

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tea DURJAVA

**DOLOČANJE BAKTERIJSKE ADHEZIJE V
MIKROTITRSKI PLOŠČICI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tea DURJAVA

**DOLOČANJE BAKTERIJSKE ADHEZIJE V MIKROTITRSKI
PLOŠČICI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF BACTERIAL ADHESION IN MICROTITRE
PLATE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija Živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana izr. prof. dr. Barbara Jeršek in za recenzentko prof. dr. Tatjana Košmerl.

Mentorica: izr. prof. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Košmerl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Tea Durjava

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24+579.26(043)=163.6
KG	bakterijska adhezija/bakterijski biofilmi/ <i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /mikrotitrna ploščica/metoda barvanja s kristal violetom/detekcija živosti z reagentom XTT/optimizacija metod
AV	DURJAVA, Tea
SA	JERŠEK, Barbara (mentorica) / KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	DOLOČANJE BAKTERIJSKE ADHEZIJE V MIKROTITRSKI PLOŠČICI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 66 str., 6 pregl., 28 sl., 21 pril., 35 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen našega raziskovalnega dela je bila optimizacija metode za določanje bakterijske adhezije z barvilom kristal violet (KV) v mikrotitrski ploščici (MTP). Glede na objave s tega področja smo analizirali protokole in ugotovili, da med njimi obstajajo velike razlike. Da bi odgovorili na vprašanje, kateri protokol uporabiti za pridobitev najbolj reprezentativnih in ponovljivih rezultatov, je naše delo potekalo po sistemu izločanja. To pomeni, da smo za povečanje učinkovitosti preizkušali posamezen parameter in se glede na statistično ovrednotenje rezultata, z izbiro najboljšega dejavnika med možnimi alternativami, odločili za najbolj ustrezno izvedbo metode. Pri optimizaciji metode smo testirali naslednje dejavnike: faza bakterijske rasti, začetno število bakterij, obogatitev gojišča z dodatkom glukoze, učinek mešanja pri spiranju mikrotitrne ploščice, koncentracija KV, temperaturni režim sušenja in toplotno fiksiranje kulture ter uporaba različnih topil (etanol, metanol, očetna kislina in mešanica etanola in acetona). Ugotovili smo, da na določanje adhezije z metodo barvanja s KV poleg začetnega števila bakterij v vzorcu, pomembno vpliva način sušenja MTP, koncentracija barvila in izbira topila. Za določitev stopnje adhezije živih bakterijskih celic smo uporabili metodo, ki temelji na metabolični aktivnosti živih celic in jo lahko določimo z reagentom XTT (natrijev 2,3-bio-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksianilid). Pri tej metodi je izmerjena absorbanca sorazmerna številu metabolično aktivnih mikrobnih celic. Za pridobitev reprezentativnih in ponovljivih rezultatov smo določili optimalen volumen in koncentracijo reagenta XTT ter čas inkubacije kulture z reagentom XTT. Rezultati detekcije živosti adherirane kulture pri uporabi 100 µl, 0,1 mg/ml reagenta XTT so pokazali, da je absorbanca (merilo živosti/adhezije) presnovnega produkta reagenta XTT po 50 minutah inkubacije z reagentom konstantna ($P > 0,05$). Rezultati obeh metod določanja bakterijske adhezije (s KV in z reagentom XTT) so pokazali, da je stopnja adhezije odvisna od vrste in seva bakterij.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.24+579.26(043)=163.3

CX bacterial adhesion/bacterial biofilms/*Staphylococcus aureus*/*Pseudomonas aeruginosa*/microtitre plate/crystal violet assay/ XTT cells viability assay/ method optimization

AU DURJAVA, Tea

AA JERŠEK, Barbara (supervisor) / KOŠMERL, Tatjana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Departement of Food Science and Technology

PY 2016

IT DETERMINATION OF BACTERIAL ADHESION IN MICROTITRE PLATE

TD Graduation thesis (University studies)

NO XII, 66 p., 6 tab., 28 fig., 21 ann., 35 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The goal of our research was optimising the method for determining bacterial adhesion with the dyeing agent crystal violet (KV) in a microtiter plate (MTP). In accordance with academic articles from this field, we analysed protocols and determined that there are significant differences between them. To answer the question which protocol should be used for obtaining the most representative and reproducible results, we used an elimination system. This means that we tested individual parameters for increasing efficiency and then, considering the statistical value of results, by choosing the best factor among all the possible alternatives, we chose the most suitable method. For optimising the method, we tested the following factors: bacterial growth phase, initial number of bacteria, enrichment with glucose, mixing effect at washing microtiter plates, concentration of KV, drying temperature regime, thermal fixation of culture and using different solvents (ethanol, methanol, acetic acid, mixture of ethanol and acetone). We found out that, besides the initial number of bacteria in the sample, also the MTP drying regime, the concentration of the dyeing agent and the selection of solvent significantly affect the determination of adhesion with the KV-dyeing method. For determining the degree of adhesion of living bacterial cells, we used a method based on metabolic cell activity, which can be determined with the XTT reagent (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt). With this method, the measured absorbance is proportional with the number of metabolically active microbiotic cells. To gain representative and reproducible results, we determined the optimal volume and concentration of the XTT reagent and the culture incubation time with the XTT reagent. The results of the detection of the adherent culture activity using 100 µl, 0.1 mg/ml of the XTT reagent showed that the absorbance (criterion for activity/adhesion) of the metabolic product of the XTT reagent after 50 minutes of incubation time with the reagent is constant ($P > 0,05$). The results of both methods for determining bacterial adhesion (with KV and XTT reagent) showed that the degree of adhesion depends on the type and strain of bacteria.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJSKA ADHEZIJA	3
2.1.1 Adhezija in tvorba biofilma	3
2.1.2 Adhezijske interakcije	5
2.2 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA BAKTERIJSKO ADHEZIJO	6
2.2.1 Okoljski dejavniki	6
2.2.2 Lastnosti površin in mikrotopografija	6
2.2.3 Hidrofobnost	7
2.2.4 Bakterijski površinski naboj	7
2.2.5 Bakterijska celična stena	8
2.2.6 Bakterijska signalizacija	9
2.3 POSLEDICE NASTANKA BIOFILMA IN NJEGOVO PREPREČEVANJE ..	9
2.3.1 Strategija kontrole biofilma v obratih	9
2.3.2 Protimikrobna sredstva	10
2.3.3 Površinska modifikacija materiala	10
2.4 DOLOČANJE TVORBE BIOFILMA V MIKROTITRSKI PLOŠČICI	10
2.5 METODE OCENJEVANJA STOPNJE BAKTERIJSKE ADHEZIJE	11
2.5.1 Barvanje z barvilom kristal violet	12
2.5.2 Barvanje z barvilom metilensko modrilo	17
2.5.3 Barvanje z barvilom fluorescein-di-acetat	17
2.5.4 Barvanje z barvili LIVE/DEAD	17
2.5.5 Dodatek resazurina	17

2.5.6	Dodatek reagenta XTT	18
2.5.7	Dodatek reagenta BioTimer	18
2.5.8	Molekularne metode na osnovi DNA	18
3	MATERIALI IN METODE	20
3.1	POTEK DELA	20
3.2	MATERIALI.....	21
3.2.1	Bakterije	21
3.2.2	Mikrobiološka gojišča.....	23
3.2.3	Kemikalije.....	25
3.2.4	Laboratorijska oprema	25
3.3	METODE DELA.....	26
3.3.1	Revitalizacija bakterij	26
3.3.2	Priprava inokuluma.....	26
3.3.3	Določanje adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja s kristal violetom	26
3.3.4	Optimizacija določanja adhezije na mikrotitrski ploščici z metodo barvanja s kristal violetom	28
3.3.4.1	Vpliv bakterijske faze rasti.....	30
3.3.4.2	Vpliv začetnega števila celic v inokulumu.....	30
3.3.4.3	Vpliv obogatitve gojišča TSB z dodatkom glukoze.....	30
3.3.4.4	Vpliv mešanja pri spiranju mikrotitrne ploščice.....	30
3.3.4.5	Vpliv sušenja.....	31
3.3.4.6	Vpliv koncentracije barvila kristal violet.....	31
3.3.4.7	Vpliv vrste topila.....	32
3.3.5	Določitev adhezije bakterij z optimizirano metodo barvanja s kristal violetom	32
3.3.6	Določanje adhezije na polistirenske MTP z reagentom XTT	32
3.3.7	Optimizacija določanja adhezije v mikrotitrski ploščici z reagentom XTT	34
3.3.7.1	Vpliv volumna reagenta XTT	36
3.3.7.2	Določanje časa inkubacije kulture z reagentom XTT	36
3.3.7.3	Vpliv koncentracije reagenta XTT.....	36
3.3.8	Določitev adhezije različnih vrst bakterij z optimizirano metodo z reagentom XTT.....	36

3.3.9	Vrednotenje rezultatov in statistična analiza	37
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	38
4.1	OPTIMIZACIJA METODE BARVANJA S KRISTAL VIOLETOM	38
4.1.1	Vpliv faze rasti bakterijskega inokuluma.....	38
4.1.2	Vpliv začetnega števila celic v gojišču	39
4.1.3	Vpliv obogatitve gojišča z dodatkom glukoze	40
4.1.4	Vpliv mešanja in sušenja mikrotitrskih ploščic	42
4.1.5	Vpliv sušenja in toplotne fiksacije.....	42
4.1.6	Vpliv koncentracije barvila kristal violet	43
4.1.7	Vpliv vrste topila.....	45
4.2	ADHEZIJA BAKTERIJ DOLOČENA Z METODO BARVANJA S KRISTAL VIOLETOM.....	49
4.3	OPTIMIZACIJA METODE DOLOČANJA ADHEZIJE Z REAGENTOM XTT	51
4.3.1	Vpliv volumna reagenta XTT	51
4.3.2	Vpliv časa inkubacije vzorcev z reagentom XTT	52
4.3.3	Vpliv koncentracije reagenta XTT.....	54
4.4	ADHEZIJA BAKTERIJ DOLOČENA Z METODO DOLOČANJA ADHEZIJE Z REAGENTOM XTT.....	58
5	SKLEPI	61
6	POVZETEK	62
7	VIRI	63

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primeri razmer pri pripravi bakterijskega inokuluma za določitev adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja z barvilom kristal violet	14
Preglednica 2: Primeri razmer pri določitvi adhezije v mikrotitrski ploščic z metodo barvanja z barvilom kristal violet	15
Preglednica 3: Primeri kvantifikacije pri določitvi adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja z barvilom kristal violet	16
Preglednica 4: Izbor bakterijskih sevov za eksperimentalno delo.....	22
Preglednica 5: Laboratorijski aparati.....	26
Preglednica 6: Postopki sušenja mikrotitrške ploščice pri določanju adhezije bakterijskih celic z metodo barvanja s kristal violetom.	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema osnovnih stopenj eksperimentalnega dela	20
Slika 2: Splošna shema določanja bakterijske adhezije v mikrotitrski plošči z metodo barvanja s kristal violetom.....	27
Slika 3: Shema optimizacije metode določanja bakterijske adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja s kristal violetom.....	29
Slika 4: Splošna shema določanja bakterijske adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja z reagentom XTT (Pettit in sod., 2005).	33
Slika 5: Shema optimizacije določanja bakterijske adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja z reagentom XTT.	35
Slika 6: Vpliv faze rasti bakterij vrste <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72 na stopnjo adhezije.....	38
Slika 7: Vpliv faze rasti bakterij vrste <i>P. aeruginosa</i> ŽMJ87 na stopnjo adhezije.	39
Slika 8: Vpliv začetnega števila bakterij vrst <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72 in <i>P. aeruginosa</i> ŽMJ87 na stopnjo adhezije.....	40
Slika 9: Vpliv dodatka glukoze v gojišče TSB na stopnjo adhezije bakterij vrste <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72 določeno z metodo barvanja s kristal violetom.	41
Slika 10: Vpliv mešanja mikrotitrski ploščice na stopnjo adhezije bakterij vrste <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72 določeno z metodo barvanja s kristal violetom.	42
Slika 11: Vpliv toplotne fiksacije bakterij vrste <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72 določen z metodo barvanja s kristal violetom.....	43
Slika 12: Vpliv koncentracije barvila kristal violet na določitev stopnje adhezije bakterij vrste <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72 po 24-urni in 115-urni inkubaciji, določen z metodo barvanja s kristal violetom.	44
Slika 13: Vpliv koncentracije barvila kristal violet na stopnjo adhezije bakterij vrste <i>P. aeruginosa</i> ŽMJ87 po 24-urni inkubaciji, določen z metodo barvanja s kristal violetom..	45
Slika 14: Vpliv vrste topila na določitev stopnje adhezije bakterij vrste <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72 z metodo barvanja s kristal violetom po 24- in 115-urni inkubaciji.	46

Slika 15: Vpliv metanola in očetne kisline na določitev stopnje adhezije bakterij <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72 z metodo barvanja s kristal violetom.	47
Slika 16: Vpliv vrste topila na določitev stopnje adhezije bakterij vrste <i>P. aeruginosa</i> ŽMJ87 z metodo barvanja s kristal violetom.	47
Slika 17: Shema optimizirane metode določanja bakterijske adhezije z metodo barvanja s kristal violetom.	49
Slika 18: Vpliv vrste in seva bakterij na stopnjo adhezije določeno z metodo barvanja s kristal violetom.	50
Slika 19: Razvrstitev bakterijskih sevov v skupine glede na jakost adhezije, določene z metodo barvanja s kristal violetom.	51
Slika 20: Vpliv volumna reagenta XTT na določitev stopnje adhezije bakterij vrste <i>P. aeruginosa</i> ŽMJ87.	52
Slika 21: Stopnja adhezije bakterij vrste <i>P. aeruginosa</i> ŽMJ87 1 h in 3 h po dodatku reagenta XTT.	53
Slika 22: Povprečna razlika absorbanc bakterij vrste <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72 v času od 5 min do 245 min po dodatku reagenta XTT.	53
Slika 23: Primer določanja stopnje adhezije bakterij <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72 v mikrotitrski ploščici z reagentom XTT.	54
Slika 24: Vpliv koncentracije reagenta XTT na določitev stopnje adhezije bakterij vrste <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72.	55
Slika 25: Vpliv koncentracije reagenta XTT na določitev stopnje adhezije bakterij vrste <i>Staph. aureus</i> ŽMJ72 z grafičnim prikazom prehoda presnove reagenta XTT iz eksponentne v stacionarno fazo.	57
Slika 26: Primeri mikrotitrskih ploščic za določitev stopnje adhezije živih bakterijskih celic z reagentom XTT.	58
Slika 27: Določitev stopnje adhezije živih bakterijskih celic z reagentom XTT.	59
Slika 28: Razvrstitev bakterijskih sevov v skupine glede na jakost adhezije, določene z reagentom XTT.	59

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vpliv faze rasti bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 na stopnjo adhezije.

Priloga B: Vpliv faze rasti bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 na stopnjo adhezije pri različnem začetnem številu celic.

Priloga C: Vpliv začetnega števila bakterij vrst *Staph. aureus* ŽMJ72 in *P. aeruginosa* ŽMJ87 na stopnjo adhezije.

Priloga D: Vpliv dodatka glukoze v gojišče TSB na stopnjo adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽM72 določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

Priloga E: Vpliv mešanja mikrotitrne ploščice na stopnjo adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽM72 določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

Priloga F: Vpliv toplotne fiksacije na stopnjo adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽM72 določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

Priloga G: Vpliv koncentracije barvila kristal violet na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 po 24-urni in 115-urni inkubaciji z metodo barvanja s kristal violet.

Priloga H: Vpliv koncentracije barvila kristal violet na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 po 24-urni inkubaciji določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

Priloga I: Vpliv topila na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 po 24-urni inkubaciji z metodo barvanja s kristal violetom.

Priloga J: Vpliv topila na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 po 115-urni inkubaciji z metodo barvanja s kristal violetom.

Priloga K: Vpliv metanola in očetne kisline na določiteve stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 z metodo barvanja s kristal violetom.

Priloga L: Vpliv topil na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 z metodo barvanja s kristal violetom.

Priloga M: Vpliv vrste in seva bakterij na stopnjo adhezije določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

Priloga N: Vpliv volumna reagenta XTT na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87.

Priloga O: Stopnja adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 določena 1 h in 3 h po dodatku reagenta XTT.

Priloga P: Povprečna absorbanca kot merilo adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 v času od 5 min do 245 min po dodatku reagenta XTT.

Priloga Q: Vpliv koncentracije reagenta XTT na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72.

Priloga R: Statistična obdelava meritev absorbance pri različnih koncentracijah reagenta XTT za določitev adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72.

Priloga S: Določitev stopnje adhezije živih bakterijskih celic z reagentom XTT v času od 75-155 min po dodatku.

Priloga T: Določitev stopnje adhezije živih bakterijskih celic z z reagentom XTT.

Priloga U: Razvrstitev bakterijskih sevov v skupine glede na jakost adhezije, določene z metodo barvanja s KV in z reagentom XTT.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$\Delta\bar{A}$	razlika povprečnih absorbanc
A	absorbanca
$\bar{A}$	povprečna absorbanca
ALOA	selektivno gojišče po Ottavianiju in Agostiju
BP	selektivno gojišče Baird-Parker
CFU	število kolonijskih enot
eDNA	zunajcelična DNA
EPS	zunajcelične polimerne snovi
KV	kristal violet
MTP	mikrotitrski ploščica
P	verjetnost
PA	selektivno gojišče <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SD	standardna deviacija
TSA	triptični soja agar
TSB	triptični soja bujon
XLD	selektivno gojišče s ksilozo, z lizinom in deoksiholatom
XTT	natrijev 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid

1 UVOD

Veliko raziskav je usmerjenih v proučevanje bakterijskih biofilmov, saj v različnih industrijskih procesih predstavljajo velik problem. Težave se živilski industriji kažejo v mehanskih ovirah, slabšem prevajanju toplote, biološkem obremenjevanju kovinskih delov opreme in delov iz umetne snovi, kar posledično lahko privede do kontaminacije živil z mikroorganizmi. Na primer v mlečni industriji kontaminacija s tvorci biofilma privede do povzročitve močnih priokusov, kot so zagrenjenost, žarkost ali starikav okus. V pivovarnah lahko tvorba biofilma privede do kislega in maslenega okusa piva. Prav tako predstavljajo biofilmi problem v vinskih kletah, ki se kažejo v tvorbi neželenih arom (miševina), zagrenjenosti in maslenega okusa vin. Biofilmi redko predstavljajo tveganje za zdravje v industriji brezalkoholnih pijač in sadnih sokov, vendar so potencialni vir dolgotrajnih kontaminacij in povzročitelji kvarjenja proizvodov. V sistemih za recikliranje vode je tvorba biofilma problematična zlasti v sektorju ribogojstva, kjer biofilmi v vzrejni bazenih in filtracijskih enotah, cevovodih in črpalkah lahko povzročijo velike finančne izgube in izbruh bolezni (Børge K. M., 2014).

V zadnjih nekaj letih je bilo opisanih veliko različnih metod kvantifikacije bakterijske adhezije oz. biofilma. Metode lahko v grobem razdelimo na tiste, ki temeljijo na kvantifikaciji biomase (merimo število živih in mrtvih celic), na sposobnosti preživetja (merimo količino živih celic) in na metode, kjer s posebnimi tehnikami barvanja kvantificiramo bakterijsko matriko.

