisu statistički značajni. Skraćenice: MEB, Malt Extract Broth; YPD, Yeast Peptone Dextrose; Ra, hrapavost površine; OD, optička gustina...51
- Slika 14. Uticaj medijuma za rast i temperature na adheziju sojeva iz roda *Pichia* na površine nerđajućeg čelika sa različitim stepenom hrapavosti površine (Ra). Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između temperatura na istoj Ra i medijumu, dok različita slova (a, b, c, d ...) označavaju značajne razlike između Ra na istoj temperaturi i medijumu za svaki soj. Različita slova (A, B, C, D...) ukazuju da postoji značajna razlika između vrsta na istoj Ra, temperaturi i medijumu ( $P < 0.05$ ). Neoznačeni izrazi nisu statistički značajni. Skraćenice: MEB, Malt Extract Broth; YPD, Yeast Peptone Dextrose; Ra, hrapavost površine; OD, optička gustina...53
- Slika 15. Antimikrobna aktivnost ekstrakata *Humulus lupulus* (A), *Alpinia katsumadai* (B) i *Evodia rutaecarpa* (C) prema kvascima *Candida albicans* ATCC 10261, *Candida glabrata* ZIM 2369 i *Pichia membranifaciens* ZIM 2417. Eksperimenti su izvedeni sa osam nezavisnih ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost optičke gustine (OD) sa standardnom devijacijom. Zvezdice (\*) označavaju vrednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).....56
- Slika 16. Antibiofilm aktivnost biljnih ekstrakata prema kvascima *Candida albicans* ATCC 10261 i *Candida glabrata* ZIM 2369 na površini od nerđajućeg čelika. Efekat biljnih ekstrakata u različitim koncentracijama ( $1/2 \times \text{MIC}$  i  $1 \times \text{MIC}$ ) na inicijalnu adheziju (A) i formirani 24h biofilm uz izlaganje od 3h (B). Eksperimenti su izvedeni sa deset nezavisnih ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost optičke gustine (OD) sa standardnom devijacijom. \*  $P < 0.05$  naspram kontrole.....58
- Slika 17. Antibiofilm aktivnost biljnih ekstrakata prema kvascu *Pichia membranifaciens* ZIM 2417 na površini od nerđajućeg čelika. Efekat biljnih ekstrakata u različitim koncentracijama ( $1/2 \times \text{MIC}$  i  $1 \times \text{MIC}$ ) na inicijalnu adheziju (A) i formirani 24h biofilm uz izlaganje od 3h (B). Eksperimenti su izvedeni sa deset nezavisnih ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost optičke gustine (OD) sa standardnom devijacijom. \*  $P < 0.05$  naspram kontrole.....59



## SPISAK PRILOGA

Prilog A. Optimizacija metode kristal violet. Adhezija kvasca <i>Candida albicans</i> ATCC 10261 na polistiren površinu.....	79
Prilog B. Šematski prikaz mikrotitar ploče pri određivanju minimalne inhibitorne koncentracije biljnih ekstrakata <i>Humulus lupulus</i> , <i>Alpinia katsumadai</i> i <i>Evodia rutaecarpa</i> (µg/ml).....	80

## SPISAK SKRAĆENICA

AFM	mikroskop atomskih sila (eng. Atomic Force Microscopy)
Als	eng. „agglutinin-like sequence“
ATCC	eng. „American Type Culture Collection“
ATP	eng. „Adenosine triphosphate“
CFU	eng. „Colony Forming Units“
CLSI	eng. „Clinical and Laboratory Standards Institute“
CSH	hidrofobnost površine ćelije (eng. „Cell Surface Hydrophobicity“)
CV	kristal violet (eng. „Crystal Violet“)
DMSO	dimetil sulfoksid
ECM	ekstracelularni matriks
EPS	ekstracelularna polimerna supstanca
Hwp	eng. „Hyphal wall protein“
MEA	čvrsti medijum Malt Extract Agar
MEB	tečni medijum Malt Extract Broth
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (eng. „Minimal Inhibitory Concentration“)
NaCl	natrijum hlorid
OD	optička gustina (eng. „Optical Density“)
PBS	fiziološki rastvor puferisan fosfatom (eng. Phosphate Buffered Saline)
PVC	polivinil hlorid
Ra	hrapavost površine (eng. surface roughness)
RPMI	tečni medijum (eng. Roswell Park Memorial Institute)
SEM	skenirajući elektronski mikroskop (eng. Scanning Electron Microscopy)
YNB	tečni medijum (eng. Yeast Nitrogen Base)
YPD	tečni medijum (eng. Yeast Peptone Dextrose)

## 1. UVOD

Adhezija mikroorganizama je početni i najvažniji koraku u formiranju biofilma, i važan faktor virulencije. U poslednjih nekoliko decenija adhezija i formiranje biofilma mikroorganizama je ozbiljan problem u mnogim oblastima ljudske aktivnosti od oblasti medicine do industrije. U prehrambenoj industriji, adhezija kvasaca na abiotičke površine, a potom razvoj biofilma, može da izazove unakrsnu kontaminaciju tokom proizvodnje, dovodeći do velikih ekonomskih gubitaka zbog kvarenja hrane i smanjenja kvaliteta proizvoda, a takođe može da šteti zdravlju potrošača. Kvasci unutar biofilma su znatno otporniji prema dezinficijensima, što utiče na njihov opstanak u objektima za preradu i proizvodnju hrane. Formiranje biofilma kvasaca takođe može uzrokovati i druge negativne efekte kao što je smanjenje prenosa toplote ili korozija opreme za preradu. Za razliku od obimne literature koja opisuje adheziju bakterija na abiotičke površine, malo pažnje je posvećeno kvascima, naročito vrstama iz rodova *Candida* i *Pichia*, iako se često javljaju kao kontaminanti u industriji hrane i pića.

Pored toga, najvažniji rod kvasaca patogenih za ljude, *Candida*, poznata je po svojoj sposobnosti da formira biofilme na različitim tipovima medicinskih sredstava, uključujući katetere, stentove, šantove, proteze, implantate, kao i zubnim i drugim veštačkim površinama. Gljive roda *Candida* su mikroorganizmi koji su deo normalne mikroflore i postaju patogeni kada je imuni sistem domaćina oslabljen, tada ovi organizmi imaju sposobnost da izazovu razne površinske i sistemske infekcije. U proteklih dvadeset godina, vrste roda *Candida* su odgovorne za oko 80% gljivičnih infekcija kod ljudi. Iako je *Candida albicans* najčešći oportunistički patogen, i druge ne-*Candida albicans* *Candida* vrste kao što su *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* se javljaju kao česti uzročnici infekcija. Formiranje biofilмова *Candida* nosi značajne kliničke posledice zbog njihove povećane otpornosti na antigljivičnu terapiju i imuni sistem domaćina.

S druge strane, veoma dobro je poznato da na adheziju kvasaca utiču različiti faktori kao što su karakteristike površine ćelije (hidrofobnost površine ćelije, naelektrisanje), faktori sredine (temperatura, pH, medijum) i osobine površine materijala (hrapavost površine, slobodna površinska energija, hemijska svojstva, hidrofobnost). Međutim, uticaj faktora na adheziju kvasaca nije u potpunosti jasan. Zbog toga, javila se evidentna potreba da se ispita uticaj različitih faktora na adheziju odabranih kvasaca na abiotičke površine, čije razumevanje bi pomoglo da se razvije preventivna mera protiv biofilm-infekcije.

## 2. PREGLED LITERATURE

Proces adhezije je zasnovan na fizičkim i hemijskim interakcijama između mikroorganizama i površine, i predstavlja prvi korak u kolonizaciji mikroorganizama a samim tim i formiranju biofilma (Hori i Matsumoto, 2010). U poslednjih nekoliko decenija, problem adhezije i formiranja biofilma mikroorganizama na biotičke i abiotičke površine je prisutan u mnogim oblastima ljudske aktivnosti od oblasti medicine do industrije, zbog povećane rezistentnosti mikroorganizama unutar biofilma kako na antimikrobne lekove, tako i na dezinfekciona sredstva (Donlan, 2001; Shi i Zhu, 2009).

Za razliku od obimne literature koja opisuje adheziju bakterija na abiotičke površine, malo pažnje je posvećeno kvascima kao adhezivnim agensima, naročito vrstama iz rodova *Candida* i *Pichia*, koji su česti kontaminanti u prehrambenoj industriji i uzrokuju kvarenje hrane, smanjenje kvaliteta proizvoda i prenos bolesti (Fleet, 1992; Loureiro i Malfeito-Ferreira, 2003). Broj infekcija kod ljudi uzrokovanih vrstama roda *Candida* je u porastu proteklih godina. Iako se većina slučajeva kandidijaza prepisuje *Candida albicans*, i druge ne-*Candida albicans* *Candida* vrste kao što su *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* se javljaju kao česti uzročnici infekcija (Fidel i sar., 1999; Bassetti i sar., 2006). Vrste roda *Candida* imaju sposobnost da formiraju biofilme na različitim tipovima medicinskih sredstava, uključujući katetere, stentove, šantove, proteze, implantate, kao i zubnim i drugim veštačkim površinama (Kojic i Darouiche, 2004; Ramage i sar., 2006). Dakle, učestalost sistemskih infekcija uzrokovanih vrstama roda *Candida* zaslužuje veliku zabrinutost zbog visoke stope smrtnosti kod imunokompromitovanih pacijenata, povećane rezistentnosti gljiva na antimikotike i sposobnosti ćelija unutar biofilma da izdrže imuni sistem domaćina (Silva i sar., 2011).

Adhezija mikroorganizama na površine se smatra veoma složenim procesom. Mnoge studije su pokazale da karakteristike površine ćelije, kao što su hidrofobnost i naelektrisanje, značajno utiču na inicijalni proces adherencije (Brugnoni i sar., 2007). Hidrofobnost površine ćelije (eng. Cell Surface Hydrophobicity, CSH) igra važnu ulogu u procesu adhezije, jer hidrofobni proteini ugrađeni u matriks ćelijskog zida *Candida* obezbeđuju neophodne interakcije za njihovo vezivanje na različite površine (Jabra-Rizk i sar., 2001). *C. albicans* je jedina među vrstama iz roda *Candida* kod koje je do sada primećeno da ima sposobnost da menja CSH status sa promenom uslova rasta i faze rasta (Masuoka i Hazen, 2004; Singleton i sar., 2005). Poznato je da su hidrofobni kvasci znatno virulentniji od hidrofiličnih (Hazen i Hazen, 1993). Nekoliko prethodnih istraživanja su pokazala da postoji pozitivna korelacija između adhezije *Candida* na abiotičke površine i relativne hidrofobnosti površine ćelije (Luo i Samaranyake, 2002; Li, 2003).

Pored toga, površine materijala imaju nekoliko karakteristika koje utiču na mikrobnu adheziju i formiranje biofilma. Mikroorganizmi se mnogo brže vežu za hidrofobne površine kao što su teflon i druge plastike nego na hidrofilne materijale kao što su staklo i metal (Donal, 2001). Prema nekim autorima, stepen mikrobne kolonizacije se povećava sa porastom hrapavosti površine. To je zato što je sila smicanja smanjena, i površina za adherenciju mikroorganizama je znatno veća na hrapavijim površinama (Ortega i sar., 2008; Radford i sar., 1998).

S druge strane, faktori sredine kao što su temperatura, pH, sastav medijima imaju značajnu ulogu u procesu adhezije mikroorganizama (Hawser i Douglas, 1994; Karam El-Din i sar., 2012). Sposobnost da rastu na temperaturi tipičnoj za ljudsku groznicu (37°C-39°C) je važna virulentna osobina patogena. Šećeri koji se koriste u ishrani, kao što su glukoza i saharoza, mogu biti od značaja u patogenezi *C. albicans* u usnoj duplji, s obzirom na uticaj ovih šećera na adherenciju kvasca (Oslen, 1990). Pokazano je da su ćelije kvasca koje su rasle u medijumu sa visokom koncentracijom galaktoze, saharoze, glukoze ili maltoze, imale veću sposobnost adhezije na akrilne površine nego kvasci koji su rasli u medijumu sa niskom koncentracijom glukoze (Samaranayake i sar., 1980). Glukoza takođe može da promoviše proizvodnju kiseline i niži pH, što ima za posledicu aktivaciju kiselih proteinaza i ekstracelularnih fosfolipaza, faktora uključenih u adheziju kvasca (Abu-Elteen i sar., 2001).

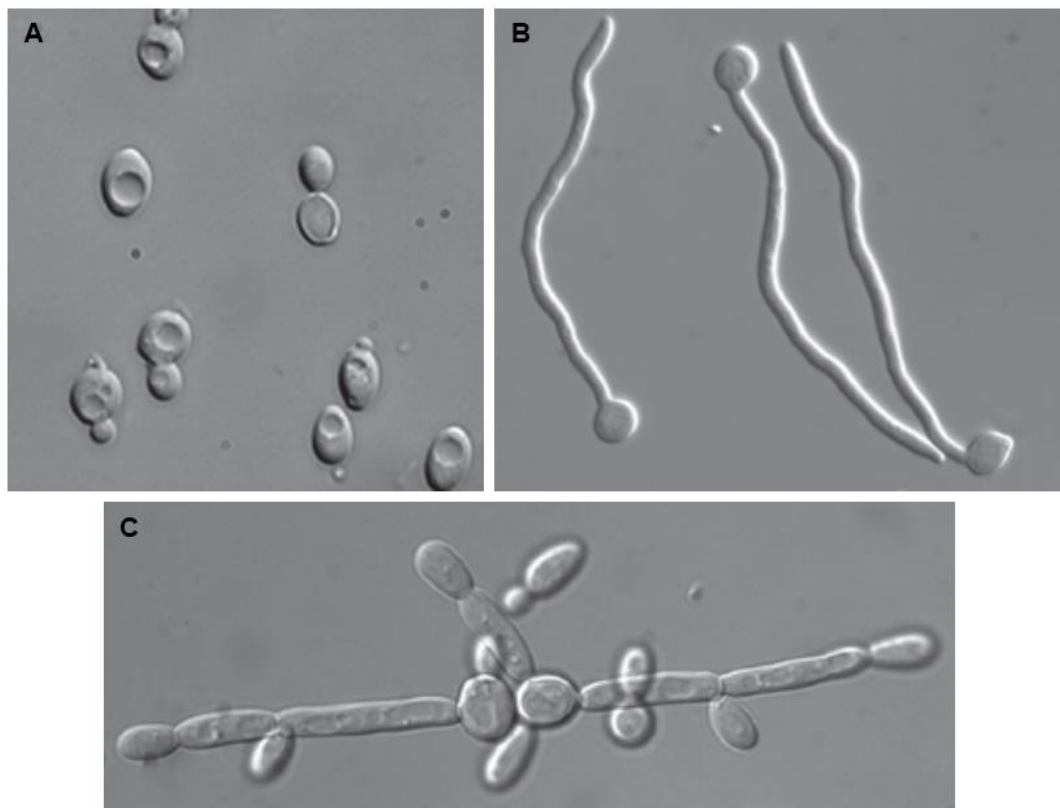
Međutim, uticaj navedenih faktora na proces adhezije nije u potpunosti ispitan i u literaturi se može naći delimično objašnjenje za samo neke vrste roda *Candida* (Silva i sar., 2011), a naročito malo se zna o vrstama roda *Pichia* kao adhezivnim agensima.

## 2.1. Rast i sposobnost formiranja biofilma kod kvasaca

Ćelije kvasca su jednoćelijske, sfernog ili ovalnog oblika, i formiraju glatke bele kolonije. Kvasci se razmnožavaju specifičnim procesom mitotičke deobe poznat kao pupljenje, u kojem se ćerka ćelija odvaja od majke ćelije. Morfogeneza je osnovna osobina kod patogene gljive *C. albicans* i veoma je važna za virulentnost. Kod *C. albicans* morfogeneza je definisana kao prelaz iz jednoćelijskog oblika kvasca u filamentozni oblik (poznat kao dimorfizam), tako da može da raste u različitim morfološkim oblicima poput kvasca, pseudohifa i hifa (Slika 1). *C. albicans* takođe može formirati hlamidospore to jest, sferne ćelije debelih zidova ili bespolne spore koje se pojavljuju pod nepovoljnim ekološkim uslovima. Kod pseudohifa ćerka pupoljak se izdužuje i nakon formiranja septuma ćerka ćelija ostaje vezana za majku ćeliju. Pseudohife su uglavnom elipsoidne (tj. njihova širina je veća u centru nego na krajevima) i imaju suženje na septalnom delu. Nasuprot tome, hife imaju paralelne strane, ujednačene su širine, poseduju prave septe, i nemaju suženja (Sudbery i sar., 2004; Thompson i sar., 2011). Izduženi pupoljci

kod pseudohifa mogu biti ekstremni tako da ovi filamenti mogu da liče na hife. Međutim, hife su uže nego ćelije pseudohifa (2  $\mu\text{m}$ ) i imaju paralelne zidove bez vidljivih suženja na mestu septi. Rana faza u formiranju pravih hifa je poznata kao "germinativne tube". Germinativne tube, koje su kratki hifalni elementi, su važne u adherenciji organizma za epitelijum domaćina. *C. albicans* u obliku kvasca takođe ima virulentne osobine i smatra se da promoviše diseminaciju unutar krvotoka i uspostavljanje infekcije na udaljenim mestima. Nekoliko istraživača je utvrdilo da je oblik hifa virulentniji od oblika kvasca (Kozinn i sar., 1960; Nadeem i sar., 2013).

Morfološke promene između oblika kvasca i raznih filamentoznih oblika se javljaju kao odgovor na promene u uslovima rasta. Parametri koji promovišu razvoj hifa *in vitro* uključuju temperaturu rasta iznad 35°C, pH viši od 6.5, nedostatak azota i/ili ugljenika, nefermentabilne izvore ugljenika, niske koncentracije kiseonika, i širok spektar hemikalija uključujući N-acetilglukozamin, prolin (i druge amino kiseline) i alkohole. Serum je jedan od najmoćnijih induktora razvoja hifa (Sudbery, 2011). Uticaj seruma je kompleksan ali se smatra da deluje, delom, obezbeđujući balans aminokiselina. Dva poznata induktora formiranja hifa, N-acetilglukozamin (GlcNAc) i prolin, mogu da doprinesu efektu seruma jer se generišu degradacijom serumskih (gliko-) proteina (Ernst, 2000). Dobro je poznato da pH oko neutralnog pogoduje razvoju hifa *C. albicans in vitro*, dok niži pH (pH < 6.5) zaustavlja formiranje hifa i stimuliše rast oblika kvasca. Rast ćelija u obliku kvasca se promoviše inokulumom iznad 10<sup>6</sup> ćelija/ml, temperaturom rasta ispod 35°C, pH manjim od 6.5, glukozom i amonijum soli (Nadeem i sar., 2013).



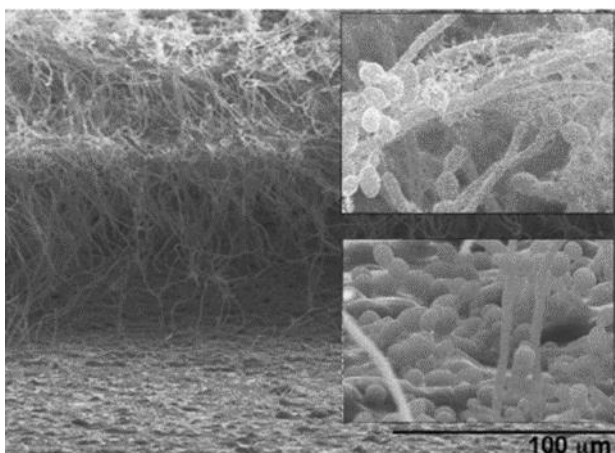
Slika 1. Morfološki oblici (A) kvasac, (B) hife i (C) pseudohife (Sudbery, 2011).

Patogeni kvasci imaju sposobnost da se adheriraju na biotičke kao i na abiotičke površine kao što su proteze i kateteri, i tako obezbeđuju unutrašnji rezervoar infektivnih ćelija visoko rezistentnih na lekove (Kojic i Darouiche, 2004). Za razliku od uglavnom bezopasne površinske infekcije, diseminovane gljivične infekcije imaju visoku stopu smrtnosti (> 40%) (Wisplinghoff i sar., 2004), svrstavajući gljivičnu adheziju kao centralnu ulogu u današnjoj medicini. Adhezija kvasaca je takođe od velikog ekonomskog značaja za prehrambena preduzeća, jer adherirane ćelije mogu formirati visoko rezistentne biofilmove u industrijskim postrojenjima. Sa pozitivne strane, adhezija ćelija industrijskih kvasaca piva i vina je često eksploatisana kao pogodan i ekonomičan način za odvajanje biomase iz raznih fermentisanih proizvoda (Verstrepen i sar., 2003). Na kraju procesa fermentacije, kada su svi raspoloživi šećeri pretvoreni u etanol i ugljen dioksid, ćelije kvasaca počinju da adheriraju jedna sa drugom formirajući makroskopske "flokule" sastavljene na hiljade ćelija. Adhezija među ćelijama kvasca se stoga često naziva "flokulacija". U zavisnosti od sojeva kvasca koji se koristi, flokule kvasca brzo sedimentiraju na dno ("lager" sojevi) ili plutaju po površini ("ale" sojevi), čime se olakšava njihovo uklanjanje iz medijuma (Verstrepen i Klis, 2006).

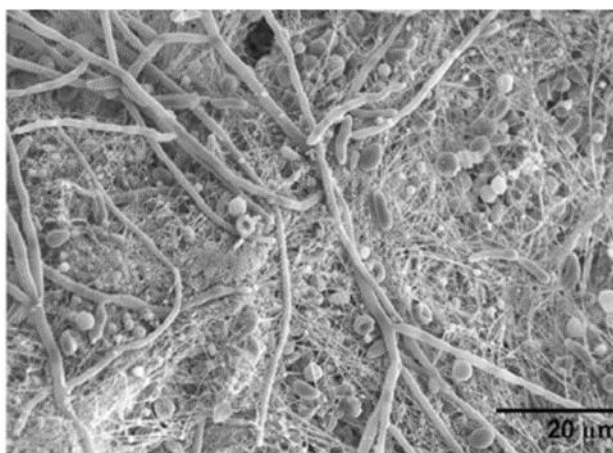
## 2.2. Formiranje biofilma

Biofilm je strukturna zajednica mikrobnih ćelija zatvorenih u matriks ekstracelularne polimerne supstance (EPS), raste na podlozi, i ispoljava fenotipske karakteristike koje se razlikuju od njihovih planktonskih ili slobodno plutajućih oblika (Ramage i sar., 2012) (Slika 2).

### *In vitro*



### *In vivo*



Slika 2. Struktura biofilma *Candida albicans* *in vitro* i *in vivo* (Finkel i Mitchell, 2011).

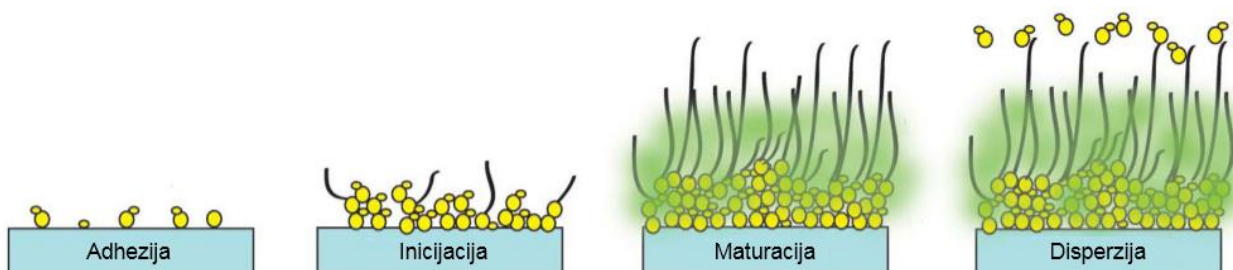
Formiranje biofilma donosi brojne prednosti različitim organizmima, na primer zaštitu od okoline, otpornost na fizički i hemijski stres, metaboličku saradnju i zajednicu zasnovanu na regulaciji ekspresije gena (Ramage i sar., 2009).

Biofilmovi predstavljaju višekomponentnu arhitekturu razvijenu tokom različitih faza. Tipična struktura biofilma *C. albicans* je intenzivno proučavana i obuhvata sledeće faze (Douglas, 2003; Jabra-Rizk i sar., 2004; Seneviratne i sar., 2008; Finkel i Mitchell, 2011) (Slika 3):

- (i) period adhezije – početna adherencija blastokonidija u izrazite mikrokolonije (0h – 11h)
- (ii) srednja faza – zatim dvoslojna struktura koja sadrži mešavinu kvasaca, germinativnih tuba i mladih hifa, ova srednja faza je karakteristična po proizvodnji ekstracelularnog matriksa (12h – 30h)
- (iii) faza sazrevanja – biofilm postaje gust sa ekstracelularnim polimernim materijalom, u kojem je ugrađena gusta mreža kvasaca, pseudohifa i hifa (14h – 24h)



- (iv) disperzna faza – odvajanje ćelija *Candida* koje su u stanju da ponovo promovišu adheziju



Slika 3. Različite faze razvoja biofilma *Candida albicans* (Finkel i Mitchell, 2011).

Ekstracelularni matriks (ECM) se smatra kao prepoznatljiva odlika mikrobnog biofilma (Douglas, 2003; Ramage i sar., 2009). Baillie i Douglas (2000), su tokom prvog ispitivanja pokazali da preparati matriksa iz biofilma sadrže ugljene hidrate, proteine, fosfor i heksozamin. Silva i sar. (2009) su uporedili sastav ekstracelularnog matriksa kliničkih izolata *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. glabrata*. Interesantno, *C. parapsilosis* je imao velike količine ugljenih hidrata i manje proteina. Nasuprot tome, polimerni materijal izolovan iz biofilma *C. tropicalis* je imao male količine ugljenih hidrata i proteina, dok je matriks biofilma *C. glabrata* imao velike količine i proteina i ugljenih hidrata (Silva et al., 2009). Još jedna karakteristika biofilmova *Candida* je prisustvo vodenih kanala koji se razvijaju kao rezultat odvajanja pojedinih mikrokolonija iz biofilma. Takve strukture dozvoljavaju odlaganje otpada i priliv hranljivih materija u biofilmove tako da čak i ćelije u dubljim slojevima imaju pristup hranljivim materijama i kiseoniku (Ramage i sar., 2001a).

Biofilmovi su prisutni svuda, javljaju se u vodenim i industrijskim sistemima kao i u velikom broju okruženja i na medicinskim sredstvima bitni za javno zdravlje (Donlan i Costerton, 2002). Globalno, mikrobnii biofilmovi su svakodnevni izazov sa kojim se suočava prehrambena industrija i društvo. Mnoge epidemije izazvane patogenima su pripisane biofilmovima, i procenjuje se da biofilmovi čine i do 80 % mikrobnih infekcija (Sadekuzzaman i sar., 2015).

Medicinski uređaji kao što su kateteri, vokalne proteze, površine zubnih proteza, veštački srčani zalisci, pejsmekeri, kao i presađeni organi često su kolonizovani vrstama roda *Candida* i postaju jedinstveno utočište za njihovu adheziju (Kojic i Darouiche, 2004; Cauda, 2009;

Ramage i sar., 2009). Važno je napomenuti da se više od polovine infekcija krvi javlja kod pacijenata sa kateterima (Cauda, 2009). *C. albicans* je najčešće izolovana i klinički najznačajnija vrsta. Ostale ne-*Candida albicans* *Candida* vrste takođe formiraju biofilmove na kateterima i drugim medicinskim uređajima izazivajući infekcije, tu spadaju *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* i *C. tropicalis* (Ramage i sar., 2009).

Pored toga, rasprostranjenost biofilmova je značajan problem hrane i prehrambene industrije. U proizvodnoj okolini, različiti mikroorganizmi kolonizuju hranu i kontaktne površine, preživljavaju, rastu i ponekad formiraju biofilm. Kada se razvijaju, biofilmovi su značajan potencijalni izvor kontaminacije prehrambenih proizvoda, mogu dovesti do kvarenja hrane i/ili značajan su rizik za zdravlje potrošača nakon konzumiranja (Shi i Zhu, 2009; Simões i sar., 2010; Srey i sar., 2013). Kod vode i prečišćavanja otpadnih voda, biofilmovi (biofouling) su takođe problematični: izazivaju koroziju metala, povećavaju rizik konatminacije proizvoda, smanjuju kvalitet vode i efikasnost razmene toplote (Sadekuzzaman i sar., 2015).

### 2.3. Faktori koji utiču na formiranje biofilma kvasaca *Candida* i *Pichia*

Pronađeno je da različiti spoljašnji i unutrašnji faktori moduliraju adheziju i formiranje biofilma *Candida*. Razumevanje njihovog efekata i mehanizama će pomoći u razvoju nove strategije za prevenciju i kontrolu kandidijaza.