Metodo določanja adhezije in tvorbe biofilma v mikrotitrski ploščici (MTP) odlikuje enostavnost, prilagodljivost različnih aplikacij k splošnemu protokolu, enostavno določanje vplivov drugih dejavnikov glede na obseg in kinetiko vezave oz. tvorbe biofilma in sočasno spremljanje pritrditve večjega števila mikroorganizmov. Ta metoda predstavlja pomembno orodje za študij zgodnjih faz tvorbe biofilma in omogoča učinkovite analize dejavnikov, ki sodelujejo pri sami celični pritrditvi.

Namen našega raziskovalnega dela je bila optimizacija metode za določanje adhezije oz. tvorbe bakterijskega biofilma v mikrotitrski ploščici z barvilom kristal violet (KV). Metoda barvanja s kristal violetom se je v letih od prvega opisa (Christensen in sod., 1985) izpopolnjevala in razvijala v različne smeri, kar je privedlo do kopice različnih bolj in manj kvalitetnih načinov za ovrednotenje adhezije in tvorbe bakterijskega biofilma. Glavna pomanjkljivost metode določanja biofilma z barvilom kristal violet je ta, da ne poda informacije o živosti celic. Barvilo KV namreč obarva celice tako žive kot mrtve kot tudi celični matriks. Zato smo za razlikovanje med živimi in mrtvimi celicami uporabili metodo, ki temelji na metabolni aktivnosti živih celic z reagentom XTT (natrijev 2,3-bio-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid), pri kateri je pomerjena absorbanca sorazmerna številu metabolično aktivnih mikrobnih celic.

1.1 DELOVNE HIPOTEZE

Pri določanju bakterijske adhezije v mikrotitrski ploščici (MTP) z barvilom kristal violet (KV) smo predpostavili, da bo:

- ❖ mešanje vsebine MTP ugodno vplivalo na spiranje nepritrjene kulture in/ali reagentov,
- ❖ tehnika sušenja vsebine MTP vplivala na občutljivost in reprezentativnost rezultatov,
- ❖ obogatitev osnovnega gojišča triptični soja bujon (TSB) z glukozo ugodno vplivala na stopnjo bakterijske adhezije,
- ❖ ključni vpliv na reprezentativnost rezultatov imela koncentracija KV in izbor topila,
- ❖ starost bakterijske kulture vplivala na stopnjo adhezije,
- ❖ začetno število celic v MTP vplivalo na stopnjo adhezije,
- ❖ vrsta (in sev) bakterijske kulture vplivala na stopnjo adhezije.

Pri določanju bakterijske adhezije v MTP z barvilom XTT ((natrijev 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid)) smo predpostavili, da bo na določitev stopnje živosti adherirane kulture vplival:

- ❖ volumen reagenta XTT in
- ❖ koncentracija reagenta XTT.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJSKA ADHEZIJA

Bakterijska adhezija je dinamičen, večstopenjski proces kompleksnih interakcij vezave bakterijskih adhezinov na receptorska mesta (površina, gostitelj) (Abraham in sod., 2015). Predstavlja lahko temelj patogeneze, saj je prvi potreben korak za povzročitev okužb in vzbuja veliko skrb v medicini, industriji in okolju (Vesterlund in sod., 2005).

Generični biološki cikel bakterijske adhezije in rasti adherirane populacije imenujemo biofilm (Garrett in sod., 2008). Njegova tvorba se začne z adhezijo posameznih celic na biotično ali abiotično površino (Myszka in Czaczyk, 2011). Sam biofilm bi lahko opisali kot mikrobiološko skupnost celic, ene ali več vrst (mikrokolonija) s spremenjenim fenotipom, vgrajenih v matrico eksopolisaharidov. V odvisnosti od vrste bakterij je matriks biofilma sestavljen iz 10–25 % celic in 75–90 % zunajceličnih polimernih snovi (EPS) (Garrett in sod., 2008). Bakterije so mikroorganizmi, ki imajo veliko tendenco adhezije na površino in tvorbe biofilma (Boland in sod., 2010). Približno 99 % mikroorganizmov v naravi tvori biofilm. Ta jim omogoča sposobnost preživetja pri pomanjkanju hranil, prilagajanje na fenotipske variacije in dinamiko okolja ter zaščito pred protimikrobnimi snovmi (Garrett in sod., 2008). Zato je razumevanje bakterijske adhezije oz. tvorbe biofilma ključnega pomena pri oblikovanju strategij za preprečevanje in odpravo posledic bakterijske kolonizacije (Abraham in sod., 2015).

Številni dejavniki, ki sodelujejo pri bakterijskemu oprijemu, kot npr. površinska obdelava, masni transport, površinski naboj, hidrofobnost in hrapavost površine, gojišče in površinska mikrotopografija lahko otežijo njihovo točno opredelitev in vsesplošen pomen vsakega dejavnika na adhezijo (Palmer in sod., 2007).

2.1.1 Adhezija in tvorba biofilma

Struktura in funkcija biofilma variirata v odvisnosti od vrste in seva bakterij, vendar lahko tvorbo biofilma splošno opišemo v štirih korakih: oblikovanje kondicionirnega sloja, reverzibilna adhezija, ireverzibilna adhezija in rast pritrjene kulture (Boland in sod., 2010).

Bakterijsko pritrditev na razpoložljivo površino in nadaljnji razvoj biofilma narekujejo številne spremenljivke, vključno z vrsto bakterij, sestavo površin, okoljskih dejavnikov in bistvenih metaboličnih produktov (Dunne, 2002). Primarna adhezija med bakterijo in abiotsko površino poteka preko nespecifičnih fizikalno-kemijskih interakcij medtem, ko je bakterijski oprijem na biotske površine urejen s specifičnimi molekularnimi mehanizmi (lektin, ligand ali adhezin) (Dunne, 2002).

Začetne fizikalno-kemijske interakcije med bakterijo in površino so temeljni del adhezije, ki omogočijo nadaljnjo molekulsko ali celično fazo oprijema med bakterijo in površino (Katsikogianni in Missirlis, 2004). Primarni oprijem lahko predstavlja reverzibilno interakcijo med kondicionirnim slojem in planktonskimi celicami. Ta je posredovan preko številnih fizikalno-kemijskih interakcij, ki opredeljujejo vezavo bakterijske celične površine s kondicionirnim slojem (Dunne, 2002). Suspenzija substrata in bakterij se s pomočjo sile težnosti ali/in s tokom gibanja usede in adsorbira na podlago (Garrett in sod., 2008). Posledično se površina prekrije s slojem majhnih organskih molekul (proteini, ioni in voda), ki so prisotne v mediju in tvorijo tako imenovani kondicionirni sloj (Boland in sod., 2010). Kondicionirni sloj je temelj, na katerem biofilm raste, in je lahko organskega

ali anorganskega izvora. Omogoča pritrdišče bakterij in modificira dostop hranil, potrebnih za rast bakterijske združbe (Myszka in Czaczyk, 2011).

Za uspešno pritrditev se morajo bakterije najprej približati površini, bodisi naključno npr. s tokom fluida, ki teče preko površine ali usmerjeno preko kemotakse in gibljivosti (Dunne, 2002). Bakterijski transport skozi substrat in oprijem na podlago sta odvisna od različnih fizikalno-kemijskih sil, kot je Brownovo gibanje, vpliv privlačnih van der Waalsovih sil, gravitacijske sile, učinka elektrostatičnega naboja površine in hidrofobnih interakcij. Na bakterijsko gibanje vpliva koncentracijski gradient, difuzija, kemotaksa (regulacija celičnih adhezinov) ali haptotaksa (površinska vezava kemoatraktivnih snovi (aminokisline, sladkorji, oligopeptidi)) (Katsikogianni in Missirlis, 2004). Ko celica doseže kritično bližino površine (običajno < 1 nm) je oprijem določen z vsoto privlačnih ali odbojnih sil med dvema površinama. Te sile vključujejo vpliv elektrostatičnih in hidrofobnih interakcij, steričnih pregrad, van der Waalsovih sil in temperature. Elektrostatične interakcije so po večini odbojne, saj je večina bakterij in inertnih površin z negativnim nabojem. Zato predvidevajo, da imajo na primarni oprijem večji vpliv hidrofobne interakcije. Primarni oprijem se po navadi pojavi med celico in kondicionirnim slojem, katerega hidrofobnost lahko močno variira glede na molekule prisotne v samem sloju. Odboj med dvema površinama lahko celice premagujejo s posebnimi molekularnimi interakcijami adhezinov (npr. pili), ki so lokalizirani na celični površini. Trajanje primarnega oprijema je odvisno od vsote vseh opisanih spremenljivk, lahko pa površinska kemija potisne ravnotežje v korist oprijema, saj predvideva, da se organske snovi v raztopini koncentrirajo bližje površini in da se celice pogosto zadržujejo v okolju, bogatem s hranili (Dunne, 2002).

Druga stopnja oprijema je povezana z vezavo specifičnih adhezinov na površino in predstavlja ireverzibilen oprijem bakterij. Na tej točki ohlapno vezane celice utrdijo oprijem s tvorbo (produkcijo) zunajceličnih polisaharidov in/ali vključitvijo specifičnih receptorskih ligandov (pili, fimbrije) lokaliziranih na celični površini (Dunne, 2002). Prevladujejo specifične molekularne interakcije med bakterijskimi površinskimi strukturami (kapsula, fimbrije ali pili in sluz) in površino substrata. Pri večini bakterij funkcionalni del površinskih struktur predstavljajo adhezini, še posebej, ko substrat predstavlja tkivo gostitelja (Katsikogianni in Missirlis, 2004). Bakterijam flagele, fimbrije in pili omogočajo, da se s pomočjo kemijskih reakcij oksidacije in hidratacije povežejo v mrežo kondicionirnega sloja in se tako ireverzibilno adsorbirajo in imobilizirajo (Garrett in sod., 2008).

Ob zaključku druge faze postane oprijem ireverzibilen – celice so trdno pritrjene na podlago. V tej fazi se lahko planktonski mikroorganizmi in/ali različne že pritrjene celice povežejo med seboj in tvorijo mikrobne agregate na površini substrata. Zanimivo je, da lahko prisotnost ene vrste bakterij na površini spodbudi oprijem druge vrste. Tvorba bakterijskih adhezinov je gensko regulirana in omogoča regulacijo transkripcije tudi v odvisnosti od vplivov okolja. Ko so bakterije ireverzibilno pritrjene na površino, se prične zorenje biofilma (Dunne, 2002). Razvoj biofilma in sprostitve celic (bodisi posamezno bodisi v skupinah) je reguliran proces celične komunikacije, odvisen od gostote populacije. Komunikacija poteka preko genskega izražanja signalnih molekul, kot so acilirani hemoserin laktoni (AHL) pri gramnegativnih bakterijah in specifični peptidi pri grampozitivnih bakterijah.

Rast biofilma, ki je odvisna od količine dostopnih hranil v biofilmu in okoliškem koloidnem sistemu, vodi do tvorbe mikrokolonij, na podlagi katerih se biofilmska površina

širi in povečuje. Celice sintetizirajo tudi dodatne zunajcelične polimere, ki pomagajo pri procesu pritrditve celic na površino in zaščitijo biofilmski agregat pred okoljskimi nihanji. Zorenje biofilma je počasen proces, v nekaj dneh doseže debelino nekaj milimetrov, odvisno od razmer v okolju (Myszka in Czaczyk, 2011).

2.1.2 Adhezijske interakcije

Ko se celice približajo površini, je pritrditev določena preko fizikalno-kemijskih interakcij, ki so lahko privlačne ali odbojne, odvisno od kemijske kompleksnosti prepletanja bakterijske in substratne površine v vodni fazi (Katsikogianni in Missirlis, 2004). Za razumevanje sil, ki določajo bakterijski oprijem, se uporabljajo trije teoretični fizikalno-kemijski pristopi: teorija DLVO, termodinamska teorija in razširjena teorija DLVO (Katsikogianni in Missirlis, 2004).

Teorija DLVO je bila uporabljena za opis interakcij med celico in površino kot ravnotežje med privlačnimi van der Waalsovimi silami (medmolekulske sile) in splošno odbojnimi interakcijami električne dvojne plasti (Sternov in difuzni sloj). Teorija DLVO upošteva nizko stopnjo bakterijske oprijemljivosti na negativno nabite površine (eksperimentalno ugotovljeno), ne pojasni pa različne stopnje adhezije na različnih površinah ali vpliva elektrolitov v suspenziji. Lahko bi trdili, da teorija DLVO opisuje enega izmed sestavnih delov procesa celične adhezije – premagovanje elektrostatičnih pregrad, vendar pa ne opisuje molekularnih interakcij (med polimeri na bakterijski površini z molekularnimi skupinami na podlagi). Poleg tega ne upošteva bakterijske strukture in prisotnosti različnih molekul na celični površini, ki vplivajo na razdaljo celic od površine. Prav tako ne upošteva interakcij v odvisnosti od hrapavosti, hidrofilnosti/hidrofobnosti površin in površinskega naboja (Katsikogianni in Missirlis, 2004). Bakterijska celična površina ni le inertno-rigidna strukturna komponenta celice, ampak tudi kompleksna matrika proteinov, ogljikovih hidratov in ostalih komponent, s katerimi celica zaznava spreminjajoče se okoljske parametre medija (spremembe ionske moči, pH, prisotnost makromolekul in drugih površin), v katerem se nahaja in se odziva na kemijske ali fizikalne stresne dejavnike (Palmer in sod., 2007). Pri opisu bakterijske adhezije s teorijo DVLO obravnavamo bakterijsko celico kot koloidni delec z enakomerno površino in enakomerno porazdeljenim površinskim nabojem. Celico sestavljajo številne kompleksne strukture, kot so flagele, pili, fimbrije, glikoproteini, ogljikovi hidrati, teihoična kislina in ostale biološke substance proteinskega izvora. Ta kompleksna celična struktura opredeli celični površinski naboj na mikroskopski ravni celične površine, kar lahko posreduje celično pritrditev preko lokalne elektrostatične privlačnosti, ne glede na skupno celično odbojno naravo (Palmer in sod., 2007).

Termodinamska teorija je drugi fizikalno-kemijski pristop za opis bakterijske adhezije. Upošteva različne vrste privlačnih in odbojnih interakcij – van der Waalsove, elektrostatične, dipol, ki jih skupno izraža v smislu proste energije. Pristop zahteva oceno numeričnih vrednosti termodinamičnih parametrov – vsota Gibbsove energije, ki je potrebna za bakterijsko adhezijo (Katsikogianni in Missirlis, 2004). Termodinamski pristop razumevanja bakterijske adhezije temelji na prosti površinski energiji pri interakciji med površinami (Hori in Matsumoto, 2010). Predpostavlja, da je adhezija reverzibilen proces, kar pogosto ne drži. Hidrofobnost je pomemben dejavnik, ki vpliva tako na adhezijo kot tudi na agregacijo bakterijskih celic in ga lahko utemeljimo s termodinamskim pristopom oprijema bakterij na hidrofobne in hidrofilne površine (bakterije s hidrofobno/hidrofilno celično površino se lažje adherirajo na hidrofobne/hidrofilne

površine) (Hori in Matsumoto, 2010). Termodinamski pristop je ravnotežni model, ki ne dopušča kinetične razlage. Na splošno je zaradi kompleksnosti celične površine zelo težko pridobiti natančne vrednosti proste energije bakterij. Tako so lahko izračuni prostih sprememb energije med adhezijo napačni. Poleg tega termodinamska teorija velja za zaprt sistem, v katerem se energija ne dovaja, bakterije pa so živi organizmi, ki pretvarjajo substrat v energijo, ki sploh omogoča adhezijo, sintezo adhezinov in ostale fiziološke mehanizme. Z uporabo termodinamske teorije ne moremo v celoti napovedati ali pojasniti bakterijske adhezije, vendar pa pristop vsekakor pomaga pri obrazložitvi številnih dejavnikov, ki vplivajo na bakterijski oprijem (Katsikogianni in Missirlis, 2004).

Niti teorija DLVO niti termodinamska teorija ne pojasnita bakterijske adhezije v celoti. Iz tega razloga so z upoštevanjem sil dolgega dosega, hidrofilnih/hidrofobnih in osmotskih interakcij bakterijske adhezije teorijo DLVO razširili. **Razširjena teorija DLVO** je obetaven način študije bakterijskega oprijema, vendar pa še ni bila natančno preizkušena (Katsikogianni in Missirlis, 2004).

2.2 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA BAKTERIJSKO ADHEZIJO

Bakterijska adhezija je zelo zapleten proces, odvisen od številnih dejavnikov, vključno z okoljskimi dejavniki, pretoka medija, prisotnosti serumskih proteinov ali antibiotikov, bakterijskih lastnosti in karakteristike površin (Katsikogianni in Missirlis, 2004).

2.2.1 Okoljski dejavniki

Bakterijska sposobnost adhezije in tvorbe biofilma je odvisna od več okoljskih dejavnikov, npr. prisotnosti drugih bakterij, temperature, dostopnosti hranil in pH. Čeprav mehanizmi, povezani s temi učinki niso vedno pojasnjeni, lahko v nekaterih primerih vplivajo na spremembe na bakterijski celični površini in posledično na tvorbo biofilma (Van Houdt in Michiels, 2010).

Hidrodinamske razmere so prevladujoči okoljski dejavniki, ki močno vplivajo na število adheriranih bakterij, uspešnost adhezije in strukturo biofilma. Suspendirane bakterije se lahko odzovejo na strižne sile s spremembo njihove hitrosti rasti, morfologije, velikosti, gostote in presnove. Koncentracije elektrolitov (npr. KCl, NaCl) in pH v okolju prav tako vplivajo na bakterijsko adhezijo. Ionska moč in pH vplivata na bakterijski oprijem s spreminjanjem površinskih značilnosti bakterij kot materialov (hidrofobnost, naboj), zato posledično prihaja do sprememb v interakcijah začetne faze oprijema. Prisotnost antibiotikov zmanjšuje bakterijsko adhezijo v odvisnosti od bakterijske občutljivosti in koncentracije antibiotika. Prisotnost organskih molekul (serumski ali tkivni proteini, kot so albumini, fibronectini, fibrinogen, laminini, denaturiran kolagen in drugi) pospešuje ali zavira bakterijsko adhezijo, bodisi z vezavo na površino substrata, vezavo na bakterijsko površino ali s samo prisotnostjo v tekočem mediju v času oprijema (Katsikogianni in Missirlis, 2004).

2.2.2 Lastnosti površin in mikrotopografija

Lastnosti površin so pomembni dejavniki, saj skupaj z bakterijskimi celicami določajo potencial nastanka biofilma. Izbira materiala je zato velikega pomena pri oblikovanju površin, ki so v neposrednem stiku z živili. Higienško stanje materiala določimo na podlagi lastnosti, kot so hrapavost, sposobnost čiščenja in razkuževanja, omočljivosti (hidrofobnost) in občutljivosti, ki vplivajo na sposobnost celic, da se adherirajo na določeno površino. Materiali, ki se pogosto uporabljajo v živilski industriji, so nerjaveče

jeklo, različne vrste umetnih materialov, guma, steklo, keramika in cement (Van Houdt in Michiels, 2010).

Dejavniki, ki vplivajo na bakterijski oprijem na bioloških površinah vključujejo kemijsko sestavo materiala, površinski naboj, hidrofobnost in hrapavost površin ali fizično konfiguracijo. Površinska hrapavost (večja površina) in nepravilnosti polimernih površin (ugodnejša mesta za kolonizacijo) spodbujajo bakterijski oprijem in tvorbo biofilma. Bakterije prednostno kolonizirajo porozno površino z več utori in drugimi nepravilnostmi na površini v primerjavi z ravnimi in gladkimi površinami. Utori in praske, ki so v velikostnem razredu bakterijske celice, povečajo kontaktno površino med celico in površino in s tem posledično potencial vezave. Zaradi različnih fizikalno-kemijskih lastnosti bakterijskih vrst in sevov kot materialov (kontaktnih površin) je stopnja adhezije različna med vrstami in sevi (Katsikogianni in Missirlis, 2004).

Nerjaveče jeklo je najpogostejše uporabljen material v živilski industriji, saj ga odlikuje enostavnost proizvodnje, trpežnost, kemijska in fizikalna inertnost, obstojnost pri različnih temperaturnih režimih in tlačnih razlikah, splošna odpornost proti koroziji in običajno enostavno čiščenje. Novejše mikrotopografije nerjavečega jekla, narejene z vrstično elektronsko in atomsko mikroskopijo, so pokazale drobne razpoke in reže, ki bakterijam omogočajo lažjo pritrditev in hkrati zaščito pred kemijskimi čistilnimi sredstvi in strižnimi silami (Palmer in sod., 2007).

2.2.3 Hidrofobnost

Na splošno se bakterije s hidrofobnimi (hidrofilnimi) lastnostmi boljše adherirajo na hidrofobne (hidrofilne) površine. Izkazalo pa se je, da ima hidrofobnost površine pomembnejšo vlogo pri bakterijski adheziji kot sama bakterijska hidrofobnost (Katsikogianni in Missirlis, 2004). Hidrofobnost je eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vpliva na začetni oprijem na podlago pri bakterijah kot tudi kvasovkah in parazitih (*Cryptosporidium parvum* in *Giardia lamblia*). Celična hidrofobnost je v precejšnji meri odvisna od proteinske strukture celične stene (Palmer in sod., 2007). Vloga lipopolisaharidov pri procesu adhezije mikroorganizmov na podlago še vedno ni povsem raziskana, vendar njihova prisotnost povzroči hidrofilnost, medtem ko odsotnost poveča hidrofobnost celične stene, kar nakazuje, da je bakterijska celica sposobna zaznati spremembe v zunanjem okolju in posledično spremeniti glavne celične površinske lastnosti, kot je hidrofobnost (Katsikogianni in Missirlis, 2004).

2.2.4 Bakterijski površinski naboj

Večina delcev pridobi površinski električni naboj v vodni suspenziji zaradi ionizacije njihovih površinskih skupin. Bakterije v vodni suspenziji so skoraj vedno negativno nabite. Naboj površine bakterij se spreminja glede na bakterijsko vrsto, vrsto gojišča, pH in ionsko moč gojišča, bakterijsko starost in bakterijske površinske strukture. Vendar pa prispevek bakterijskega površinskega naboja na bakterijsko adhezijo še ni najboljše proučen (Katsikogianni in Missirlis, 2004).

Pri nevtralnem pH je bakterijska celična membrana po navadi negativno nabita. Magnituda naboja je pod vplivom kulture in variira od vrste do vrste. Odvisna je od starosti kulture, ionske moči in pH. Naboj celične površine je pogosto opisan kot bakterijski zeta potencial, ki ga določimo na podlagi mobilnosti bakterijske celice na električnem polju ob znani koncentraciji soli in hidroksidnih ionov v raztopini. Spremembe naboja celične stene lahko pripišemo disociaciji kislinskih (karboksilna, fosfatna in amino skupina) in bazičnih

komponent na celični steni. Posledično je zeta potencial bakterijske celice odvisen od ionske jakosti medija, v katerem so suspendirane celice. To pomeni, da višja kot je ionska moč, lažje poteče nevtralizacija celične površine. Relativni celični naboj lahko kromatografsko ocenimo preko afinitete na ionski ali kationski medij. Celični naboj je lahko odvisen tudi od pH medija. Površinski naboj inertnih materialov, na katerega se lahko bakterije adherirajo, prav tako igra pomembno vlogo pri bakterijski adheziji. Jakost kovin, ki so protonirane (pozitivno nabite skupine), nevtralne ali disociirane (negativno nabite skupine) je močno odvisen od pH medija. Različne kovine imajo tudi različne vrednosti pK_a in pK_b (negativni desetiški logaritem disociacijske konstante kisline oz. baze), zato lahko različna razmerja kovinskih oksidov na površini pripomorejo k variabilnosti površinskega naboja pri enakem pH. Obdelava površin prav tako lahko vpliva na površinski naboj in s tem posledično na bakterijsko adhezijo (Palmer in sod., 2007).

2.2.5 Bakterijska celična stena

Fizikalno-kemijska struktura celične stene odločilno vpliva na adhezijo in posledično na nastajanje biofilma. Flagelarna gibljivost je ključnega pomena za začetni stik celica-podlaga in na splošno velja, da je gibljivost virulenčni dejavnik patogenih bakterij, saj jim olajša kolonizacijo gostitelja. Flagele lahko vplivajo na adhezijo in formacijo biofilma preko različnih mehanizmov v odvisnosti od bakterijske vrste. Flagelarna gibljivost glede na pretok substrata omogoča bakterijam premagovanje odbojnih sil med celico in površino, poleg tega z gibanjem po površini težijo k rasti in širjenju biofilma. Nitaste strukture celične površine – fimbrije so klasificirane na podlagi njihovih adhezivnih sposobnosti, antigenskih ali fizikalnih lastnosti, ali na osnovi podobnosti primarne aminokislinske sekvence. Fimbrije tipa 1 so paličaste oblike in široki približno 7 nm ter dolgi 1 μm . So najpogostejši adhezini tako komenzalnih kot patogenih bakterij (*E. coli*). Bakterije vrste *Klebsiella pneumoniae* proizvajajo fimbrije tipa 1 in tipa 3, ki jim olajšajo adhezijo na steklene površine in polipropilen ter pripomorejo k oblikovanju zrelega biofilma na polistirenu. Fimbrije tipa 4 spodbujajo nastanek močno adheriranega biofilma pri oportunistično patogenih bakterijah vrste *Aeromonas caviae*, vplivajo na vezavo bakterij vrste *Pseudomonas aeruginosa* na nerjaveče jeklo, polistiren in polivinilklorid. Pili (strukturno podobni fimbrijam) so vključeni v proces prenosa genov – konjugacija. Proces konjugacije lahko spodbudi razvoj biofilma, saj lahko konjugativni pilus deluje kot adhezivni dejavnik, ki omogoča nespecifično celično pritrditev na površino ali kontakt celica-celica. Pri tem lahko visoka gostota bakterijske populacije v biofilmu stimulira konjugacijo in plazmidno širjenje in tako prispeva k širjenju rezistentnih genov na plazmidu (Van Houdt in Michiels, 2010).

Mnoge bakterije proizvajajo in izločajo zunajcelične polisaharide (EPS), ki so poleg nukleinskih kislin, proteinov, glikoproteinov in lipoproteinov pomembni sestavni deli ekstracelularnega matriksa biofilma. EPS povečajo odpornost biofilma na biocide in pomembno vplivajo pri tvorbi biofilma v odvisnosti od strukture, relativne količine in naboja površine. Lipopolisaharidi (LPS) igrajo pomembno vlogo pri nastanku biofilma, hkrati pa vplivajo na občutljivost bakterij na razkužila, antibiotike in druge biocidne molekule (Van Houdt in Michiels, 2010).

Prisotnost eDNA (zunajcelična DNA, sproščena z avtolizo celic) na površini bakterijske celice s pomočjo kisinsko-bazičnih interakcij poveča stopnjo adhezije in površinsko agregacijo. Hkrati ustvarja termodinamsko ugodne razmere za bakterijsko oprijemljivost na hidrofobne površine. Pri oprijemu na hidrofobne površine v enaki meri poteka adhezija

in agregacija, medtem ko je oprijem na hidrofilne površine odvisen predvsem od bakterijske agregacije (Das in sod., 2010).

2.2.6 Bakterijska signalizacija

Sporazumevanje (angl. quorum sensing) bakterij temelji na proizvodnji signalnih molekul z nizko molekulsko maso. Pri nizki koncentraciji bakterijskih celic bo tudi zunajcelična koncentracija signalnih molekul nizka. S povečanjem gostote celic v naraščajoči populaciji biofilma se doseže kritična signalna koncentracija, ki omogoča bakterijam, da se odzovejo. Narava signalnih molekul je raznolika, večina gramnegativnih bakterij tvori N-acil-hemoserin lakton (AHL), grampozitivne bakterije pa pogosto uporabljajo aminokisline in kratke post-translacijsko spremenjene peptide. Mehanizmi vključeni v sporazumevanje bakterijskih celic kontrolirajo različne funkcije, npr. virulenco, razvoj biofilma in proizvodnjo protimikrobnih spojin in drugih sekundarnih metabolitov (Van Houdt in Michiels, 2010).

2.3 POSLEDICE NASTANKA BIOFILMA IN NJEGOVO PREPREČEVANJE

Tvorba biofilma v živilsko-predelovalnih okoljih pomeni nevarnost, saj predstavlja stalni vir mikrobne kontaminacije. Posledice so kvarjenje in/ali kontaminacije živil s patogenimi mikroorganizmi. Pomembna posledica je tudi povečana odpornost mikroorganizmov proti razkužilom. Protimikrobna učinkovitost razkužil je odvisna od številnih dejavnikov, vključno z lastnostmi površine, temperature, časa izpostavljenosti, koncentracije, pH in bakterijske odpornosti. Do mikrobne adaptacije in odpornosti celic v biofilmu vodijo različni mehanizmi, kot so: počasno ali nepopolno prodiranje biocida v biofilm, spremenjena fiziologija celic biofilma kot odraz prilagoditvenega odziva na stres ali diferenciacije populacije celic. Prednostna naloga v živilski industriji je vlaganje v razvoj učinkovitih strategij čiščenja in razkuževanja, v smeri preprečevanja in/ali odprave biofilma. Ključni mehanizmi vključujejo prepoznavo ogroženih območij obstoječe proizvodne linije s sistematičnim spremljanjem ekološke in mikrobne obremenitve (Van Houdt in Michiels, 2010).

V živilski industriji si prizadevajo razviti higiensko oblikovano opremo, pribor, material (z upoštevanjem toplotne, mehanske in kemične odpornosti) in metode za lažje odstranjevanje in aktivno preprečevanje nastanka biofilmov na površinah, ki so v neposrednem stiku z živili (Van Houdt in Michiels, 2010).

Biofilmi poleg povečanega tveganja kontaminacije živil povzročajo tudi slabši prenos toplote, povečan koloidni upor in trenje, povečujejo stopnjo korozije površin, ki vodijo k izgubi energije in slabši produktivnosti. Patogena mikroflora na živilskih površinah in predelovalnih okoljih lahko povzroči navzkrižno kontaminacijo ali po-procesno kontaminacijo. Posebno velika možnost navzkrižne kontaminacije je v mlekarški in mesni industriji (Garrett in sod., 2008).

2.3.1 Strategija kontrole biofilma v obratih

Odkar biofilmi v živilski panogi predstavljajo problem, je bilo narejenih veliko študij z namenom, da bi bolje razumeli njihov razvoj in širjenje. Posledično je veliko raziskav pripomoglo k pomembnim ukrepom v »boju« proti biofilmom. Prva in najpomembnejša poteza preprečitve tvorbe biofilma je redno čiščenje in razkuževanje, ki celicam onemogoča ireverzibilno pritrditev na površino. Za preprečevanje tvorbe in nadaljnega širjenja biofilma uporabljamo različne strategije – dobra higienska praksa (DHP), CIP

(ang. cleaning in place), uporaba kemijskih sredstev v strogih režimih razkuževanja, inhibicija adhezije mikroorganizmov z uporabo materialov, ki ovirajo njihovo oprijemanje. Ena izmed možnosti je tudi premazovanje delovnih površin s protimikrobnimi sredstvi (CaCO_3 , srebrovi premazi). Adhezijo lahko preprečimo tudi s površinsko aktivnim delovanjem – pred-kondicioniranjem, tako postane površina bolj hidrofilna, kajti hidrofobne površine znatno povečajo možnost bakterijske adhezije (Srey in sod., 2013). Mnogi mikroorganizmi v biofilnu izražajo drugačne fenotipske in genotipske značilnosti kot planktonski in zaradi tega je nadzor mikroorganizmov zahtevnejši (Hori in Matsumoto, 2010).

2.3.2 Protimikrobna sredstva

Uporaba protimikrobnih sredstev je pogosto uporabljena metoda nadzora tvorbe biofilma. Mikroorganizmi v biofilmih so na splošno odpornejši na mnoge protimikrobne snovi, s katerimi učinkovito odstranjujemo planktonsko živeče celice. Še posebno zaskrbljujoča je odpornost na antibiotike pri patogenih bakterijah v biofilnu, saj so vzrok mnogih kroničnih bakterijskih okužb. Klor je kot sestavina sredstev za razkuževanje najpogostejše uporabljeno razkužilo. S svojo zmerno oksidativno naravo reagira z različnimi komponentami bakterijskih celic. Vendar je njegova učinkovitost pri biofilmih za približno 4 velikostne razrede nižja kot pri planktonskih celicah. Za učinkovito razkuževanje biofilma je potrebna višja koncentracija klora, vendar v reakciji zlasti z visoko stopnjo organskih snovi prihaja do tvorbe škodljivih stranskih produktov. Stalna uporaba enakih sredstev za razkuževanje lahko povzroči mikrobno odpornost. Srebro, ki nima oksidacijske zmogljivosti, je eden izmed najbolj razširjenih biocidov, zlasti v medicini. Kombinacija dveh protimikrobnih sredstev, npr. srebra z antibiotikom (tobramicin) je lahko učinkovita strategija za preprečevanje adhezije in nastajanja biofilmov (Hori in Matsumoto, 2010).

2.3.3 Površinska modifikacija materiala

Površinska modifikacija materialov lahko izboljša ali prepreči bakterijsko adhezijo. Na primer: površinsko modificirano steklo zmanjša bakterijsko adhezijo za več kot 98 %. Kovalentno vezan poli-4-vinil-N-heksilpiridin bromid na stekleni površini ustvari površino, ki lahko zmanjša adhezijo bakterij vrst *Staph. epidermidis*, *P. aeruginosa*, in *E. coli*. do 94 ± 4 %, polietilen-oksidi na stekleni površini inhibirata bakterijsko in kvasno adhezijo, z zmanjšanjem Lifshitz – van der Waalsovih interakcij med celicami in stekleno površino (Hori in Matsumoto, 2010).

Raziskovalci so za nadzor bakterijske adhezije predlagali tudi modifikacije površin z RIGP-polimerizacijo (ang. Radiation-induced graft polymerization) različnih vrst monomerov in polimerov (npr. polietilen (PE)), kar omogoča pridobitev novih funkcionalnih skupin, ki lahko preprečijo ali vzpodbudijo bakterijsko adhezijo. Za nadzorovanje bakterijske adhezije lahko uporabimo tudi postopke, ki temeljijo na elektroodbojnih interakcijah med bakterijami z negativnim površinskim nabojem in površino (Hori in Matsumoto, 2010).

2.4 DOLOČANJE TVORBE BIOFILMA V MIKROTITRSKI PLOŠČICI

Določanje tvorbe biofilma v mikrotitrski ploščici (MTP) je preprosta metoda, ki omogoča sočasno spremljanje adhezije večjega števila mikroorganizmov. Metodo odlikuje enostavnost in prilagodljivost različnih aplikacij splošnemu protokolu ter možnost določanja vplivov drugih dejavnikov na obseg in kinetiko vezave oz. tvorbe biofilma (Merriott in sod., 2005).

Pomembno je, da imamo v okviru študij mikrobne adhezije v MTP pozitivno kontrolo in negativno kontrolo za vsako poskusno ploščico, še posebej pri določitvi majhnih razlik med bakterijskimi vrstami ali sevi. Do večjih variabilnosti rezultatov pride zaradi razmer inkubacije in pri spiranju MTP. Poleg tega je treba poudariti, da razen sposobnosti mikroorganizmov, da se adherirajo na površino, obstajajo tudi drugi dejavniki, ki lahko vplivajo na rezultate (npr. slabša rast se kaže kot pomanjkanje adhezijske kapacitete). Časovni potek bakterijske rasti in razmere za tvorbo biofilma bi bilo potrebno empirično določiti za vsak mikroorganizem, saj se stopnja tvorbe biofilma razlikuje od organizma do organizma. Na primer, pri respiraciji bakterij vrste *P. aeruginosa* se bakterije pretežno adherirajo na meji med substratom in zračnim medijem in tvorijo tako imenovani obroč, medtem ko se pri fermentaciji te bakterije adherirajo po celotni površini (Merritt in sod., 2005).

Kvantifikacija biofilma v MTP lahko temelji na določanju biofilmske biomase (kvantifikacija matriksa ter živih in mrtvih celic), živosti (kvantifikacija samo živih celic) in kvantifikaciji celičnega matriksa (temelji na specifičnem barvanju komponent matriksa) (Peeters in sod., 2008).

Pri študijah biofilma je model biofilma v MTP med najpogostejše uporabljenimi. Kultivacija mikroorganizmov v MTP spominja na bioproces z enkratnim polnjenjem, kajti med procesom ne dovajamo niti ne odvezujemo gojišča. Posledično se okolje za rast in razmnoževanje mikroorganizmov v MTP med eksperimentom spreminja. Študij biofilmov v MTP je uporabniku prijazen, široko uporaben sistem. Je poceni, potrebne so le majhne količine reagentov, ne zahteva posebne laboratorijske opreme, zagotavlja sočasno izvajanje velikega števila vzorcev in enostavno kvantifikacijo. Sistem raziskovalcem omogoča enostavno in hkratno spremljanje več parametrov, vključno s sestavo rastnega medija, inkubacijske temperature, koncentracije O₂, CO₂. Biofilmi se tvorijo direktno na dnu in po stenah MTP ali pa se pritrdijo na površino kupona, vstavljenega v MTP (Coenye in Neils, 2010).

2.5 METODE OCENJEVANJA STOPNJE BAKTERIJSKE ADHEZIJE

Raziskave biofilmov so postale multidisciplinarno delo, ki vključuje raziskovalce iz različnih področij, kot so mikrobiologija, kemija, fizika, inženirstvo in računalništvo. Po večini so raziskave biofilma usmerjene v strukturni, funkcionalni in ekološki vidik. Vključujejo analize tvorbe biofilma od začetnega oblikovanja – adhezija mikroorganizma na substrat, do razvoja v zrel biofilm in procesa separacije. Proučujejo biokemijsko in mikrobno sestavo kot tudi arhitekturo biofilma, gensko ekspresijo in fiziološko aktivnost mikroorganizmov v biofilmu v odvisnosti od okoljskih dejavnikov. Študije vključujejo tudi raziskave kompleksnih večceličnih interakcij, ki temeljijo na celični signalizaciji, izmenjavi genskega materiala med celicami biofilma, absorpcijskih in zaščitnih mehanizmov biofilmov glede na izpostavljenost različnim anorganskim in organskim polutantom, kemičnim sredstvom kot so biocidi, detergenti, sintetične površinsko aktivne snovi in ksenobiotiki v kombinaciji s težkimi kovinami in reaktivnimi kisikovimi spojinami, kot tudi funkcijo biofilmov pri procesih biološke razgradnje. Analize biofilmov vključujejo mikroskopske, mikrobiološke, molekularne, biološke, kemijske in fizikalne metode (Denkhaus in sod., 2007).

Poudariti je potrebno, da so poenostavljene meritve *in vitro* lahko zavajajoče, saj je adhezija zapleten, dinamičen proces. Pri študijah bakterijske adhezije *in vivo* je substrat po navadi v stanju mehansko-dinamične napetosti, saj se površina lahko spremeni s časom in interakcijo površine s pretokom biološke tekočine. Poleg tega se lahko bakterije pritrdijo na površino reverzibilno ali ireverzibilno, sprostijo več snovi – adhezinov, katerih specifičnost, aktivnost in število je funkcija časa (Katsikogianni in Missirlis, 2004).