#### 2.3.1. *Candida* vrste/sojevi

Studije Hawser i Douglas (1994) su pokazale da *C. krusei* ima veći stepen formiranja biofilma u odnosu na *C. albicans*. Ovaj pronalazak se može objasniti na osnovu razlike u njihovoj hidrofobnosti, pošto je *C. krusei* generalno mnogo hidrofobnija od *C. albicans* (efekat ćelijske hidrofobnosti na adheziju i formiranje biofilma će biti razmotren u odeljku 2.3.2.). Posle *C. krusei* najbolju sposobnost formiranja biofilma među različitim vrstama roda *Candida* ima *C. albicans* (Hawser i Douglas, 1994; El-Azizi i Khardori, 1999; Kuhn i sar., 2002a). Međutim, ove podatke treba uzeti sa rezervom, jer su mnoge od prethodnih studija koristile samo nekoliko izolata za svaku vrstu. Stoga, u cilju dobijanja pouzdanijih i validnih rezultata, Shin i sar. (2002) su povećali veličinu uzorka svake vrste iz roda *Candida* do 146. Oni su zapazili da je formiranje biofilma najčešće za izolate *C. tropicalis* (80%), zatim *C. parapsilosis* (73%), *C. glabrata* (28%) i *C. albicans* (8%) (Shin i sar., 2002). Ovi rezultati su u kontrastu sa studijama opisanim gore, i protivrečeni rezultati opravdavaju dalja istraživanja sa odgovarajućom veličinom uzoraka.

### 2.3.2. Hidrofobnost površine ćelije (CSH)

Hidrofobnost površine ćelije (eng. Cell Surface Hydrophobicity, CSH) igra važnu ulogu u inicijalnoj fazi adhezije vrsta roda *Candida* na epitelne ćelije i medicinske biomaterejale. Ovo obuhvata fizičko-hemijske sile kao što su hidrofobnost i elektrostatičke interakcije koje promoviraju adheziju ćelija na sluzokožu tkiva ili supstrate i formiranje biofilmova na inertne površine medicinskih implanata (El-Azizi i Khardori, 1999; Jabra-Rizk i sar., 2001; Panagoda i sar., 2001). Početno vezivanje *C. albicans* na površine je prvenstveno posredovano manoprotein adhezivima spoljašnjeg fibrilarnog sloja površine ćelija kvasca. Hidrofobni proteini ugrađeni u matriks ćelijskog zida *C. albicans* obezbeđuju hidrofobne interakcije potrebne da se ovo početno vezivanje između gljivica i površine pretvori u jake veze. Hidrofobne interakcije, dakle, mogu značajno povećati broj uspešnih kontakata između dve površine (Jabra-Rizk i sar., 2001). Nekoliko prethodnih istraživanja su pokazala da postoji pozitivna korelacija između adhezije vrsta roda *Candida* na abiotičke površine i relativne hidrofobnosti površine ćelije (Luo i Samaranyake, 2002; Li i sar., 2003).

Vrsta *C. albicans* je jedina patogena gljiva kod koje je do sada primećeno da reguliše status hidrofobnosti površine ćelije, koji se menja sa fazom rasta i uslovima. CSH status je povezan sa karakteristikom strukture ćelijskog zida. Površinski sloj ćelijskog zida *C. albicans* sadrži fibrilarne strukture sastavljene od manoproteina. Sposobnost *C. albicans* da reguliše hidrofobnost površine ćelije (CSH) očigledno odgovara sposobnosti da promeni konformaciju manoproteinskih fibrila (Masuoka i Hazen, 2004; Singleton i sar., 2005). Fibrili na površini hidrofobnih ćelija su kratki (skraćeni ili preklapljeni), agregirani, i varijabilni. S druge strane, fibrili hidrofilnih ćelija su duži, ravnomernije raspoređeni i zrakasti (Hazen i Hazen, 1992). Između hidrofobnih i hidrofilnih ćelija nema razlike u ukupnom sastavu manoproteina (proteina, heksoze, fosfata, ili elektroforetskog profila). Međutim, kiselo-labilan manan kod hidrofobnih ćelija se sastoji od dužih oligosaharida nego kod hidrofilnih ćelija (Masuoka i Hazen, 1999). Ovi procesi obuhvataju nekoliko proteina koji su pokazali hidrofobna svojstva. Jedan od njih je Csh1, 38 kDa protein, uključen u hidrofobnost površine ćelije (Singleton i sar., 2001). Singleton i Hazen (2004) su pokazali da je ekspresija *CSH1* značajno veća u ranoj stacionarnoj fazi kod kultura koje su rasle na 37°C za razliku od 23°C, i detekcija proteina na površini je u korelaciji sa visokim nivom ekspresije intracelularnog Csh1p. S druge strane, podaci Borecká-Melkusová i Bujdáková (2008) su pokazali da su ćelije hidrofobnije na 28°C nego na 37°C. Na hidrofobnost površine ćelije (CSH) *C. albicans* mogu uticati neki antifungalni agensi. Na primer, dodavanje amfotericina B ili nistatina dovodi do smanjenja CSH kod *C. albicans* (Egusa i sar., 2000).

### 2.3.3. Faktori okoline

Mnogi faktori životne sredine kao što su temperatura, sastav hranljivih materija, svojstva supstrata utiču na formiranje biofilma. Prema tome, uticaj eksperimentalnih parametara na formiranje biofilma vrsta roda *Candida* je ispitivan, neki od najznačajnijih su opisani u nastavku.

#### 2.3.3.1. Temperatura

Vrste roda *Candida* mogu da rastu na širokom spektru temperatura, pošto adheziji prethodi rast nije iznenađujuće da se adhezija takođe javlja u širokom temperaturnom opsegu. Temperatura inkubacije utiče na hidrofobnost i germinaciju ćelija kvasca, koje imaju važnu ulogu u adheziji. Pokazano je da je adherencija *C. albicans* na polistiren površinu bila veća na temperaturi 37°C nego na 20°C i 25°C, međutim adhezija je bila najveća na 40°C (El-Azizi i sar., 1999).

#### 2.3.3.2. Medijum

Obično korišćeni medijumi za procenu formiranja biofilma *Candida* su, YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose), YNB (eng. Yeast Nitrogen Base) i RPMI 1640 (eng. Roswell Park Memorial Institute). Svaki medijum sadrži različite hranjive materije, suplemente i odražava pH koji utiču ne samo na rast ćelija već i na arhitekturu i disperziju ćelija iz biofilma (Uppuluri i sar., 2010; Kucharíková i sar., 2011; Tomičić i Raspor, 2017). Korišćenjem YNB medijuma ćelije unutar biofilma su uglavnom rasle kao blastospore. Međutim, kada je biofilm uzgajan na istom supstratu a različitom medijumu (RPMI-1640 medijum, poznat da indukuje formiranje hifa), biofilmovi su se uglavnom sastojali od hifa *C. albicans*. Ove studije sugerišu da su obe forme *C. albicans*, kvasac i hife, važne za formiranje biofilma, i da struktura biofilma *C. albicans* zavisi od prirode i okruženja kontaktne površine (Mukherjee i sar., 2005). Takođe je poznato da promene sastava hranljivih materija utiču na rast biofilma *Candida*. Ispitan je uticaj različitih ugljenih hidrata na formiranje biofilma *C. albicans* i pokazano je da je formiranje biofilma nakon 48 h veće u medijumu koji sadrži 500 mM galaktoze ili 50 mM glukoze nego u nisko glukoznj sredini (Hawser i Douglas, 1994).

### 2.3.3.3. Prisustvo kondicioniranog filma

*In vivo*, kateteri i ostali implantati brzo adsorbuju proteine domaćina koji formiraju kondicionirani film na površini implanta. Preinkubacija PVC kateter diskova sa fibrinogenom ili kolagenom poboljšava formiranje biofilma *C. albicans* (Douglas, 2003; Mukherjee i sar., 2005). Isto tako kondicionirani filmovi seruma ili pljuvačke povećavaju formiranje biofilma na akrilne proteze (Chandra i sar., 2001b; Nikawa i sar., 1996).

### 2.3.3.4. Supstrat

Različiti supstrati izazivaju različite nivoe adhezije i formiranja biofilma *Candida*. U sistemu modela kateterskih diskova, formiranje biofilma *C. albicans* je veće na lateks ili silikon elastomeru nego na polivinil-hloridu, ali je značajno smanjeno na poliuretanu ili 100% silikonu (Hawser i Douglas, 1994).

Poznato je da fizičko-hemijske osobine supstrata kao što su hrapavost i hidrofobnost utiču na mikrobnu adheziju i eventualno naknadno formiranje biofilma. Ortega i sar. (2008) su zapazili da se stepen mikrobne kolonizacije povećava sa porastom hrapavosti površine. To je zato što je sila smicanja smanjena, i površina za adherenciju mikroorganizama je znatno veća na hrapavijim površinama. Uticaj hrapavosti na mikrobnu adheziju takođe može biti povezan sa teškoćama u čišćenju površine (Korber i sar., 1997), što dovodi do brzog ponovnog rasta biofilma. Većina istraživača je otkrila da se mikroorganizmi vežu mnogo brže na hidrofobne, nepolarne površine kao što su teflon i druge plastike nego na hidrofilne materijale kao što su staklo i metali (Cuéllar-Cruz i sar., 2012). Iako su rezultati ovih studija vremenom kontradiktorni jer nema standardizovanih metoda za određivanje površinske hidrofobnosti, neka vrsta hidrofobne interakcije se odvija između površine ćelije i supstrata što ćeliji omogućava da prevaziđe odbojne sile aktivne na određenoj udaljenosti od površine supstrata i ireverzibilno prikači.

## 2.4. Kontaktne površine

Formiranje biofilma vrsta roda *Candida* je izučavano na različitim materijalima kao što su polistiren, poliuretan i silikon. Polistiren se smatra kao jednostavan model za formiranje biofilma. Tipičan polistirenski supstrat predstavljaju polistirenske mikrotar ploče sa 96 bunarčića (Ramage i sar., 2001a). Poliuretan i silikon su istaknuti materijali koji se koriste za proizvodnju medicinskih sredstava. Poliuretan se uglavnom koristi za proizvodnju centralnih

venskih katetera, dok se silikonski kateteri uglavnom primenjuju u urologiji, kao i za vaskularne i pedijatrijske katetere koji se koriste za enteralnu ishranu. Ne samo površina već i njene osobine mogu uticati na razvoj biofilma. Površina poliuretana je gruba i promovise bolje prijanjanje ćelija kvasca tokom perioda adhezije. S druge strane, površina polistirena je izuzetno hidrofobna, što takođe može značajno doprineti formiranju biofilma (Cuéllar-Cruz i sar., 2012).

Danas se u prehrambenoj industriji koriste razne vrste površina kao što su plastika, nerđajući čelik, staklo i drvo. Ove površine su podložne kontaminaciji od strane mikroorganizama, od kojih neki mogu da formiraju biofilm (Srey i sar., 2013). Drvo ima dugu tradiciju kao prirodan materijal koji ljudi koriste vekovima. Od 1960, održavane su konstantne debate o higijenskim svojstvima drveta i drvenih proizvoda, i kao rezultat, upotreba drveta se vidi kritičnim u mnogim sektorima. Smatra se da su proizvodi napravljeni od sintetičkih materijala kao što su nerđajući čelik i plastika čistiji od onih napravljenih od prirodnog materijala kao što je drvo. Dobro je poznato da je drvo porozan materijal koji može da absorbuje i zadrži mikroorganizme, i stoga se smatra da ga je nemoguće održavati potpuno čistim i dekontaminiranim. Međutim, nekoliko naučnih studija je procenilo higijenski potencijal drveta u poređenju sa drugim materijalima i pokazale da neke vrste drveta imaju antimikrobna svojstva (Milling i sar., 2005; Schönwälder i sar., 2002; Tomičić i sar., 2017). Pored toga, nerđajući čelik tip AISI 304 se koristi u prehrambenoj industriji kao idealan materijal za proizvodnju opreme zbog fizičko-hemijske stabilnosti i visoke otpornosti na koroziju (Shi i Zhu, 2009). Uticaj svojstva površine nerđajućeg čelika na adheziju i zadržavanje bakterija je najčešće istraživano, međutim malo pažnje je posvećeno kvascima, iako su česti kontaminanti u industriji hrane i pića. Pri proučavanju mikrobne adhezije na površine, sveobuhvatna karakterizacija parametara hrapavosti površine i vizualizacija topografije površine je veoma bitna. Hrapavost površine je dvodimenzionalni parametar površine materijala i obično je opisana kao aritmetička srednja hrapavost ( $R_a$ ) i srednja vrednost kvadratnog odstupanja ( $R_q$ ), dok je topografija trodimenzionalni parametar i opisuje oblik površine.  $R_a$  i  $R_q$  su najčešće prikazani parametri površinske hrapavosti kada se istražuje adhezija mikroorganizama, međutim, to su mere varijacije visine bez informacija o topografiji (karakteristike površine) (Hočevar i sar., 2014). Tokom poslednjih godina, skenirajući elektronski mikroskop (eng. Scanning Electron Microscopy (SEM)) ili mikroskop atomskih sila (eng. Atomic Force Microscopy (AFM)) se koriste za trodimenzionalnu vizualizaciju površinske topografije uključujući AFM određivanje trodimenzionalnih topografskih parametara u nanometarskom opsegu.  $R_a$  vrednost od 0.8  $\mu\text{m}$  ili manje se preporučuje za mlekare i, generalno, za površine koje dolaze u kontakt sa hranom (Hilbert i sar., 2003).

## 2.5. Metode određivanja biofilma

Najčešće korišćene metode za kvantifikaciju biofilma su zasnovane na: (i) izlaganju tetrazolijumovim solima ili bojenju kristal violetom, (ii) određivanju suve biomase, (iii) određivanju broja jedinica koje formiraju koloniju (eng. Colony Forming Units, CFU) i (iv) merenju adenozin trifosfata (eng. adenosine triphosphate, ATP) – bioluminiscencije (Mukherjee i sar., 2005).

*Kolorimetrijski testovi.* Kvantifikacija biofilma *Candida* na osnovu metaboličke aktivnosti uključuje konverziju tetrazolijumske boje 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid (eng. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) ili 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolium hidroksid (eng. 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) (XTT) u odgovarajući formazan proizveden gljivičnim mitohondrijskim dehidrogenazama. MTT je žuta tetrazolijumska so rastvorljiva u vodi, koja se konvertuje u nerastvorljivi ljubičasti formazan cepanjem tetrazolijumskog prstena od strane dehidrogenaze u mitohondrijama. Čelijske membrane ne propuštaju formazan pa se on akumulira u zdravim ćelijama. Čelije se liziraju, a kristali formazana se rastvaraju u rastvaraču. MTT – formazan je proizvod koji se oslobađa tretiranjem ćelija sa dimetil-sulfoksidom (eng. dimethylsulphoxide, DMSO), a zatim procenjuje spektrofotometrijski (Hawser i Douglas, 1994). Nasuprot, XTT – formazan je proizvod rastvorljiv u vodi, izlazi u ekstracelularni medijum bez tretmana sa DMSO, i može se lako kvantifikovati spektrofotometrijski na 592 nm. Zbog lake upotrebe i manjka tretmana sa DMSO, XTT test je postao zajednički metod za praćenje i kvantifikaciju formiranja biofilma *Candida* na kateterskim površinama (Ramage i sar., 2001b; Chandra i sar., 2001a). Ramage i sar. (2001b) su prilagodili XTT test za *in vitro* ispitivanje antifungalne osetljivosti biofilmova *Candida*, koisteći mikrotar ploče sa 96 bunarčića. Međutim, XTT metod ima određena ograničenja koja treba uzeti u obzir prilikom korišćenja testa za poređenje biofilmova među različitim vrstama. U tom pogledu, Kuhn i sar. (2003) su poredili varijacije u metabolizmu dve tetrazolijumske boje među sojevima vrsta *C. albicans* i *C. parapsilosis*. Korišćene boje su XTT i WST-8 [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonil)-2H-tetrazolium] [eng. 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphonyl)-2H-tetrazolium]. Ovi istraživači su pokazali da: (i) poređenje među sojevima u odsustvu detaljne standardizacije treba izbegavati, jer različiti sojevi metabolišu supstrat sa različitom sposobnošću, (ii) treba napraviti odgovarajuće standardne krive za svaku količinu tetrazoliuma radi validne kvantifikacije, i (iii) neki sojevi mogu zadržati značajnu količinu intracelularnog formazana koji se može rastvoriti tek nakon ćelijskog tretmana sa dimetilsulfoksidom (DMSO). Količina ovog zadržanog proizvoda se može razlikovati između različitih planktonskih i biofilmskih oblika vrsta roda *Candida*.

Još jedan metod koji se koristi za kvantifikaciju biofilmova *Candida* uključuje bojenje sa kristal violetom (eng. Crystal Violet, CV). U ovoj metodi, ćelije *Candida* se boje rastvorom CV (0.02%, w/v) u trajanju od 1 minut, ispiraju kako bi se uklonio višak boje i inkubiraju sa rastvorom za dekolorizaciju (etanol:acetone:80%:20%). Absorbanca rastvora dekolorizacije se meri spektrofotometrijski na 590 nm (Mukherjee i sar., 2005). Li i sar. (2003) su ispitali kvantitativne varijacije formiranja biofilma i njegov odnos prema multilokularnim genotipovima kod 115 sojeva vrste *C. albicans* koristeći XTT i CV testove. Dobijeni rezultati su bili u značajnoj korelaciji. Međutim, u odvojenoj studiji, Jin i sar. (2003) su odredili formiranje biofilma 46 kliničkih izolata *C. albicans* koristeći XTT i kristal violet metode i objavili da je XTT metoda pokazala bolju reproduktivnost ( $P < 0.05$ ) u odnosu na drugi metod.

Pored MTT, XTT i CV, istražene su druge analize za testiranje osetljivosti i karakterizaciju biofilma, kao što su Alamar blue/resazurin, safranin, Alician blue i DMMB (1,9-dimethyl methylene blue) (Costa-Orlandi i sar., 2017).

*Određivanje suve biomase.* Nekoliko istraživača je koristilo suhu biomasu kao promenljivu za kvantifikaciju formiranja biofilma *C. albicans* na različitim supstratima (Kuhn i sar., 2002a; Kuhn i sar., 2004; Chandra i sar., 2001b). U ovom testu, biofilm se skida sa diska supstrata (kateter, proteze, itd.) i sakuplja u različite epruvete. Suspenzija ćelija sa svakog diska supstrata se zatim filtrira kroz prethodno izvagan filter prečnika 0.2  $\mu\text{m}$ . Filter (koji sadrži ćelije biofilma) se suši na 37°C i ponovo izvaga. Razlika u težini osušenog filtra pre i posle filtracije predstavlja suhu masu formiranog biofilma (Mukherjee i sar., 2005).

*Određivanje broja jedinica koje formiraju koloniju (colony forming units, CFU).* Brojanje kolonija CFU iz biofilma *Candida* je jedna od najranije korišćenih metoda za kvantifikaciju formiranog biofilma. U ovoj metodi, ćelije biofilma se sakupljaju u medijum i dobijena suspenzija se nežno sonicira kratak period (1 minut) kako bi razorili aggregate. Suspenzija se zatim inokuliše na agar ploče, inkubira 24h i broje se CFU (Jin i sar, 2004; Mukherjee i sar., 2005).

*Merenje ATP bioluminiscencije.* Nivo ATP-a unutar biofilma može se koristiti za praćenje formiranja biofilma *C. albicans*. U tipičnom testu za meranje nivoa ATP bioluminiscencije za formiran biofilm *C. albicans*, biofilm se skida sa supstrata u sterilne epruvete sa PBS (eng. Phosphate buffered saline) (~ 200  $\mu\text{l}$ ), i vorteksuje. Količina ATP bioluminiscencije u dobijenoj suspenziji se zatim određuje koristeći komercijalno dostupni ATP analizator. Pokazana je korelacija ATP i XTT analiza sa CFU testom (ATP vs CFU,  $r = 0.994$ ,  $P = 0.006$ ; XTT vs CFU,  $r = 0.985$ ,  $P = 0.015$ ) (Jin i sar, 2004; Mukherjee i sar., 2005).



Skenirajući elektronski mikroskop (SEM), transmisijski elektronski mikroskop (TEM) i konfokalni mikroskop se takođe koriste za proučavanje i otkrivanje ćelija biofilma i ekstracelularnog matriksa (ECM) (Costa-Orlandi i sar., 2017; Mukherjee i sar., 2005).

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) je tehnika u kojoj se uzorak priprema fiksacijom, dehidratacijom i sušenjem, a slika se obrađuje nakon što se uzorci prevlače sa provodnikom kao što je zlato ili ugljenik pod visokim vakuumom. Međutim, sušenje i dehidratacija mogu promeniti morfologiju biofilma zbog narušavanja ECM. Pored toga, artefakti mogu promeniti sliku. Alternativno, ekološki SEM se pojavio kao metoda izbora jer se biofilm može posmatrati bez fiksacije i dehidratacije, a vakum je umeren, čuvajući morfologiju i strukturu površine (Bridier i sar., 2013; Priester i sar., 2007).

Transmisijski elektronski mikroskop (TEM) se takođe koristi za vizualizaciju arhitekture biofilma. Priprema za TEM je slična onoj u SEM-u. Međutim, u ovom postupku, biofilm je ugrađen u smoli što omogućava ECM da ostane stabilan, za razliku od SEM-a. Jedini nedostatak TEM-a je u tome što nije moguće vizualizirati topografiju biofilma (Priester i sar., 2007).

Konfokalni lasersko-skenirajući mikroskop (CLSM) je još jedan uređaj koji se koristi za analizu trodimenzionalne (3D) arhitekture i debljine biofilma. Pored toga, moguće je proveriti prisutnost makromolekularnih jedinjenja, kao što su polisaharidi, proteini, nukleinske kiseline i lipidi (Chandra i sar., 2008; Lawrence i sar., 2003). Druga prednost je u tome što se CLSM može koristiti sa ili bez fluorescencije ili sa fluorescentnom in situ hibridizacijom (FISH) za procenu izmene specifičnih jedinjenja gljivične populacije (Costa-Orlandi i sar., 2017).

## 2.6. Suzbijanje formiranja biofilma

Antigljivična terapija protiv mukoznih ili invazivnih infekcija izazvanih ljudskim patogenim gljivicama uključuje nekoliko klasa antifungalnih lekova dostupnih na tržištu kao što su polieni, analozi pirimidina, azoli i najnovija klasa ehinokandina. Poslednjih decenija, povećan je broj kliničkih izolata rezistentnih na širok spektar antifungalnih sredstava uglavnom izolovanih kod imunokompromitovanih pacijenata i pacijenata sa neutropenijom nakon dužeg lečenja. Ovaj fenomen je postao ozbiljan medicinski problem sa širokim uticajem na društvo. Poznato je da su ćelije *Candida* unutar biofilma više od 500 puta otpornije na antifungalne agense nego planktonske ćelije (Bink i sar., 2011; Kojic i Darouiche, 2004). Uticaj klinički važnih antimikotika, uključujući amfotericin B, flukonazol, flucitozin, itrakonazol i ketokonazol su ispitani na različite vrste roda *Candida*. Svi ovi agensi su pokazali znatno

manju aktivnost na biofilm *C. albicans* nego na planktonske ćelije. Koncentracije antifungalnih sredstava potrebne za smanjenje metaboličke aktivnosti za 50 % su bile pet do osam puta veće za biofilme nego za planktonske ćelije, a 30-2000 puta veće od odgovarajuće minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Biofilmovi ne-*C. albicans* *Candida* vrsta kao što su *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* i *C. glabrata* su takođe otporni na lekove (Douglas, 2003; Hawser i Douglas, 1995).

Budući da je antifungalna terapija često neefikasna, infekcije povezane sa biofilmom su problematične i preporučuje se uklanjanje zaraženog uređaja. Međutim, u slučaju zaraženih srčanih zalistaka, šanta centralnog nervnog sistema i zglobne proteze, uklanjanje može rezultirati ozbiljnim implikacijama za pacijenta (Jabra-Rizk i sar., 2004; Kuhn i sar., 2002a; Ramage i sar., 2012). Dakle, postoji očigledan zahtev za antifungane lekove koji su aktivni protiv ove vrste infekcije. U poslednje vreme, dve klase antifungalnih sredstava, naime, lipidne formulacije amfotericina B (lipozomski AMB i AMB lipidni kompleks) i ehinokandini su pokazali aktivnost protiv biofilma *Candida* (Kuhn i sar., 2002b). Napori su takođe načinjeni da se ispita efekat antigljivičnog predtretmana supstrata na formiranje biofilma *Candida*. Utvrđeno je da oblaganje supstrata sa kaspofunginom rezultira nižem stepenu formiranja biofilma *C. albicans* (Bachmann i sar., 2002). Pored predtretmana kvasaca ili supstrata sa antifungalnim sredstvima, efekat antifungalnih sredstava na razvoj biofilma *Candida* je takođe ispitivan. SEM studija je pokazala da su ćelije kvasca unutar biofilma tretirane sa kaspofunginom razvile manje oblike hifa od onih netretiranih (Bachmann i sar., 2002).

Pored toga, u pogledu ozbiljnih neželjenih uticaja biofilma na mnoge ljudske aktivnosti, različiti pristupi su korišćeni dugi niz godina radi sprečavanja i uklanjanja biofilma. Tradicionalne fizičke i hemijske metode, kao što su ispiranje, hlorisanje, i dezinfekcija ultravioletnim zracima se koriste za kontrolu i uklanjanje biofilma. Međutim, zbog nedostatka efikasnosti i bezbednosti ovih strategija zabrinutost još uvek postoji, ona se zasniva na traženju, razvoju i primeni novih pristupa za disperziju i/ili inhibiciju formiranja biofilma. Navedeni napreci u istraživanju biofilma pružili su nove uvide u mehanizam formiranja biofilma i doveli do uzbudljivog napretka u razvoju novih strategija za prevenciju i inhibiciju biofilma (Sadekuzzaman i sar., 2015).

### 2.6.1. Mehanizmi otpornosti biofilma

Mehanizmi otpornosti biofilma na antimikrobna sredstva nisu u potpunosti jasni. Smatra se da su najmanje četiri faktora odgovorna za povećanu otpornost kod biofilma *Candida*. To su: (i) ograničena difuzija leka kroz matriks ekstracelularnog polimernog materijala, (ii) fenotipske razlike koje su posledica usporenog rasta ili ograničenja hranljivih materija, (iii) ekspresija gena rezistencije, posebno one koje kodiraju efluks pumpe i (iv) prisustvo "persister" ćelija (Douglas, 2003; Ramage i sar., 2005). Gustina ćelija, steroli membrane, glukani ćelijskog zida takođe mogu igrati važnu ulogu (Ramage i sar., 2012; Silva i sar., 2017; Taff i sar., 2013) (Slika 4). Do danas, većina dokaza sugerise da je otpornost biofilmova *Candida* možda posledica kombinacije dva ili više ovih mehanizma.

#### 2.6.1.1. Doprinos ekstracelularnog matriksa biofilma

Ključna karakteristika zrelih biofilmova je proizvodnja ekstracelularnog matriksa, polimernog materijala koji promoviše adherenciju i štiti ćelije biofilma od spoljašnjih faktora. Smatra se da ovaj materijal takođe pomaže u zadržavanju hranljivih materija, vode i enzima (Flemming i Wingender, 2010; Taff i sar., 2013). Istraživanja su dovela u pitanje da li matriks biofilma može smanjiti prodiranje lekova, bilo putem sterične prepreke ili aktivnim vezivanjem ili sekvestriranjem antifungalnih lekova. Douglas i sar. su izveli prve studije u ovoj oblasti. Promenom uslova rasta uspeli su proizvesti biofilmove sa različitim količinama ekstracelularnog matriksa. Biofilmovi koji su uzgajani u šejker inkubatoru proizveli su vidljivo više matriksa u poređenju sa onim uzgajanim pod statičnim uslovima. Uprkos razlici u količini matriksa, biofilmovi su bili jednako otporni na amfotericin B, flukonazol i flucitozin (Baillie i Douglas, 2000). Tek nakon ispitivanja biofilmova koji su uzgajani pod stalnim protokom, stanje koje promoviše najveću količinu matriksa i najviše podseća na *in vivo* uslove, mogli su da povežu otpornost biofilma *Candida* na proizvodnju ekstracelularnog matriksa. Korelacija između stepena proizvodnje ekstracelularnog matriksa i antifungalne rezistencije je pronađena za biofilmove *C. albicans* i *C. tropicalis* (Al-Fattani i Douglas, 2006).

#### 2.6.1.2. Usporen rast i ograničenje hranljivih materija

Dobro strukturirani slojevi biofilma otvaraju još jednu hipotezu o antifungalnoj rezistenciji vrsta roda *Candida*, odnosno da ćelije smeštene u dubljim slojevima biofilma rastu sporije zbog nedostatka hranljivih materija i kasnije su otpornije na antifungalne lekove.