Obstajajo preprosti in enostavni sistemi za študij bakterijskega oprijema na različnih površinah. Načeloma temeljijo na numerični določitvi adheriranih celic (ne-adherirane celice se odstrani s spiranjem ali centrifugiranjem). Adherirane bakterije in bakterije biofilma lahko določimo z naslednjimi metodami (Katsikogianni in Missirlis, 2004):

Mikroskopske metode kvantifikacije in opazovanja morfologije adheriranih bakterij:

- ❖ Svetlobna mikroskopija (ang. Light microscopy),
- ❖ epifluorescenčna mikroskopija (ang. Image-analysed epifluorescence microscopy),
- ❖ vrstična elektronska mikroskopija (ang. Scanning Electron Microscopy) (SEM),
- ❖ konfokalna laserska mikroskopija (ang. Scanning Confocal Laser Microscopy),
- ❖ atomska mikroskopija (ang. Atomic Force Microscopy),
- ❖ vrstična konfokalna laserska mikroskopija (ang. CLSM),
- ❖ konfokalna ramanska mikroskopija (ang. CRM),
- ❖ elektronska mikroskopija (ang. EM),
- ❖ rentgenska mikroskopija (ang. XM),
- ❖ vrstična tipalna mikroskopija in spektroskopija (ang. SPM).

Metode določanja živosti bakterij:

- ❖ Štetje kolonij na trdih gojiščih (ang. plate counting),
- ❖ radioaktivno označevanje (ang. Radiolabelling),
- ❖ spektrofotometrija (ang. Spectrophotometry) (določanje z dodatkom reagenta INT, XTT, TTC, resazurin, uporaba bioluminiscence in biokemijskih označevalcev, npr. ATP (ang. Biochemical Markers), barvanje s klortetraciklinom (CTC barvanje) (ang. CTC staining)).

Druge metode:

- ❖ Spektrofotometrija (ang. Spectrophotometry) (npr. metoda barvanja z barvilom kristal violet ali metilenskim modrilom),
- ❖ merjenje debeline, gostote biofilma (ang. Thickness, Density Measurements) (SEM, Konfokalna mikroskopija),
- ❖ merjenje vsebine biofilma (ang. Measurement of Biofilm Content),
- ❖ masna spektrometrija (MS),
- ❖ molekularne metode.

2.5.1 Barvanje z barvilom kristal violet

Ena izmed prvih uporabljenih metod kvantifikacije bakterijskega biofilma je metoda barvanja z barvilom kristal violet (KV). Metoda temelji na vezavi barvila na negativno nabite bakterijske celične stene, polisaharide in zunajcelične polimere. Adsorbirano barvilo KV se po barvanju eluira s topilom (etanol, očetna kislina). Količina KV v eluatu se je sorazmerna količini biofilma. Ključne omejitve te metode so povezane z nizko ponovljivostjo, ki je odvisna od eksperimentalnih razmer za rast biofilma, narave in koncentracije topila ter elucijskega časa. Metoda ne podaja informacije o živih bakterijah,

saj z barvilom obarvamo žive in mrtve celice kot tudi biofilmski matriks, zato ni primerna za evalvacijo učinkovitosti protimikrobnih snovi. V praksi se za premostitev tega problema odstrani biofilm s podlage in določi števila adheriranih bakterij z metodo štetja kolonij na trdih gojiščih. Slabost invazivnega in nizko donosnega postopka odstranjevanja biofilma s podlage je tudi vprašljivost popolne odstranitve bakterijskih celic ter poškodbe, ki pri tem nastanejo, in lahko vodijo do lažno negativnih rezultatov. Poleg tega so bakterije iz biofilma lahko v agregatih različnih velikosti in ne kot samostojne celice, zato pri metodi štetja kolonij na trdih gojiščih prihaja do velikih odstopanj, ki so znak nizke zanesljivosti (Patanella in sod., 2013).

Določanje bakterijske adhezije z metodo barvanja z barvilom kristal violet so začeli splošno uporabljati sredi 90. let prejšnjega stoletja. Od takrat je metoda doživela številne modifikacije osnovnega protokola, ki so ga opisali Christensen in sod. leta 1985. Princip metode temelji na inkubaciji bakterijske kulture v MTP pri željeni temperaturi v izbranem času. Po inkubaciji kulture sledi spiranje in barvanje pritrdjenih mikroorganizmov z barvilom KV. Sledi ponovno spiranje in razbarvanje barvila z ustreznim topilom (DMSO, etanol/acetone (80 %/20 %), 95 % etanol, 33 % očetna kislina) ter spektrofotometrično merjenje količine vezanega barvila (Cabarkapa in Djuragic, 2013), ki predstavlja merilo adhezije oz. tvorbe biofilma. Kristal violet je osnovno barvilo, ki se veže na negativno nabite površinske molekule in polisaharide zunajceličnega matriksa (Peeters in sod., 2008).

V preglednicah 1–3 smo zbrali nekaj protokolov za določanje bakterijskih biofilmov z metodo barvanja s KV. Želeli smo predstaviti ključne razlike v parametrih, ki vplivajo na izvedbo metode in s tem tudi na rezultat določitve stopnje adhezije. Ti parametri so bili tudi glavni predmet raziskav v diplomski nalogi.

Preglednica 1: Primeri razmer pri pripravi bakterijskega inokuluma za določitev adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja z barvilom kristal violet

Vir	Razmere inkubacije za namnožitev inokuluma												
	Gojišče							Čas (h) in temperatura (°C)			Mešanje		Začetno število (CFU/ml)
	TSB+G	TSB	NB	NA	MHB	BHI	CA	ČN	18±2 h	24 h	OM	BM	
Rivas in sod., 2007			X	X					37 °C			x	1x10 ⁷
Harvey in sod., 2007			X						30 °C		/	/	1x10 ⁷
Extremina in sod., 2011	X							37 °C			x		1x10 ⁸
Lianou in Koutsoumanis, 2012		X								37 °C		x	1x10 ⁷
Peeters in sod., 2008		X		X				37 °C					1x10 ⁹
Chavant in sod., 2007						X		37 °C			/	/	/
Teh in sod., 2010					X		X	37 °C			30 rpm		1x10 ⁷
Rodrigues in sod., 2010	X	X							36 °C		/	/	/

Legenda: TSB+G: triptični soja bujon z dodatkom glukoze, TSB: triptični soja bujon, NA: hranljivi agar, NB: hranljivi bujon, MHB: tekoče gojišče Mueller – Hinton, BHI: Gojišče Brain heart infusion agar, CA: Columbia agar z dodatkom krvi, ČN: čeznočna kultura; OM: orbitalno mešanje, BM: brez mešanja, /: ni podatka.

Preglednica 2: Primeri razmer pri določitvi adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja z barvilom kristal violet

Vir	Razmere inkubacije pri določitvi adhezije in biofilma												
	Gojišče						Temperatur a (°C) in čas (h) inkubacije	Mešanje		Spiranje			
	TSB+ G	BHI	MWB	TSB	NB	MHB		OM	BM	FP	FR	RS	DV
Rivas in sod., 2007				X	X		25 °C, 24 h in 48 h		X				3x250 μl
Harvey in sod., 2007			X	X			20 °C, 24 h, 48 h in 72 h		X				3x150 μl
Extremina in sod., 2011	X						37 °C, 24 h	150 rpm		3x200 μl			
Lianou in Koutsoum anis, 2012				X			37 °C, 48 h		X			1x200 μl	
Peeters in sod., 2008				X			37 °C, 4 h, 24 h (odstranitev supernatanta)		X	X	X		
Chavant in sod., 2007		X					37 °C, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h, 48 h		X				3x200 μl
Teh in sod., 2010						X	37 °C, 72 h	30 rpm					3x200 μl
Rodrigues in sod., 2010	X						36 °C, 24 h		X		3x250 μl		

Legenda: TSB+G: triptični soja bujon z dodatkom glukoze, TSB: triptični soja bujon, NB: hranljivi bujon, MHB: tekoče gojišče Mueller – Hinton, BHI: Gojišče Brain heart infusion agar, MWB: modificirano Welshimer-gojišče, OM: orbitalno mešanje, BM: brez mešanja, FP: fosfatni pufer, FR: fiziološka raztopina, RS: Ringerjeva raztopina (1/4), DV: destilirana voda, /: ni podatka.

Preglednica 3: Primeri kvantifikacije pri določitvi adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja z barvilom kristal violet

Vir	Razmere kvantifikacije adhezije in biofilma							
	Fiksacija	Sušenje	Barvanje		Spiranje	Sušenje	Topilo	Absorbanca (λ)
			c (%), V (μ l)	t (min)				
Rivas in sod., 2007	/	45 min sušenje na zraku	1 %, 150 μ l	30	dH ₂ O, do čistega	/	150 μ l etanola	595 nm
Harvey in sod., 2007	/	30 min pri 30 °C	1 %, 150 μ l	45	3x150 μ l dH ₂ O	30 min, 30 °C	100 μ l etanola	595 nm
Extremina in sod., 2011	/	1 h sušenje na zraku	0,5 %, 100 μ l	15	3x fosfatni pufer	15 min, sobna T	aceton: etanol (20:80)	570 nm
Lianou in Koutsoumanis, 2012	99,8 % metanol, 200 μ l, 15 min	20 min sušenje na zraku (obrnjena MTP)	1 %, 200 μ l	20	3x200 μ l dH ₂ O	1 h, sobna T	/	580 nm
Peeters in sod., 2008	99,0 % metanol, 100 μ l, 15 min	sušenje na zraku	0,5 %, 100 μ l	20	spiranje pod tekočo vodo	/	150 μ l očetne kisline (33 %)	595 nm
Chavant in sod., 2007	/	45 min sušenje na zraku	0,1 %, 100 μ l	45	/	/	očetna kislina (33 %)	540 nm
Teh in sod., 2010	/	/	0,5 %, 200 μ l	15	3x200 μ l dH ₂ O	30 min, 42 °C	200 μ l etanola (98 %)	595 nm
Rodrigues in sod., 2010	99,8 % metanol, 200 μ l, 15 min	sušenje na zraku do suhega	2,0 %, 200 μ l	5	spiranje pod tekočo vodo	T (sobna), do suhega	/	550 nm

Legenda: /: ni podatka, PBS: fosfatni pufer, dH₂O: destilirana voda, (λ): valovna dolžina na čitalcu mikrotitrskih ploščic, c: koncentracija, V: volumen, t: čas, v minutah.

2.5.2 Barvanje z barvilom metilensko modrilo

Metoda barvanja z barvilom DMMB (1,9-dimetil metilensko modro) se specifično uporablja za detekcijo biofilma bakterij vrste *Staph. aureus*. Metoda temelji na dejstvu, da je glavna sestavina zunajceličnih polimerov biofilma bakterij vrste *Staph. aureus* medcelični polisaharid adhezin (PIA) sestavljen iz poli- β -1,6-N-acetilglukozamina. DMMB je kationsko barvilo, ki se običajno uporablja za detekcijo specifičnih glikozaminoglikanov (GAG) v bioloških vzorcih. Glede na strukturno podobnost med PIA in GAG, se DMMB uporablja za specifično določanje zunajceličnih polimerov biofilma bakterij vrste *Staph. aureus*. Po reakciji barvila DMMB s polisaharidi biofilma bakterij vrste *Staph. aureus* se vzorcu doda topilo, ki sprosti barvilo ter spektrofotometrično določi količino biofilma. Postopek je hiter, enostaven in varčen. Glavna omejitev metode je določanje količine biofilma, le pri bakterijah vrste *Staph. aureus* pri katerih zunajcelični polimeri vsebujejo polisaharid adhezin. Poleg tega metoda barvanja z barvilom DMMB daje nezanesljive informacije o količini živih bakterij v biofilmu, zato se predvideva dodatne eksperimente z uporabo resazurina. Metoda tako postane bolj zapletena in dolgotrajna (Patanella in sod., 2013).

2.5.3 Barvanje z barvilom fluorescein-di-acetat

Določitev adhezije temelji na uporabi brezbarvne suspenzije fluorescein-di-acetata (FDA), ki je topen v celični membrani. Bakterijske celične esterase barvilo FDA hidrolizirajo v fluorescein, ki je fluorescentno rumene barve in signal lahko merimo spektrofotometrično. Mrtve celice ne presnavljajo FDA. Ta metoda je bila uporabljena za določevanje rasti biofilma kvasovk vrste *Candida albicans* na površini silikonskih diskov. Test je izvedbeno enostaven in ni drag, vendar se ne uporablja pogosto, saj metoda ni primerna za kvantitativni študij na zrelih biofilmih, dobimo le semikvantitativne rezultate (Patanella in sod., 2013).

2.5.4 Barvanje z barvili LIVE/DEAD

Metoda temelji na uporabi dveh barvil, ki se vežejo na DNA. Fluorescentno zeleno Syto9 lahko prehaja preko bakterijske membrane in se veže na DNA bakterij. Fluorescentno rdeče barvilo propidium-jodid prehaja samo preko poškodovanih bakterijskih membran. Za ovrednotenje žive in mrtve bakterijske populacije se uporabi fluorescentno mikroskopijo. Žive bakterije fluorescirajo v zeleni, mrtve bakterije pa v oranžno-rdeči barvi. Glavna pomanjkljivost metode je, da moramo upoštevati statistično ustrezni delež vzorca, ki je reprezentativen za celotno populacijo. Metoda zagotavlja le semi-kvantitativne rezultate (Patanella in sod., 2013).

2.5.5 Dodatek resazurina

Resazurin, znan tudi kot Alamar Blue (7-hidroksi-3-fenoksazin-3-on-10-oksid), je biološko barvilo modre barve, ki ne poškoduje živih celic. Celice ga pretvorijo v fluorescentno roza produkt rezorufin, katerega količino lahko določimo spektrofotometrično. Resazurin je bil uporabljen za določanje živosti mikroorganizmov v številnih študijah učinkovitosti protimikrobnih sredstev kot tudi za kvantifikacijo živih celic v biofilmu. Test je zelo občutljiv na bakterijsko respiracijo, ki je povezana z rastno fazo, debelino in s starostjo mikrobnega biofilma. Poleg tega je čas presnove resazurina odvisen od vrste in seva bakterij, za kar posledično eksperimentalne razmere težko standardiziramo (Patanella in sod., 2013).

2.5.6 Dodatek reagenta XTT

Osnova kvantifikaciji živih celic je metabolna aktivnost celic. Določanje adhezije z reagentom XTT (natrijev 2,3-bio-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid) temelji na redukciji barvila v vodotopni formazan. Absorbanca celičnega supernatanta je proporcionalna številu metabolno aktivnih mikrobnih celic. Uporablja se za kvantitativno oceno živih celic v planktonski kulturi in kvantifikacijo biofilmov bakterij in gliv. Pri bakterijah se XTT reducira z encimi dihalne verige lokaliziranih na membranah citoplazme, medtem ko pri kvasovkah redukcija poteče z mitohondrijskimi dehidrogenazami. Najmanjše število bakterijskih celic potrebnih za njihovo določitev z reagentom XTT je približno med 3×10^6 in 3×10^8 CFU/ml v prostorčku mikrotitrne ploščice (200 μ l), kar je precej manjša občutljivost kot pri drugih metodah kvantifikacije živosti. Ta metoda je tudi zamudnejša, dražja in nič bolj točna v primerjavi z ostalimi metodami tega tipa (Peeters in sod., 2008).

Tetrazolijeve soli so heterociklične organske komponente, ki nadomestijo končni akceptor elektronov (kisik) v biološkem procesu redukcije. Tetrazolijeve soli se reducirajo do derivatov formazana preko encimskega sprejemanja elektronov iz substanc transportnega sistema vodika ali ne-encimsko preko umetnih prenašalcev elektronov (fenazin-metasulfat in menadion), ki pospešijo reakcijo. Tetrazolijeve soli s pomočjo dehidrogenazne aktivnosti hitro prehajajo v žive mikrobne celice in dalje v/skozi subcelularne membrane, kjer se pretvorijo do obarvanih derivatov formazana. Zatorej se jih uporablja kot indikatorje reduktivnega sistema. Tetrazolijeva sol XTT se ob prisotnosti elektronskega akceptorja pretvori v vodotopni formazan. Narava in koncentracija reagenta XTT sta bistvenega pomena za pridobitev dobre korelacije med tvorbo formazana in številom živih celic. Visoke koncentracije reagenta XTT lahko povzročijo inhibicijo produkcije formazana, nizke koncentracije pa njegovo slabo pretvorbo. Zato je potrebno za kvantifikacijo biofilma določiti optimalno koncentracijo reagenta XTT (Meletiadis in sod., 2001).

2.5.7 Dodatek reagenta BioTimer

Bio Timer (BTA) je kolorimetrični test, ki omogoča kvantifikacijo živih bakterij v biofilmu. Določitev temelji na reagentu, ki vsebuje fenol rdeče, zaradi katerega pri reakciji z metaboliti primarne mikrobiološke fermentacije pride do spremembe barve vzorca iz rdeče na rumeno. Čas, ki je potreben za spremembo barve, je odvisen od začetne koncentracije bakterij v vzorcu. Na podlagi podatka o času, ki je potreben za barvni prehod, se s pomočjo specifične korelacijske krivulje določi število bakterij v vzorcu. Metoda detekcije BTA je poceni in enostavna za izvedbo. Uporablja se za mikrobiološke analize kakovosti živil, za štetje živih bakterij v biofilmu in oceno občutljivosti biofilma na antibiotike. Za štetje nefermentirajočih bakterij (npr. *Pseudomonas aeruginosa*) v biofilmu se uporabi reagent resazurin. Glaven problem metode BTA se pojavlja pri vrednotenju števila mikroorganizmov v biofilmih, ki vsebujejo različne vrste mikroorganizmov (Patanella in sod., 2013).

2.5.8 Molekularne metode na osnovi DNA

❖ PCR

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) se pogosto uporablja kot diagnostični postopek. Metoda omogoča učinkovito identifikacijo specifičnih genskih sekvenc v biofilmu, povezanih s posameznimi vrstami bakterij. PCR ni primerna za kvantifikacijo biofilma,

temveč za kvantifikacijo adheriranih celic. Za biofilmske celice lahko uporabimo RT-qPCR (kvantitativni PCR v realnem času z reverzno transkripcijo). Pri PCR se prisotnost specifičnih genskih sekvenc določi na koncu reakcije, pri PCR v realnem času pa se fluorescentni signal meri pri vsakem ciklu pomnoževanja in je neposredno sorazmeren s številom pomnožkov. Z metodo RT-qPCR lahko na podlagi kratke razpolovne dobe bakterijske mRNA uporabimo ne samo za zaznavanje, ampak tudi kvantifikacijo specifičnih mikroorganizmov v biofilmu. Pomanjkljivosti te metode so povezane s pripravo vzorca brez inhibitorjev PCR, ustrezno izbiro sekvenc začetnih oligonukleotidov, visokimi stroški in težavnostjo izvedbe (Patanella in sod., 2013).