Kontrolisanjem hranljivih materija u perforiranom biofilm fermentoru, Baillie i Douglas (1998a, 1998b) su uspeli da uporede antifungalnu osetljivost biofilmova *Candida* koji su rasli pri različitim brzinama. Pri širokom opsegu brzina rasta, ćelije biofilma su pokazale slične nivoe rezistencije na amfotericin B, što ukazuje na to da brzina rasta ne igra značajnu ulogu u rezistenciji biofilma na antifungalna sredstva. Slično tome, pokazano je da su biofilmovi *C. albicans* uzgajani pod ograničenim uslovima glukoze i gvožđa bili visoko rezistentni na amfotericin B. Ipak, faktori uključujući pH, temperaturu, raspoloživost kiseonika su opisani kao mogući induktori promene arhitekture biofilma i time antifungalne osetljivosti (Silva i sar., 2017).

### 2.6.1.3. Uloga efluks pumpi

Mnogi slučajevi otpornosti prema lekovima su povezani sa povećanjem aktivnosti efluks pumpi u ćelijskoj membrani *Candida* i posledično smanjenjem akumulacije lekova unutar ćelije (Morschhäuser, 2002). Efluks pumpe *C. albicans* imaju važnu ulogu u otpornosti na azole, ali ne i u otpornosti na amfotericin B i ehinokandine (Niimi i sar., 2006; Shapiro i sar., 2011; Silver i sar., 2008). U odsustvu antifungalnog izlaganja, ATP vezujući kasetni transporter (CDR1 i CDR2) i glavni transportni posrednik (MDR1) su tipično izraženi u niskim nivoima (Schubert i sar., 2011). Pronalasci da klinički izolati otporni na azole često pokazuju konstitutivnu prekomernu ekspresiju ovih pumpi podstakli su istraživače da postuliraju da fenotip biofilma rezistentan na lekove može biti povezan sa povećanom aktivnošću efluks pumpe (Taff i sar., 2013).

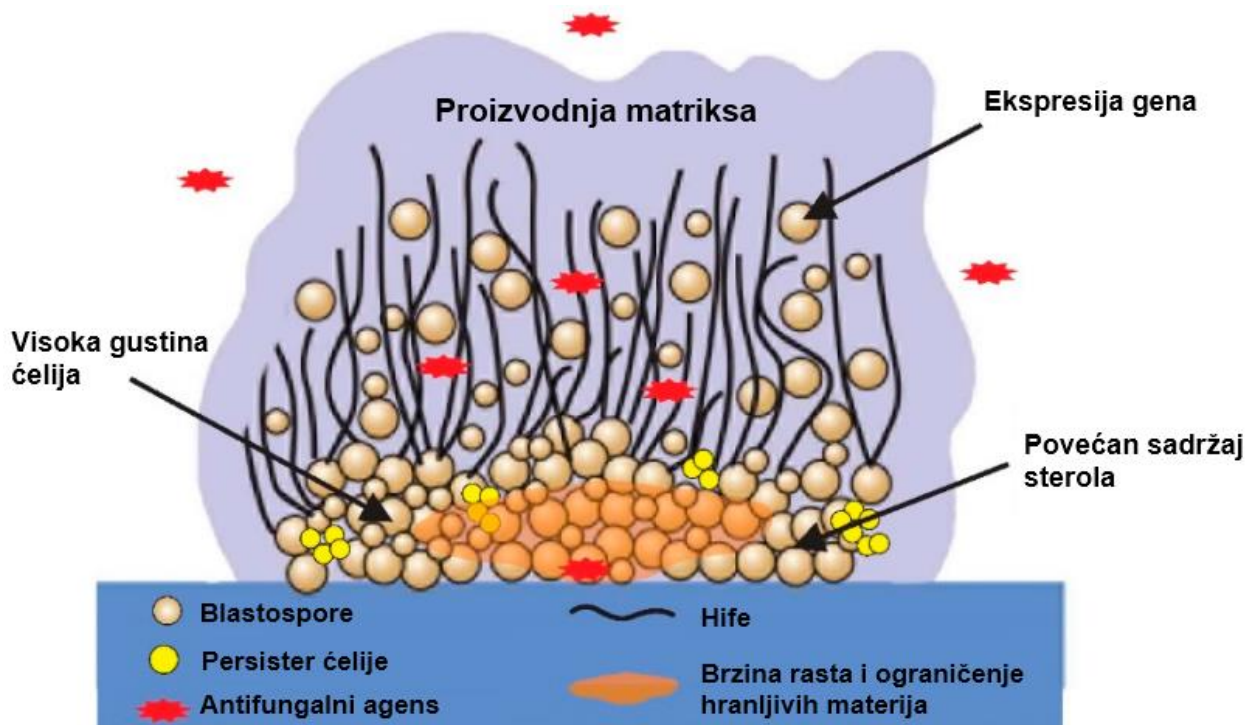
Ramage i sar. (2002) su pokazali da je transkripcija oba *MDR1* i *CDR1* gena obilnija u 24h biofilmu *C. albicans* nego kod planktonske kulture iste starosti. Da bi se ispitala uloga efluks pumpi tokom rasta biofilma, autori su ispitali uticaj uklanjanja *MDR1*, *CDR1* i/ili *CDR2* na otpornost na lekove. Tokom planktonskog rasta, ovi mutanti su pokazali preosetljivost na flukonazol. Međutim, ovaj fenotip nije primećen kada su isti mutanti uzgajani kao biofilm tokom 24-48h, što ukazuje na to da efluks pumpe ne doprinose značajno otpornosti na lekove tokom faze maturacije biofilma.

Mukherjee i sar. (2003) su ispitali ulogu efluks pumpi u antifungalnoj rezistenciji tokom procesa formiranja biofilma. Rani (0–11 h), srednji (12–30 h) i zreo (31–72 h) biofilm *C. albicans* je poređen sa planktonskim rastom. Slično prethodnom istraživanju, jednostruki, dvostruki i trostruki mutanti tri glavna efluks gena nisu bili više osetljivi na tretman flukonazolom tokom zrelog rasta biofilma u odnosu na roditeljske sojeve; međutim, u ranoj fazi (6 h), dvostruki i trostruki mutanti su imali značajno povećanu osetljivost na azole u

poređenju sa roditeljskim sojevima. Remećenje jedne efluks pumpe je imao minimalan uticaj na otpornost biofilma, čak i u najranijoj fazi. Ovo sugerije da efluks pumpe doprinose otpornosti tokom rane faze razvoja biofilma, i da pumpe mogu funkcionisati na kooperativan način. Ova teorija o funkcionalnosti efluks pumpe specifična za vremenski period je dodatno podržana transkripcijskom analizom, koja pokazuje veću ekspresiju gena efluks pumpi nakon 12h formiranja biofilma u poređenju sa zrelim 48h formiranjem biofilma. Ispitivanja su takođe pokazala up-regulaciju efluks pumpi u biofilmovima *C. glabrata* i *C. tropicalis*. To su zbirni dokazi da efluks pumpe *Candida* verovatno doprinose otpornosti na lekove tokom rane faze rasta biofilma, dok je njihova uloga u rezistenciji najmanja u zrelim biofilmovima.

#### 2.6.1.4. Prisustvo "persister" ćelija

Razvoj u razumevanju otpornosti biofilma vrsta roda *Candida* je prisustvo persister ćelija. Većina ćelija biofilma, kao i planktonske ćelije koje se oslobađaju s površine biofilma, osetljive su na antimikrobne lekove. Samo mala frakcija 0.1-10% ćelija biofilma je neosetljiva na produženu izloženost ili veće koncentracije antimikrobnih lekova, i perzistira usprkos terapiji (Vraneš i Leskovar, 2009). Iako su persisteri otkriveni još sredinom 20. veka u planktonskim kulturama, o njihovoj se prirodi još uvek malo zna. Za sada je poznato da persisteri nisu mutanti, već se pretpostavlja da su ćelije fenotipske varijante divljeg tipa (Lewis, 2005). Dok mehanizmi tranzicije persister ćelija *Candida* ostaju nejasni, transkripcijska analiza ovih ćelija pokazuje diferencijalnu regulaciju gena uključenih u ergosterol (*ERG1* i *ERG25*) i  $\beta$ -1,6 glukan (*SKN1* i *KRE1*) puteve (Khot i sar., 2006; Taff i sar., 2013). Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da prelazak na persister ćeliju uključuje promene u ćelijskoj membrani i ćelijskom zidu.



Slika 4. Šematski prikaz mehanizma otpornosti biofilma vrsta roda *Candida* (Silva i sar., 2017).

### 2.6.2. Antimikrobne supstance prirodnog porekla

Usled visokog stepena rezistencije gljivica na konvencionalne antimikotike, neprestano se traga za novim alternativnim agensima i razvijaju se strategije za prevazilaženje ovog problema. Veliku pažnju privlače biljke kao potencijali izvor jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću. Najčešći predmet istraživanja su biljni ekstrakti i etarska ulja, kao i njihove bioaktivne komponente.

Zbog svojih osobina koje su još od davnina primećene u prirodi i tradicionalne primene u mnogim kulturama, kao i brojni dokazi o njihovoj efikasnosti u lečenju različitih bolesti, biljni ekstrakti i etarska ulja se danas koriste u velikoj meri. Prirodni proizvodi, kao što su biljni ekstrakti, bilo kao čista jedinjenja ili kao standardizovani ekstrakti, pružaju neograničene mogućnosti za kontrolu mikobnog rasta zbog njihove hemijske raznovrsnosti. Pored antimikrobnog, nekoliko biljaka se koristi u različitim oblastima ljudskog zdravlja kao što su tradicionalna medicina, funkcionalna hrana, dijetetski suplementi i za proizvodnju rekombinantnih proteina (Negi, 2012).

Korišćenje prirodnih antimikrobnih sredstava kao što su biljni ekstrakti, etarska ulja, organske kiseline, i bakteriocini može biti dobra alternativa za osiguranje bezbednosti hrane. Biljni proizvodi se takođe koriste od davnina za aromatizaciju hrane i pića. Procenjuje se da ima oko 250 000 do 500 000 biljnih vrsta na zemlji i samo jedna desetina je istražena do danas. U poslednjih nekoliko godina, brojna istraživanja su sprovedena u različitim zemljama da bi se dokazala efikasnost biljnih proizvoda, i na hiljade jedinjenja je izolovano iz ovih biljaka, za koje se tvrdi da imaju antimikrobna i lekovita svojstva (Raybaudi-Massilia i sar., 2009; Tiwari i sar., 2009). Upotreba biljnih ekstrakata sa poznatim antimikrobnim svojstvima može biti od velikog značaja u čuvanju hrane. Vrednost biljaka leži u nekim hemijskim supstancama koje deluju na mikrobiološki, hemijski i senzorni kvalitet hrane, i ove fitohemikalije su grupisane u nekoliko kategorija uključujući polifenole, flavonoide, tanine, alkaloidne, terpenoide, izotiocianate, lektine, polipeptide i njihove oksigen supstituirne derivate (Cowan, 1999; Negi, 2012; Negri i sar., 2014). Stoga, u cilju zaštite i održanja ekološkog ekvilibrijuma, primena biljnih ekstrakata i etarskih ulja kao fitofarmaceutika i u prezervaciji hrane se sve više prihvata kao alternativa sintetskim hemijskim produktima. U odnosu na konvencionalne antimikotike, prirodni antimikrobni agensi imaju brojne prednosti, kao što su manje štetni efekti, široka prihvaćenost zbog njihove tradicionalne upotrebe, bolja biodegradacija, itd.

Iz navedenih razloga, istraživanja o efikasnosti biljnih ekstrakata, etarskih ulja i bioaktivnih komponenti u borbi sa problemom multiple rezistencije mikroorganizama, čak i kao agensa za kontrolu biofilma, su veoma aktuelna (Adukwu i sar., 2012; Bazargani i Rohloff, 2016; Cowan, 1999). Uprkos svojoj popularnosti, veliki broj lekovitih biljaka nije naučno istražen. Nekoliko biljnih ekstrakata kao što su *Humulus lupulus*, *Alpinia katsumadai* i *Evodia rutaecarpa* su izabrana u ovoj studiji kako bi se ispitala antifungalna i antibiofilm aktivnost protiv *C. albicans*, *C. glabrata* i *P. membranifaciens*.

### 2.6.3. Biljni ekstrakti

Iako se biljni ekstrakti kao i etarska ulja dobijaju iz biljaka, među njima postoji značajna razlika u smislu njihove čistoće, hemijskog sastava i procesa dobijanja. Biljni ekstrakti su farmaceutski preparati koji se dobijaju iz osušenih ili svežih biljaka primenom odgovarajućih ekstrakcionih postupaka. Biljni ekstrakti mogu biti tečni, polučvrsti i čvrsti, pri čemu su bioaktivne komponente zastupljene u većem procentu kod polučvrstih ili čvrstih ekstrakata. Tečni ekstrakti se mogu koristiti u obliku kapi, ili češće u obliku sirupa (Capasso i sar., 2003). Pored tradicionalnih farmaceutskih ekstrakata, pripremljenih upotrebom vode, etanola ili u smeši vode i alkohola, danas se mnogi ekstrakti prave sa glicerinom i drugim organskim rastvaračima. U etanolnim ekstraktima često dominiraju polifenolna jedinjenja kao što su

tanini, flavonoidi, proantocijanidini itd. Kao i u slučaju etarskih ulja, hemijski sastav ekstrakata varira u zavisnosti od delova biljke iz kojih je ekstrakt pripremljen, kao i polarnosti primenjenog ekstragensa. Najčešće korišćeni rastvarači su voda, alkohol (metanol ili etanol), etil acetat, dietiletar i hloroform. Tuberoso i sar. (2010) su pokazali da etanolni i vodeni ekstrakti imaju veću količinu ekstrahovanih komponenti u poređenju sa etilacetatnim ekstraktima, dok je veća antiradikalska i antioksidantna aktivnost zabeležena za etanolne i etilacetatne ekstrakte. Takođe, etanolni ekstrakti imaju najveći sadržaj fenolnih komponenti, što je u korelaciji sa antiradikalnom i antioksidantnom aktivnošću ekstrakata (Tuberoso i sar., 2010).

#### 2.6.3.1. *Humulus lupulus*

Hmelj (*Humulus lupulus* Linnaeus) je dvodomna, višegodišnja biljka koja pripada porodici Cannabaceae. Rod *Humulus* obuhvata druge dve vrste, *Humulus japonicus* Siebold & Zucc i *Humulus yunnanensis* Hu, ali je samo *Humulus lupulus* od industrijskog i medicinskog značaja. Rod *Humulus* verovatno potiče iz Kine, odakle je migrirao na ogromna područja umerenih klimatskih zona severne i južne hemisfere. Danas, najveći proizvođači hmelja su Nemačka, SAD, Kina i Češka (Karabín i sar., 2016). Ženski cvet biljke hmelja (šišarica) sadrži smole i eterična ulja koja pivu daju gorak ukus i karakterističnu aromu. Gorka jedinjenja hmelja se svrstavaju u  $\alpha$ -kiseline (humuloni) i  $\beta$ -kiseline (lupuloni). Osim što pivu daje gorak ukus i aromu, već dugo se zna da ekstrakti hmelja imaju antimikrobno dejstvo. Zabeleženo je da  $\beta$ -kiseline (lupuloni) imaju veću antimikrobnu aktivnost od izo- $\alpha$ -kiselina (humuloni) (Larson i sar., 1996). Antimikrobna aktivnost gorkih kiselina hmelja, se uglavnom pokazala protiv Gram-pozitivnih bakterija, dok su Gram-negativne bakterije ili otporne ili samo pogođene visokim koncentracijama hmeljnih smola. Hmelj je takođe važan izvor fenolnih jedinjenja u pivu, uključujući (prenilirane) flavonoide. U novije vreme, hmelj je privukao veliko interesovanje zbog bioloških i potencijalnih antikancerogenih aktivnosti nekih od njegovih sastojaka. Kao primer, prenilirani halkan ksantohumul (XN) je indentifikovan kao hemopreventivni agens sa inhibitornim mehanizmima u fazama inicijacije, promocije i progresije karcinogeneze. Štaviše, u tradicionalnoj medicini, hmelj je korišćen u razne medicinske svrhe kao što su nesanica, problemi sa želudcem i drugo (Gerhäuser, 2005; Zanoli i Zavatti, 2008).



### 2.6.3.2. *Alpinia katsumadai*

*Alpinia katsumadai hayata* (Kinesko ime Caodoukou), tradicionalni kineski lek, se široko koristi kao anti-emetik za lečenje stomaćnih poremećaja poput epigastrične distenzije, mučnine, povraćanja i anoreksije. Flavonoidi i diarilheptanoidi, kao što su kardamomin, alpinetin, pinocembrin, pinocembrin halkona i 1,7-difenil-4,6-heptadien-3-ol, su glavne delotvorne komponente u semenu *A. katsumadai*. Dokazano je da imaju široke farmakološke aktivnosti uključujući i antiinflamatorne, antibakterijske, anti-oksidativne, anti-mutagene, anti-tumorske efekte i druge važne tarapeutske aktivnosti od potencijalnog značaja. Kardamomin takođe pokazuje znatne *in vitro* anti-HIV kao i anti-virusne aktivnosti (Gröblacher i sar., 2012; Xiao i sar., 2011).

### 2.6.3.3. *Evodia rutaecarpa*

Osušen nezreo plod *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth (*E. rutaecarpa*, Kinesko ime, Wu-zhu-yu) se koristi kao jedan od tradicionalnih kineskih lekova više od 2000 godina i zvanično je na listi u kineskoj farmakopeji. Efikasan je u lečenju gastrointestinalnih poremećaja, glavobolje, postporodajnog krvarenja, amenoreje i hladnih udova. Do sada, poznato je da *E. rutaecarpa* sadrži veliki broj jedinjenja uključujući limonoide, alkaloidne, eterična ulja, karboksilne kiseline i flavonoide (Zhang i sar., 2013). Alkaloidi, koji sadrže indolkinazolin i kvinolon alkaloidne, su glavna aktivna jedinjenja u plodovima *E. rutaecarpa*. Neke studije su pokazale da kvinolonski alkaloidi iz plodova *E. rutaecarpa* imaju farmakološke efekte, uključujući značajan inhibitorski efekat na biosintezu leukotriena u ljudskim granulocitima i visoku antibakterijsku aktivnost protiv *Helicobacter pylori* (Zhang i sar., 2014).

### 3. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

#### 3.1. Cilj istraživanja

Na osnovu literaturnih podataka jasno je da je problem formiranja biofilma i rezistencije kvasaca iz rodova *Candida* i *Pichia* veliki izazov današnjice i da su neophodna sistematičnija i sveobuhvatnija istraživanja na polju pronalaženja alternativnih agenasa i strategija za njegovu kontrolu. Iz tog razloga, opšti cilj istraživanja je upravo pronalaženje novih, nekonvencionalnih antimikrobnih agenasa i/ili strategija u kontroli formiranja biofilma sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia*. Realizacija opšteg cilja biće ostvarena kroz nekoliko specifičnih ciljeva:

- određivanje hidrofobnosti površine ćelije sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia*
- kvantitativno određivanje adheriranih ćelija sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* na polistiren površinu i na diskove od nerđajućeg čelika (AISI 304) sa različitim stepenom hrapavosti površine ( $R_a = 25.20 - 961.9$  nm)
- određivanje broja adheriranih ćelija sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* na dva tipa drvenih površina (bukva, glatka i hrapava) automatskim brojanjem vijabilnih ćelija
- ispitivanje uticaja temperature i medijuma na adheziju odabranih sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* na površine diskova od nerđajućeg čelika
- određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) biljnih ekstrakata
- ispitivanje uticaja različitih koncentracija biljnih ekstrakata na adheziju odabranih sojeva kvasaca

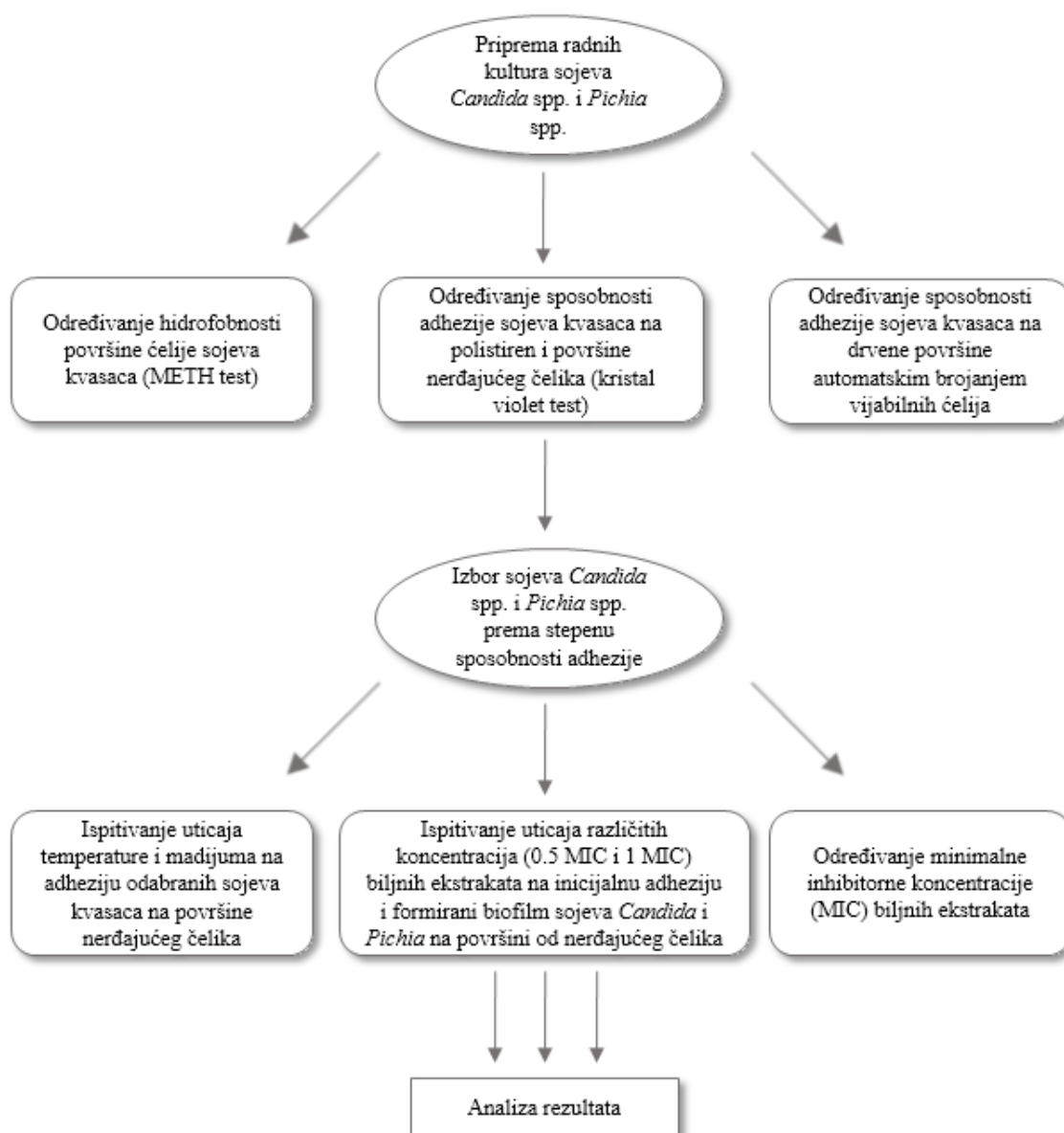
#### 3.2. Hipoteze istraživanja

- Hidrofobnost kvasaca (*Candida* spp., *Pichia* spp.) određuje sposobnost adhezije na abiotičke površine
- Stepem hrapavosti kontaktne površine (nerđajućeg čelika i drveta) utiče na adheziju kvasaca
- Promena temperature i medijuma utiče na adheziju ćelija kvasaca
- Aplikacija biljnih ekstrakata utiče na adheziju kvasaca (*Candida* spp., *Pichia* spp.) na površini od nerđajućeg čelika

#### 4. MATERIJAL I METODE

Na osnovu radnih hipoteza postavljen je koncept eksperimentalnog rada, koji je izveden u periodu od novembra 2012. godine do oktobra 2013. godine u laboratorijama Katedre za biotehnologiju, mikrobiologiju i bezbednost hrane, Biotehnički fakultet, Univerzitet u Ljubljani.

##### 4.1. Šema rada



Slika 5. Hodogram eksperimenta.

## 4.2. Materijal

Ovo poglavlje rezimira materijal koji se koristi u eksperimentalnom radu u okviru doktorske teze.

### 4.2.1. Kulture mikroorganizama

Glavni radni mikroorganizmi, sojevi kvasaca koji su korišćeni za izvođenje istraživačkog rada u okviru doktorske teze su deo Zbirke industrijskih mikroorganizama (ZIM), Katedre za biotehnologiju, mikrobiologiju i bezbednost hrane, Biotehnički fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija (Tabela 1). U istraživanju je korišćeno osam sojeva iz roda *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*) i tri soja iz roda *Pichia* (*P. pijperi*, *P. membranifaciens*) za određivanje potencijala adhezije na polistiren i površine diskova od nerđajućeg čelika i drveta. Tri soja iz roda *Candida* su bila referentna, dok su ostali sojevi izolovani iz različitih uzoraka. Identifikacija sojeva je izvršena PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism - analiza dužine restrikcionih fragmenata) analizom sekvenci ITS rDNK regiona (Andrade i sar., 2006).

Tabela 1. Sojevi iz rodova *Candida* i *Pichia* korišćeni u ispitivanju, njihova oznaka i poreklo

Vrsta kvasca	Oznaka	Poreklo
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10261	Čovek, nokat, slučaj paronihije
<i>Candida glabrata</i>	ZIM 2367	Čovek, trahealna aspiracija
<i>Candida glabrata</i>	ZIM 2369	Čovek, bronhoalveolarna lavaža (BAL)
<i>Candida glabrata</i>	ZIM 2382	Čovek, urin iz ugrađenog katetera
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	Čovek, slučaj spru
<i>Candida parapsilosis</i>	ZIM 2014	Čovek, ispljuvak (lat. <i>sputum</i> )
<i>Candida parapsilosis</i>	ZIM 2234	Koncentrat voćnog soka
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	Čovek, ispljuvak (lat. <i>sputum</i> )
<i>Pichia pijperi</i>	ZIM 1368	Šira Refošk
<i>Pichia membranifaciens</i>	ZIM 2302	Pokvareno vino
<i>Pichia membranifaciens</i>	ZIM 2417	Beli sir od kravljeg mleka

#### 4.2.2. Mikrobiološki medijumi

Za održavanje, kultivaciju i skladištenje sojeva kvasaca korišćeni su medijumi navedeni u Tabeli 2.

Tabela 2. Čvrsti i tečni medijumi korišćeni za eksperimentalni rad sa kvascima

SASTAV	PRIPREMA
<b>Tečni medijum Malt Extract Broth (MEB)</b>	
Osnovni medijum; Malt Extract Broth (Merck, Germany) dH <sub>2</sub> O	8.5 g osnovnog medijuma je rastvoreno u 500 ml dH <sub>2</sub> O i sterilisano u autoklavu (121 °C, 20 min). Do upotrebe medijum je čuvan na 4 °C.
<b>Tečni medijum Yeast Peptone Dextrose (YPD)</b>	
Osnovni medijum; Yeast Peptone Dextrose (Sigma-Aldrich, USA) dH <sub>2</sub> O	25 g osnovnog medijuma je rastvoreno u 500 ml dH <sub>2</sub> O i sterilisano u autoklavu (121 °C, 20 min). Do upotrebe medijum je čuvan na 4 °C.
<b>Čvrsti medijum Malt Extract Agar (MEA)</b>	
Osnovni medijum; Malt Extract Agar (Merck, Germany) dH <sub>2</sub> O	24 g osnovnog medijuma je rastvoreno u 500 ml dH <sub>2</sub> O i sterilisano u autoklavu (121 °C, 20 min). Kada je medijum ohlađen na 45 °C, aseptično je razliven u sterilne Petri ploče i ploče sa medijumom su čuvane do upotrebe na 4 °C.

#### 4.2.3. Reagensi i rastvori za rad sa kvascima

U Tabeli 3 su navedeni reagensi i rastvori koji su korišćeni za rad sa kvascima u zavisnosti od vrste eksperimenta.

Tabela 3. Reagensi i rastvori korišćeni za eksperimentalni rad sa kvascima

RASTVORI, REAGENSI	PRIPREMA
<b>Fiziološki rastvor puferisan fosfatom (PBS)</b>	
PBS tablete (Oxoid, England) dH <sub>2</sub> O	Prema uputstvima proizvođača, jedna tableta PBS je rastvorena u 100 ml dH <sub>2</sub> O i rastvor je sterilisan u autoklavu (121 °C, 20 min). Do upotrebe rastvor PBS je čuvan na 4 °C.
<b>4M amonijum sulfat</b>	
Amonijum sulfat (Merck, Germany) PBS (Oxoid, England)	26.43 g amonijum sulfata je rastvoremo u 50 ml PBS mešanjem na magnetnoj mešalici.
<b>Dimetil sulfoksid (DMSO)</b>	
DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	DMSO je korišćen kao rastvarač za pripremu štok koncentracija biljnih ekstrakata.
<b>Sirćetna kiselina</b>	
Acetic acid (glacial) 100% (Merck, Germany) dH <sub>2</sub> O	Sirćetna kiselina je pomešana sa dH <sub>2</sub> O u željenom odnosu i čuvana na 4 °C do upotrebe.
<b>Kristal violet</b>	
Kristal violet (Merck, Germany) dH <sub>2</sub> O	Komercijalno pripremljen rastvor kristal violeta je razblažen sa dH <sub>2</sub> O do željene koncentracije.
<b>Metilensko plavo</b>	
Metilensko plavo (Sigma-Aldrich, Germany) Natrijum citrat dihidrat (Sigma-Aldrich, Germany) dH <sub>2</sub> O	U 10 ml dH <sub>2</sub> O je rastvoreno 0.01 g metilenskog plavog, dodato 2 g natrijum citrat dihidrata i rastvoreno mešanjem na magnetnoj mešalici. Sadržaj je prenet u normalni sud od 100 ml i dopunjen destilovanom vodom do oznake. Rastvor metilenskog plavog je zatim filtriran kroz 0.2 µm filter i čuvan na 4 °C do upotrebe.
<b>Ksilen</b>	
Xylene (Merck, Germany)	

#### 4.2.4. Biljni ekstrakti

Biljni ekstrakti *Alpinia katsumadai* i *Evodia rutaecarpa* korišćeni u eksperimentalnom radu su pripremljeni na Katedri za farmakognoziju, Instituta za farmaceutске nauke, Univerzitet u Gracu, Austrija, kako je prethodno objavljeno (Kovač i sar., 2014; Bezek i sar., 2016). Ekstrakt *Humulus lupulus* je dobijen iz pivare Laško, Ljubljana, Slovenija. Određena koncentracija ekstrakata je pripremljena u DMSO rastvaraču i dodatno razređena u odgovarajućem medijumu za svaki eksperiment. Sadržaj DMSO u svim finalnim rastvorima je iznosio < 1 %.

#### 4.2.5. Kontaktni materijali

Za određivanje uticaja hrapavosti kontaktne površine na adheziju sojeva kvasaca korišćeni su diskovi od nerđajućeg čelika (AISI 304) i drveta (bukva) sa različitim stepenom hrapavosti površine.

##### 4.2.5.1. Nerđajući čelik

Pet tipova diskova od nerđajućeg čelika (AISI 304, 5 mm prečnika i 1mm debljine) sa različitim stepenom hrapavosti površine (Ra) dobijeni su iz Iskra Pio, Ljubljana, Slovenija. Mikroskop atomskih sila (eng. atomic force microscopy (AFM)) je korišćen za karakterizaciju površinske topografije materijala na skali sub-mikrometra. Velika prednost ove metode je mogućnost prikazivanja površina sa visokom rezolucijom i kvantitativna ocena odabranih površinskih karakteristika, uključujući statističku analizu, što omogućava određivanje parametara hrapavosti. U našoj studiji korišćen je sistem VEECO Dimension 3100 AFM (Town of Oyster Bay, NY, USA) i merenja su izvršena u kontaktnom režimu (Bohinc i sar., 2014). Karakteristike hrapavosti površine pet tipova diskova su izražene u parametru hrapavosti Ra. Vrednosti Ra su se kretale od 25.2 nm (najglatkiji) do 961.9 nm (najhrapaviji) (Tabela 4). Svi diskovi od nerđajućeg čelika očišćeni su sa 96% etanolom, isprani destilovanom vodom i autoklavirani 15 minuta na 121°C pre upotrebe.

Tabela 4. Hrapavost površine svakog tipa diska od nerđajućeg čelika

Tip diska	3D poliran	brušen	3C	elektropoliran	brušen (240)
Hrapavost, Ra (nm)	25.20	71.90	160.88	592	961.90

#### 4.2.5.2. Drvo

Dva tipa drvenih diskova (bukva; glatki i hrapavi; dužine, širine i debljine 15.0, 7.0 i 1.0 mm, respektivno) dobijena su sa Odeljenja za obradu drveta, Biotehnički fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija. Površinska hrapavost diskova je izražena u parametru hrapavosti Ra. Ra za glatke i hrapave diskove je bila  $(44.0 \pm 1.5)$  i  $(5.8 \pm 1.5)$   $\mu\text{m}$ , respektivno. Svi drveni diskovi su autoklavirani 15 minuta na  $121^\circ\text{C}$  pre upotrebe.

#### 4.2.6. Laboratorijski materijal i oprema

Ovo poglavlje rezimira materijal i opremu koji je korišćen u eksperimentalnom radu.

Tabela 5. Laboratorijski materijal korišćen u eksperimentalnom radu

LABORATORIJSKI MATERIJAL	OZNAKA	PROIZVOĐAČ
Automatske pipete i nastavci	10 $\mu\text{l}$ , 20-200 $\mu\text{l}$ , 1000 $\mu\text{l}$ , 10 ml	Eppendorf, Germany
Burker-Türk komora za brojanje	/	Brand, Germany
Magneti	/	Brand GMBH, Germany
Mikrocentrifuške epruvete	1.5 i 2 ml	Eppendorf, Germany
Parafilm	Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, USA
Plastične eze	10 $\mu\text{l}$	Labor tehnika Golias, Slovenia
Plastične epruvete za centrifugiranje	15 i 50 ml	TPP, Switzerland
Plastične sterilne posude	100 ml	Labor tehnika Golias, Slovenia
Polistirenske mikrotitarske ploče	96F, katalog broj: 266120	Nunc, Denmark
Staklene laboratorijske boce sa navojem	250 ml, 500 ml, 1000 ml	Duran, Germany
Staklene čaše i epruvete	96F	Brand, Germany
Sterilne plastične Petri ploče	Fi 30 i 90	Labor tehnika Golias, Slovenia
Filtri sa porama	SLGV033RS	Merck, Germany

Pored navedenog korišćen je i ostali laboratorijski pribor i potrošni materijal, kao što su stalci za epruvete, pincete, zaštitne rukavice, vreće za autoklaviranje otpadnog materijala.



Tabela 6. Laboratorijska oprema korišćena u eksperimentalnom radu

LABORATORIJSKA OPREMA	OZNAKA	PROIZVOĐAČ
Autoklav	A-21 i A-63 C	Kambič, Slovenia
Vage	PB 1502-S Sartorius, analytic ME5 in CP 2202S-OCE	Mettler Toledo, USA GMBH, Germany Sartorius, Switzerland
Vodeno kupatilo	WB-13EHK i Julabo	Kambič, Slovenia
Vorteks	IKA Lab Dencer	IKA, USA
Zamrzivač -80 °C	HERAfreeze HFU T Series	Thermo Scientific, USA
Zamrzivač -20 °C	Economic	Gorenje, Slovenia
Inkubator	I 150 C	Kambič, Slovenia
Kamera	DFC290	Leica, Germany
Laminarna komora	PIO LFVP 12	IskraPIO, Slovenia
Magnetna mešalica	RCT basic	IKA, Germany
Mikroskop	DM4000 B	Leica, Germany
pH metar	Seven multi	Mettler Toledo, USA
Frižider	/	Gorenje, Slovenia
Centrifuga sa mogućnošću hlađenja	3K30	Sigma, USA
Čitač mikrotitarskih ploča	Safire 2	Tecan Trading, AG Switzerland

Pored navedenog laboratorijskog materijala i opreme korišćen je i softver Magellan (Tecan, Switzerland), Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, USA), Image J, v1.43u, softver za obradu slika.

### 4.3. Metode

Ovo poglavlje opisuje metode rada koje smo koristili za izvođenje eksperimenata u okviru doktorske teze.

#### 4.3.1. Revitalizacija kvasaca

Sojevi kvasaca *Candida* i *Pichia* koji su korišćeni u eksperimentalnom radu su čuvani u Yeast Peptone Dextrose (YPD) medijumu sa dodatkom 40 % glicerola na temperaturi od -80°C. Svi sojevi su revitalizovani iz zamrznutih štokova kultivacijom na Malt Extract Agar (MEA) pločama i inkubirani 24h na 37°C (sojevi roda *Candida*) ili 27°C (sojevi roda *Pichia*) pre početka testa adhezije.

#### 4.3.2. Priprema inokuluma

Izrasle kolonije kvasca svakog ispitivanog soja su resuspendovane u Malt Extract broth (MEB) medijumu i podešena je radna suspenzija veličine  $1 \times 10^7$  ćelija/ml. Koncentracija ćelija u suspenziji je određena pomoću bojenja ćelija metilenskim plavim, mikroskopa sa kamerom (Leica DFC290) i softvera za obradu slika Image J, v1.43u (Zupan i sar., 2013). Za svaki soj, 50 µl suspenzije ćelija je razblaženo sa 50 µl metilenskog plavog i nakon vorteksiranja 20 µl dvostruko razblažene suspenzije je preneto na Bürker-Türk komoru za brojanje (hemocitometar) prekrivenu sa krovnom stakalcem. Uzorak je zatim posmatran pod mikroskopom (10 puta uvećanje) i u skladu sa specifičnim podešavanjima za snimanje slika (aparatura 1, gama 10, crnobela slika) snimljena je slika živih ćelija u vidljivom polju (Zupan i sar., 2013). Slika je prenetu u kompjuterski program Image J pomoću kojeg je dobijen broj ćelija na određenoj površini, koji je zatim uzimajući u obzir razblaženje i površinu, upotrebljen za izračunavanje koncentracije ćelija po mililitru suspenzije prema jednačini:

$$\text{broj} \frac{\text{ćelija}}{\text{ml}} = \frac{\text{prosečan broj ćelija na vidnom polju}}{\text{površina vidnoga polja}} \times \text{faktor razblaženja}$$

#### 4.3.3. Određivanje hidrofobnosti površine ćelije kvasaca *Candida* i *Pichia* – MATH test

Hidrofobnost površine ćelije (eng. Cell Surface Hydrophobicity, CSH) sojeva kvasca je određena pomoću testa Mikrobne adhezije na ugljovodonike (Microbial Adhesion To Hydrocarbon, MATH) prema metodi Rosenberg (Rosenberg, 1984), uz modifikacije. Sojevi kvasaca su najpre gajeni u 6 ml Malt Extract broth (MEB) medijumu tokom 48h na 37°C (sojevi roda *Candida*) ili 27°C (sojevi roda *Pichia*). Nakon inkubacije, ćelije su centrifugirane na  $1500 \times g$  u trajanju od 3 minute i dva puta isprane sa fiziološkim fosfatnim puferom (Phosphate buffered saline, PBS). Ćelije kvasaca su zatim resuspendovane u 6 ml 4M amonijum sulfata u PBS, što povećava hidrofilnost vodene faze, i suspenzija je podešena do optičke gustine 0.7 - 0.8 na 650 nm ( $A_0$ ). Alikvoti ćelijskih suspenzija od 1.4 ml su preneti u epruvete za centrifugiranje (2 ml), i 0.2 ml ugljovodonika ksilena kao organskog rastvarača je dodato za pokretanje testa. Epruveta bez dodatog ksilena je korišćena kao kontrola. Epruvete su vorteksovane 1 minut i ostavljene da odstoje 15 minuta kako bi se obezbedilo potpuno razdvajanje dve faze, vodene i ugljovodonične. Nakon razdvajanja faza, zapremina od 300  $\mu$ l donje vodene faze je pažljivo uklonjena i optička gustina uzoraka (A) i kontrole ( $A_0$ ) je merena na 650 nm na čitaču mikrotitar ploča (Tecan, Mannedorf/Zurich, Switzerland). Testovi su izvedeni u triplikatu sa tri ponavljanja. Hidrofobnost je izražena kao procenat ćelija kvasca adheriranih na ksilen prema sledećoj formuli:

$$CSH (\%) = (1 - A/A_0) \times 100\%$$

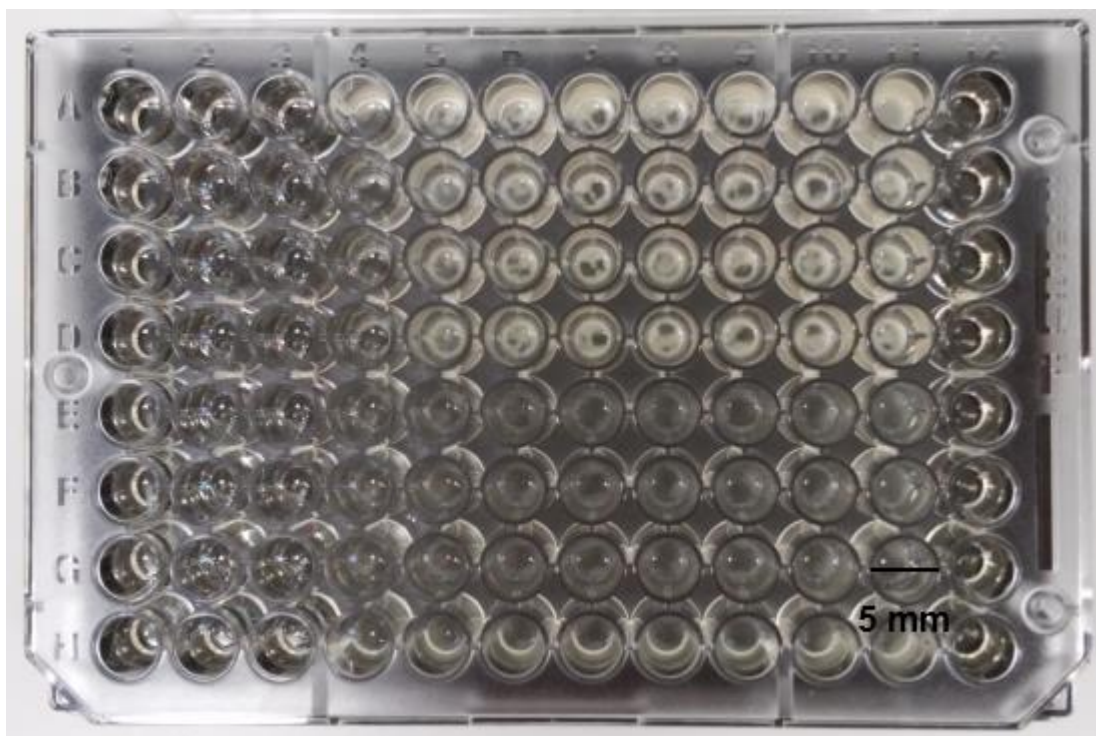
gde je  $A_0$  optička gustina suspenzije ćelija pre dodavanja ksilena (pre razdvajanja), a A je optička gustina vodene faze (nakon razdvajanja).

Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost dobijenih procenata sa standardnom devijacijom i predstavljeni grafički primenom softvera Origin 8.1. (Microcal Software, USA). Prema klasifikaciji koju su predložili Li i McLandsborough (1999) sojevi su klasifikovani u četiri kategorije: jako hidrofobni (vrednosti CSH veće od 55%), umereno hidrofobni (vrednosti CSH u opsegu 30 - 54%), umereno hidrofilni (vrednosti CSH u opsegu 10 - 29%) i jako hidrofilni (vrednosti CSH manje od 10%).

#### 4.3.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) biljnih ekstrakata

Otpornost sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* na tri različita biljna ekstrakata je određena bujon mikrodilucionom metodom prema protokolu CLSI standarda (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), standard M27-A2) (NCCLS, 2002). U sterilne mikrotar ploče sa 96 bunarčića dodato je po 100  $\mu$ l MEB medijuma osim u prvu kolonu. Biljni ekstrakti su rastvoreni u dimetil sulfoksid (DMSO) rastvaraču i pripremljeni za rad razblaživanjem do koncentracije od 1600  $\mu$ g/ml u MEB medijumu. Mikrotar ploče su pripremljene za rad dodavanjem po 100  $\mu$ l rastvora biljnih ekstrakata u prvu i drugu kolonu i dvostrukim razblaživanjem u preostale kolone. Finalne koncentracije biljnih ekstrakata u mikrotitar pločama su se kretala od 800  $\mu$ g/ml do 1.5625  $\mu$ g/ml, pri čemu finalna koncentracija DMSO rastvarača nije prelazila 1 %.

Inokulum sojeva kvasaca je pripreman suspendovanjem kolonija sa čvrste podloge Malt Extract agara (MEA) u sterilni fiziološki rastvor PBS. Finalna koncentracija inokuluma  $5 \times 10^3$  cells/ml je dobijena razblaženjem 1:50 (v/v) u MEB medijumu i podešena je pomoću Bürker-Türk komore za brojanje, mikroskopa sa kamerom (Leica DFC290) i softvera ImageJ za obradu slika (Zupan i sar., 2013), a zatim 100  $\mu$ l ovako pripremljene suspenzije je dodato u bunarčiće mikrotitar ploče. Ploče su inkubirane 48h na 35°C (sojevi roda *Candida*) ili 27°C (soj roda *Pichia*). Nakon perioda inkubacije određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) merenjem optičke gustine (eng. Optical Density, OD) u bunarčićima mikrotitar ploče na 650 nm pomoću čitača mikrotitar ploča (Tecan, Mannedorf/Zurich, Switzerland) i korišćenjem računarskog programa »Magellan«. Test je obuhvatao pozitivnu kontrolu/kontrolu rasta (inokulum u MEB medijumu bez biljnog ekstrakta) i negativnu kontrolu (MEB medijum bez suspenzije kvasaca) (Slika 6). MIC je definisana kao najniža koncentracija biljnog ekstrakta koja je inhibirala vidljivi rast test mikroorganizama za 50 % u poređenju sa pozitivnom kontrolom. Eksperiment je izveden sa četiri nezavisna ponavljanja, a dobijene vrednosti optičkih gustina su izražene kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom i predstavljene grafički.



Slika 6. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) biljnih ekstrakata.

#### 4.3.5. Određivanje sposobnosti adhezije kvasaca *Candida* i *Pichia* na polistiren površinu metodom kristal violet

Za kvantitativno ispitivanje sposobnosti adhezije sojeva kvasaca korišćen je kristal violet test u mikrotitar pločama sa 96 bunarčića i ravnim dnom prema metodi koju su opisali Mowat i sar. (2007), uz modifikacije. Za svaki soj, po 200  $\mu\text{l}$  ćelijske suspenzije ( $1 \times 10^7$  ćelija/ml) pripremljene kao što je prethodno opisano (odjeljak 4.3.2.) je inokulisano u 12 bunarčića polistirenske mikrotitar ploče (NUNC, Roskilde, Germany), a kao negativna kontrola korišćen je sterilni MEB medijum bez dodatka inokuluma. Ploče su inkubirane tokom 24h na 37°C (sojevi roda *Candida*) ili 27°C (sojevi roda *Pichia*). Nakon perioda inkubacije, uklonjen je sadržaj iz ploče i bunarčići su isprani tri puta sa 300  $\mu\text{l}$  sterilne destilovane vode kako bi se uklonile neadherirane ćelije. Zaostale adherirane ćelije su fiksirane sušenjem 10 minuta sa fenom. Nakon sušenja, u svaki bunarčić je dodato po 100  $\mu\text{l}$  0,5 % rastvora kristal violeta i ploče su inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi. Kristal violet je uklonjen inverzijom mikrotitar ploča i ispiranjem tri puta sa sterilnom destilovanom vodom, nakon čega su ploče osušene sušenjem sa fenom u trajanju od 10 minuta. Kristal violet koji je ostao vezan za

adherirane ćelije rastvoren je dodavanjem 100 µl 33 % sirćetne kiseline u svaki bunarčić i ploče su šejkane 3 minuta kako bi se postigla potpuna razgradnja boje. Adhezivnost sojeva je određena na osnovu izmerene vrednosti optičke gustine kristal violeta u rastvoru na talasnoj dužini od 584 nm na čitaču mikrotitar ploča (Tecan, Mannedorf/Zurich, Switzerland). Vrednosti optičkih gustina korišćenih za karakterizaciju adhezije testiranih sojeva su dobijene umanjnjem svake dobijene optičke gustine za srednju vrednost optičke gustine negativne kontrole ( $OD_{584}$ ). Na osnovu dobijenih vrednosti optičkih gustina, sojevi su klasifikovani u četiri kategorije prema Stepanović i sar. (2000).

#### 4.3.6. Određivanje sposobnosti adhezije kvasaca *Candida* i *Pichia* na diskovima od nerđajućeg čelika metodom kristal violet

Za određivanje uticaja hrapavosti površine nerđajućeg čelika na adheziju sojeva kvasaca korišćeno je pet tipova diskova od nerđajućeg čelika (AISI 304, 5 mm prečnika i 1mm debljine) sa različitim stepenom hrapavosti površine ( $Ra = 25.20 - 961.90$  nm). Po 12 diskova svakog tipa nerđajućeg čelika je postavljano na dno Petri ploče (prečnika 3 mm), a zatim je za svaki soj po 2 ml ćelijske suspenzije ( $1 \times 10^7$  ćelija/ml) pripremljene kao što je prethodno opisano (odjeljak 4.3.2.) dodato u Petri ploče kako bi prekrili diskove. Kod negativne kontrole diskovi od nerđajućeg čelika su inokulisani na identičan način sa 2 ml sterilnog MEB medijuma. Ploče su inkubirane tokom 24h na 37°C (sojevi roda *Candida*) ili 27°C (sojevi roda *Pichia*).

Količina ćelija kvasaca adheriranih na diskove od nerđajućeg čelika je merena metodom bojenja kristal violetom (Tomičić i Raspor, 2017). Nakon perioda inkubacije, suspenzije ćelija su uklonjene iz ploča i diskovi su pažljivo isprani tri puta sa 3 ml sterilne destilovane vode kako bi se uklonile neadherirane ćelije. Zaostale adherirane ćelije su fiksirane sušenjem 10 minuta sa fenom. Diskovi su po dodatku 0,5 % rastvora kristal violeta inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi, a potom pažljivo isprani tri puta sa sterilnom destilovanom vodom i osušeni sušenjem sa fenom u trajanju od 10 minuta. Diskovi od nerđajućeg čelika su zatim prebačeni u čistu mikrotitar ploču sa 96 bunarčića i 100 µl 33 % sirćetne kiseline je dodato u svaki bunarčić. Ploče su šejkane 3 minuta kako bi se postigla potpuna razgradnja boje. Sadržaj iz bunarčića je prenet u novu mikrotitar ploču i koncentracija kristal violeta u sirćetnoj kiselini je korišćena za određivanje količine adheriranih ćelija merenjem optičke gustine (OD) na 584 nm pomoću čitača mikrotitar ploča (Tecan, Mannedorf/Zurich, Switzerland). Vrednosti optičkih gustina korišćenih za karakterizaciju adhezije testiranih sojeva su dobijene umanjnjem svake dobijene optičke gustine za srednju vrednost optičke gustine negativne kontrole za svaki tip površine ( $OD_{584}$ ).

Za ispitivanje adhezivnosti odabranih sojeva kvasaca pri različitim temperaturama i medijumu korišćen je kristal violet test kao što je prethodno opisano (Tomičić i Raspor, 2017).

#### 4.3.7. Uticaj biljnih ekstrakata na inicijalnu adheziju i formirani biofilm kvasaca *Candida* i *Pichia* na površini od nerđajućeg čelika

Sa tendencijom otkrivanja biljnih ekstrakata koji bi imali inhibitorni efekat na inicijalnu adheziju i formirani biofilm kvasaca *Candida* i *Pichia* korišćeni su ekstrakti *Humulus lupulus*, *Alpinia katsumadai* i *Evodia rutaecarpa*. Za biljne ekstrakte je prvo određena vrednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), a prilikom izvođenja testa korišćeni su deset puta koncentrovani rastvori kako bi finalna koncentracija biljnih ekstrakata u ploči odgovarala koncentracijama u iznosu od 0.5 MIC i 1 MIC. Testovi su sprovedeni na tri izolata *Candida albicans* ATCC 10261, *Candida glabrata* ZIM 2369 i *Pichia membranifaciens* ZIM 2417, a biofilmovi su formirani na odabranoj površini nerđajućeg čelika (AISI 304, 5 mm prečnika i 1mm debljine, Ra = 592 nm) prema metodi Tomičić i Raspor (2017), uz modifikacije. Sojevi su najpre gajeni na MEA pločama tokom 24h na 37°C (sojevi roda *Candida*) ili 27°C (soj roda *Pichia*). Nakon isteka perioda inkubacije, ćelije kvasaca su suspendovane u MEB medijumu i koncentracije ćelija su određene i podešene na  $2 \times 10^7$  ćelija/ml pomoću Bürker-Türk komore za brojanje i mikroskopa (Leica DFC290) sa automatskim brojanjem vijabilnih ćelija kao što je prethodno opisano (odjeljak 4.3.2.). Test je iniciran dodavanjem 2 ml ćelijske suspenzije sa ili bez prisustva biljnih ekstrakata u Petri ploče (prečnika 3mm) u koje su prethodno postavljeni diskovi od nerđajućeg čelika. Ploče su inkubirane na 37°C (sojevi roda *Candida*) ili 27°C (soj roda *Pichia*) tokom 24h. U prvom delu eksperimenta, ćelije kvasca su bile izložene prisustvu različitih koncentracija (0.5 MIC i 1 MIC) ekstrakata tokom 24h inkubacije radi ispitivanja prisustva inhibitorne aktivnosti na inicijalnu adheziju. U drugom delu eksperimenta, posle formiranja biofilma na diskovima od nerđajućeg čelika, nakon 24h inkubacije uklonjen je sadržaj iz ploča gde na početku nije dodat ekstrakt i neadherirane ćelije su uklonjene ispiranjem tri puta sa sterilnim fiziološkim fosfatnim puferom (PBS). Ekstrakt u MEB medijumu je zatim dodat u različitim koncentracijama (0.5 MIC i 1 MIC) na adherirane ćelije i ploče su inkubirane tokom 3h. U svim eksperimentima uključena je pozitivna kontrola (MEB medijum sa ćelijskom suspenzijom) i negativna kontrola (MEB medijum). Uticaj biljnih ekstrakata na inicijalnu adheziju i količinu formiranog biofilma je određen kvantifikacijom ukupne biomase formiranog biofilma primenom kristal violet testa prema protokolu opisanom u odeljku (4.3.6.).

#### 4.3.8. Određivanje sposobnosti adhezije kvasaca *Candida* i *Pichia* na drvenim površinama automatskim brojanjem vijabilnih ćelija

Za određivanje uticaja hrapavosti drvene površine na adheziju sojeva kvasaca korišćena su dva tipa drvenih diskova (bukva; glatki i hrapavi; dužine, širine i debljine 15.0, 7.0 i 1.0 mm, respektivno). Na dno Petri ploče (prečnika 3 mm) je najpre postavljeno po 3 diska svakog tipa drvene površine, a zatim je za svaki soj po 2 ml ćelijske suspenzije ( $1 \times 10^7$  ćelija/ml) pripremljene kao što je prethodno opisano (odjeljak 4.3.2.) dodato u Petri ploče kako bi prekrili diskove. Kod negativne kontrole diskovi su inokulisani na identičan način sa 2 ml sterilnog MEB medijuma. Ploče su inkubirane tokom 24h na 37°C (sojevi roda *Candida*) ili 27°C (sojevi roda *Pichia*).

Nakon perioda inkubacije, neadherirane ćelije su uklonjene ispiranjem tri puta sa fiziološkim rastvorom PBS, a diskovi su zatim prebačeni u plastične epruvete za centrifugiranje (15 ml) u koje je prethodno dodato po 2 ml PBS. Uzorci drveta su centrifugirani na  $1500 \times g$  u trajanju od 3 minute kako bi se odvojile adherirane ćelije. Koncentracija ćelija u suspenziji je određena pomoću bojenja ćelija metilenskim plavim, mikroskopa sa kamerom (Leica DFC290) i softvera za obradu slika Image J, v1.43u kao što je prethodno opisano u odeljku (4.3.2.) (Tomicic i sar., 2017; Zupan i sar., 2013). Za svaki soj, 50  $\mu$ l suspenzije ćelija je razblaženo sa metilenskim plavim u odnosu 1:1 (po zapremini), i nakon vorteksiranja 20  $\mu$ l razblažene suspenzije je preneto na Bürker-Türk komoru za brojanje (hemocitometar). Uzorak je posmatran pod mikroskopom (10 puta uvećanje) i u skladu sa specifičnim podešavanjima za snimanje slika (aparatura 1, gama 10, crnobela slika) snimljena je slika živih ćelija u vidljivom polju (Zupan i sar., 2013). Slika je preneto u kompjuterski program Image J pomoću kojeg je dobijen broj ćelija na određenoj površini, koji je zatim uzimajući u obzir razblaženje i površinu, upotrebljen za izračunavanje koncentracije ćelija po mililitru suspenzije. Test je izveden u tri nezavisnih ponavljanja, a dobijene vrednosti su izražene kao srednja vrednost broja ćelija po  $\text{mm}^2$  drvene površine sa standardnom devijacijom i predstavljene su grafički pomoću softvera Origin 8.1. (Microcal Software, USA).