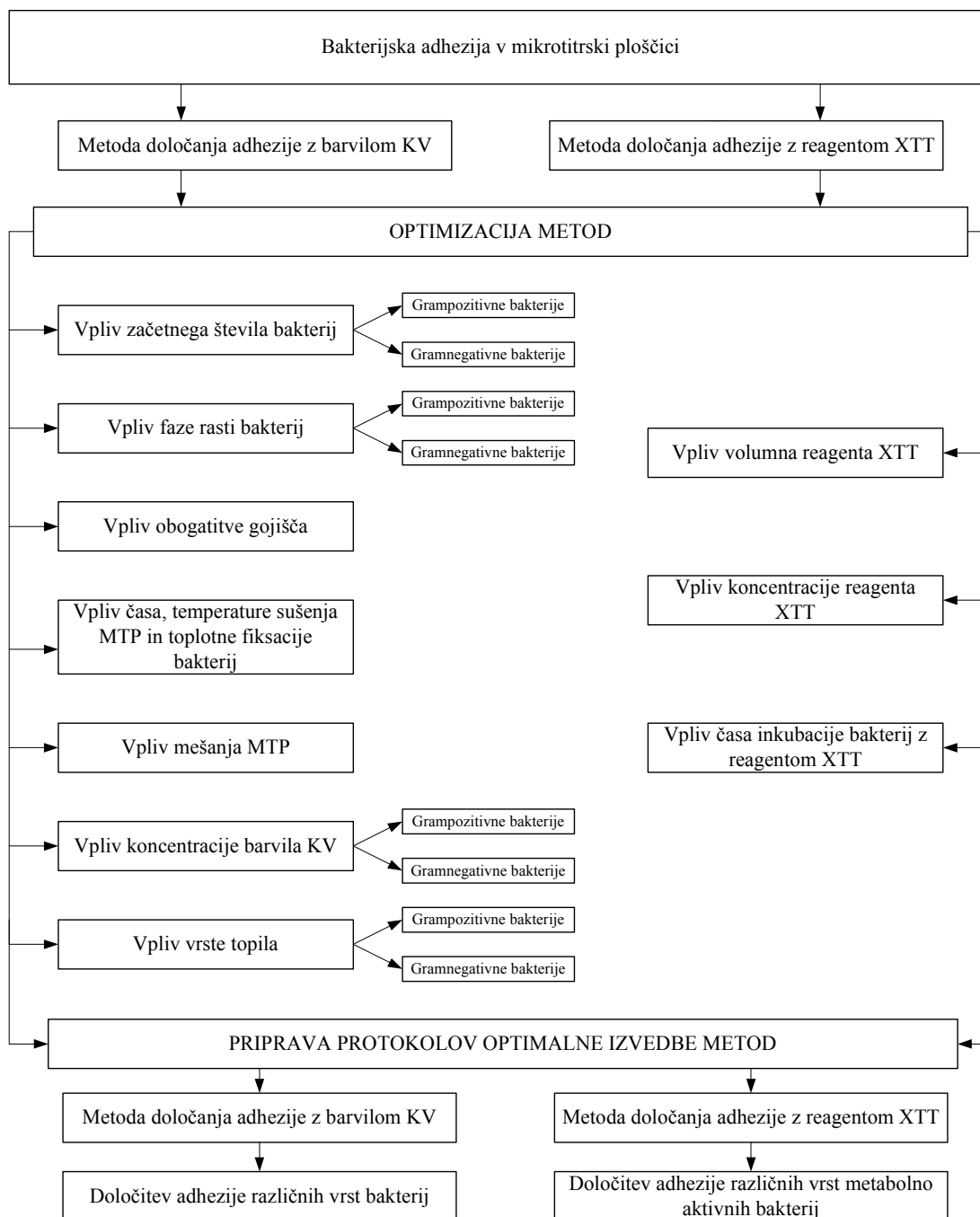
❖ **Fluorescentna hibridizacija *in situ***

Fluorescentna hibridizacija *in situ* (FISH) je genetska tehnika za preučevanje mikrobnih biofilmov z uporabo oligonukleotidnih sond, označenih s fluorescentnimi barvili. Te sonde so zasnovane tako, da se vežejo na rRNA živih celic ali na specifične molekule. Zaradi genskega pristopa se metoda lahko uporablja za študij na več vrstah biofilma. Z metodo FISH lahko zaznamo žive celice v biofilmu, medtem ko nekultivabilnih bakterij in bakterij z zmanjšano metabolično aktivnostjo ne detektiramo. Tehnika je zamudna in draga, vendar zagotavlja visoko kakovostne, semikvantitativne rezultate (Patanella in sod., 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA

Namen našega dela je bil optimizirati določanje bakterijske adhezije v MTP z barvilom kristal violet in z reagentom XTT (natrijev 2,3-bio-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid) ter nato z obema metodama določiti adhezijo različnih bakterij (slika 1).



Slika 1: Shema osnovnih stopenj eksperimentalnega dela

Legenda: XTT: natrijev 2,3-bio-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid, MTP: mikrotitrski ploščica, KV: barvilo kristal violet.

Naloge smo se lotili sistematično. S pregledom literature (preglednice 1-3, iz poglavja 2.7) smo ugotovili, kateri so tisti parametri, ki predstavljajo razlike med metodami in posledično privedejo do razlik pri rezultatih preiskav. V optimizacijo metode določanja adhezije z barvilom kristal violet smo vključili 8 parametrov (vpliv sušenja MTP, vpliv fiksacije, vpliv obogatitve gojišča z glukozo, vpliv koncentracije barvila kristal violet, vpliv topila, vpliv starosti kulture, vpliv začetnega števila celic v gojišču in vpliv vrste bakterij). V optimizacijo metode določanja adhezije z reagentom XTT smo vključili 3 parametre (vpliv volumna reagenta XTT, vpliv koncentracije reagenta XTT in vpliv časa inkubacije). Z optimiziranimi protokoloma smo nato določili adhezijo bakterij na polistirensko površino mikrotitrne ploščice.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Bakterije

Pri izvedbi eksperimentalnega dela smo uporabili 17 različnih bakterijskih sevov iz zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete. Izbor bakterijskih sevov je temeljil na uporabi kultur, ki so sposobne tvorbe biofilma (preglednica 4).

Preglednica 4: Izbor bakterijskih sevov za eksperimentalno delo

Oznaka seva	Vir seva	Izvor seva	Reakcija na barvanje po Gramu	Selektivno gojišče
<i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ72	ATCC25923	Tipski sev	+	BP
<i>Staphylococcus aureus</i> ŽM518	ATCC29213	Tipski sev	+	BP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ŽMJ87	Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana	/	-	PA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ŽM517	ATCC15442	Tipski sev	-	PA
<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ3	Tovarna olja, Slovenska Bistrica Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana	Jabolčni kis	+	BC
<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ91	Zbirka ZIM, Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana	S1(RZS)	+	BC
<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ116	Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana	Kondenzirano mleko	+	BC
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM58	IHM, Würzburg, Nemčija	Referenčni sev	+	ALOA
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM69	Mikrobiološki inštitut, Ljubljana	Human sev	+	ALOA
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM80	Mikrobiološki inštitut, Ljubljana	Human sev	+	ALOA
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM407	Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana	Živilski sev	+	ALOA
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM520	DMRICC3633, Danska	/	+	ALOA
<i>Salmonella</i> Enteritidis ŽM348	Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana	Živilski sev	-	XLD
<i>Salmonella</i> Infantis ŽM350	Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana	Živilski sev	-	XLD
<i>Salmonella</i> Hadar ŽM378	Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana	Živilski sev	-	XLD
<i>Salmonella</i> Infantis ŽM390	Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana	Živilski sev	-	XLD
<i>Escherichia coli</i> ŽM516	ATCC25922	Tipski sev	+	TBC

Legenda: IHM: Inštitut za higieno in mikrobiologijo, Würzburg, Nemčija; DMRICC: Danish Meat Research Institute Culture Collection; ŽM: zbirka mikrobnih kultur Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, BP: selektivno gojišče Baird-Parker, PA: selektivno gojišče *Pseudomonas aeruginosa*, ALOA: selektivno gojišče po Ottaviani in Agosti, XLD: selektivno gojišče s ksilozo, lizinom in deoksiholatom, +: grampozitivne bakterije, -: gramnegativne bakterije.

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

❖ Gojišče TSA

Sestavine:

- Triptični soja agar (TSA) [ang. Tryptone Soya Agar, Oxoid, CM0131, Velika Britanija]
- Kvasni ekstrakt [ang. Yeast Extract, Biolife, 412220, Italija]
- di-kalijev-hidrogenfosfat (K_2HPO_4) [Kemika, 1116108, Hrvaška]
- D-(+)-glukoza [Kemika, 0705007, Hrvaška]

Priprava: 20 g gojišča TSA smo zatehtali v 1000 ml steklenico, dodali 3 g kvasnega ekstrakta, 1,25 g K_2HPO_4 , 1,25 g D-(+)-glukoze in 500 ml destilirane vode. Vsebino steklenice smo dobro premešali in 20 min sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C. Tako pripravljeno gojišče smo ohladili na 45 °C in ga aseptično razlili v sterilne, primerno označene petrijeve plošče, katere smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

❖ Gojišče TSB

Sestavine:

- Triptični soja bujon (TSB) [Tryptone Soya Broth, Oxoid, CM0129, Velika Britanija]

Priprava: 15 g gojišča TSB smo zatehtali v 1000 ml steklenico in dodali 500 ml destilirane vode. Vsebino steklenice smo dobro premešali in 20 min sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C. Tako pripravljeno gojišče smo do uporabe hranili v hladilniku na 4 °C.

❖ Selektivno gojišče BHI

Sestavine:

- Brein Heart Broth (BHI) [Merck, 1.10493.0500, Nemčija]

Priprava: 18,5 g gojišča BHI smo zatehtali v 1000 ml steklenico, dodali 500 ml destilirane vode, vsebino dobro premešali in jo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 121 °C. Tako pripravljeno gojišče smo ohladili na 45 °C in ga aseptično razlili na sterilne, primerno označene petrijeve plošče, katere smo do uporabe hranili v hladilniku na 4 °C.

❖ Selektivno gojišče XLD

Sestavine:

- Agar XLD (ang. Xylose Lysine Deoxycholate Agar) [Oxoid, CM0469, Velika Britanija]

Priprava: 28 g gojišča XLD smo zatehtali v 1000 ml steklenico, dodali 500 ml destilirane vode in vsebino dobro premešali. S pomočjo mikrovalovne pečice smo vsebino steklenice segreli in s tem pospešili raztapljanje XLD agarja. Sledila je sterilizacija v avtoklavu 20 min pri temperaturi 115 °C. Tako pripravljeno gojišče smo ohladili na 45 °C in ga aseptično razlili na sterilne, primerno označene petrijeve plošče, katere smo do uporabe hranili v hladilniku na 4 °C.

❖ **Selektivno gojišče ALOA**

Sestavine:

- ALOA agar – Agar Listeria acc. To Ottaviani & Agosti [Biolife, Italija, 4016052]
- Selektivni dodatek ALOA enrichment selective supplement [Biolife, Italija, 423501]

Priprava: 35,3 g gojišča ALOA smo raztopili v 500 ml destilirane vode, vsebino dobro premešali in jo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 121 °C. Tako pripravljeno gojišče smo nato ohladili na 45 °C in mu aseptično primešali selektivni dodatek ALOA, 2,5 ml 96 % etanola in 2,5 ml sterilne destilirane vode. Gojišče smo aseptično razlili na primerno označene petrijeve plošče, katere smo do uporabe hranili v hladilniku na 4 °C.

❖ **Selektivno gojišče BC**

Sestavine:

- Bacillus cereus agar base (PEMBA) [Biolife, 4011122, Italija]
- Jajčna emulzija »Egg yolk emulsion«, 50 % [Biolife, 42111601]
- Selektivni dodatek Bacillus cereus supp. [Biolife, 4240001, Italija]

Priprava: 20,5 g gojišča Bacillus cereus agar base smo raztopili v 470 ml destilirane vode, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu (15 min pri temperaturi 121 °C). Tako pripravljeno gojišče smo ohladili na 45 °C in mu aseptično primešali 25 ml jajčne emulzije in 5 ml selektivnega dodatka Bacillus cereus supp.. Gojišče smo aseptično razlili na primerno označene petrijeve plošče, katere smo do uporabe hranili v hladilniku na 4 °C.

❖ **Selektivno gojišče PA**

Sestavine:

- Pseudomonas selective agar [Biolife, 401963, Italija]
- Glicerol [Kemika, 12232, Hrvaška]

Priprava: 23 g gojišča PA smo raztopili v 500 ml destilirane vode in s pomočjo brizge dodali 5 ml glicerola, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu (15 min pri temperaturi 121 °C). Tako pripravljeno gojišče smo ohladili na 45 °C in ga aseptično razlili na sterilne, primerno označene petrijeve plošče, katere smo do uporabe hranili v hladilniku na 4 °C.

❖ **Fiziološka raztopina**

Sestavine:

- Kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) [Merck, Nemčija, 1.04873.0250]

Priprava: 3,4 g KH_2PO_4 smo raztopili v 100 ml destilirane vode. 1,25 ml te raztopine smo v 1000 ml steklenici razredčili z 1000 ml destilirane vode. Tako pripravljeno fiziološko raztopino smo 20 min sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C. Do uporabe smo jo hranili v hladilniku pri 4 °C.

❖ Fosfatni pufer

Sestavine:

- Fosfatni pufer (PBS, ang. Phosphate buffered saline) [Oxoid, BR0014, Velika Britanija]

Priprava: Komercialno pripravljeno tabletko fosfatnega pufra (PBS) smo raztopili v 100 ml destilirane vode in 10 minut avtoklavirali pri 115 °C. Do uporabe smo raztopino hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.3 Kemikalije

❖ Kristal violet [Merck, 1.09218.2500, Nemčija]

Za pripravo 1 % (0,5 %) raztopine KV smo v primerno označeno stekleničko natehtali 1 g (0,5 g) barvila KV ter dodali 100 ml 96 % etanola. Po 24 urah smo raztopino prefiltrirali skozi filter papir (velikost por 100 µm). Tako pripravljen reagent smo do uporabe hranili v temi na sobni temperaturi.

❖ Menadion [Sigma, M5625, Nemčija]

1 mM raztopino smo pripravili tako, da smo 0,0172 g rumenih kristalčkov menadiona raztopili v 100 ml acetona (CH_3COCH_3 , Merck, Nemčija). Do uporabe smo raztopino hranili v hladilniku pri 4 °C.

❖ XTT (natrijev 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karbonsanilid) [Sigma, X4626, Nemčija]

0,01 g XTT smo raztopili v 10 ml fosfatnega pufra (PBS). Raztopino smo do uporabe hranili v sterilnih epruvetah pri –80 °C. XTT smo razredčili v pripravljenem fosfatnem pufri do koncentracije 1 mg/ml.

Reagent XTT smo vedno pripravili svež tik pred analizo in sicer v razmerju 12,5 delov XTT na en del menadiona. Količino tega reagenta smo pripravili glede na volumen potreben za analizo.

❖ Etanol 96 % [Merck, 1.00971.6025, Nemčija]

❖ Ocetna kislina (100 %) [Merck, 1.00063.2500, Nemčija]

❖ Aceton (100 %) [Merck, 1.00012.2500, Nemčija]

❖ Metanol (99,9 %) [Merck, 1.06009.1000, Nemčija]

3.2.4 Laboratorijska oprema

Poleg aparatov, navedenih v preglednici 5, smo pri raziskovalnem delu uporabljali še obvezno zaščitno opremo (halja, rokavice, očala, maska) in običajno laboratorijsko opremo, kot je: epruvete, petrijeve plošče, polistirenske mikrotitrne ploščice z ravnim dnom, merilne valje, bučke, čaše, avtomatske pipete, multikanalne pipete, kadičke, papirnate brisače, trak za potrditev uspešnosti sterilizacije, petrifilm, pincete, štoparico, stojala, ...

Preglednica 5: Laboratorijski aparati

Aparat	Oznaka	Proizvajalec
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Beograd, Srbija
Plinski gorilnik	/	/
Čitalec mikrotitrskih ploščic	Megellan	Tecan, Avstrija
Digestorij	PIO SMBC 122AV	Iskra, Slovenija
Inkubator	I - 115	Kambič, Slovenija
Stresalnik	Vibromix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija
Hladilnik	/	LTH, Slovenija
Zamrzovalnik	/	LTH, Slovenija
Tehtnica	Sartorius analytic	Sartorius, Nemčija
Mikrovalovna pečica	Cookgrill 1300	Sanyo, Japonska
Vrtinčni mešalnik	Vibromix 104 EV	Tehtnica, Slovenija
Digitalna tehtnica	PB 1502 - S	Mettler Toledo, Švica
Sušilec las	/	/

3.3 METODE DELA**3.3.1 Revitalizacija bakterij**

Izolati (preglednica 4) so bili zmrznjeni ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) v krio-epruvetah z dodatkom glicerola (15 %). Posamezen izolat smo odotali ter ga nato aseptično prenesli v 4 ml tekočega gojišča TSB. Suspenzijo smo dobro premešali in 24 h inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kulture smo nacepili na selektivna gojišča (preglednica 4) ter jih ponovno 24 ur inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za kulturo značilno razraslo kolonijo smo nato s cepilno zanko aseptično prenesli na trdno gojišče TSA. Sledila je 24-urna inkubacija pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in nato priprava inokuluma.

3.3.2 Priprava inokuluma

V sterilno in primerno označeno epruveto smo aseptično odpipetirali 4 ml tekočega gojišča TSB. S sterilno cepilno zanko smo aseptično prenesli eno bakterijsko kolonijo, nacepljeno na trdnem gojišču TSA (3.3.1). Inokulum smo dobro premešali na vrtinčnem mešalniku. Nato je sledila 6- ali 18-urna inkubacija pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Čas inkubacije je bil odvisen od eksperimenta, saj smo del poskusov izvajali s kulturo v eksponentni fazi in del eksperimentov s kulturo v stacionarni fazi.

3.3.3 Določanje adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja s kristal violetom

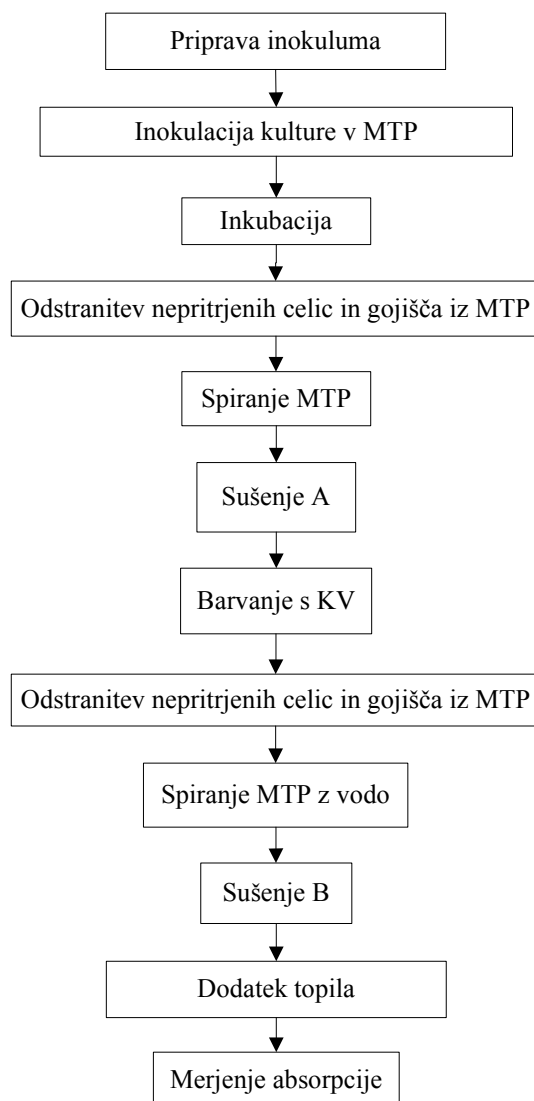
Za optimizacijo določanja adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja s kristal violetom smo uporabili dve bakterijski kulturi, in sicer grampozitivne bakterije vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 in gramnegativne bakterije vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87.