#### 4.3.9. Statistička obrada rezultata

Deskriptivne statističke analize za izračunavanje srednje vrednosti i standardne devijacije izvršene su korišćenjem Microsoft Excel software (Microsoft Office, 2013). Svi dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom i predstavljeni grafički primenom softvera Origin 8.1. (Microcal Software, USA). Procena statistički značajnih razlika između testiranih parametara je izvedena primenom različitih testova (Mann-Whitney, Kruskal-



Wallis) i odgovarajućim post hoc testom (test višestrukih komparacija). U okviru svih merenja vrednost  $P < 0.05$  je smatrana statistički značajnom. Za utvrđivanje korelacije između hidrofobnosti površine ćelije i adhezije sojeva kvasaca na polistiren korišćen je regresioni model. Analize su izvedene pomoću statističkog softvera SPSS version 21 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

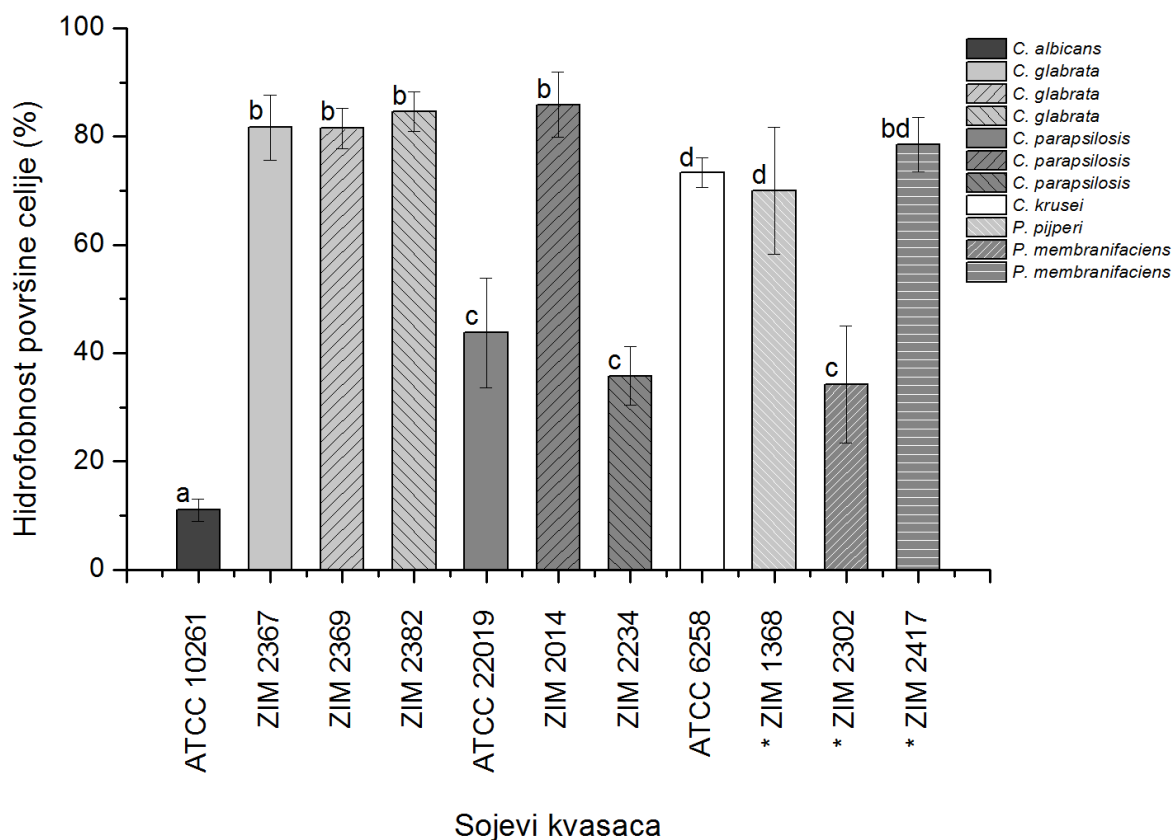
Ovo poglavlje opisuje rezultate dobijene u eksperimentalnom radu. Na osnovu postavljenih radnih hipoteza ispitali smo, (I) da li hidrofobnost površine ćelije kvasca određuje sposobnost adhezije na abiotičke površine; (II) da li stepen hrapavosti kontaktne površine (nerđajućeg čelika i drveta) utiče na adheziju kvasaca; (III) da li promena temperature i medijuma utiče na adheziju ćelija kvasaca; (IV) da li primena biljnih ekstrakata utiče na adheziju kvasaca.

### 5.1. Hidrofobnost kvasaca (*Candida* spp., *Pichia* spp.) određuje sposobnost adhezije na abiotičke površine

#### 5.1.1. Korelacija između hidrofobnosti površine ćelije sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* i adhezije na polistiren površinu

Adezijska mikroorganizama na površine se smatra multifaktorskim procesom. Mnoge studije su pokazale da osobine površine ćelije, kao što je hidrofobnost, igraju važnu ulogu u inicijalnoj fazi mikrobne adhezije (Brugnoni i sar., 2007; Chae i sar., 2006; Li, 2003; Nguyen i sar., 2011). U našem istraživanju određena je hidrofobnost površine ćelije (eng. Cell Surface Hydrophobicity, CSH) sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* pomoću testa mikrobne adhezije na ugljovodonike (MATH) sa ciljem razumevanja veze između adhezije i hidrofobnosti.

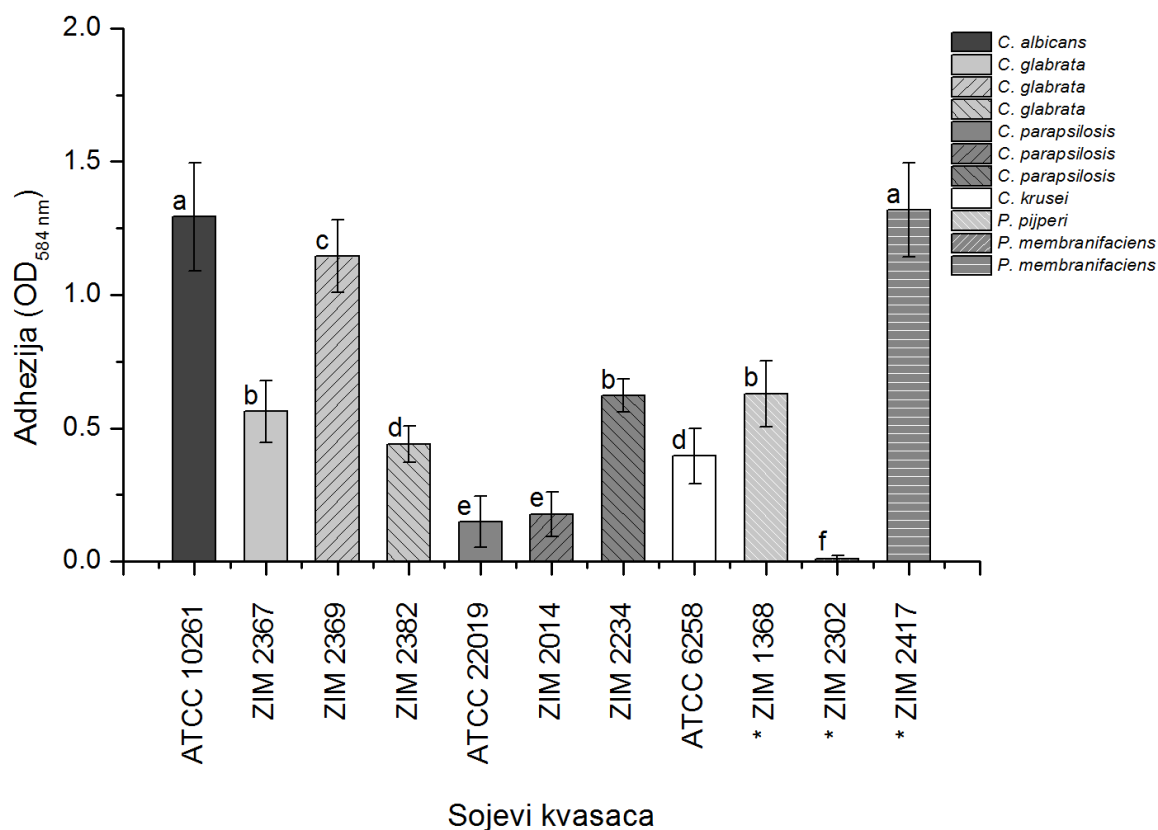
Rezultati su pokazali širok opseg vrednosti stepena hidrofobnosti testiranih sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* od 10% do 90%, kako je prikazano grafički na Slici 7 ( $P < 0.05$ ). Prema klasifikaciji koju su predložili Li i McLandsborough (1999) sojevi su klasifikovani u tri grupe. Većina sojeva je bila izrazito hidrofobna (vrednosti CSH veće od 55%), dok su sojevi ATCC 22019, ZIM 2234 i ZIM 2302 bili umerano hidrofobni sa vrednostima CSH između 30% i 54%. S druge strane, jedino referentni soj vrste *C. albicans* ATCC 10261 je bio hidrofilan. Interesantno je da je najadhezivniji kvasac *C. albicans* (Slika 8) imao najnižu vrednost CSH, što otvara pitanje da li je CSH prvenstveno odgovoran za potencijal adhezije. U našem istraživanju, hidrofobnost površine ćelije nije značajno u korelaciji sa količinom ćelija adheriranih na polistiren, ističući da se CSH ne može smatrati jedinstvenim prediktorom za adheziju. U pogledu korelacije između CSH i adhezije na polistiren, rezultati drugih autora su nesaglasni (Li, 2003; Silva-Dias i sar., 2015). Prethodne studije su pokazale da postoji pozitivna korelacija između hidrofobnosti i adhezije kvasaca *Candida* na plastične površine i ćelije domaćina, dok kod drugih korelacija nije utvrđena (Camacho i sar., 2007; Samaranayake i sar., 1995; Tomičić i sar., 2016).



Slika 7. Hidrofnobnost površine ćelije (cell surface hydrophobicity, CSH) sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* (\*) merena prema testu mikrobne adhezije na ugljovodonike (MATH). Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija tri nezavisna ponavljanja. Različita slova (a, b, c, d) označavaju značajne razlike između sojeva.

U ovom delu istraživanja cilj je bio da se proceni potencijal adhezije sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* na polistiren površinu. Rezultati stepena adhezije testiranih sojeva na polistiren dobijeni korišćenjem metode bojenja kristal violetom prikazani su grafički na Slici 8. Očigledno je da su svi sojevi iz roda *Candida* i većina sojeva iz roda *Pichia* imali sposobnost adhezije na polistiren, iako su razlike zabeležene na nivou soja i vrste. Najveću sposobnost adhezije na polistiren površinu je pokazao soj vrste *C. albicans* ATCC 10261, a zatim slede druge testirane vrste: *C. glabrata*, *C. krusei* i *C. parapsilosis*. U poređenju sa ne-*Candida albicans* *Candida* vrstama, *C. albicans* je već okarakterisana da pokazuje veću sposobnost adhezije i efikasnost infekcije (Hawser i Douglas, 1994; Kuhn i sar., 2002a). Poznato je da je *C. albicans* adhezivnija u obliku hifa, kada izražava adhezine poput Als1, Als3, i Hwp1 (Dranginis i sar., 2007; Nobile i Mitchell, 2006; Tronchin i sar., 2008). U slučaju sojeva iz

roda *Pichia* jedino je soj ZIM 2302 bio potpuno ne-adhezivan. Takođe je primećeno da su sojevi vrsta *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *P. membranifaciens* pokazali visok stepen heterogenosti unutar vrste u svojoj sposobnosti da adheriraju na polistiren. Ova varijacija unutar vrste kod *C. glabrata* i *C. parapsilosis* u njihovoj adherenciji na različite biomaterijale je prethodno objavljena (Bernardis i sar., 1999; Luo i Samaranyake, 2002; Silva i sar., 2010; Trofa i sar., 2008). Takvi nalazi nesumljivo odražavaju inherentne fiziološke razlike između vrsta i sojeva i mogu imati značaj u kontaminaciji u formiranju biofilma a i patogenom potencijalu.



Slika 8. Adhezija sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* (\*) na polistiren površinu merena korišćenjem kristal violet testa. Eksperimenti su izvedeni sa dvanaest nezavisnih ponavljanja i prikazana je srednja vrednost optičke gustine (OD) sa standardnom devijacijom. Različita slova (a, b, c, d...) označavaju značajne razlike između sojeva.

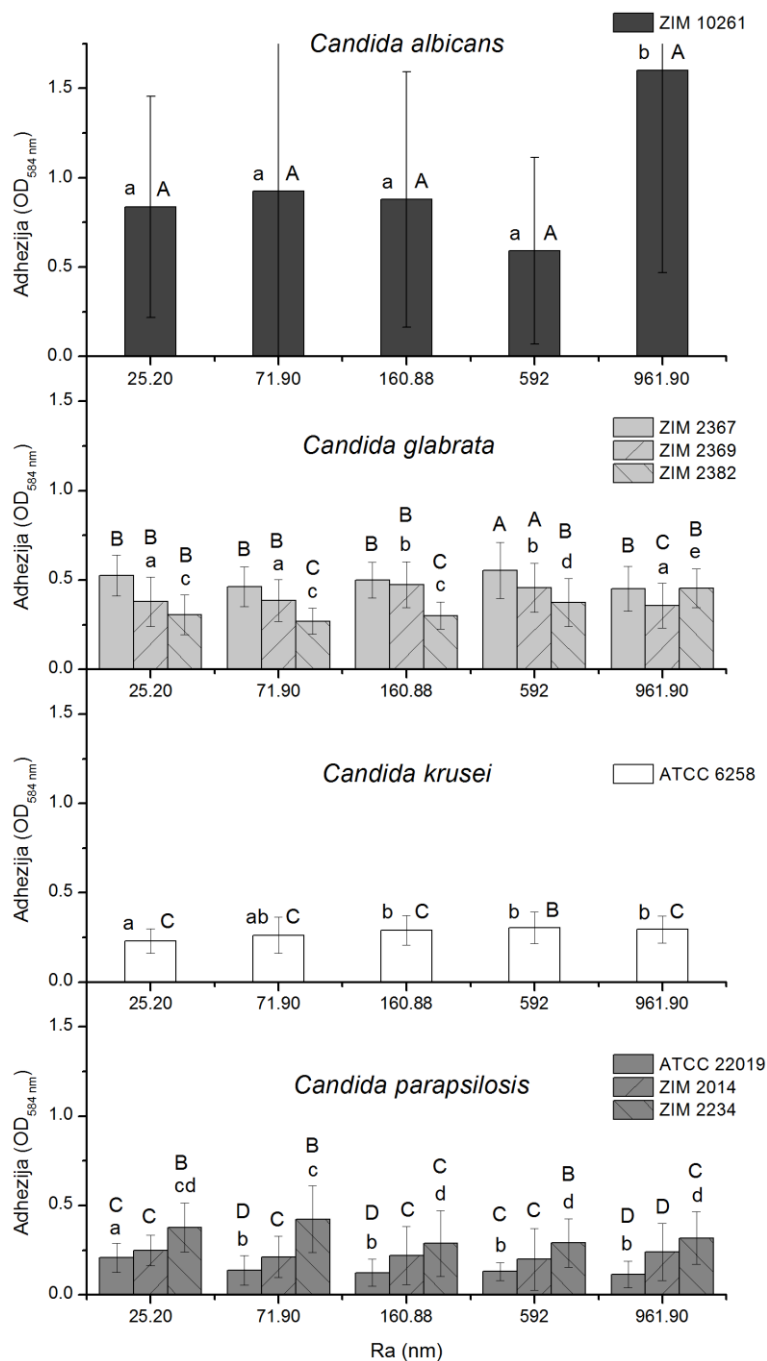
## 5.2. Stepen hrapavosti kontaktnih površina (nerđajućeg čelika i drveta) utiče na adheziju kvasaca

### 5.2.1. Uticaj hrapavosti površine nerđajućeg čelika na adheziju sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia*

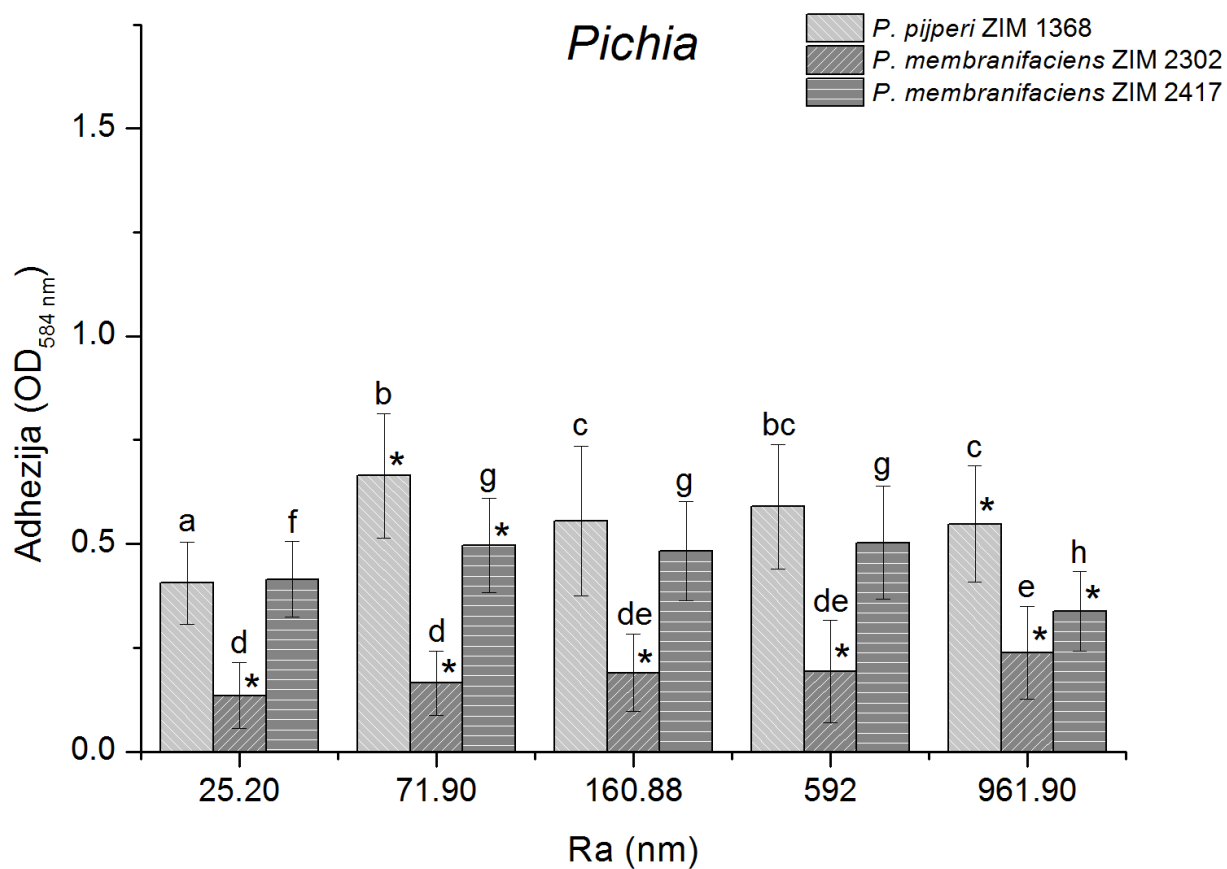
Grafički prikaz na Slikama 9 i 10 prikazuje rezultate adhezije sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* na pet tipova diskova od nerđajućeg čelika (AISI 304, 5 mm prečnika i 1mm debljine) sa različitim stepenom hrapavosti površine ( $R_a = 25.20 - 961.90$  nm), dobijene korišćenjem metode bojenja kristal violetom. Uočeno je da su različite vrste pokazale varijaciju u svojoj sposobnosti adhezije. Mi smo verifikovali da kvasac *C. albicans* pokazuje visok stepen adhezije na površine nerđajućeg čelika, zatim slede: *C. glabrata*, *C. krusei* i *C. parapsilosis* ( $P < 0.05$ ), što je u saglasnosti sa rezultatima adhezije na polistiren površinu prikazanim na Slici 8. U slučaju sojeva iz roda *Pichia*, sojevi vrste *P. membranifaciens* su bili manje adhezivni na nerđajući čelik u poređenju sa sojem vrste *P. pijperi* ( $P < 0.05$ ), međutim, kod rezultata adhezije na polistiren jedan soj vrste *P. membranifaciens* ZIM 2417 je imao veću tendenciju za adheziju nago soj vrste *P. pijperi* ZIM 1368 (Slika 8). Dobijeni rezultati takođe pokazuju da je hrapavost površine nerđajućeg čelika uticala na adheziju većine sojeva što je naročito evidentno za sojeve ATCC 10261, ZIM 2382 i sve testirane sojeve roda *Pichia* ( $P < 0.05$ ), dok na sojeve ZIM 2367 i ZIM 2014 nije imala uticaja ( $P > 0.05$ ).

Istraživanja koja su sproveli drugi istraživači dovela su do sličnih zaključaka u pogledu sposobnosti vrsta roda *Candida* da adheriraju na abiotičke površine (Estivill i sar., 2011; Silva i sar., 2010; Tomičić i sar., 2017). Međutim, studije o formiranju biofilma kvasaca *Candida* i *Pichia* na površinama od nerđajućeg čelika još uvek nisu toliko obilne. U našem istraživanju otkriveno je da kvasac *C. albicans* ispoljava veću sposobnost adhezije na polistiren i nerđajući čelik u odnosu na druge vrste iz istog roda. Ovi nalazi su u saglasnosti sa drugima, koji su objavili da *C. albicans* pokazuje dobar rast biofilma na površinama PVC kateterskih diskova (Hawser i Douglas, 1994) i na silikonskim elastomernim diskovima (Kuhn i sar., 2002a). Za razliku od naših studija, Shin i sar. (2002) su primetili da je formiranje biofilma na polistiren najčešće kod izolata *C. parapsilosis* (73%), zatim *C. glabrata* (28%) i *C. albicans* (8%). Takođe je objavljeno da *Candida* spp. brže adheriraju na hidrofobne površine kao što su teflon i druge plastike nego na hidrofilne materijale kao što su staklo ili metali (Cuéllar-Cruz i sar., 2012). Poznato je da formiranje biofilma u velikoj meri zavisi od vrste, soja i uslova okoline kao što su pH, sastav medijuma i kiseonik (Jain i sar., 2007; Thein i sar., 2007). Dakle, treba naglasiti da je korišćeno samo nekoliko izolata i da drugi izolati koji pripadaju istoj vrsti se mogu drugačije ponašati u procesu adhezije na površinu.

Prema nekim autorima (Bohinc i sar., 2014; Carlen i sar., 2001; Ortega i sar., 2008; Verran i Maryan, 1997), mikrobna adhezija zavisi od hrapavosti kontaktne površine. Kao što je pokazano u ovom istraživanju (Slike 9 i 10), na adheziju sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* značajno je uticala hrapavost površine nerđajućeg čelika ( $P < 0.05$ ). Nasuprot tome, Hilbert i sar. (2003) su otkrili da hrapavost površine nerđajućeg čelika u opsegu Ra vrednosti od 0.01 do 0.9  $\mu\text{m}$  nije značajno uticala na adheziju kod *Pseudomonas* sp., *L. monocytogenes* i *Candida lipolytica*. Flint i sar. (2000) su takođe pokazali da adhezija termorezistentnih *Streptococcus* ne zavisi od hrapavosti površine ( $Ra = 0.5\text{-}3.3 \mu\text{m}$ ). Međutim, autori sugerišu da neke nepravilnosti na površini mogu pružiti zaštitu ćelijama u pukotinama površine, što može biti povezano sa teškoćama u čišćenju površine (Korber i sar., 1997), dovodeći do brzog ponovnog rasta biofilma.



Slika 9. Adhezija sojeva kvasaca *Candida* na nerđajući čelik sa različitim stepenom hrapavosti površine (Ra) merena korišćenjem kristal violet testa. Eksperimenti su izvedeni sa dvanaest nezavisnih ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost optičke gustine (OD) sa standardnom devijacijom. Različita slova (a, b, c, d...) označavaju značajne razlike između Ra za svaki soj, dok različita slova (A, B, C, D...) ukazuju na to da postoji značajna razlika između vrsta roda *Candida* na istoj Ra.

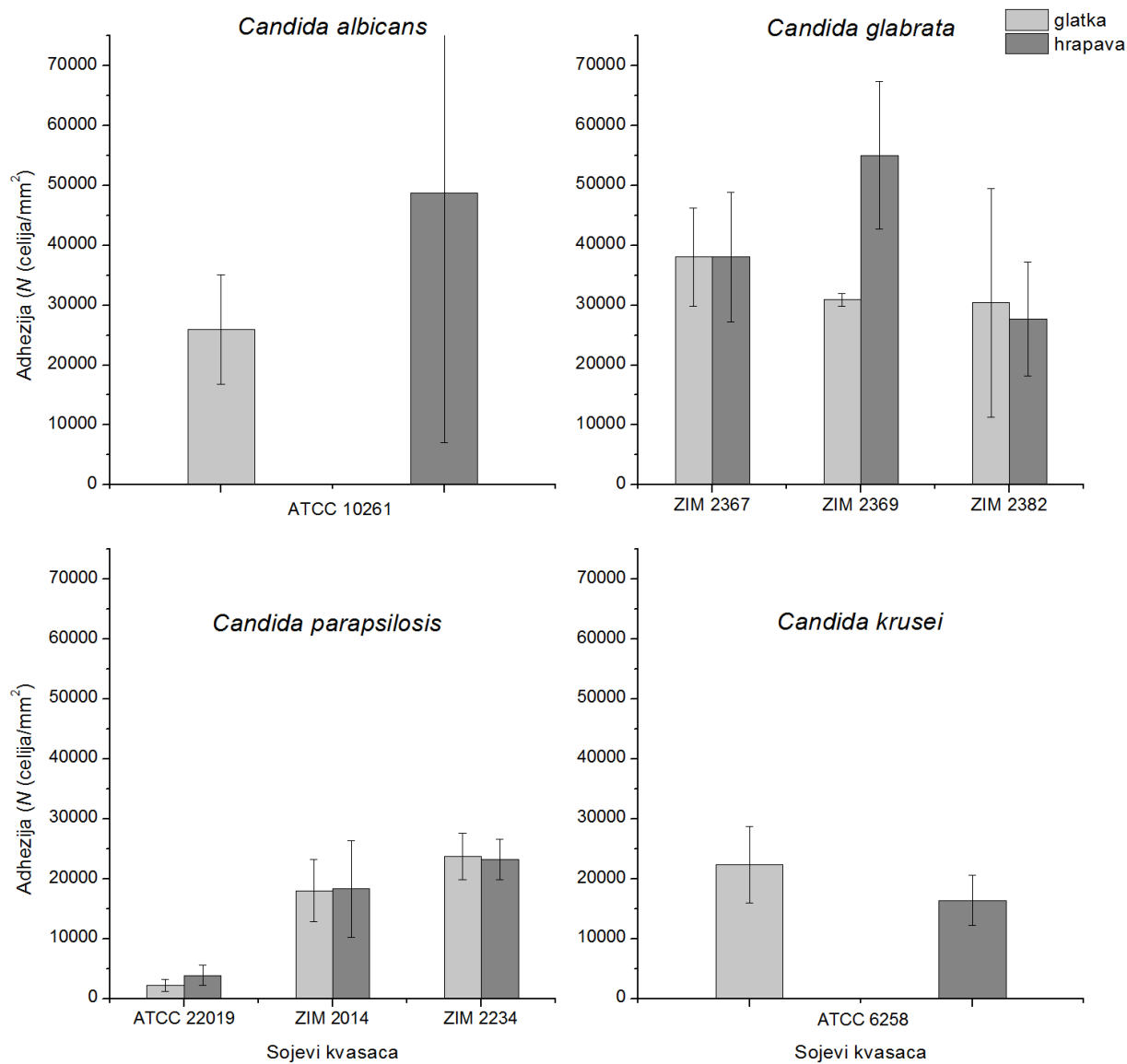


Slika 10. Adhezija sojeva kvasaca *Pichia* na nerđajući čelik sa različitim stepenom hrapavosti površine (Ra) merena korišćenjem kristal violet testa. Eksperimenti su izvedeni sa dvanaest nezavisnih ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost optičke gustine (OD) sa standardnom devijacijom. Različita slova (a, b, c, d...) označavaju značajne razlike između Ra za svaki soj, dok zvezdice (\*) ukazuju na to da postoji značajna razlika između sojeva roda *Pichia* na istoj Ra.

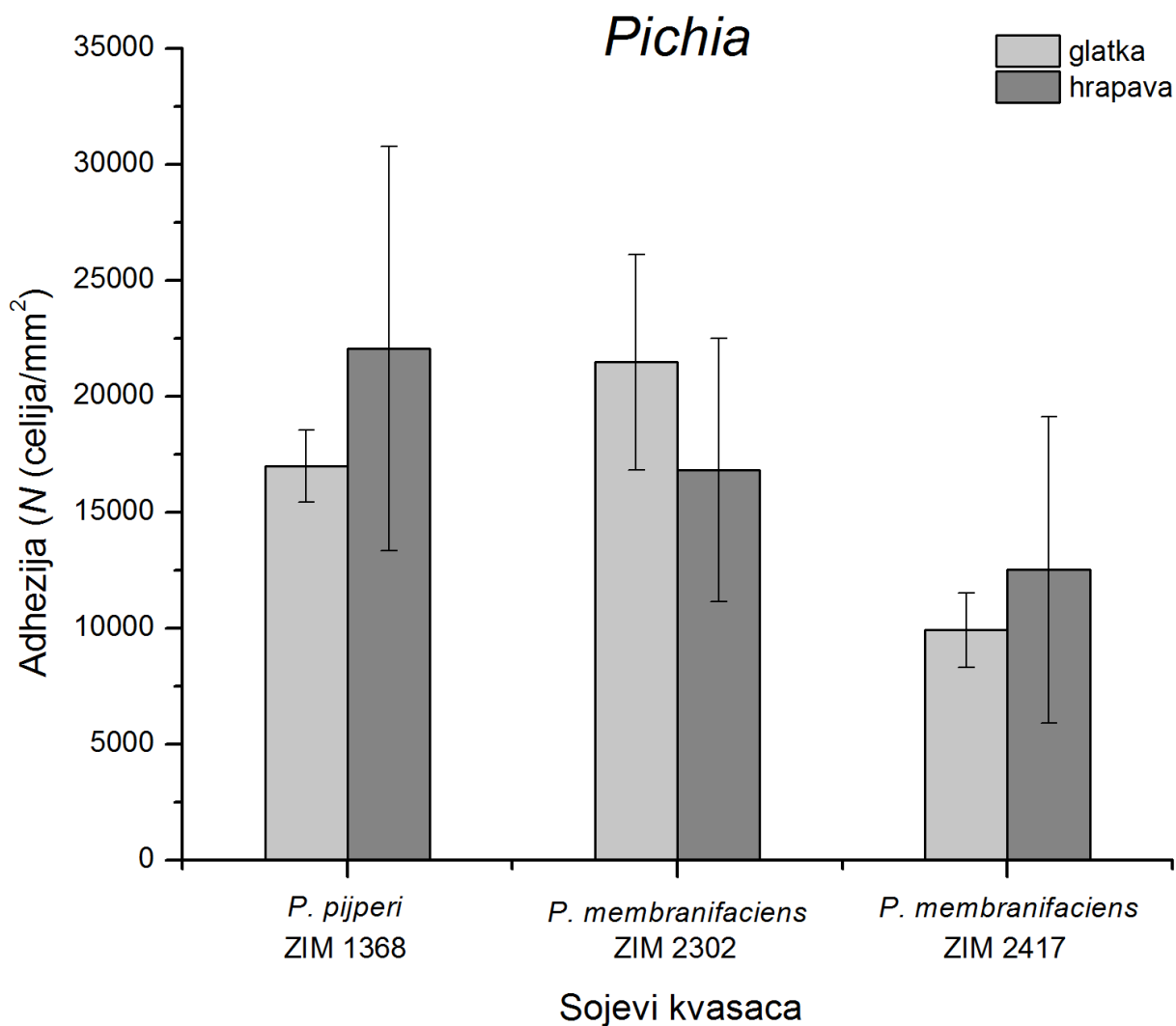


### 5.2.2. Uticaj hrapavosti površine drveta na adheziju sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia*

Evaluacija adhezije sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* u našem istraživanju je otkrila da ovi kvasci imaju sposobnost da adheriraju na drvene površine, iako u različitom stepenu u zavisnosti od vrste i soja. Slika 11 pokazuje rezultate broja adheriranih ćelija (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija) sojeva iz roda *Candida* na glatke i grube površine drveta dobijene automatskim brojanjem vijabilnih ćelija pomoću mikroskopa. Statistička analiza je pokazala da su sojevi vrsta *C. albicans* ATCC 10261 i *C. glabrata* (ZIM 2367, ZIM 2369 i ZIM 2382) ispoljili mnogo veću sklonost za adherenciju na oba tipa drvenih površina nego sojevi vrsta *C. parapsilosis* (ATCC 22019, ZIM2014 i ZIM 2234) i *C. krusei* ATCC 6258 ( $P < 0.05$ ). Saglasno rezultatima dobijenim kod adhezije na polistiren i površine nerđajućeg čelika pronađena je značajna varijacija među sojevima vrste *C. parapsilosis*. Soj ATCC 22019 je imao manju sposobnost adhezije na drvene površine u odnosu na sojeve ZIM 2014 i ZIM 2234 ( $P < 0.05$ ). S druge strane, sojevi vrste *C. glabrata* su u ekvivalentnoj količini adherirali na drvene površine ( $P > 0.05$ ). Neke prethodne studije su takođe pokazale varijacije među sojevima vrste *C. parapsilosis* u pogledu adhezije na abiotičke površine (Bernardis i sar., 1999; Panagoda i sar., 2001). U slučaju kod roda *Pichia*, svi testirani sojevi su imali sposobnost da adheriraju na oba tipa drvenih površina kao što je prikazano na Slici 12. Sojevi ZIM 1368 i ZIM 2302 su u većoj meri adherirali na glatkoj površini u odnosu na soj ZIM 2417 ( $P < 0.05$ ). Dakle, znanje o sposobnosti *Candida* spp. i *Pichia* spp. da se vežu na drvene površine je veoma važno u različitim postrojenjima prehrambene industrije zbog toga što ovi mikroorganizmi mogu biti izvor kontaminacije hrane. Kao što je prethodno pomenuto, poznato je da osobina površine materijala, kao što je hrapavost, može značajno uticati na adheziju kvasaca. U nekim istraživanjima je otkriveno da je stepen adhezije kvasca *C. albicans* na protezama sa različitim stepenom hrapavosti površine bio veći na grubim nego na glatkim površinama (Radford i sar., 1998; Verran i Maryan, 1997). Međutim, mi smo pokazali da hrapavost drvenih površina nije značajno uticala na adheziju sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* ( $P > 0.05$ ), kako je prikazano na Slikama 11 i 12. Takvi rezultati su u saglasnosti sa prethodnim studijama koje su pokazale da na adheziju bakterija nije uticala hrapavost površine materijala (Hahnel i sar., 2009; Li i Logan, 2004). Razlog za ove kontradiktorne nalaze može biti činjenica da na mikrobnu adheziju utiču i druge osobine različitih materijala i metode koje se koriste za kvantifikaciju adhezije.



Slika 11. Adhezija sojeva kvasaca *Candida* na glatke i hrapave drvene površine. Eksperimenti su izvedeni sa tri nezavisna ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost broja adheriranih ćelija (N) po mm<sup>2</sup> drvene površine sa standardnom devijacijom.



Slika 12. Adhezija sojeva kvasaca *Pichia* na glatke i hrapave drvene površine. Eksperimenti su izvedeni sa tri nezavisna ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost broja adheriranih ćelija (N) po mm<sup>2</sup> drvene površine sa standardnom devijacijom.

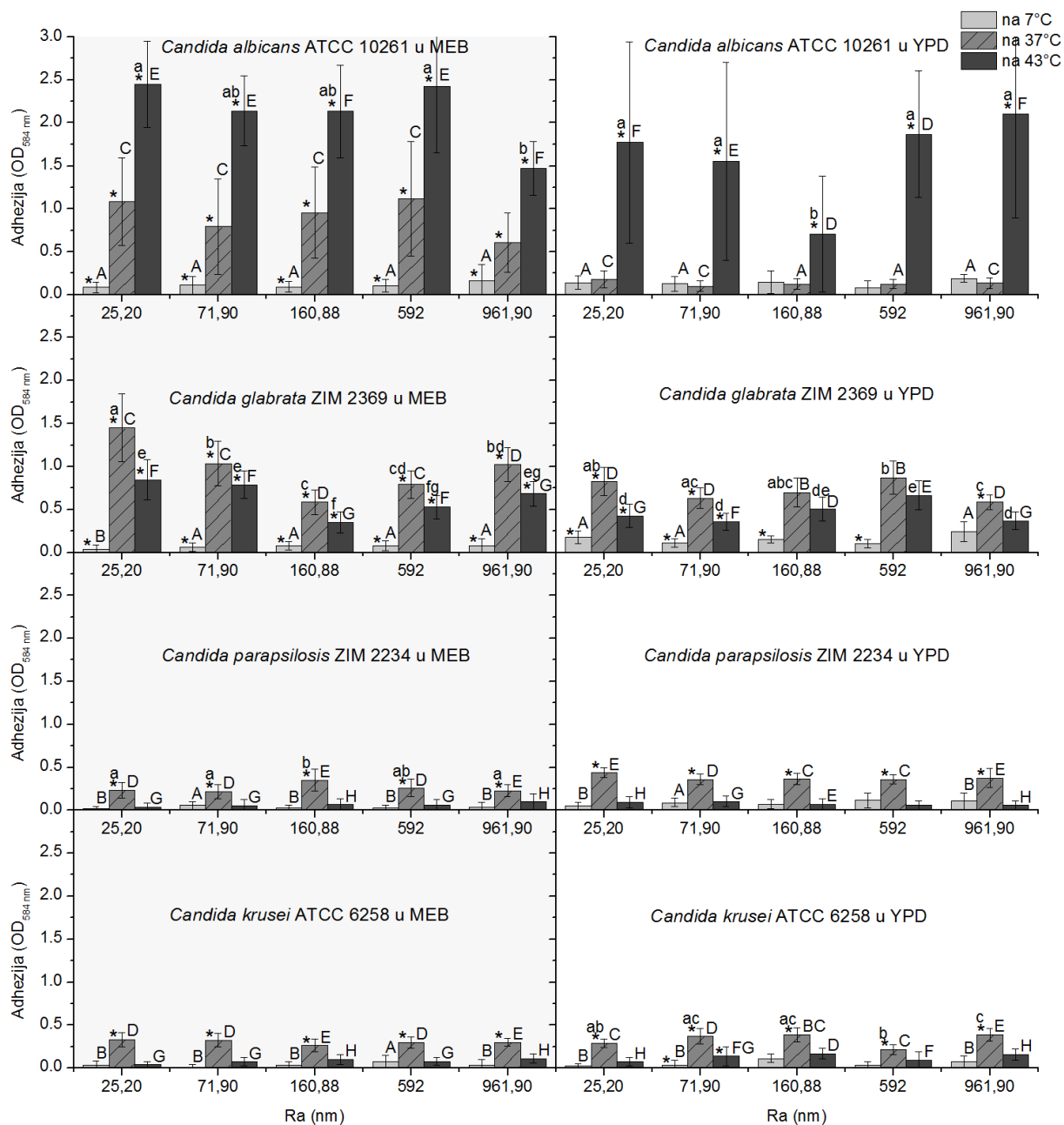
### 5.3. Promena temperature i medijuma utiče na adheziju ćelija kvasaca

Mikrobna adhezija na površini od nerđajućeg čelika je regulisana različitim fizičkim, hemijskim i biohemijskim faktorima. Nasuprot obimnoj literaturi koja opisuje bakterijsku adheziju, malo pažnje je posvećeno kvascima kao adhezivnim agensima, naročito vrstama iz rodova *Candida* i *Pichia*, koji su važni za procenu higijenskog statusa i sadrže patogene i tehnološki nepogodne vrste, koje mogu uzrokovati kvarenje hrane. Stoga, poznavanje

adhezivnog ponašanja kvasaca je od velikog značaja ne samo za prehrambenu industriju, nego i u kliničkim ustanovama u cilju definisanja najefikasnijih strategija čišćenja i dezinfekcije. Cilj ovog dela studije je da pruži bolje razumevanje procesa adhezije sojeva iz rodova *Candida* i *Pichia* na površine nerđajućeg čelika pod različitim uslovima rasta. Ukupno četiri odabrana soja iz roda *Candida* i dva soja iz roda *Pichia* su korišćena kako bi se ispitaio uticaj različitih temperatura (7°C, 37°C, 43°C za sojeve roda *Candida* i 7°C, 27°C, 32°C za sojeve roda *Pichia*) i medijuma za rast (Malt Extract Broth (MEB) medijumu i Yeast Peptone Dextrose (YPD) medijum) na adheziju kvasaca.

### 5.3.1. Uticaj medijuma za rast i temperature na adheziju sojeva kvasaca *Candida*

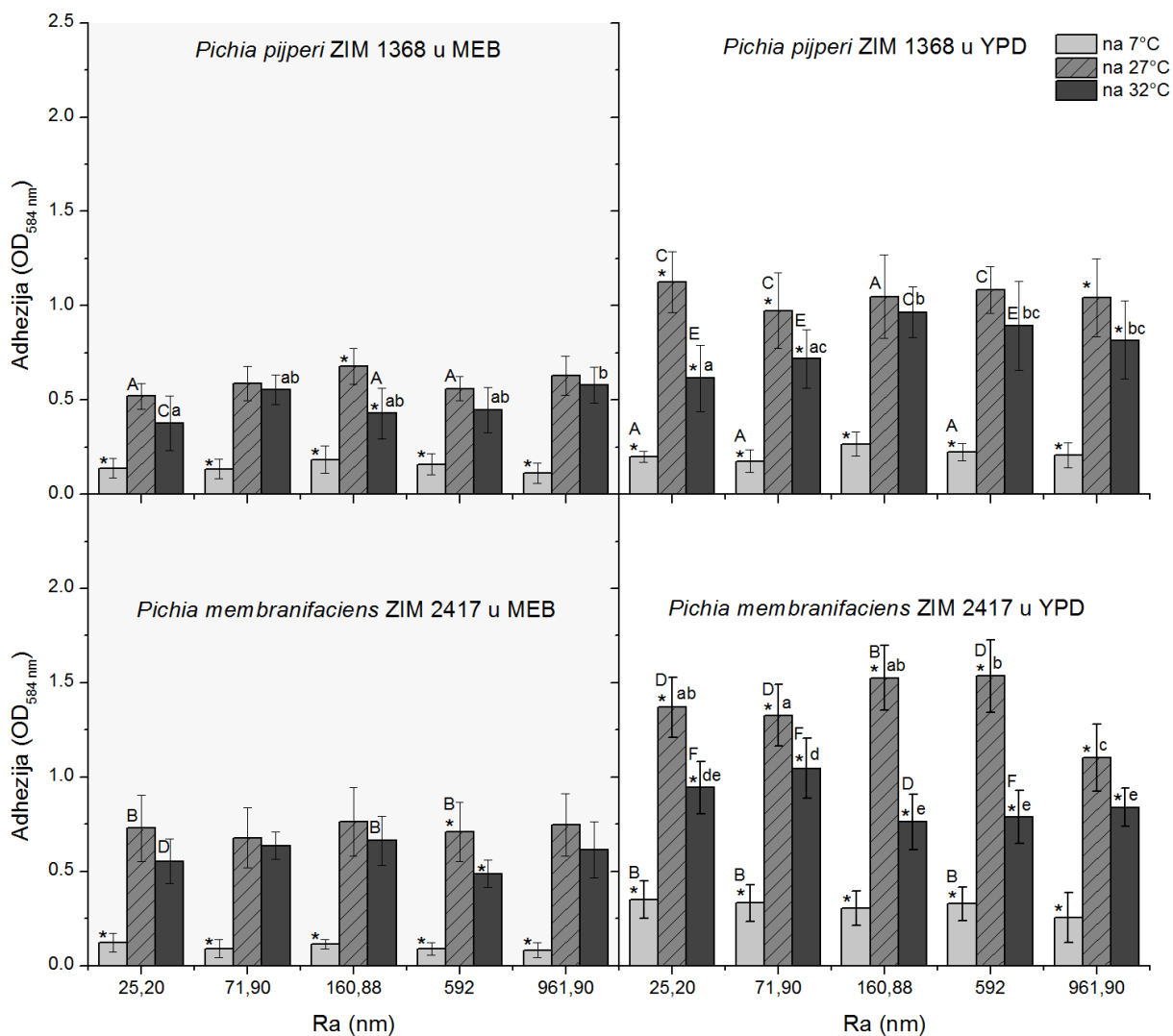
Uticaj tri različite temperature (7°C, 37°C i 43°C) na adheziju sojeva kvasaca *Candida* uzgajanih u Malt Extract Broth (MEB) medijumu ili Yeast Peptone Dextrose (YPD) medijumu na površine od nerđajućeg čelika je ispitan. Slika 13 prikazuje rezultate količine adheriranih ćelija (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija OD na 584 nm) testiranih sojeva na površine nerđajućeg čelika sa različitim stepenom hrapavosti površine ( $R_a = 25.20-961.9$  nm). Različite OD vrednosti su dobijene u zavisnosti od soja, medijuma za rast, temperature i hrapavosti površine nerđajućeg čelika, što ukazuje da sojevi ispoljavaju različita ponašanja u sposobnosti adhezije pod različitim uslovima rasta. Na osnovu dobijenih rezultata primećano je da je sadržaj hranljivih materija u medijumu značajno uticao na količinu adheriranih ćelija. Statistička analiza je pokazala da je adhezija kvasaca *C. albicans* ATCC 10261 i *C. glabrata* ZIM 2369 bila veća u MEB medijumu, dok je kod kvasaca *C. parapsilosis* ZIM 2234 i *C. krusei* ATCC 6258 bila u YPD medijumu ( $P < 0.05$ ). U pogledu uticaja temperature, referentni soj vrste *C. albicans* ATCC 10261 je adherirao u znatno većem stepenu na površine nerđajućeg čelika u oba medijuma pri temperaturi 43°C u poređenju sa 7°C i 37°C ( $P < 0.05$ ). S druge strane, kvasci *C. glabrata* ZIM 2369, *C. parapsilosis* ZIM 2234 i *C. krusei* ATCC 6258 su pokazali različito ponašanje sa statistički značajno većom adhezijom na temperaturi 37°C nago na 7°C i 43°C ( $P < 0.05$ ). Generalno za sve sojeve, najslabija adhezija je bila na 7°C. Važno je napomenuti da su kvasci *C. parapsilosis* ZIM 2234 i *C. krusei* ATCC 6258 imali manju sposobnost adhezije na površine od nerđajućeg čelika u odnosu na kvasce *C. albicans* ATCC 10261 i *C. glabrata* ZIM 2369.



Slika 13. Uticaj medijuma za rast i temperature na adheziju sojeva iz roda *Candida* na površine nerđajućeg čelika sa različitim stepenom hrapavosti površine (Ra). Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između temperatura na istoj Ra i medijumu, dok različita slova (a, b, c, d ...) označavaju značajne razlike između Ra na istoj temperaturi i medijumu za svaki soj. Različita slova (A, B, C, D...) ukazuju da postoji značajna razlika između vrsta na istoj Ra, temperaturi i medijumu ( $P < 0.05$ ). Neoznačeni izrazi nisu statistički značajni. Skraćenice: MEB, Malt Extract Broth; YPD, Yeast Peptone Dextrose; Ra, hrapavost površine; OD, optička gustina.

### 5.3.2. Uticaj medijuma za rast i temperature na adheziju sojeva kvasaca *Pichia*

Slika 14 poredi adhezivno ponašanje kvasaca *P. pijperi* ZIM 1368 i *P. membranifaciens* ZIM 2417 koji su uzgajani u Malt Extract Broth (MEB) medijumu ili Yeast Peptone Dextrose (YPD) medijumu pri temperaturama 7°C, 27°C i 32°C na površinama od nerđajućeg čelika sa različitim stepenom hrapavosti ( $R_a = 25.20-961.9$  nm). Različite OD vrednosti su dobijene u zavisnosti od soja, medijuma za rast, temperature i hrapavosti površine nerđajućeg čelika. Primećeno je da je soj ZIM 2417 adherirao u znatno većoj meri u odnosu na soj ZIM 1368. Međutim, oba soja su pokazala slično ponašanje u sposobnosti adhezije na površine nerđajućeg čelika pod testiranim uslovima rasta. Evidentno je da je sadržaj hranljivih materija u medijumu značajno uticao na količinu adheriranih ćelija testiranih sojeva kvasaca ( $P < 0.05$ ). Najefikasniji medijum u promovisanju adhezije je bio YPD medijum. Podaci takođe ukazuju da je temperatura rasta veoma važan faktor koji je značajno uticao na adheziju ćelija. Sposobnost adhezije kvasaca *P. pijperi* ZIM 1368 i *P. membranifaciens* ZIM 2417 tokom rasta u oba medijuma je bila izrazito veća na temperaturi 27°C u poređenju sa 7°C i 32°C ( $P < 0.05$ ), dok je najslabija bila na 7°C.



Slika 14. Uticaj medijuma za rast i temperature na adheziju sojeva iz roda *Pichia* na površine nerđajućeg čelika sa različitim stepenom hrapavosti površine (Ra). Zvezdice (\*) označavaju značajne razlike između temperatura na istoj Ra i medijumu, dok različita slova (a, b, c, d ...) označavaju značajne razlike između Ra na istoj temperaturi i medijumu za svaki soj. Različita slova (A, B, C, D...) ukazuju da postoji značajna razlika između vrsta na istoj Ra, temperaturi i medijumu ( $P < 0.05$ ). Neoznačeni izrazi nisu statistički značajni. Skraćenice: MEB, Malt Extract Broth; YPD, Yeast Peptone Dextrose; Ra, hrapavost površine; OD, optička gustina.

U prehrambenom i kliničkom okruženju kvasci mogu biti izloženi različitim hranljivim supstratima. Dobro je poznato da mnogi unutrašnji i spoljašnji faktori utiču na adheziju, među njima i sastav medijuma (Hawser i Douglas, 1994; Jain i sar., 2007; McCourtie i Douglas, 1981). Prethodne studije su uglavnom bile zasnovane na korišćenju jednog medijuma, međutim, mi smo pokazali da je adhezivnost u velikoj meri zavisna od medijuma za rast. Sastav medijuma nije imao isti uticaj na sve testirane sojeve kvasaca *Candida* i *Pichia*, bar ne u istoj meri (Slika 15 i 16). Količina adheriranih ćelija kvasaca *C. albicans* i *C. glabrata* na površinama od nerđajućeg čelika je bila znatno veća u MEB medijumu, dok je za kvasce *C. parapsilosis* i *C. krusei* bila u YPD medijumu. U slučaju kod roda *Pichia*, kvasci *P. pijperi* i *P. membranifaciens* su u većoj meri adherirali u YPD medijumu. Ovi nalazi su u saglasnosti sa drugim istraživanjima čiji pronalasci ukazuju da hranljive materije i druge komponente u medijumu utiču na adheziju kvasaca na biotičke i abiotičke površine (Abu-Elteen, 2005; McCourtie i Douglas, 1981; Samaranayake i MacFarlane, 1982). U studiji o sojevima kvasca *C. albicans* izolovani iz pacijenata, McCourtie i Douglas (1981) su uočili dobru adheziju ćelija kvasaca uzgajanih u medijumu koji sadrži 50 mM glukoze, međutim, adhezija je značajno poboljšana kada su ćelije gajene u medijumu koji sadrži visoke koncentracije galaktoze i saharoze (500 mM). Mehanizmi pomoću kojih ugljeni hidrati (Abu-Elteen, 2005; Pires i sar., 2001) mogu povećati adheziju mogu biti povezani sa dodatnom proizvodnjom fibrilarno-flokularnog površinskog sloja, kako je navedeno za *C. albicans* (Tronchin i sar., 1984). Glukoza takođe može promovisati proizvodnju kiselina i niži pH, uz posledično aktiviranje kiselinskih proteinaza i ekstracelularnih fosfolipaza, faktora uključenih u adheziju kvasaca (Abu-Elteen i sar., 2001; Samaranayake i sar., 1986). Dakle, možemo spekulirati o razlozima za drugačiji uticaj nutritivnog sadržaja medijuma za rast. Jedno od mogućih objašnjenja za različite reakcije kvasaca na uslove rasta može biti činjenica da različite pH vrednosti medijuma mogu uticati na adheziju (Karam El-Din i sar., 2012).

Poznato je da kvasci mogu rasti u širokom rasponu temperatura. Na osnovu naših rezultata (Slika 15), ne-*Candida albicans* *Candida* vrste su u najvećoj meri adherirale na temperaturi 37°C, dok je soj vrste *C. albicans* pokazao različito ponašanje sa izrazito većom tendencijom za adheziju na 43°C. Ovo zapažanje nije iznenađujuće uzimajući u obzir da je poreklo većine ispitivanih sojeva kvasaca *Candida* iz čoveka. Vredno je napomenuti činjenicu da je sposobnost adhezije na nerđajući čelik na povišenoj temperaturi (iznad 37°C) takođe važna virulentna osobina *Candida* (Li i sar., 2007), što je veoma važno u kliničkom okruženju posebno kod pacijenata sa stentovima (Kojic i Darouiche, 2004; Ramage i sar., 2005). S druge strane, u ovom istraživanju oba soja iz roda *Pichia* su adherirala na temperaturama između 7°C i 32°C (Slika 16), tipičnim temperaturama koje se koriste u prehrambenoj industriji tokom obrade i skladištenja, što ukazuje na visok potencijal kvarenja od strane ovih kvasaca. Zbog ovih razloga, naši rezultati bi mogli imati praktičnu primenu prilikom suočavanja sa



higijenskim i sanitarnim pitanjima vezanim za adheziju *Pichia* spp. kao i *Candida* spp. u prehrambenoj industriji i ukazuju na značaj temperature kao faktora. Istraživanja koja su sprovedli drugi istraživači (Karam El-Din et al., 2012; Kimura and Pearsall, 1978; Luo and Samaranyake, 2002) dovela su do sličnih zaključaka u pogledu uticaja temperature na vezivanje kvasaca na površine.

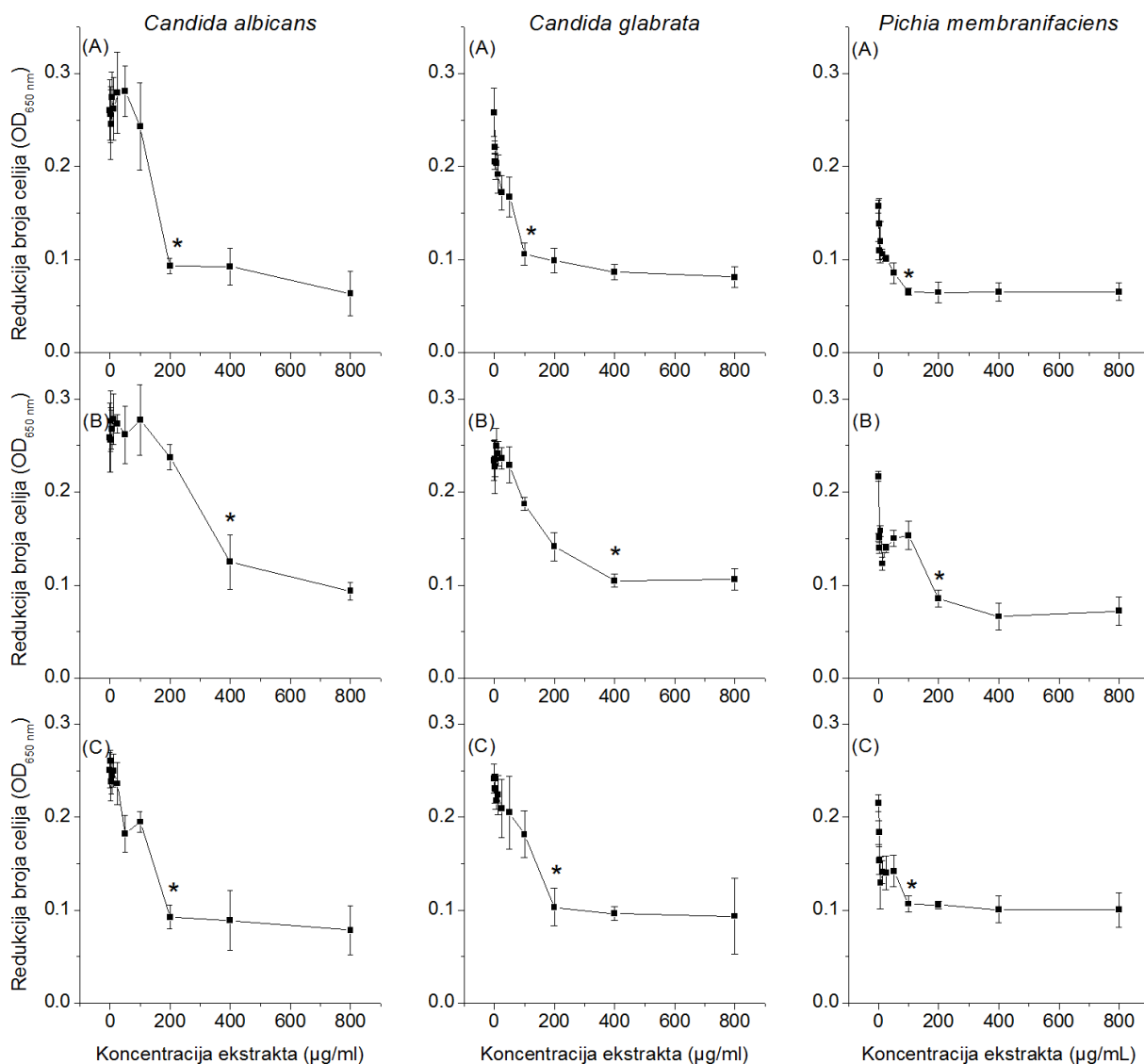
#### 5.4. Aplikacija biljnih ekstrakata utiče na adheziju kvasaca (*Candida* spp., *Pichia* spp.) na površini od nerđajućeg čelika

Obilje rasta neželjenih kvasaca u postrojenjima za preradu hrane može dovesti do problema u kvalitetu i sigurnosti uz značajne finansijske gubitke. Mnoge strategije za očuvanje hrane, kao što su zamrzavanje, smanjenje aktivnosti vode, ograničenje hranljivih materija, acidifikacija, fermentacija, pasterizacija ili sintetička antimikrobna sredstva tradicionalno se koriste za kontrolu mikrobnog kvarenja u namirnicama, ali kontaminacija hrane i kvarenje od strane mikroorganizama je problem koji treba adekvatno kontrolisati (Negi, 2012). Stoga, postoji potreba za novim agensima koji mogu inhibirati rast i razvoj biofilma kvasaca. Upotreba biljnih ekstrakata sa poznatim antimikrobnim svojstvima može biti od velikog značaja u očuvanju hrane. Uzimajući ovo u obzir, ovaj deo istraživanja je sproveden kako bi se procenila antimikrobna svojstva biljnih ekstrakata prema kvascima *C. albicans*, *C. glabrata* i *P. membranifaciens* i njihovom biofilmu.