Inokulum smo pripravili kot je opisano v podpoglavju 3.3.2. Predvidevali smo, da so se bakterije namnožile do 10^8 CFU/ml, zato smo 1 ml pripravljene suspenzije redčili z gojiščem TSB tako, da smo imeli začetno število 10^6 oz. 10^3 CFU/ml. Kulturo smo prenesli v sterilno mikrotitrsko ploščico tako, da smo v vsak prostorček dodali 200 μl .

Kontrolni vzorci so vsebovali po 200 μ l sterilnega gojišča TSB brez bakterijske kulture. Sledila je 24-urna inkubacija pri 37 °C.

Nepritrjene bakterije in gojišče smo po inkubaciji odstranili in prostorčke v ploščici trikrat sprali s 150 μ l sterilne vode. Sledilo je pivnanje MTP z visoko vpojnim papirjem in 30-minutno sušenje pri 30 °C.

Adherirano kulturo smo nato obarvali z barvilom kristal violet tako, da smo v vsak prostorček mikrotitrsko ploščice dodali 150 μ l barvila. Po 15 minutah smo barvilo odlili in ploščico trikrat sprali s 150 μ l sterilne vode. Mikrotitrsko ploščico smo ponovno osušili (30 °C, 30 minut). Nato smo v vsak prostorček dodali 100 μ l topila in izmerili absorbanco s čitalcem mikrotitrskih ploščic pri valovni dolžini 584 nm.



Slika 2: Splošna shema določanja bakterijske adhezije v mikrotitrski plošči z metodo barvanja s kristal violetom.

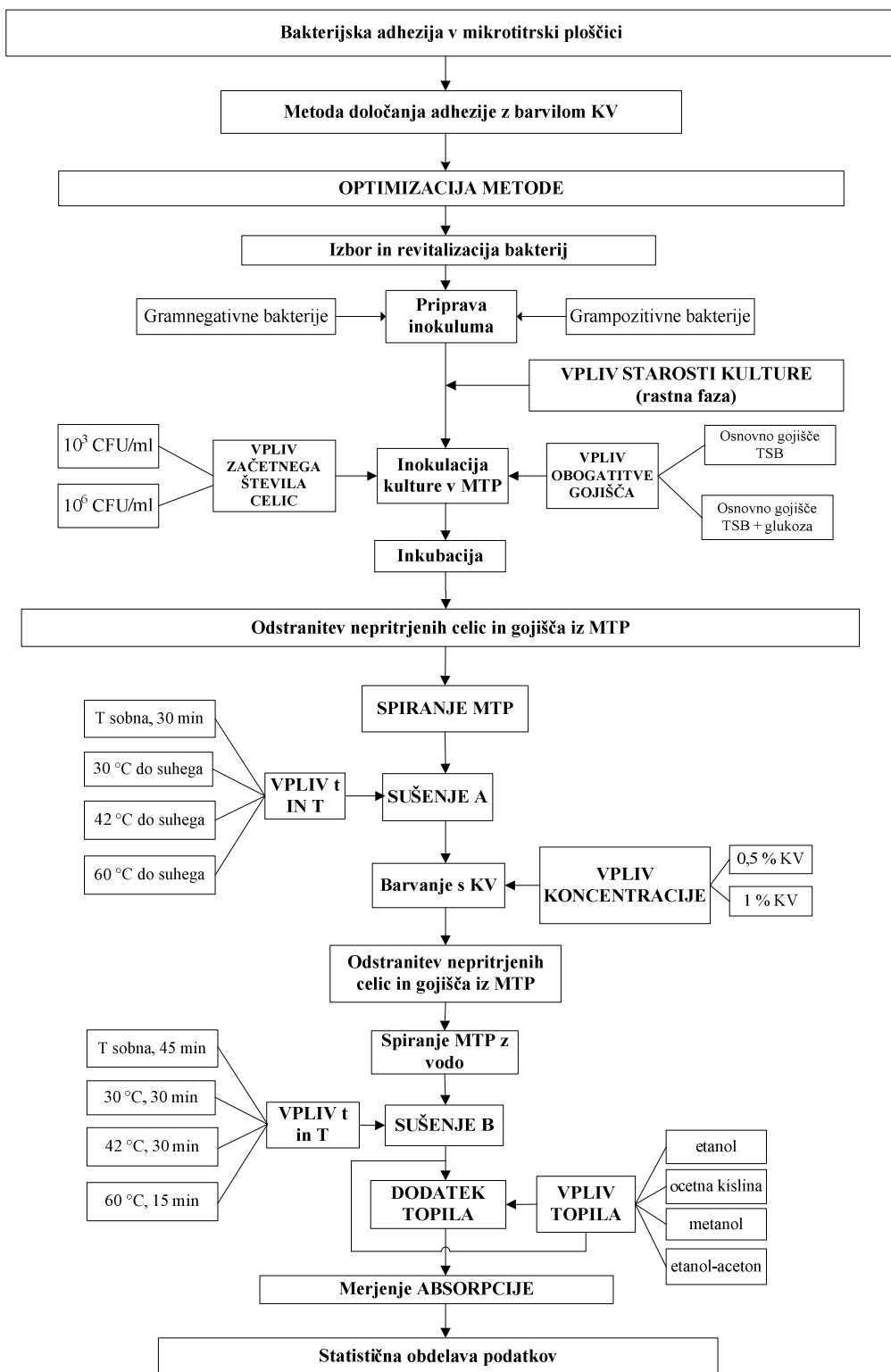
Legenda: MTP: mikrotitrsko ploščica, sušenje A: sušenje po odlitju gojišča in spiranju nepritrjene kulture, sušenje B: sušenje po barvanju z barvilom kristal violet, KV: barvilo kristal violet.

3.3.4 Optimizacija določanja adhezije na mikrotitrski ploščici z metodo barvanja s kristal violetom

Optimizacija določanja adhezije v MTP z metodo barvanja s KV je obsegala naslednje točke (slika 4):

- ❖ vpliv starosti kulture,
- ❖ vpliv začetnega števila celic v gojišču,
- ❖ vpliv obogatitve gojišča z glukozo,
- ❖ vpliv mešanja,
- ❖ vpliv sušenja,
- ❖ vpliv koncentracije barvila kristal violet in
- ❖ vpliv topila.

Adhezijo na polistiren smo določali ločeno za grampozitivne in gramnegativne bakterije. Predstavnik grampozitivnih bakterij je bila kultura *Staph. aureus* ŽMJ72, pri gramnegativnih pa *P. aeruginosa* ŽMJ87.



Slika 3: Shema optimizacije metode določanja bakterijske adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: MTP: mikrotitrski ploščica, T: temperatura, t: čas, merjen v minutah, sušenje A: sušenje po odstranitvi neadherirane kulture in/ali gojišča in po spiranju z vodo; sušenje B: sušenje po odstranitvi kristal violeta in po spiranju z vodo, TSB: tekoče gojišče triptični sojin bujon, 0,5 in 1 % KV: koncentracija barvila kristal violet.

3.3.4.1 Vpliv bakterijske faze rasti

Vpliv bakterijske faze rasti in s tem starosti bakterijskega inokuluma na intenzivnost adhezije je bila naša prva točka optimizacije metode določanja adhezije v mikrotitrski ploščici z barvanjem s kristal violetom. Za vsako bakterijsko kulturo smo pripravili po 2 inokuluma tako, da smo kulturo v logaritemski fazi rasti pridobili po 5-urni inkubaciji, in kulturo v stacionarni po 18-urni inkubaciji pri 37 °C. Suspenzije tekočega gojišča TSB in bakterijske kulture smo nato serijsko redčili do 10^3 CFU/ml in dodali v vsak prostorček MTP po 200 µl.

3.3.4.2 Vpliv začetnega števila celic v inokulumu

Z analizo vpliva začetnega števila celic v gojišču smo želeli preveriti, ali je stopnja adhezije odvisna od CFU števila celic v gojišču. Vpliv začetnega števila celic na stopnjo adhezije smo določili z grampozitivnimi bakterijami *Staph. aureus* ŽMJ72 in gramnegativnimi bakterijami *P. Aeruginosa* ŽMJ87. Bakterijske inokulume smo 5 ur inkubirali pri 37 °C (logaritemska faza rasti), jih serijsko razredčili in pripravili suspenzije s 10^3 in 10^6 CFU/ml gojišča. Nato smo v prostorčke MTP nacepili 200 µl inokuluma. Po 24-urni inkubaciji kulture pri 37 °C smo z metodo barvanja s kristal violetom določili stopnjo adhezije na polistiren (3.3.3.).

3.3.4.3 Vpliv obogatitve gojišča TSB z dodatkom glukoze

Zatehti gojišča TSB smo dodali 2 % D-(+)-glukoze, dobro premešali in 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C. Gojišče smo nato uporabili za določitev adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 po postopku, opisanem v podpoglavju 3.3.3.

3.3.4.4 Vpliv mešanja pri spiranju mikrotitrne ploščice

V MTP smo nacepili 200 µl suspenzije gojišča TSB z 10^3 CFU/ml bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 v logaritemski fazi rasti. Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C smo določili vpliv mešanja MTP pri procesih izpiranja.

Iz MTP smo gojišče in nepritirjeno bakterijsko kulturo aseptično odlili in jo s pomočjo multikanalne pipete trikrat sprali s sterilno destilirano vodo. Pri zadnjem spiranju smo ploščico z 200 µl sterilne destilirane vode 5 minut nežno stresali (150 RPM) na stresalniku mikrotitrskih ploščic. Po protokolu je sledilo sušenje MTP in barvanje z barvilom kristal violet (1 %). Pri drugem izpiranju (izpiranju barvila) po končanem barvanju smo postopek mešanja ponovili. Sledilo je sproščanje barvila z metanolom in merjenje absorbance s čitalcem mikrotitrskih ploščic pri valovni dolžini 584 nm.

Vzporedno smo določili stopnjo bakterijske adhezije vzorcem, kjer smo izključili postopek mešanja in kontrolnim vzorcem, kjer ni bilo dodanih bakterij.

3.3.4.5 Vpliv sušenja

V preglednici 6 smo zbrali nekaj načinov sušenja MTP pri določanju bakterijske adhezije z barvilom kristal violet.

Preglednica 6: Postopki sušenja mikrotitrne ploščice pri določanju adhezije bakterijskih celic z metodo barvanja s kristal violetom.

OPIS POSTOPKA SUŠENJA	VIR
Sušenje A, B: T_{sobna} , 45 min	Rivas in sod., 2007.
Sušenje A, B: $T_{30\text{ °C}}$, 30 min	Harvey in sod., 2007.
Sušenje A: T_{sobna} , 60 min Sušenje B: T_{sobna} , 15 min	Extremine in sod., 2011.
Sušenje A: T_{sobna} , 20 min Sušenje B: T_{sobna} , 60 min	Lianou in Koutsoumanis, 2012.
Sušenje A, B: $T_{42\text{ °C}}$, 30 min	Teh in sod., 2010.
Sušenje A, B: $T_{60\text{ °C}}$, 15 min	Vesterlund in sod., 2005.

Legenda: sušenje A: sušenje po odstranitvi neadherirane kulture in/ali gojišča in po spiranju z vodo; sušenje B: sušenje po odstranitvi kristal violeta in po spiranju z vodo, min: minuta.

MTP smo nacepili 200 μl suspenzije gojišča TSB z 10^3 CFU/ml bakterij vrste *Staph. aureus* ŽM72 v logaritemski fazi rasti. Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C smo suspenzijo gojišča in nepritrjenih celic iz MTP aseptično odlili in trikrat sprali s sterilno destilirano vodo. Ploščice smo delno osušili s papirjem visoke vpojnosti. Vzporedno smo določili stopnjo bakterijske adhezije na MTP kontrolnem vzorcu, kjer ni bilo nacepljene kulture. Na osušene MTP smo s pipeto v vsak prostorček dodali 150 μl barvila kristal violet (1 %). Barvilo smo po 15 minutah barvanja pri sobni temperaturi odlili iz vzorca in ploščice trikrat sprali s sterilno destilirano vodo. Pred dodatkom ustreznega topila (100 μl) smo ploščice osušili z vpojnim papirjem in izbranim postopkom sušenja.

Preizkusili smo 3 postopke sušenja mikrotitrne ploščice.

❖ SUŠENJE PO PROTOKOLU Harvey in sod. (2007)

Sušenje MTP je potekalo 30 minut pri 30 °C v inkubatorju.

❖ SUŠENJE s 5 min direktnim segrevanjem (40 °C)

Sušenje smo izvedli s sušilcem za lase z direktnim uvajanjem toplote na MTP s 5-minutnim segrevanjem/pihanjem toplega zraka (40 °C).

❖ SUŠENJE IN TOPLOTNA FIKSACIJA po protokolu Vesterlund in sod. (2005).

Pri pregledu literature smo zasledili, da so Vesterlund in sod. (2005) uporabili 15-minutno toplotno fiksacijo kulture pri 60 °C. Sušenje MTP smo izvedli s sušilcem za lase z direktnim uvajanjem toplote (60 °C). S tem smo dosegli osušitev in hkrati pritrditev oz. fiksacijo adheriranih bakterijskih celic.

3.3.4.6 Vpliv koncentracije barvila kristal violet

Za določitev vpliva koncentracije barvila KV na učinkovitost metode določanja bakterijske adhezije na polistiren smo pripravili raztopini z 0,5 in 1 % koncentracijo barvila v 96 %

etanolu. Barvili smo uporabili za določitev adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽM72 po postopku, opisanem v podpoglavju 3.3.3.

3.3.4.7 Vpliv vrste topila

Pri pregledu protokolov za določanje adhezije z barvilom kristal violet smo ugotovili, da prihaja do raznovrstnosti pri izboru topil. Rivas in sod. (2007) so uporabili 98 % etanol, Extremina in sod. (2011) raztopino etanol-aceton v razmerju 80:20, Chavant in sod. (2007) pa so uporabili 33 % ocatno kislino. Zato smo določili vpliv topila na učinkovitost raztapljanja barvila KV, vezanega na polisaharide zunajceličnega matriksa bakterij in na bakterije.

Adhezijo na polistiren smo določali ločeno za grampozitivne in gramnegativne bakterije po postopku, opisanem v 3.3.3. Kot topila za vezan kristal violet smo uporabili metanol (100 %), etanol (96 %), ocatno kislino (33 %) in mešanico etanol-aceton (80:20).

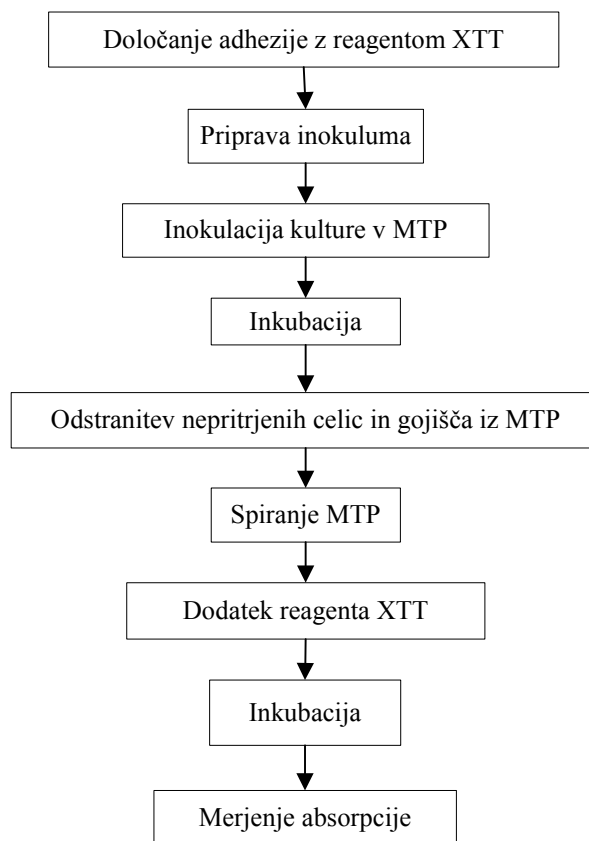
3.3.5 Določitev adhezije bakterij z optimizirano metodo barvanja s kristal violetom

Z optimizirano metodo določanja bakterijske adhezije z barvilom KV smo določili adhezijo na polistiren 10 grampozitivnim sevom (5 sevov *Listeria monocytogenes* (ŽM58, ŽM69, ŽM80, ŽM407, DMRICC 3633), 3 sevi *Bacillus cereus* (ŽMJ3, ŽMJ91, ŽMJ116), 2 seva *Staph. aureus* (ŽMJ72, ŽMJ518) in 6 gramnegativnim sevom (4 sevi bakterij vrste *Salmonella* (ŽM348, ŽM350, ŽM378, ŽM390) in 2 seva bakterij vrste *Pseudomonas aeruginosa* (ŽMJ87, ŽM517) (preglednica 4).

Inokulume grampozitivnih bakterij smo inkubirali 5 ur pri 37 °C (logaritemska faza rasti), inokulume gramnegativnih pa 18 ur pri 37 °C (stacionarna faza rasti). Predvidevali smo, da so se bakterije v času inkubacije namnožile do 10^8 CFU/ml, zato smo suspenzije serijsko redčili do 10^6 CFU/ml. Suspenzije kultur (10^6 CFU/ml) v tekočem gojišču TSB smo prenesli v MTP, in sicer v vsak prostorček po 200 µl in za vsako kulturo 24 ponovitev. Kontrolni vzorci so vsebovali po 200 µl sterilnega gojišča TSB brez bakterijske kulture. Po 24-urni inkubaciji vzorcev pri 37 °C smo vsebino MTP aseptično odlili in jo trikrat sprali s sterilno destilirano vodo. Ploščice smo delno osušili s papirjem visoke vpojnosti ter adherirano kulturo toplotno fiksirali na polistiren. Po 5-minutnem barvanju vzorcev z 1 % raztopino barvila KV smo barvilo odlili in ponovno ploščice sprali ter do suhega osušili z direktnim uvajanjem toplote s temperaturo 40 ali 60 °C. Pri gramnegativnih bakterijah smo za topljenje barvila KV uporabili metanol, pri grampozitivnih bakterijah pa 33 % ocatno kislino. Z merjenjem absorbance pri 584 nm v čitalcu mikrotitrskih ploščic in statistično analizo dobljenih rezultatov smo sevom določili stopnjo adhezije na polistiren.

3.3.6 Določanje adhezije na polistirenske MTP z reagentom XTT

Drugi del našega diplomskega dela je bil določiti metabolično aktivnost bakterijskih kultur, adheriranih na polistirensko površino MTP. Izbrali smo reagent XTT (natrijev 2,3-bio-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid). Študije živosti adherirane kulture v mikrotitrski ploščici z reagentom XTT smo v začetni fazi izvedli po protokolu Pettit in sod. (2005), ki je na splošno predstavljen na sliki 4.



Slika 4: Splošna shema določanja bakterijske adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja z reagentom XTT (Pettit in sod., 2005).

Legenda: MTP: mikrotitrski ploščica, XTT: natrijev 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboxanilid.

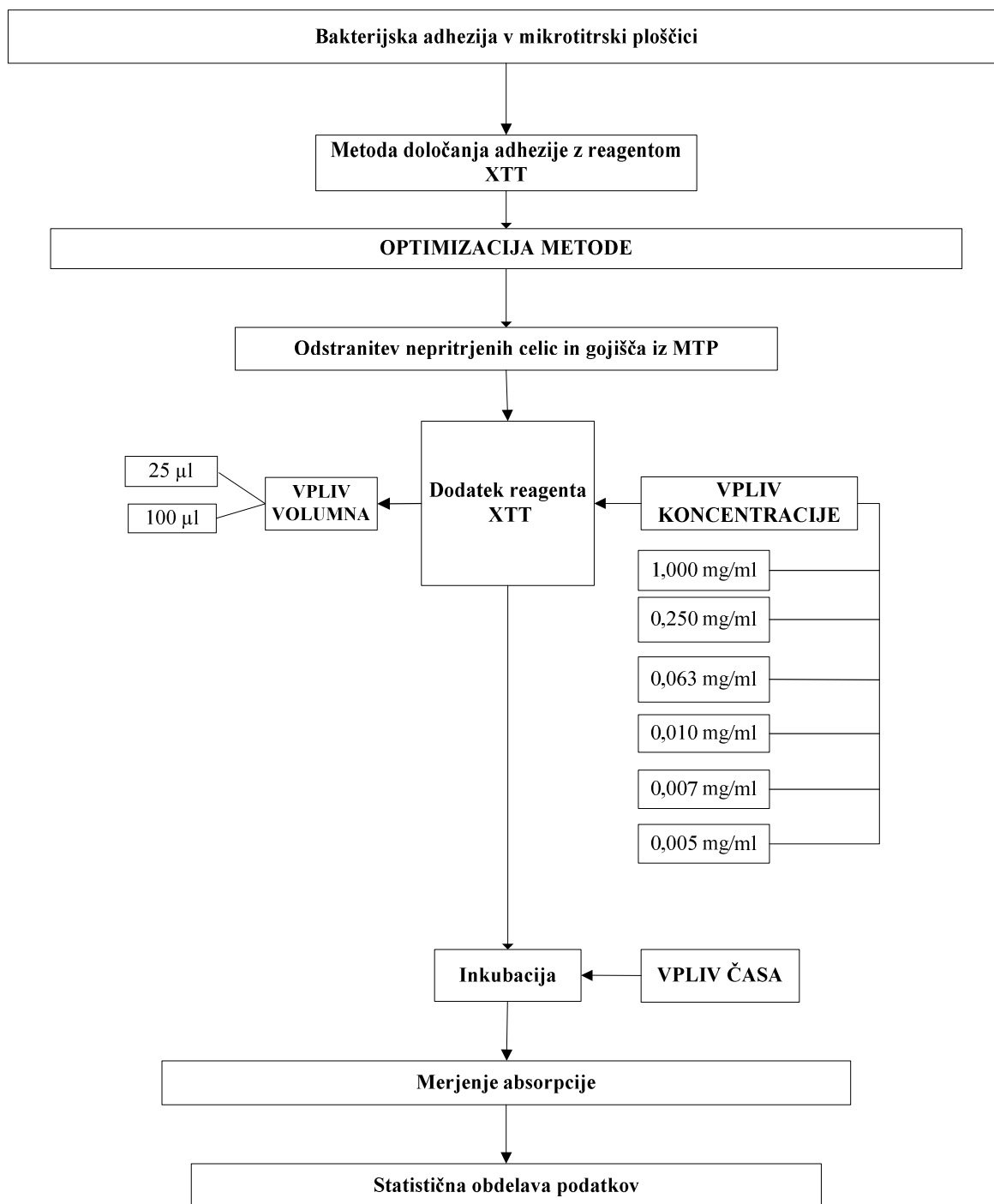
Ker se je pri optimizaciji določanja adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja s kristal violetom izkazalo, da prihaja do manjših razlik med grampozitivnimi in gramnegativnimi bakterijami, smo tudi pri analizah z reagentom XTT obravnavali vsako skupino posebej. Za optimizacijo metode smo uporabili grampozitivne bakterije vrste *Staph. aureus* ŽMJ 72 in gramnegativne bakterije vrste *P. aeruginosa* ŽMJ 87. Kulturo smo pripravili, kot je opisano v podpoglavju 3.3.2. Nato smo 1 ml homogenega inokuluma prenesli v 80 ml tekočega gojišča TSB (10^6 CFU/ml). Suspenzijo smo dobro premešali ter prenesli v 96-mikrotitrsko ploščico tako, da smo v vsak prostorček dodali 200 μ l (10^6 CFU/ml). Sledila je 24-urna inkubacija pri 37 °C.

Zanimala nas je le adherirana kultura, zato smo po inkubaciji gojišče in planktonsko živeče bakterije sprali iz mikrotitrski ploščice. Vsak prostorček ploščice smo trikrat sprali s 150 μ l destilirane vode. Nato smo dodali predhodno sveže pripravljen reagent XTT (25 μ l v vsak prostorček). Ker je reagent občutljiv na svetlobo, smo delovni prostor zatemnili in mikrotitrsko ploščico takoj po dodatku ovili v aluminijasto folijo. Sledila je 1-urna inkubacija na stresalniku pri 37 °C in nato spektrofotometrična določitev oranžno obarvanega produkta metabolično aktivnih celic na čitalcu mikrotitrskih ploščic pri valovni dolžini 465 nm.

3.3.7 Optimizacija določanja adhezije v mikrotitrski ploščici z reagentom XTT

Pri prenosu metode določanja adhezije v mikrotitrski ploščici z reagentom XTT po protokolu Pettit in sod. (2005) smo naleteli na nekaj težav. Da bi dosegli reprezentativne in ponovljive rezultate, smo se odločili, da bomo skušali metodo optimizirati. Optimizacija je zajemala naslednje elemente (slika 5):

- ❖ vpliv volumna reagenta XTT,
- ❖ vpliv koncentracije reagenta XTT in
- ❖ določitev časa inkubacije kulture z reagentom XTT.



Slika 5: Shema optimizacije določanja bakterijske adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja z reagentom XTT.

Legenda: MTP: mikrotitrski ploščica, XTT: natrijev 2,3-bio-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid.

3.3.7.1 Vpliv volumna reagenta XTT

V MTP smo nacepili suspenzijo (200 µl/kanalček) čeznočne kulture bakterij *P. aeruginosa* ŽMJ87 v tekočem gojišču TSB z začetnim številom celic 10^6 CFU/ml. Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C smo na sprane mikrotitrne ploščice z adherirano kulturo dodali reagent XTT (1 mg/ml). Eni polovici vzorcev (24 paralelk) smo dodali po 25 µl reagenta, drugi polovici (24 paralelk) pa po 100 µl reagenta XTT v prostorček MTP. Pri kontrolnih vzorcih – vzorcih brez kulture smo storili enako, eni polovici (6 paralelk) smo dodali po 25 µl reagenta XTT, drugi polovici (6 paralelk) pa po 100 µl reagenta XTT. Po enourni inkubaciji vzorcev pri 37 °C smo z merjenjem absorbance oranžno obarvanega produkta metabolično aktivnih celic na čitalcu mikrotitrskih ploščic pri valovni dolžini 465 nm določili vpliv volumna reagenta XTT na uspešnost kvantifikacije živih bakterijskih celic.

3.3.7.2 Določanje časa inkubacije kulture z reagentom XTT

Pettit in sod. (2005) so absorbanco formazana določili eno uro po dodatku, ker je bila absorbanca vzorca v intervalu od 1 do 4 ure po dodatku XTT konstantna. Da bi zadostili pogoju, da mora biti povprečna razlika absorbanc vzorca in kontrolnega vzorca ($\Delta\bar{A}$) konstantna, smo absorbanco formazana izmerili po 1 in po 3 urah po dodatku reagenta XTT v MTP z bakterijami vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87.

Pri bakterijah vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 smo po dodatku reagenta XTT absorbanco spremljali v 5-minutnih intervalih, v čitalcu mikrotitrskih ploščic pri temperaturi 37 °C.

3.3.7.3 Vpliv koncentracije reagenta XTT

Vpliv koncentracije reagenta XTT na tvorbo formazana smo preverili z dodatkom različnih koncentracij reagenta: 1 mg/ml (A), 0,250 mg/ml (B), 0,010 mg/ml (C) in 0,063mg/ml (D) 0,007 mg/ml (E) in 0,005 mg/ml (F). Tvorbo formazana smo pri koncentraciji A spremljali 4 h 5 min, pri koncentraciji B in C 5 h 40 min, pri koncentracijah D, E in F pa 2 h 50 min. Vzporedno smo merili absorbanco kontrolnih vzorcev, v katerih ni bilo inokulirane bakterijske kulture.

3.3.8 Določitev adhezije različnih vrst bakterij z optimizirano metodo z reagentom XTT

Z metodo določanja metabolno aktivnih adheriranih celic z reagentom XTT smo določili stopnjo adhezije na polistiren 10 grampozitivnih (5 sevov *L. monocytogenes* (ŽM58, ŽM69, ŽM80, ŽM407, DMRICC 3633), 3 sevi *B. cereus* (ŽMJ3, ŽMJ91, ŽMJ116), 2 seva *Staph. aureus* (ŽMJ72, ŽMJ518) in 6 gramnegativnih sevov (4 sevi bakterij vrste *Salmonella* (ŽM348, ŽM350, ŽM378, ŽM390) in 2 seva bakterij vrste *P. aeruginosa* (ŽMJ87, ŽMJ517) (preglednica 4).

Pripravljene inokulume grampozitivnih bakterij smo inkubirali 5 ur pri 37 °C (logaritemska faza rasti), inokulume gramnegativnih pa 18 ur pri 37 °C (stacionarna faza rasti). Suspenzije kultur z 10^6 CFU/ml v tekočem gojišču TSB smo nacepili v MTP, v vsak prostorček po 200 µl in za vsak vzorec po 24 ponovitev. Kontrolni vzorci (24 paralelk) so vsebovali po 200 µl sterilnega gojišča TSB brez bakterijske kulture. Po 24-urni inkubaciji vzorcev pri 37 °C smo vsebino MTP aseptično odlili in jo s pomočjo multikanalne pipete trikrat sprali s sterilno destilirano vodo. Na ploščice smo dodali reagent XTT (0,01 mg/ml, po 100 µl na vzorec). Vzorce v MTP smo z aluminijasto folijo zaščitili pred negativnim učinkom svetlobe na reagent.

Po 75-minutni inkubaciji vzorcev z reagentom XTT pri 37 °C smo inkubacijo nadaljevali (še 80 min) v čitalcu mikrotitrskih ploščic, in hkrati spremljali spremembo absorbance v 10-minutnih intervalih.

3.3.9 Vrednotenje rezultatov in statistična analiza

Za merilo bakterijske adhezije, določene z metodo barvanja s kristal violetom oz. z reagentom XTT smo iz izmerjenih absorbanc izračunali naslednje parametre:

- ❖ povprečna absorbanca kontrolnega vzorca ($\bar{A}_{\text{kontrolnega vzorca}}$), ki je bila pri vsakem eksperimentu narejena v MTP v 12–24 paralelkah tako, da v gojišče TSB nismo dodali bakterij,
- ❖ razlika absorbanc posameznega vzorca (ΔA), pri čemer smo absorbanci vzorca odšteli povprečno absorbenco kontrolnega vzorca ($\bar{A}_{\text{kontrolnega vzorca}}$),
- ❖ povprečna razlika absorbanc ($\Delta \bar{A}$), ki smo jo izračunali kot povprečje razlik absorbanc posameznega vzorca (ΔA).

Pridobljene rezultate analiz smo statistično ovrednotili s testom ANOVA (analiza variance) v programu Microsoft Excel.

Analiza variance (ANOVA) je metoda, s katero preučujemo vpliv enega ali več dejavnikov na statistična povprečja. Analiza variance odgovarja na vprašanje, če so učinki dejavnikov statistično pomembni in kako veliki so. Glede na število dejavnikov in število vzorcev smo za vrednotenje rezultatov uporabili enojno in dvojno ali večkratno analizo variance. Pri enojni analizi variance smo proučevali, kako različni nivoji enega dejavnika, ki predstavljajo postopke, vplivajo na vrednosti statističnega znaka. V nekaterih primerih pa smo želeli analizirati vpliv dodatnega dejavnika ali več dejavnikov, ki spremljajo izvajanje poizkusa, zato smo uporabili dvojno ali večkratno analizo variance (Jesenko, 2001).

Analizo variance smo izvedli tako, da smo si izbrali dejavnike, ki smo jih želeli preveriti v poizkusu in opredelili proučevane parametre. To pomeni, da smo postavili ničelno domnevo: $H_0 : \mu_1 = \mu_n = \mu_{n+1}$ in raziskovalno domnevo $H_1 : \mu_1 \neq \mu_n \neq \mu_{n+1}$. Z μ smo označili $\Delta \bar{A}$ v osnovni statistični množici. Za pridobitev statistično značilnih razlik smo uporabili 95 % stopnjo zaupanja ($\alpha = 0,05$).

Na osnovi izračunane vrednosti P smo postavili sklep:

- ❖ Če je vrednost $P < \alpha$, potem zavržemo H_0 in sprejmemo H_1 (razlike v povprečnih vrednostih absorbance vzorcev so statistično značilne).
- ❖ Če je vrednost $P > \alpha$, potem H_0 ne moremo zavreči (razlike v povprečnih vrednostih absorbance vzorcev niso statistično značilne).

Pri izračunani vrednosti $P < 0,05$ posamezni dejavnik ali njihova kombinacija statistično vpliva na $\Delta \bar{A}$.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

V prvem delu smo predstavili rezultate določitve stopnje bakterijske adhezije z metodo barvanja s kristal violetom, v drugem delu pa rezultate določitve stopnje bakterijske dobljne z reagentom XTT.

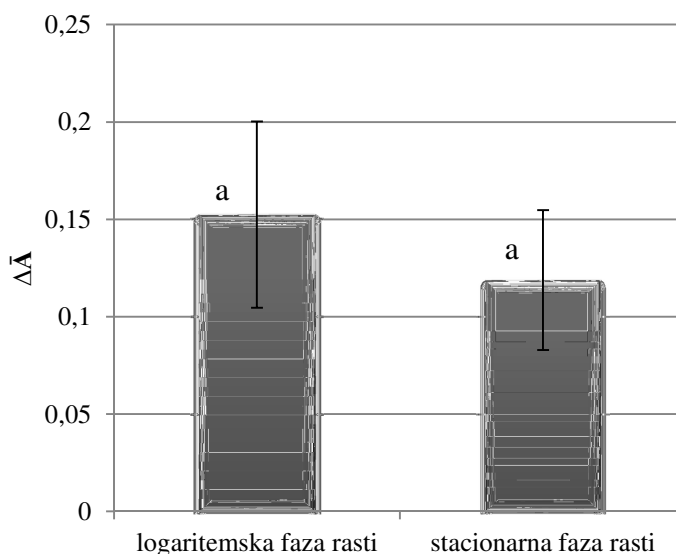
4.1 OPTIMIZACIJA METODE BARVANJA S KRISTAL VIOLETOM

V širšem pomenu lahko optimizacijo definiramo kot proces posodobitve nekega sistema z izbiro najboljšega dejavnika med možnimi alternativami, ki poveča učinkovitosti z nižjimi stroški. (Logar in Verčič, 2013) V našem eksperimentalnem delu je optimizacija analogno pomenila izbor dejavnikov, ki omogočijo določitev bakterijske adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja s kristal violetom.

4.1.1 Vpliv faze rasti bakterijskega inokuluma

V mikrotitrski ploščici smo nacepili bakterije vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 (10^6 CFU/ml) in *P. aeruginosa* ŽMJ87 (10^3 in 10^6 CFU/ml) v logaritemski in stacionarni fazi rasti ter jih 24 ur inkubirali pri 37 °C. Z metodo barvanja s KV smo določili vpliv faze rasti na stopnjo adhezije.

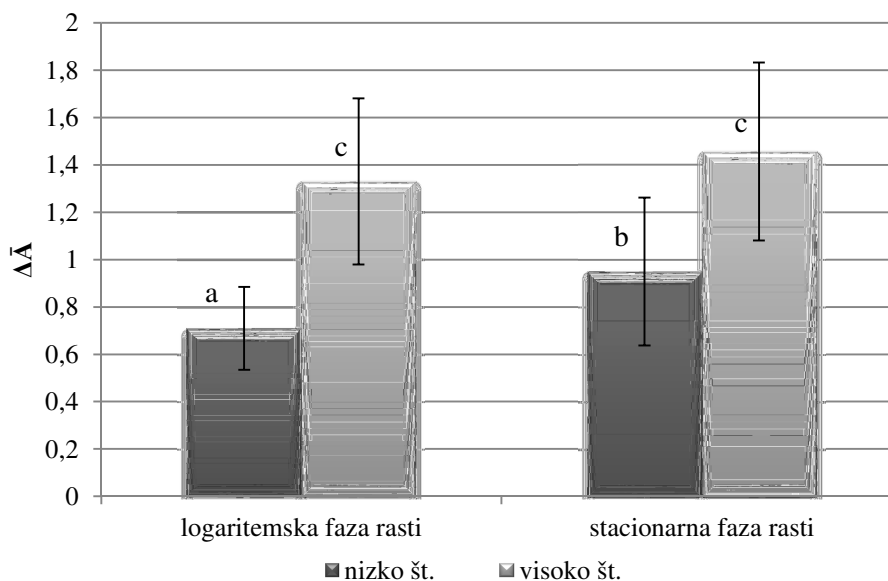
Na podlagi rezultatov (slika 6 in priloga A) lahko povzamemo, da logaritemska in stacionarna faza rasti grampozitivnih bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 nimata vpliva na določitev stopnje adhezije z metodo barvanja s KV.



Slika 6: Vpliv faze rasti bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 na stopnjo adhezije.

Legenda: ΔA : povprečna razlika absoorbanc kot merilo odhezije, a: rezultati z enako oznako se statistično značilno ne razlikujejo ($P > 0,05$).

Pri gramnegativnih bakterijah vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 so rezultati (slika 7 in priloga B) pokazali, da ima starost kulture vpliv na stopnjo adhezije le pri nižjem začetnem številu celic v gojišču (10^3 CFU/ml), medtem ko tega vpliva ni pri višjem začetnem številu.



Slika 7: Vpliv faze rasti bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 na stopnjo adhezije.

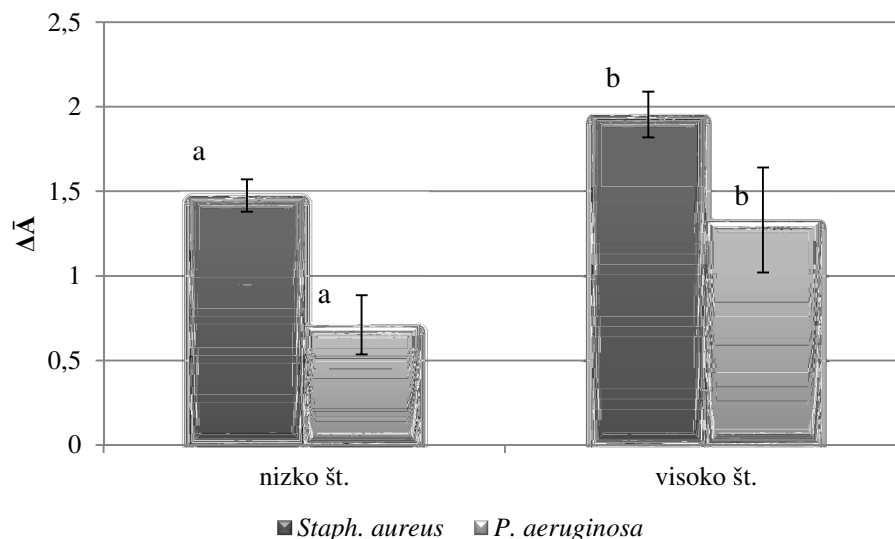
Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanco kot merilo odhezije, nizko št.: 10^3 CFU/ml, visoko št.: 10^6 CFU/ml, a, b, c: rezultati z različno oznako se statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$).