##### 5.4.1. Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata

Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata *Humulus lupulus*, *Alpinia katsumadai* i *Evodia rutaecarpa* na odabrane sojeve kvasaca je određena prema CLSI metodi. Različite vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) biljnih ekstrakata su primećene kod sojeva kao što je prikazano grafički na Slici 15.

Mogućnost antimikrobne aktivnosti ekstrakata *A. katsumadai*, *E. rutaecarpa* i *H. lupulus* skoro da nije istražena, osim studija objavljenih za bakterije (Klančnik i sar. 2012; Kramer i sar. 2014; Bezek i sar. 2016). Sa posebnim osvrtom na kvasce *C. albicans*, *C. glabrata* i *P. membranifaciens*, prethodne studije o antimikrobnoj aktivnosti ovih ekstrakata nisu objavljene. Na osnovu dobijenih MIC vrednosti u našem ispitivanju, testirani ekstrakti su bili efikasni u inhibiciji kvasaca, što ukazuju da su *A. katsumadai*, *E. rutaecarpa* i *H. lupulus* obećavajuće biljke sa antigljivičnim dejstvom na kvasce *C. albicans*, *C. glabrata* i *P. membranifaciens*.



Slika 15. Antimikrobna aktivnost ekstrakata *Humulus lupulus* (A), *Alpinia katsumadai* (B) i *Evodia rutaecarpa* (C) prema kvascima *Candida albicans* ATCC 10261, *Candida glabrata* ZIM 2369 i *Pichia membranifaciens* ZIM 2417. Eksperimenti su izvedeni sa osam nezavisnih ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost optičke gustine (OD) sa standardnom devijacijom. Zvezdice (\*) označavaju vrednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).

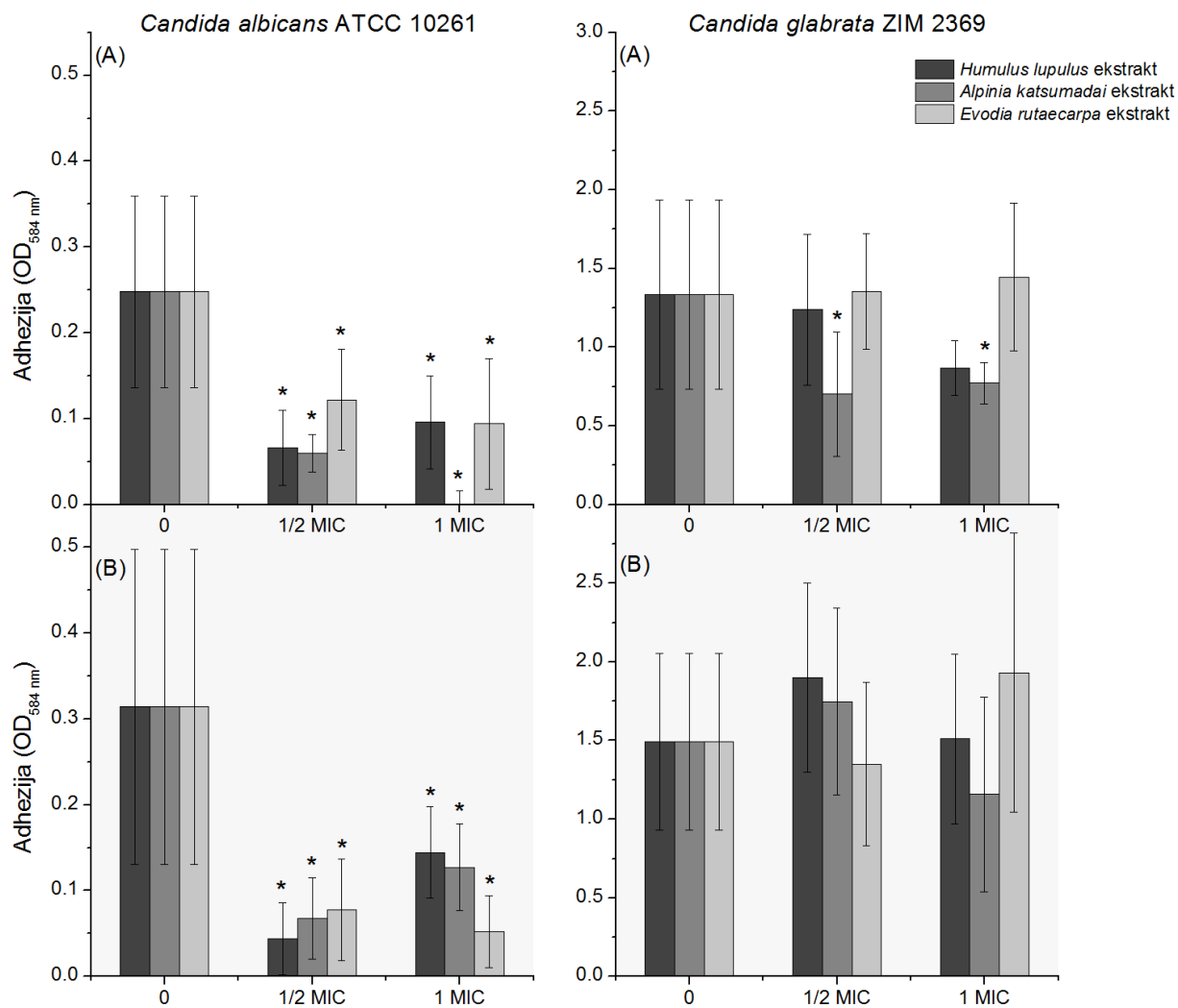
#### 5.4.2. Uticaj biljnih ekstrakata na biofilmove kvasaca *C. albicans*, *C. glabrata* i *P. membranifaciens*

Na osnovu rezultata antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata odabrane su koncentracije koje odgovaraju vrednostima  $1/2 \times \text{MIC}$  i  $1 \times \text{MIC}$  u cilju ispitivanja njihovog uticaja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm.

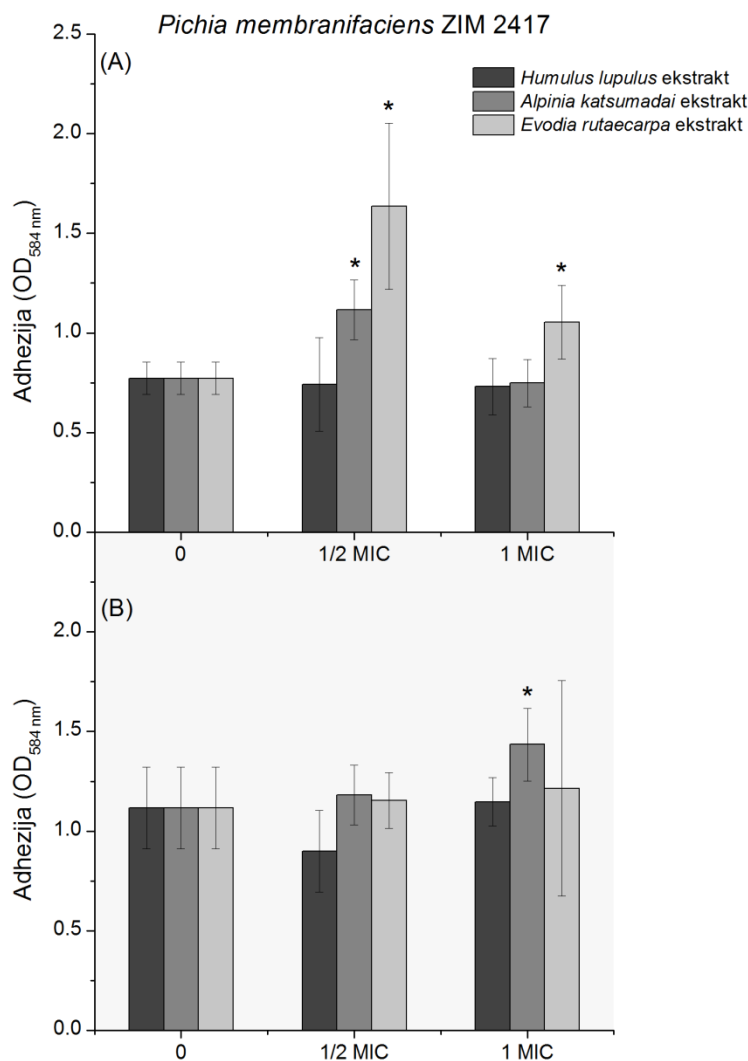
Prema našem saznanju nisu zabeleženi podaci koji ukazuju da ekstrakti *H. lupulus*, *A. katsumadai* i *E. rutaecarpa* mogu inhibirati formiranje biofilma kvasaca *C. albicans*, *C. glabrata* i *P. membranifaciens* na površini od nerđajućeg čelika. Prema tome, ovaj deo istraživanja je iniciran kako bi se procenio efekat biljnih ekstrakata na formiranje biofilma dodavanjem ekstrakta odmah na početku eksperimenta ili nakon formiranja 24h biofilma u trajanju od 3h. Uticaj ekstrakata na inicijalnu adheziju i formirani biofilm je određen metodom bojenja kristal violetom.

Iz rezultata prikazanih grafički na Slici 16 može se videti da su ispitivani biljni ekstrakti pri koncentracijama od  $1/2 \times \text{MIC}$  i  $1 \times \text{MIC}$  pokazali inhibitorni efekat na inicijalnu adheziju i formirani biofilm kvasca *C. albicans* ATCC 10261 na površini od nerđajućeg čelika ( $P < 0.05$ ). Sva tri ekstrakta su bila jednako efikasna na soj ATCC 10261. U slučaju kod kvasca *C. glabrata* ZIM 2369 (Slika 16), uočeno je da su obe koncentracije ekstrakta *A. katsumadai* značajno inhibirale početnu fazu formiranja biofilma tokom 24h inkubacije ( $P < 0.05$ ). Međutim, izlaganje prethodno formiranog 24h biofilma sa ekstraktom *A. katsumadai* u trajanju 3h nije imalo uticaj na formirani biofilm ( $P > 0.05$ ). Ostali testirani ekstrakti su bili neefikasni u inhibiciji formiranja biofilma kvasca *C. glabrata* ZIM 2369 na površini od nerđajućeg čelika. Ovi nalazi ističu da su biljni ekstrakti efikasniji u slučaju *C. albicans* nego *C. glabrata*.

S druge strane, ekstrakt *H. lupulus* nije imao efekat na inicijalnu adheziju i formirani biofilm kvasca *P. membranifaciens* ZIM 2417 na površini od nerđajućeg čelika. Međutim, ekstrakt *A. katsumadai* je značajno povećao adhezivnost pri koncentraciji od  $1/2 \times \text{MIC}$  ( $P < 0.05$ ), dok je koncentracija od  $1 \times \text{MIC}$  imala blagi stimulatívni efekat na formirani 24h biofilm nakon 3h izloženosti ( $P < 0.05$ ). Isti trend je primećen i za ekstrakt *E. rutaecarpa*. Naime, na osnovu rezultata prikazanih na Slici 17, formiranje biofilma kod kvasca *P. membranifaciens* ZIM 2417 je značajno povećano pri koncentraciji od  $1/2 \times \text{MIC}$  nakon 24h inkubacije ( $P < 0.05$ ).



Slika 16. Antibiofilm aktivnost biljnih ekstrakata prema kvascima *Candida albicans* ATCC 10261 i *Candida glabrata* ZIM 2369 na površini od nerđajućeg čelika. Efekat biljnih ekstrakata u različitim koncentracijama ( $1/2 \times \text{MIC}$  i  $1 \times \text{MIC}$ ) na inicijalnu adheziju (A) i formirani 24h biofilm uz izlaganje od 3h (B). Eksperimenti su izvedeni sa deset nezavisnih ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost optičke gustine (OD) sa standardnom devijacijom. \*  $P < 0.05$  naspram kontrole.



Slika 17. Antibiofilm aktivnost biljnih ekstrakata prema kvascu *Pichia membranifaciens* ZIM 2417 na površini od nerđajućeg čelika. Efekat biljnih ekstrakata u različitim koncentracijama ( $1/2 \times \text{MIC}$  i  $1 \times \text{MIC}$ ) na inicijalnu adheziju (A) i formirani 24h biofilm uz izlaganje od 3h (B). Eksperimenti su izvedeni sa deset nezavisnih ponavljanja i prikazana je aritmetička srednja vrednost optičke gustine (OD) sa standardnom devijacijom. \*  $P < 0.05$  naspram kontrole.

Na osnovu nalaza u ovom delu istraživanja, ekstrakti *A. katsumadai*, *E. rutaecarpa* i *H. lupulus* su pokazali najveću antibiofilm aktivnost prema kvascu *C. albicans* pri obe testirane koncentracije ( $1/2 \times \text{MIC}$  i  $1 \times \text{MIC}$ ). Ovo ukazuje da aktivne komponente ovih ekstrakata imaju jak potencijal da utiču na rast ćelija, funkciju, formiranje i razvoj biofilma *C. albicans*, ometajući bilo koji korak uključen u razvoj biofilma. Kao što je već objavljeno od strane Bezek i sar. (2016), ekstrakt *E. rutaecarpa* i negove frakcije su imale sposobnost da inhibiraju adheziju i formiranje biofilma *Campylobacter jejuni* sa najvidljivijim efektom kvinolinonske alkaloidne frakcije. Pogačar i sar. (2015) su pokazali da je ekstrakt (etanolni ekstrakt semena) i rezidualni materijal hidrodestilacije iz semena *A. katsumadai* imao veoma značajnu antiadhezivnu aktivnost protiv *C. jejuni* na PSI cl 1 ćelijama. U našem doprinosu, ekstrakt *A. katsumadai* je takođe bio efikasan u inicijalnoj fazi formiranja biofilma kvasca *C. glabrata* na  $1/2 \times \text{MIC}$  i  $1 \times \text{MIC}$  (Slika 16), što nije slučaj kod prethodno formiranog 24h biofilma. Ovo upućuje na to da su ćelije kvasca u biofilmu otpornije na antimikrobna sredstva u poređenju sa planktonskim ćelijama. Nemogućnost antimikrobnih sredstva za uklanjanje utvrđenih biofilmova su prethodno primećena (Adukwu i sar. 2012; Sandasi i sar. 2010). Generalno, naši rezultati jasno pokazuju da su biljni ekstrakti efikasniji protiv *C. albicans* u odnosu na *C. glabrata* i sugerišu na potencijalnu korist ovih biljaka u lečenju imunokompromitovanih osoba inficiranih sa *C. albicans*. U pogledu kvasca *P. membranifaciens*, ekstrakti *A. katsumadai* i *E. rutaecarpa* su imali stimulativni efekat na rast i razvoj biofilma pri koncentraciji od  $1/2 \times \text{MIC}$ . Ovi rezultati su podržani studijom Sandasi i sar. (2010), u kome neki ekstrakti promovišu rast i razvoj prethodno formiranog biofilma *Listeria monocitogenes in vitro*. Međutim, nema publikacija na kvascima. U našem istraživanju, poboljšani razvoj biofilma koji je primećen nakon izlaganja nekim ekstraktima može biti zbog prisustva određenih jedinjenja unutar ekstrakta koji favorizuju razvoj biofilma. Objavljeno je da neka prirodna jedinjenja promovišu mikrobnu adheziju (Ofek i sar. 2003; Sandasi i sar. 2008). Iako je prikazan preventivni efekat testiranih biljnih ekstrakata, potrebne su dodatne studije u svrhu izolacije i identifikacije sastojaka koji pokazuju antibiofilm svojstva što bi moglo biti od suštinskog značaja za njihovo uključivanje kao alternativa u kontroli biofilma.

## 6. ZAKLJUČAK

Tokom istraživačkog rada u okviru doktorske teze uspjeli smo da odgovorimo na postavljene hipoteze i stoga smo došli do sledećih zaključaka:

- Hidrofobnost kvasaca (*Candida* spp., *Pichia* spp.) određuje sposobnost adhezije na abiotičke površine

Svi testirani sojevi kvasaca *Candida* i *Pichia* su bili u stanju da adheriraju na polistiren, površine od nerđajućeg čelika i drveta, ali u različitoj meri. Soj vrste *C. albicans* je imao veću sposobnost adhezije na polistiren i nerđajući čelik u odnosu na sojeve vrsta *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. krusei*. U slučaju kod roda *Pichia*, ispitivani soj vrste *P. pijperi* je pokazao veću sposobnost adhezije na nerđajući čelik u odnosu na sojeve vrste *P. membranifaciens*, što nije slučaj kod adhezije na polistiren. Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da su sojevi vrsta *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *P. pijperi* i *P. membranifaciens* bili izrazito do umereno hidrofobni, dok je soj vrste *C. albicans* bio hidrofilan. Dakle, nije utvrđena korelacija između hidrofobnosti površine ćelije (CSH) kvasaca *Candida* i *Pichia* i adhezije na polistiren i površine nerđajućeg čelika. Interesantno je da je najadhezivniji kvasac *C. albicans* imao najnižu vrednost CSH, što ukazuje da CSH nije prvenstveno odgovoran za potencijal adhezije.

- Stepen hrapavosti kontaktne površine (nerđajućeg čelika i drveta) utiče na adheziju kvasaca

Na adheziju sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* značajno je uticala hrapavost površine nerđajućeg čelika, dok hrapavost drvenih površina nije značajno uticala.

- Promena temperature i medijuma utiče na adheziju ćelija kvasaca

Faktori životne sredine, kao što su temperatura i medijum za rast, značajno su uticali na adheziju kvasaca. Sojevi vrsta ne-*Candida albicans* *Candida* su se u najvećoj meri adherirali na temperaturi 37°C, dok je soj vrste *C. albicans* pokazao mnogo veću sklonost za adheziju na 43°C. Primećeno je da je količina adheriranih ćelija kvasaca *C. albicans* i *C. glabrata* na površinama od nerđajućeg čelika bila znatno veća u MEB medijumu, dok je za kvasce *C. parapsilosis* i *C. krusei* bila u YPD medijumu. U slučaju kod roda *Pichia*, sojevi vrsta *P. pijperi* i *P. membranifaciens* su se u većoj meri adherirali u YPD medijumu nego u MEB medijumu, i pokazali sposobnost adhezije na temperaturama između 7°C i 32°C.

- Aplikacija biljnih ekstrakata utiče na adheziju kvasaca (*Candida* spp., *Pichia* spp.) na površini od nerđajućeg čelika

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata korišćenjem mikrodilucione metode, ekstrakti *Humulus lupulus*, *Alpinia katsumadai* i *Evodia rutaecarpa* su pokazali antimikrobnu aktivnost prema kvascima *C. albicans*, *C. glabrata* i *P. membranifaciens*. Ispitivani biljni ekstrakti su takođe pokazali inhibitorni efekat na inicijalnu adheziju i formirani 24h biofilm *C. albicans*. Pored toga, ekstrakt *A. katsumadai* je bio efikasan u inicijalnoj fazi formiranja biofilma *C. glabrata* pri koncentracijama od  $1/2 \times \text{MIC}$  i  $1 \times \text{MIC}$ , dok je inhibiciju prethodno formiranog 24h biofilma bilo teže postići. Važno je napomenuti da su biofilmovi *C. glabrata* pokazali veću otpornost na biljne ekstrakte u odnosu na *C. albicans*. S druge strane, ekstrakti *A. katsumadai* i *E. rutaecarpa* su promovisani rast i razvoj formiranog biofilma *P. membranifaciens*.



## 7. LITERATURA

- Abu-Elteen K.H., Elkarmi A., Hamad M. (2001). Characterization of phenotype-based pathogenic determinants of various *Candida albicans* strains in Jordan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 54: 229-236.
- Abu-Elteen K.H. (2005). The influence of dietary carbohydrates on in vitro adherence of four *Candida species* to human buccal epithelial cells. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 17: 156-162.
- Adukwu E.C., Allen S.C.H., Phillips C.A. (2012). The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 113: 1217-1227.
- Al-Fattani M.A., Douglas L.J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 999-1008.
- Andrade M.J., Rodríguez M., Sánchez B., Aranda E., Córdoba J.J. (2006). DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 48-58.
- Bachmann S.P., Vande Walle K., Ramage G., Patterson T.F., Wickes B.L., Graybill J.R., López-Ribot J.L. (2002). *In vitro* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 3591-3596.
- Baillie G.S., Douglas L.J. (1998a). Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8): 1900-1905.
- Baillie G.S., Douglas L.J. (1998b). Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8): 2146-2149.
- Baillie G.S., Douglas L.J. (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 397-403.
- Bassetti M., Righi E., Costa A., Fasce R., Molinari M.P., Rosso R., Pallavicini F.B., Viscoli C. (2006). Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infectious Diseases*, 6: 21.

- Bazargani M.M., Rohloff J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61: 156-164.
- Bernardis F.D., Mondello F., Millàn R.S., Pontòn J., Cassone A. (1999). Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3481-3486.
- Bezek K., Kurinčić M., Knauder E., Klančnik A., Raspor P., Bucar F., Smole Možina S. (2016). Attenuation of adhesion, biofilm formation and quorum sensing of *Campylobacter jejuni* by *Euodia ruticarpa*. *Phytotherapy Research*, 30: 1527-1532.
- Bink A., Pellens K., Cammue B.P.A., Thevissen K. (2011). Anti-biofilm strategies: how to eradicate *Candida* biofilms? *The Open Mycology Journal*, 5: 29-38.
- Bohinc K., Dražić G., Fink R., Oder M., Jevšnik M., Nipič D., Godič-Torkar K., Raspor P. (2014). Available surface dictates microbial adhesion capacity. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 50: 265-272.
- Borecká-Melkusová S., Bujdáková H. (2008). Variation of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among genotypes of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* under antifungal treatment. *Canadian Journal of Microbiology*, 54: 718-724.
- Bridier A., Meylheuc T., Briandet R. (2013). Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron*, 48: 65-69.
- Brugnoni L.I., Lozano J.E., Cubitto M.A. (2007). Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Research International*, 40: 332-340.
- Camacho D.P., Gasparetto A., Svidzinski T.I.E. (2007). The effect of chlorhexidine and gentian violet on the adherence of *Candida* spp. to urinary catheters. *Mycopathologia*, 163: 261-266.
- Capasso F., Gaginella T.S., Grandolini G., Izzo A.A. (2003). *Phytotherapy: A quick reference to herbal medicine*. Kolundžija Z., Kodrić B. urednici: *Fitoterapija: Priručnik biljne medicine*, 2005. izdanja za Srbiju i Crnu Goru IK Prometej, Novi Sad.
- Carlen A., Nikdel K., Wennerberg A., Holmberg K., Olsson J. (2001). Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials*, 22: 481-487.
- Cauda R. (2009). *Candidaemia* in patients with an inserted medical device. *Drugs*, 1: 33-38.

- Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T., Ghannoum M.A. (2001a). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, 183: 5385-5394.
- Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. (2008). *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nature Protocols*, 3: 1909-1924.
- Chandra J., Mukherjee P.K., Leidich S.D., Faddoul F.F., Hoyer L.L., Douglas L.J., Ghannoum M.A. (2001b). Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *Journal of Dental Research*, 80: 903-908.
- Chae M.S., Schraft H., Truelstrup Hansen L., Mackereth R. (2006). Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiology*, 23(3): 250-259.
- Costa-Orlandi C.B., Sardi J.C.O., Pitangui N.S., de Oliveira H.C., Scorzoni L., Galeane M.C., Medina-Alarcón K.P., Melo W.C.M.A., Marcelino M.Y., Braz J.D., Fusco-Almeida A.M., Mendes-Giannini M.J.S. (2017). Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *Journal of Fungi*, 3: 1-24.
- Costa-Orlandi C.B., Sardi J.C.O., Santos C.T., Fusco-Almeida A.M., Mendes-Giannini M.J. (2014). *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. *Biofouling*, 30: 719-727.
- Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-582.
- Cuéllar-Cruz M., Vega-González A., Mendoza-Novelo B., López-Romero E., Ruiz-Baca E., Quintanar-Escorza M.A., Villagómez-Castro J.C. (2012). The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(10): 2513-2527.
- Di Bonaventura G., Pompilio A., Picciani C., Iezzi M., D'Antonio D., Piccolomini R. (2006). Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: Development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 3269-3276.
- Donlan R.M. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*, 7: 277-281.
- Donlan R.M., Costerton J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 167-193.

- Douglas L.J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1): 30-36.
- Dranginis A.M., Rauceo J.M., Coronado J.E., Lipke P.N. (2007). A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2): 282-294.
- Egusa H., Ellepola A.N.B., Nikawa H., Hamada T., Samaranayake L. P. (2000). Sub-therapeutic exposure to polyene antimycotics elicits a post-antifungal effect (PAFE) and depresses the cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans* isolates. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 29: 206-213.
- El-Azizi M., Khardori N. (1999). Factors influencing adherence of *Candida* spp. to host tissues and plastic surfaces. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37: 941-951.
- Ernst J.F. (2000). Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, 146: 1763-1774.
- Estivill D., Arias A., Torres-Lana A., Carrillo-Muñoz A.J., Arévalo M.P., 2011. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *Journal of Microbiological Methods*, 86, 238-242.
- Fidel P.L., Vazquez J.A., Sobel J.D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1): 80-96.
- Finkel J.S., Mitchell A.P. (2011). Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2): 109-118.
- Fleet G. (1992). Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12: 1-44.
- Flemming H.C., Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9): 623-633.
- Flint S.H., Brooks J.D., Bremer P.J. (2000). Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food Engineering*, 43: 235-242.
- Gerhäuser C. (2005). Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49: 827-831.

- Gröblacher B., Kunert O., Bucar F. (2012). Compounds of *Alpinia katsumadai* as potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20: 2701-2706.
- Hahnel S., Rosentritt M., Handel G., Bürgers R. (2009). Surface characterization of dental ceramics and initial streptococcal adhesion *in vitro*. *Dental Materials*, 25: 969-975.
- Hawser S.P., Douglas L.J. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter material *in vitro*. *Infection and Immunity*, 62(3): 915-921.
- Hawser S.P., Douglas L.J. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 2128-2131.
- Hazen K.C., Hazen B.W. (1992). Hydrophobic surface protein masking by the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 60: 1499-1508.
- Hazen K.C., Hazen B.W. (1993). Surface hydrophobic and hydrophilic protein alterations in *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, 107: 83-87.
- Henriques M., Azeredo J., Oliveira R. (2006). *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: Comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. *British Journal of Biomedical Science*, 63: 5-11.
- Hilbert L.R., Bagge-Ravn D., Kold J., Gram L. (2003). Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52: 175-185.
- Hočevar M., Jenko M., Godec M., Drobne D. (2014). An overview of the influence of stainless-steel surface properties on bacterial adhesion. *Materials and technology*, 48(5): 609-617.
- Hori K., Matsumoto S. (2010). Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 48: 424-434.
- Jabra-Rizk M.A., Falkler W.A., Meiller T.F. (2004). Fungal biofilms and drug resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 14-19.
- Jabra-Rizk M.A., Falkler W.A., Merz W.G., Baqui A.A.M.A., Kelley J.I., Meiller T.F. (2001). Cell surface hydrophobicity associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18: 17-22.
- Jain N., Kohli R., Cook E., Gialanella P., Chang T., Fries B.C., (2007). Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1697-1703.

- Jiang L.M., Hoogenkamp M.A., van der Sluis L.W., Wesselink P.R., Crielaard W., Deng D.M. (2011). Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms. *Journal of Endodontics*, 37: 31-35.
- Jin Y., Samaranayake L.P., Samaranayake Y., Yip H.K. (2004). Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Archives of Oral Biology*, 49: 789-798.
- Jin Y., Yip H.K., Samaranayake Y.H., Yau J.Y., Samaranayake L.P. (2003). Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2961-2967.
- Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P. (2016). Biologically active compounds from hops and prospects for their use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15: 542-567.
- Karam El-Din A.-Z.A., Al-Basri H.M., El-Naggar M.Y. (2012). Critical factors affecting the adherence of *Candida albicans* to the vaginal epithelium. *Journal of Taibah University for Science*, 6: 10-18.
- Khot P.D., Suci P.A., Miller R.L., Nelson R.D., Tyler B.J. (2006). A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and  $\beta$ -1,6-glucan pathway genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11): 3708-3716.
- Kimura L.H., Pearsall N.N. (1978). Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 21: 64-68.
- Klančnik A., Gröblacher B., Kovač J., Bucar F., Smole Možina S. (2012). Anti-*Campylobacter* and resistance-modifying activity of *Alpinia katsumadai* seed extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 113: 1249-1262.
- Kojic E.M., Darouiche R.O. (2004). *Candida* infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 255-267.
- Korber D.R., Choi A., Wolfaardt G.M., Ingham S.C., Caldwell D.E. (1997). Substratum topography influences susceptibility of *Salmonella enteritidis* biofilms to trisodium phosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3352-3358.

- Kovač J., Gavarić N., Bucar F., Smole Možina S. (2014). Antimicrobial and resistance modulatory activity of *Alpinia katsumadai* seed phenolic extract, essential oil and post-distillation extract. *Food Technology and Biotechnology*, 52: 248-254.
- Kozinn P.J., Taschdjian C.L., Burchall J.J. (1960). Transmission of P-32 labeled *Candida albicans* to newborn mice at birth. *American Journal of Diseases of Children*, 99: 31-34.
- Kramer B., Thielmann J., Hickisch A., Muranyi P., Wunderlich J., Hauser C. (2014). Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications. *Journal of Applied Microbiology*, 118: 648-657.
- Kuhn D.M., Balkis M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. (2003). Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 506-508.
- Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. (2002a). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity*, 70(2): 878-888.
- Kuhn D.M., George T., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. (2002b). Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1773-1780.
- Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Clark T.A., Pujol C., Chandra J., Hajjeh R.A., Warnock D.W., Sol D.R., Ghannoum M.A. (2004). *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerging Infectious Diseases*, 10(6): 1074-1081.
- Kucharíková S., Tournu H., Lagrou K., Van Dijck P., Bujdáková H. (2011). Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *Journal of Medical Microbiology*, 60: 1261-1269.
- Larson A.E., Yu R.R.Y., Lee O.A., Price S., Haas G.J., Johnson E.A. (1996). Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 195-207.
- Lawrence J.R., Swerhone G.D.W., Leppard G.G., Araki T., Zhang X., West M.M., Hitchcock A.P. (2003). Scanning transmission X-ray, laser scanning, and transmission electron

- microscopy mapping of the exopolymeric matrix of microbial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5543-5554.
- Lewis K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2): 267-274.
- Li B., Logan B.E. (2004). Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 36: 81-90.
- Li J., McLandsborough L.A. (1999). The effect of the surface charge and hydrophobicity in *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. *International Journal of Food Microbiology*, 53: 185-193.
- Li L., Redding S., Dongari-Bagtzoglou A. (2007). *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *Journal of Dental Research*, 86: 204-215.
- Li X. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149: 353-362.
- Loureiro V., Malfeito-Ferreira M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 23-50.
- Luo G., Samaranayake L.P. (2002). *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS*, 110: 601-610.
- Martinez L.R., Casadevall A. (2006). Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 1021-1033.
- Masuoka J., Hazen K.C. (1999). Differences in the acid-labile component of *Candida albicans* mannan from hydrophobic and hydrophilic yeast cells. *Glycobiology*, 9: 1281-1286.
- Masuoka J., Hazen K.C. (2004). Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and B strains. *Infection and Immunity*, 72(11): 6230-6236.
- McCourtie J., Douglas L.J. (1981). Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infection and Immunity*, 32: 1234-1241.
- Milling A., Kehr R., Wulf A., Smalla K. (2005). Survival of bacteria on wood and plastic particles: Dependence on wood species and environmental conditions. *Holzforschung*, 59: 72-81.



- Morschhäuser J. (2002). The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1587: 240-248.
- Mowat E., Butcher J., Lang S., Williams C., Ramage G. (2007). Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*, 56(9), 1205-1212.
- Mukherjee P.K., Chandra J., Kuhn D.M., Ghannoum M.A. (2003). Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and Immunity*, 71(8): 4333-4340.
- Mukherjee P.K., Zhou G., Munyon R., Ghannoum M.A. (2005). *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Medical Mycology*, 43: 191-208.
- Nadeem S.G., Shafiq A., Hakim S.T., Anjum Y., Kazm S.U. (2013). Effect of growth media, pH and temperature on yeast to hyphal transition in *Candida albicans*. *Open Journal of Medical Microbiology*, 3: 185-192.
- NCCLS. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Negi P.S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156: 7-17.
- Negri M., Salci T.P., Shinobu-Mesquita C.S., Capoci I.R.G., Svidzinski T.I.E., Kioshima E.S. (2014). Early state research on antifungal natural products. *Molecules*, 19: 2925-2956.
- Nguyen V.T., Turner M.S., Dykes G.A. (2011). Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Campylobacter* to abiotic surfaces. *Food Microbiology*, 28(5): 942-950.
- Niimi K., Maki K., Ikeda F., Holmes A.R., Lamping E., Niimi M., Monk B.C., Cannon R.D. (2006). Overexpression of *Candida albicans* *CDR1*, *CDR2*, or *MDR1* does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4): 1148-1155.
- Nikawa H., Nishimura H., Yamamoto T., Hamada T., Samaranayake L.P. (1996). The role of saliva and serum in *Candida albicans* biofilm formation on denture acrylic surfaces. *Journal Microbial Ecology in Health and Disease*, 9: 35-48.
- Nobile C.J., Mitchell A.P. (2006). Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cellular Microbiology*, 8(9): 1382-1391.

- Ofek I., Hasty D.L., Sharon N. (2003). Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 38: 181-191.
- Olsen, I. (1990). Oral adhesion of yeast. *Acta Odontologica Scandinavica*, 48: 45-56.
- Ortega M.P., Hagiwara T., Watanabe H., Sakiyama T. (2008). Factors affecting adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to stainless steel surface. *Japan Journal of Food Engineering*, 9: 251-259.
- Panagoda G.J., Ellepola A.N.B., Samaranyake L.P. (2001). Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses*, 44: 29-35.
- Peeters E., Nelis H.J., Coenye T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72: 157-165.
- Pettit R.K., Weber C.A., Kean M.J., Hoffmann H., Pettit G.R., Tan R., Franks K.S., Horton M.L. (2005). Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 2612-2617.
- Pires M.d.F.C., Corrêa B., Gambale W., Paula C.R. (2001). Experimental model of *Candida albicans* (serotypes A and B) adherence *in vitro*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 163-169.
- Pogačar M.Š., Klančnik A., Bucar F., Langerholc T., Smole Možina S. (2015). *Alpinia katsumadai* extracts inhibit adhesion and invasion of *Campylobacter jejuni* in animal and human foetal small intestine cell lines. *Phytotherapy Research*, 29: 1585-1589.
- Priester J.H., Horst A.M., van de Werfhorst L.C., Saleta J.L., Mertes L.A.K., Holden P.A. (2007). Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 577-587.
- Radford D.R., Sweet S.P., Challacombe S.J., Walter J.D. (1998). Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *Journal of Dentistry*, 26: 577-583.
- Ramage G., Bachmann S., Patterson T.F., Wickes B.L., López-Ribot J.L. (2002). Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(6): 973-980.
- Ramage G., Martinez J.P., Lopez-Ribot J. L. (2006). *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Research*, 6: 979-986.

- Ramage G., Mowat E., Jones B., Williams C., López-Ribot J. (2009). Our current understanding of fungal biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(4): 340-355.
- Ramage G., Rajendran R., Sherry L., Williams C. (2012). Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, 2012: 1-14.
- Ramage G., Saville S.P., Thomas D.P., López-Ribot J.L. (2005). *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell*, 4: 633-638.
- Ramage G., Vande Walle K., Wickes B.L., López-Ribot J.L. (2001a). Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18(4): 163-170.
- Ramage G., Vande Walle K., Wickes B.L., López-Ribot J.L. (2001b). Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9): 2475-2479.
- Raybaudi-Massilia R.M., Mosqueda-Melgar J., Soliva-Fortuny R., Martin-Belloso O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8: 157-180.
- Repp K.K., Menor S.A., Pettit R.K. (2007). Microplate alamar blue assay for susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Medical Mycology*, 45: 603-607.
- Rosenberg M. (1984). Ammonium sulphate enhances adherence of *Escherichia coli* J-5 to hydrocarbon and polystyrene. *FEMS Microbiology Letters*, 25: 41-45.
- Sadekuzzaman M., Yang S., Mizan M.F.R., Ha S.D. (2015). Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14: 491-509.
- Samaranayake L.P., MacFarlane T.W. (1982). The effect of dietary carbohydrates on the *in vitro* adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells. *Journal of Medical Microbiology*, 15: 511-517.
- Samaranayake L.P., Hughes A., Weetman D.A., MacFarlane T.W. (1986). Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. *Journal of Oral Pathology*, 15: 251-254.
- Samaranayake L.P., McCourtie J., MacFarlane T.W. (1980). Factors affecting the *in vitro* adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Archives of Oral Biology*, 25: 611-615.

- Samaranayake Y.H., Wu P.C., Samaranayake L.P., So M. (1995). Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. *APMIS*, 103: 707-713.
- Sandasi M., Leonard C.M., Viljoen A.M. (2008). The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19: 1070-1075.
- Sandasi M., Leonard C.M., Viljoen A.M. (2010). The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 30-35.
- Schönwälder A., Kehr R., Wulf A., Smalla K. (2002). Wooden boards affecting the survival of bacteria? *Holz als Roh- und Werkstoff*, 60: 249-257.
- Schubert S., Barker K.S., Znaidi S., Schneider S., Dierolf F., Dunkel N., Aïd M., Boucher G., Rogers P.D., Raymond M., Morschhäuser J. (2011). Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors Mrr1, Upc2, and Cap1 in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5): 2212-2223.
- Seidler M.J., Salvenmoser S., Muller F.M. (2008). *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 4130-4136.
- Seneviratne C.J., Jin L., Samaranayake L.P. (2008). Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Diseases*, 14: 582-590.
- Shapiro R.S., Robbins N., Cowen L.E. (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2): 213-267.
- Shi X., Zhu X., (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20: 407-413.
- Shin J.H., Kee S.J., Shin M.G., Kim S.H., Shin D.H., Lee S.K., Suh S.P., Ryang D.W. (2002). Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1244-1248.
- Shopova I., Bruns S., Thywissen A., Kniemeyer O., Brakhage A.A., Hillmann F. (2013). Extrinsic extracellular dna leads to biofilm formation and colocalizes with matrix polysaccharides in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology*, 4: 141.

- Silva S., Henriques M., Martins A., Oliveira R., Williams D., Azeredo J. (2009). Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology*, 47: 681-689.
- Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D., Azeredo J. (2010). Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *Journal of Medical Microbiology*, 59(7): 747-754.
- Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D.W., Azeredo, J. (2011). Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiology*, 19: 241-247.
- Silva S., Rodrigues C.F., Araújo D., Rodrigues M.E., Henriques M. (2017). *Candida* species biofilms' antifungal resistance. *Journal of Fungi*, 3: 1-17.
- Silva-Dias A., Miranda I.M., Branco J., Monteiro-Soares M., Pina-Vaz C., Rodrigues A.G. (2015). Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-8.
- Silver P.M., Oliver B.G., White T.C. (2008). Characterization of caspofungin susceptibilities by broth and agar in *Candida albicans* clinical isolates with characterized mechanisms of azole resistance. *Medical Mycology*, 46(3): 231-239.
- Simões M., Simões L.C., Vieira M.J., (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 573-583.
- Singleton D.R., Fidel P.L.Jr, Wozniak K.L., Hazen K.C. (2005). Contribution of cell surface hydrophobicity protein 1 (Csh1p) to virulence of hydrophobic *Candida albicans* serotype A cells. *FEMS Microbiology Letters*, 244: 373-377.
- Singleton D.R., Hazen K.C. (2004). Differential surface localization and temperature dependent expression of the *Candida albicans* CSH1 protein. *Microbiology*, 150: 285-292.
- Singleton D. R., Masuoka J., Hazen K.C. (2001). Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity. *Journal of Bacteriology*, 183: 3582-3588.
- Sohm J.A., Edwards B.R., Wilson B.G., Webb E.A. (2011). Constitutive extracellular polysaccharide (EPS) production by specific isolates of *Crocospaera watsonii*. *Frontiers in Microbiology*, 2: 229.
- Srey S., Jahid I.K., Ha S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31: 572-585.

- Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Svabić-Vlahović M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40: 175-179.
- Sudbery P., Gow N., Berman J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 12(7): 317-324.
- Sudbery P.E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 737-748.
- Taff H.T., Mitchell K.F., Edward J.A., Andes D.R. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiology*, 8(10): 1325-1337.
- Thein Z.M., Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P. (2007). In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Archives of Oral Biology*, 52: 761-767.
- Thompson D.S., Carlisle P.L., Kadosh D. (2011). Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryotic cell*, 10(9): 1173-1182.
- Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 5987-6000.
- Tomičić R., Raspor P. (2017). Influence of growth conditions on adhesion of yeast *Candida* spp. and *Pichia* spp. to stainless steel surfaces. *Food Microbiology*, 65: 179-184.
- Tomičić R., Tomičić Z., Raspor P. (2017). Adhesion of *Candida* spp. and *Pichia* spp. to wooden surfaces. *Food Technology and Biotechnology*, 55(1): 138-142.
- Tomičić Z., Zupan J., Matos T., Raspor P. (2016). Probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* (nom. nud.) modulates adhesive properties of *Candida glabrata*. *Medical Mycology*, 54: 835-845.
- Tote K., Vanden Berghe D., Maes L., Cos P. (2008). A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 249-254.
- Trofa D., Gacsér A., Nosanchuk J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4): 606-625.
- Tronchin G., Pihet M., Lopes-Bezerra L.M., Bouchara J.-P. (2008). Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Medical Mycology*, 46(8): 749-772.

- Tronchin G., Poulain D., Vernes A. (1984). Cytochemical and ultrastructural studies of *Candida albicans*. III. Evidence for modifications of the cell wall coat during adherence to human buccal epithelial cells. *Archives of Microbiology*, 139: 221-224.
- Tuberoso C.I.G., Rosa A., Bifulco E., Melis M.P., Atzeri A., Pirisi F.M., Dessi M.A. (2010). Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chemistry*, 123: 1242-1250.
- Uppuluri P., Chaturvedi A.K., Srinivasan A., Banerjee M., Ramasubramaniam A.K., Köhler J.R., Kadosh D., Lopez-Ribot J.L. (2010). Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathogens*, 6: e1000828.
- Verran J., Maryan C.J. (1997). Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 77: 535-539.
- Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Verachtert H., Delvaux F.R. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 197-205.
- Verstrepen K.J., Klis F.M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*, 60(1): 5-15.
- Vraneš J., Leskovar V. (2009). Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Medicinski Glasnik*, 6(2): 147-165.
- Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S.M., Seifert H., Wenzel R.P., Edmond M.B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*, 39: 309-317.
- Xiao X., Si X., Tong X., Li G. (2011). Preparation of flavonoids and diarylheptanoid from *Alpinia katsumadai hayata* by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*, 81: 265-269.
- Zanoli P., Zavatti M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 383-396.
- Zhang P., Pan B., Liao Q., Yao M., Xu X., Wan J., Liu D., Xie Z. (2013). Simultaneous quantification of limonin, two indolequinazoline alkaloids, and four quinolone alkaloids in *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth by HPLC-DAD method. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013: 1-9.
- Zhang P., Pan B., Liao Q., Yao M., Xu X., Wan J., Liu D., Xie Z. (2014). Separation of five quinolone alkaloids from fruits of *Evodia rutaecarpa* by high-speed counter-current chromatography. *Chinese Herbal Medicines*, 6(1): 47-52.

Zupan J., Avbelj M., Butinar B., Kosel J., Šergan M., Raspor P. (2013). Monitoring of quorum-sensing molecules during minifermentation studies in wine yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 2496-2505.



## PRILOZI

Prilog A. Optimizacija metode kristal violet. Adhezija kvasca *Candida albicans* ATCC 10261 na polistiren površinu.

Adhezija kvasca <i>C. albicans</i> ATCC 10261 na polistiren	OD <sub>584 nm</sub> ± SD	
Koncentracija Crystal Violet	0,5 % CV	0.1415 ± 0.0283
	0,1 % CV	0.1131 ± 0.0132
	0,02 % CV	0.0776 ± 0.0053
Rastvarač	33 % sirćetna kiselina	0.3618 ± 0.0234
	96 % etanol	0.1457 ± 0.0479
	metanol	0.3025 ± 0.0331
Medijum za rast	MEB medijum	0.3015 ± 0.0873
	YPD medijum	0.0917 ± 0.0144
	RPMI medijum	0.1193 ± 0.0279
Veličina inokuluma	10 <sup>7</sup> ćelija/ml	0.1730 ± 0.0472
	10 <sup>4</sup> ćelija/ml	0.1037 ± 0.0227
Starost kulture	24 h	0.2912 ± 0.0335
	18 h	0.2041 ± 0.0541
	7 h	0.1051 ± 0.0251

Prilog B. Šematski prikaz mikrotitar ploče pri određivanju minimalne inhibitorne koncentracije biljnih ekstrakata *Humulus lupulus*, *Alpinia katsumadai* i *Evodia rutaecarpa* ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Rastvorljiv u DMSO ( <i>Humulus lupulus</i> , <i>Alpinia katsumadai</i> , <i>Evodia rutaecarpa</i> )													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	K+	MEB	soj 1
B	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	K+	MEB	
C	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	K+	MEB	
D	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	K+	MEB	
E	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	K+	MEB	soj 2
F	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	K+	MEB	
G	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	K+	MEB	
H	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	K+	MEB	

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj:	
RBR	
Identifikacioni broj:	
IBR	
Tip dokumentacije:	Monografska publikacija
TD	
Tip zapisa:	Tekstualni štampani materijal
TZ	
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.):	Doktorska disertacija
VR	
Ime i prezime autora:	Ružica Tomičić, dipl. inženjer tehnologije – master
AU	
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje):	Prof. dr Siniša Dodić, redovni profesor Prof. dr Peter Raspor, redovni profesor
MN	
Naslov rada:	Uticaj faktora sredine na adheziju kvasaca na abiotičke površine
NR	
Jezik publikacije:	srpski, latinica
JP	
Jezik izvoda:	srpski / engleski
JI	
Zemlja publikovanja:	Republika Srbija
ZP	
Uže geografsko područje:	AP Vojvodina
UGP	
Godina:	2018
GO	
Izdavač:	Autorski reprint
IZ	

Mesto i adresa:	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
MA	
Fizički opis rada:	8 poglavlja, 80 stranica, 6 tabela, 17 slika, 175
FO	literaturna navoda
Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
NO	
Naučna disciplina:	Biotehnologija
ND	
Predmetna odrednica, ključne reči:	Adhezija, kvasci, abiotičke površine
PO	
UDK	
Čuva se:	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom
ČU	Sadu, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena:	Nema
VN	
Izvod:	
IZ	

Adhezija i formiranje biofilma kvasaca na kontaktne površine materijala je ozbiljan higijenski problem u prehrambenoj industriji, jer može biti izvor kontaminacije tokom proizvodnje, dovodeći do velikih ekonomskih gubitaka zbog kvarenja hrane i smanjenja kvaliteta proizvoda, a takođe može da šteti zdravlju potrošača. S druge strane, mnoge infekcije u bolnici uzrokovane su adhezijom vrsta roda *Candida* na medicinska sredstva i implantate. Međutim, trenutno razumevanje adhezije i kolonizacije kvasaca na abiotičke površine je ograničeno na samo neke vrste roda *Candida*, a naročito malo se zna o vrstama roda *Pichia* kao adhezivnim agensima.

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je bio da se proceni potencijal adhezije sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* na polistiren površinu, diskove od nerđajućeg čelika (AISI 304, Ra = 25.20 – 961.9 nm) i drveta sa različitim stepenom hrapavosti površine, i ispita uticaj hrapavosti površine na adheziju kvasaca. Hidrofobnost površine ćelije (CSH) sojeva iz rodova *Candida* i *Pichia* je određena u cilju procene korelacije između hidrofobnosti površine ćelije i adhezije kvasaca na polistiren. Pored toga, ispitan je uticaj različitih medijuma, temperatura, i različitih biljnih ekstrakata na adheziju odabranih sojeva iz rodova *Candida* i *Pichia* na površine diskova od nerđajućeg čelika.

Rezultati su pokazali da su svi testirani sojevi kvasaca *Candida* i *Pichia* su bili u stanju da adheriraju na polistiren, površine od nerđajućeg čelika i drveta, ali u različitoj meri. Soj vrste *C. albicans* je imao veću sposobnost adhezije na polistiren i nerđajući čelik u odnosu na sojeve vrsta *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. krusei*. U slučaju kod roda *Pichia*, sojevi vrste *P. membranifaciens* su pokazali manju sposobnost adhezije na nerđajući čelik nego ispitivani soj vrste *P. pijperi*, što nije slučaj kod adhezije na polistiren. Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da su sojevi vrsta *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *P. pijperi* i *P. membranifaciens* bili izrazito do umereno hidrofobni, dok je soj vrste *C. albicans* bio hidrofilan, što ukazuje da hidrofobnost površine ćelije (CSH) nije značajno u korelaciji sa količinom ćelija adheriranih na polistiren. Pored toga, na adheziju sojeva kvasaca *Candida* i *Pichia* značajno je uticala hrapavost površine nerđajućeg čelika, dok hrapavost drvenih površina nije značajno uticala. Dalje mi smo ispitali uticaj različitih medijuma za rast i temperature na adheziju odabranih kvasaca. Primećeno je da je količina adheriranih ćelija kvasaca *C. albicans* i *C. glabrata* na površinama od nerđajućeg čelika bila znatno veća u Malt Extract Broth (MEB) medijumu, dok je za *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *P. pijperi* i *P. membranifaciens* bila u Yeast Peptone Dextrose (YPD) medijumu. Naši podaci takođe ukazuju da je temperatura veoma važan faktor koji značajno utiče na adheziju ovih kvasaca. Problem adhezije i formiranje biofilma kvasaca na abiotičkim površinama i rastuća otpornost na postojeće antimikrobne agense predstavilo je izazov za nas za pronalaženjem novih alternativnih agenasa biljnog porekla. Stoga mi smo ispitali antimikrobnu i antibiofilm aktivnost biljnih ekstrakata kao što su *Humulus lupulus*, *Alpinia katsumadai* i *Evodia rutaecarpa* prema *C. albicans*, *C. glabrata* i *P. membranifaciens*. Na osnovu dobijenih MIC vrednosti, testirani biljni ekstrakti su bili efikasni u inhibiciji kvasaca. Primećeno je da su biofilmovi *C. glabrata* pokazali veću otpornost na biljne ekstrakte u odnosu na *C. albicans*. Mađutim, ekstrakti *A. katsumadai* i *E. rutaecarpa* su promovisali rast i razvoj formiranog biofilma *P. membranifaciens*.

Datum prihvatanja teme od strane 09.07.2015.

Senata:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:  
KO

**Prof. dr Jovana Grahovac**, vanredni profesor,  
Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,  
predsednik komisije

**Prof. dr Siniša Dodić**, redovni profesor,  
Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,  
mentor

**Prof. dr Peter Raspor**, redovni profesor,  
Fakultet zdravstvenih nauka, Univerzitet  
Primorska, Slovenija, mentor

**Prof. dr Dragiša Savić**, redovni profesor,  
Tehnološki fakultet, Univerzitet u Leskovcu,  
član

**UNIVERSITY OF NOVI SAD**  
**FACULTY OF TECHNOLOGY**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number:	
ANO	
Identification number:	
INO	
Document type:	Monographic publication
DT	
Type of record:	Textual printed material
TR	
Contents code:	Doctoral Dissertation
CC	
Author:	Ružica Tomičić, MSc
AU	
Mentor:	Prof. dr Siniša Dodić, full professor
MN	Prof. dr Peter Raspor, full professor
Title:	Influence of environmental factors on adhesion
TI	of yeasts to abiotic surfaces
Language of text:	Serbian, latin
LT	
Language of abstract:	Serbian / English
LA	
Country of publication:	Republic of Serbia
CP	
Locality of publication:	AP Vojvodina
LP	
Publication year:	2018
PY	
Publisher:	Author's reprint
PU	

Publication place:	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia
PP	
Physical description:	8 chapters, 80 pages, 6 tables, 17 figures, 175
PD	references
Scientific field	Technological Engineering
SF	
Scientific discipline	Biotechnology
SD	
Subject, Key words	Adhesion, yeasts, abiotic surfaces
SKW	
UC	
Holding data:	Library of Faculty of Technology, Novi Sad
HD	
Note:	None
N	
Abstract:	
AB	

The adhesion and biofilm formation of yeast on the contact surfaces of the material is a serious hygiene problem in the food industry, because it can be a source of contamination during production, leading to major economic losses due to food spoilage and reduced product quality, and can also affect the consumer's health. On the other hand, many infections in the hospital are caused by the adhesion of *Candida* spp. to medical devices and implants. However, the understanding of adhesion and colonization of yeasts on abiotic surfaces is limited to only some *Candida* species, and in particular little is known about *Pichia* species as adhesive agents.

The aim of the research in this doctoral dissertation was to assess the potential of *Candida* and *Pichia* strains to adhere to polystyrene surface, stainless steel discs (AISI 304, Ra = 25.20 - 961.9 nm) and wood (beech) with different degrees of surface roughness, and examined the influence of surface roughness on yeast adhesion. Cell surface hydrophobicity (CSH) of *Candida* and *Pichia* strains was determined in order to assess the correlation between the cell surface hydrophobicity and the yeast adhesion to polystyrene. In addition, the influence of different medium, temperature, and various plant extracts on the adhesion of selected *Candida* and *Pichia* strains to stainless steel surfaces was examined.



Our results indicated that all *Candida* and *Pichia* strains were able to adhere to polystyrene, stainless steel surfaces and wood in a species- and strain-dependent manner. *C. albicans* had a higher ability to adhere to polystyrene and stainless steel compared to *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*. Regarding *Pichia* species, *P. membranifaciens* strains were less adherent to stainless steel than *P. pijperi*, what is not the case in the adhesion to polystyrene. Based on the results obtained, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *P. pijperi* i *P. membranifaciens* strains were strongly to moderately hydrophobic while only *C. albicans* was moderately hydrophilic, indicating that the cell surface hydrophobicity is not significantly correlated with the amount of cells adhered to polystyrene. In addition, the adhesion of *Candida* and *Pichia* strains was significantly influenced by the roughness of stainless steel surface, while the roughness of wood surfaces did not significantly influence. Further on we examined the impact of different growth medium and temperature on adhesion of selected yeasts. It was noted that the amount of adhered cells of *C. albicans* and *C. glabrata* on stainless steel surfaces were significantly higher in the Malt Extract Broth (MEB) medium, whereas for *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *P. pijperi* and *P. membranifaciens* it was Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium. Our data also indicated that temperature is a very important factor which considerably affects the adhesion of these yeast. The problem of yeast adhesion and biofilm formation on abiotic surfaces and its growing resistance to existing antimicrobial agents, presented a challenge for us to find new alternative agents of plant origin. Hence, we investigated antimicrobial and antibiofilm activity of plant extracts such as *Humulus lupulus*, *Alpinia katsumadai* and *Evodia rutaecarpa* against *C. albicans*, *C. glabrata* and *P. membranifaciens*. According to the MIC values, all plant extracts were effective in the inhibition of yeast strains. It was observed that biofilms of *C. glabrata* are more resistance to plant extracts as compared to *C. albicans*. However, extracts of *A. katsumadai* and *E. rutaecarpa* were promoted the growth and development of a preformed biofilm of *P. membranifaciens*.

Accepted on Senate on: 09.07.2015.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:  
DB

**Prof. dr Jovana Grahovac**, associate professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, president

**Prof. dr Siniša Dodić**, full professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, mentor

**Prof. dr Peter Raspor**, full professor, Faculty of Health Sciences, University of Primorska, Slovenia, mentor

**Prof. dr Dragiša Savić**, full professor, Faculty of Technology, University of Leskovac, member