Extremina in sod. (2011) so pri optimizaciji razmer za kvantifikacijo biofilmov bakterij vrst *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium* v MTP prav tako prišli do spoznanja, da rastne razmere oz. fiziološka stanja mikroorganizmov vplivajo na adhezijo in tvorbo biofilma in da se zelo razlikujejo glede na vrsto mikroorganizmov. Odločili so se za uporabo kulture v stacionarni rasti in pri tem navedli razlog, da je bila ta rastna faza največkrat uporabljena pri drugih raziskovalcih. Vesterlund in sod. (2005) so ugotovili, da je povečana mikrobna adhezija v času logaritemske faze rasti, kar so pripisali povečani hidrofobnosti celične stene. Medtem ko sta Carpentier in Cerf (1999) v svoji študiji o biofilmih zapisala, da so večkrat opazili, da se sestradane celice ali tiste v stacionarni fazi rasti boljše adherirajo na površino kot tiste v logaritemski fazi rasti.

4.1.2 Vpliv začetnega števila celic v gojišču

Vpliv začetnega števila celic na stopnjo adhezije smo določili z bakterijami vrst *Staph. aureus* ŽMJ72 in *P. aeruginosa* ŽMJ87. Bakterijske inokuleme smo inkubirali 5 ur pri 37 °C, pripravili suspenzije s 10^3 in 10^6 CFU/ml ter jih nacepili v MTP. Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C smo določili stopnjo adhezije z metodo barvanja s kristal violetom.

Tako pri bakterijah vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 kot pri bakterijah vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 je bila adhezija večja pri višjem začetnem številu celic (slika 8 in priloga C).



Slika 8: Vpliv začetnega števila bakterij vrst *Staph. aureus* ŽMJ72 in *P. aeruginosa* ŽMJ87 na stopnjo adhezije.

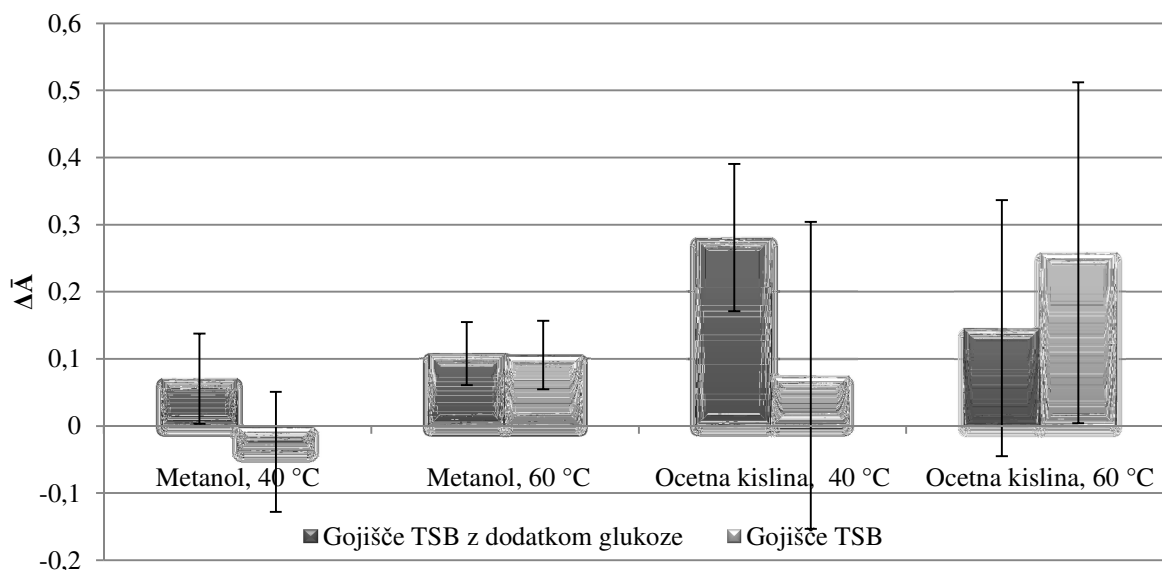
Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo odhezije, nizko št.: 10^3 CFU/ml, visoko št.: 10^6 CFU/ml, a, b: rezultati z različno oznako se statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$).

Naše rezultate lahko podkrepimo z rezultati raziskav Biørnstada (2006), ki je prav tako ugotovil, da nižje kot je začetno število bakterij, nižja je izmerjena absorbanca kot merilo adhezije. Peeters in sod. (2008) so v svoji študiji uporabe metod za kvantifikacijo biofilmov pri metodi barvanja s KV (0,5 %) v MTP nacepil, še višje število bakterij kot mi in sicer 100 μ l, 10^8 CFU/ml čeznočne kulture bakterij vrste *P. aeruginosa*, *Staph. aureus* in *Burkholderia cenocepacia*. Na podlagi rezultatov so poročali, da je ponovljivost metode barvanja s KV visoka, saj so opazili le manjše razlike med povprečnimi rezultati šestih analiz.

4.1.3 Vpliv obogatitve gojišča z dodatkom glukoze

Pri optimizaciji metode barvanja s kristal violetom smo določili vpliv obogatitve gojišča TSB z glukozo na stopnjo adhezije na polisteren. V MTP smo nanesti bakterijsko kulturo vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 v logaritemski fazi rasti v gojišču TSB in za primerjavo enako kulturo v gojišču TSB z dodatkom glukoze. Poizkus smo izvedli z 1 % barvilom kristal violet ter topiloma metanol in očetna kislina. Vzporedno smo določali vpliv temperature sušenja MTP pri 40 in 60 °C.

Rezultati (slika 9 in priloga D) so pokazali, da ima dodatek glukoze v gojišče TSB vpliv na določitev stopnje adhezije v primerih, ko smo kot topilo uporabili metanol in MTP sušili pri 40 °C ter ko smo kot topilo uporabili očetno kislino in MTP sušili pri 60 °C. Na podlagi naših rezultatov smo zaključili, da dodatek glukoze v gojišče TSB ne doprinese k učinkovitosti metode določanja bakterijske adhezije z barvilom KV.



Slika 9: Vpliv dodatka glukoze v gojišče TSB na stopnjo adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽM72 določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo adhezije, 40 in 60 °C: temperatura sušenja MTP, TSB: triptični soja bujon.

Rodrigues in sod. (2010) so z metodo barvanja s KV ugotavljali vpliv dodatka glukoze k gojišču TSB na tvorbo biofilma bakterij vrste *Staph. aureus* ATCC 25923 in 11 neznanih sevov iste vrste. Uporabili so 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 in 4 % koncentracijo glukoze. Na podlagi meritev absorbance so za vsak sev določili aritmetično srednjo vrednost absorbance treh paralelk in jo primerjali z absorbanco kontrolnega vzorca. Seve bakterij vrste *Staph. aureus* so klasificirali v 4 jakostne skupine tvorbe biofilma po sistemu:

- ❖ $\bar{A}_{seva} \leq A_{kontrolnega\ vzorca}$; ne tvorijo biofilma
- ❖ $\bar{A}_{kontrolnega\ vzorca} < \bar{A}_{seva} \leq 2\bar{A}_{kontrolnega\ vzorca}$; šibki tvorci biofilma
- ❖ $2\bar{A}_{kontrolnega\ vzorca} < \bar{A}_{seva} \leq 4\bar{A}_{kontrolnega\ vzorca}$; srednje močni tvorci biofilma in
- ❖ $4\bar{A}_{kontrolnega\ vzorca} < \bar{A}_{seva}$; močni tvorci biofilma.

V primeru, kjer v gojišču ni bilo dodane glukoze, štirje sevi niso tvorili biofilma, ostalih 8 pa so označili kot šibke tvorce biofilma. Pri 2 % dodatku glukoze v gojišču TSB trije sevi niso tvorili biofilma, 7 sevov je bilo šibkih tvorcev biofilma, 1 sev je bil srednje močan tvorec in 1 sev je bil zelo močan tvorec biofilma. Pri 4 % dodatku glukoze v gojišču sta se med ne-tvorce biofilma uvrstila le 2 seva, 4 sevi so bili med šibkimi tvorci, 1 sev srednje močan in kar 5 sevov je bilo zelo močnih tvorcev biofilma.

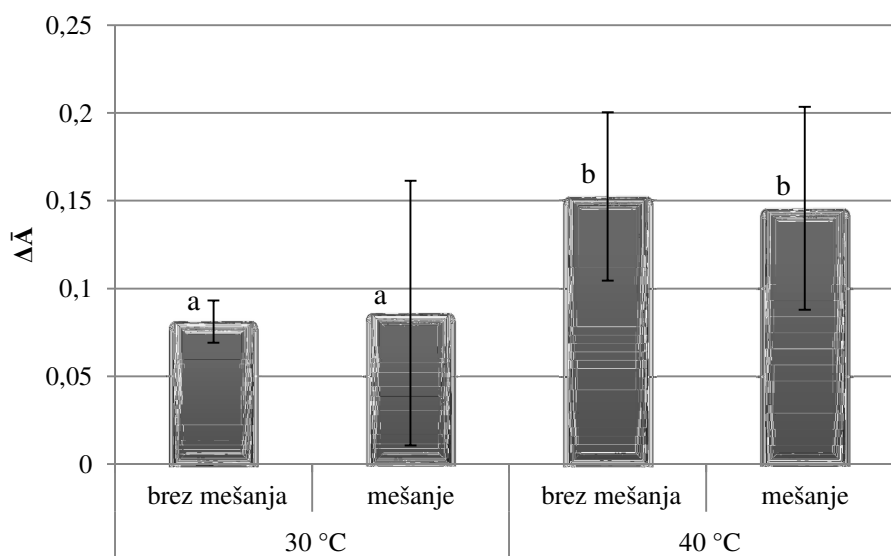
Christensen in sod. (1985) so določali tvorbo biofilma za koagulaza-negativne stafilokoke po sledečem postopku. Inokulum v stacionarni fazi rasti so serijsko redčili 1:100 v tekočem gojišču TSB ali TSB z dodatkom glukoze (ni podatka o tem, kakšno koncentracijo glukoze so uporabili) in nacepili v polistirenske MTP. Uporabili so MTP dveh različnih proizvajalcev, pri čemer niso zaznali vpliva MTP na adhezijo na polistiren. Sledila je 18-urna inkubacija kulture v MTP pri 37 °C. Nepritrjeno kulturo so odstranili s tapkanjem in uporabo vakuumске črpalke. Ploščice so 4-krat sprali z 0,2 ml fostatnega pufra. Adherirano kulturo so kemijsko fiksirali in jo obarvali s KV (1 %). Sledilo je spiranje s tekočo vodo, sušenje in spektrofotometrično določanje adhezije. V študiji so opazili, da je adhezija pri nekaterih izolatih višja brez dodatka glukoze kot z glukozo v gojišču.

4.1.4 Vpliv mešanja in sušenja mikrotitrskih ploščic

Pri določanju adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽM72 (v eksponentni fazi rasti) smo določili vpliv mešanja (150 obratov/min) pri izpiranju MTP. Adhezijo smo določali v 24 paralelkah z uporabo 1 % barvila kristal violet in uporabo metanola kot topila KV.

Hkrati smo določali vpliv načina sušenja MPT na učinkovitost metode določanja adhezije z barvilom KV. Poslužili smo se dveh načinov sušenja, in sicer v inkubatorju pri 30 °C in s sušilcem za lase pri 40 °C.

Glede na povprečne stopnje adhezije (slika 10 in priloga E) je razvidno, da mešanje mikrotitrskih ploščic pri določanju bakterijske adhezije z barvilom kristal violet nima vpliva na metodo. Zato smo mešanje MTP pri nadaljnjih poizkusih izpustili.



Slika 10: Vpliv mešanja mikrotitrskе ploščice na stopnjo adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽM72 določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc kot merilo adhezije, 30 °C in 40 °C: temperatura sušenja, a, b: rezultati z različno oznako se statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$).

Polistirenske mikrotitrskе ploščice slabo prevajajo toploto, zato je sušenje raztopin v MTP v inkubatorju dolgotrajen proces. Sušenje tudi ni enakomerno, saj je ob robovih sušenje hitrejše kot v središču MTP. Bolj enakomerno in hitro sušenje smo dosegli z uporabo sušilca za lase in vodenjem toplote v samo MTP.

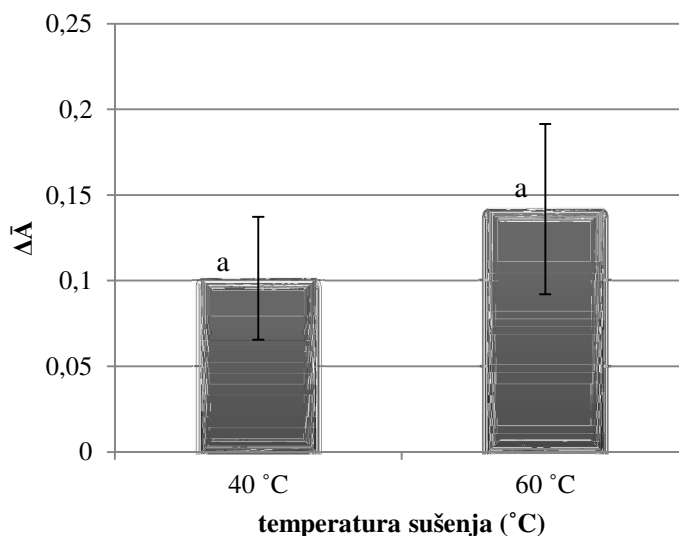
S sušilcem za lase je bilo sušenje pri določanju in kvantifikaciji bakterijske adhezije v MTP z barvilom kristal violet hitrejše in hkrati uspešnejše, saj je bila povprečna stopnja adhezije večja kot pri sušenju MTP v inkubatorju.

4.1.5 Vpliv sušenja in toplotne fiksacije

Pri določanju bakterijske adhezije na polistiren z metodo barvanja s kristal violetom smo določili vpliv toplotne fiksacije adheriranih bakterij vrste *Staph. aureus* ŽM72.

V prostorčke MTP smo nanесли čeznočno bakterijsko kulturo in jo 24 ur inkubirali. Na sprano in osušeno MTP z adherirano kulturo bakterij vrste *Staph. aureus* ŽM72 smo direktno pihali topel zrak s približno 60 °C zato, da bi dodatno pritrdili bakterije in s tem

omogočili boljše obarvanje. Poskus smo izvajali v 24 paralelkah, uporabili smo 1 % barvilo kristal violet in kot topilo metanol.



Slika 11: Vpliv toplotne fiksacije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 določen z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc kot merilo adhezije, a: rezultati z enako oznako se statistično značilno ne razlikujejo ($p < 0,05$).

Iz slike 11 in priloge F je razvidno, da je stopnja adhezije toplotno fiksiranega vzorca (sušenje pri 60 °C) adheriranih bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 določena z metodo barvanja s kristal violetom nekoliko višja kot v primeru, kjer fiksacije nismo opravili (sušenje pri 40 °C). Vendar med temperaturama sušenja ni statistično značilne razlike. Tako smo zaključili, da se pri detekciji bakterijske adhezije z metodo barvanja s kristal violetom z načinom sušenja MTP s sušilcem za lase, lahko vzorce osuši pri temperaturi 40 ali 60 °C.

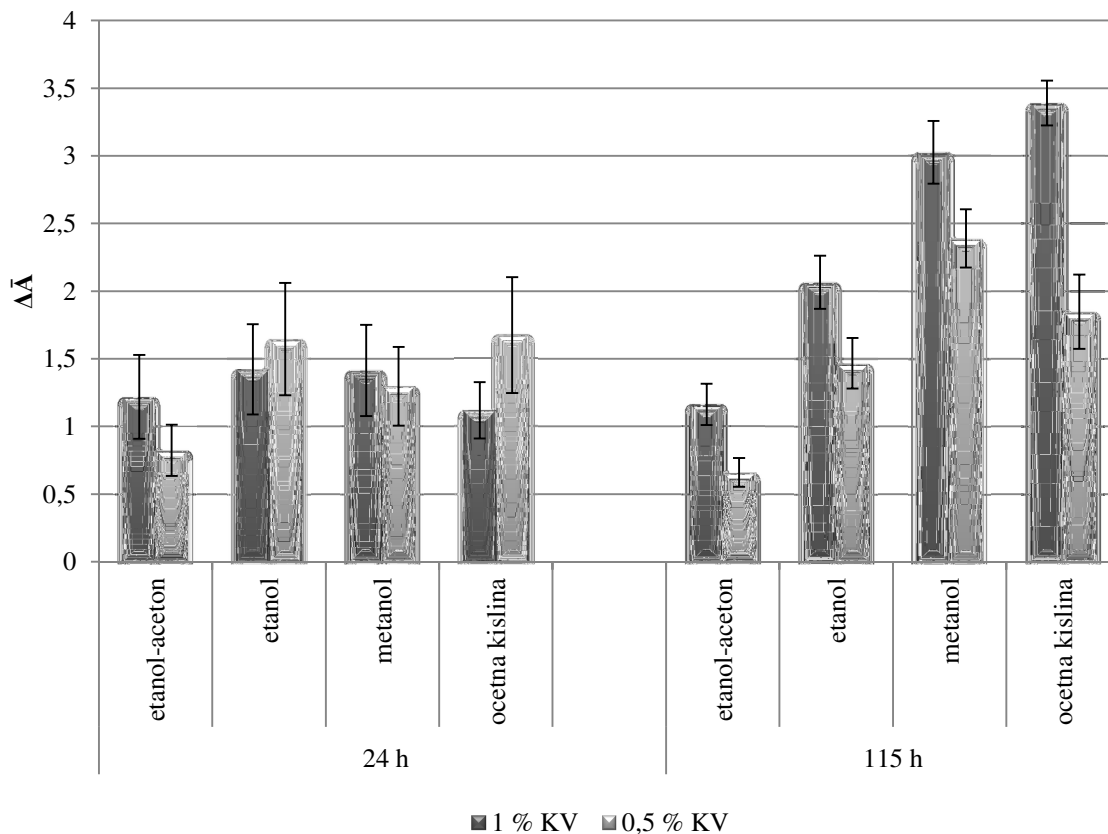
Galil in sod. (2013) so pri kvantifikaciji tvorbe biofilma bakterij *Pseudomonas aeruginosa* z metodo barvanja s KV (1 %) uporabili 15-minutno toplotno fiksacijo kulture pri 60 °C. Prav tako so adherirano kulturo toplotno fiksirali (20 minut pri 60 °C) Vesterlund in sod. (2005). De Castro Melo in sod. (2013) pa so pri svoji študiji detekcije biofilma bakterij *Staph. aureus* MTP sušili 1 uro pri 60 °C.

4.1.6 Vpliv koncentracije barvila kristal violet

Pri optimizaciji metode barvanja s kristal violetom smo ocenili vpliv koncentracije barvila KV na določitev stopnje adhezije na polistiren ločeno za grampozitivne (*Staph. aureus* ŽMJ72) in gramnegativne bakterije (*P. aeruginosa* ŽMJ87). Poizkus smo izvajali v 12 paralelkah, z uporabo 0,5 in 1 % koncentracije barvila KV.

Pri grampozitivnih bakterijah smo vpliv koncentracije barvila KV na določitev stopnje adhezije določili po 24-urni in po 115-urni inkubaciji v MTP. Pri tem smo spoznali, da je po 115-urni inkubaciji povprečna razlika absorbanc (merilo adhezije) precej višja, kot po 24-urni inkubaciji (slika 12, priloga G). To je povsem razumljivo, saj se je na prvotno adheriranih celicah (24 ur) začel razvoj biofilma (115 ur). Po 24-urni inkubaciji bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 (slika 12, priloga G) smo ugotovili, da je določena stopnja

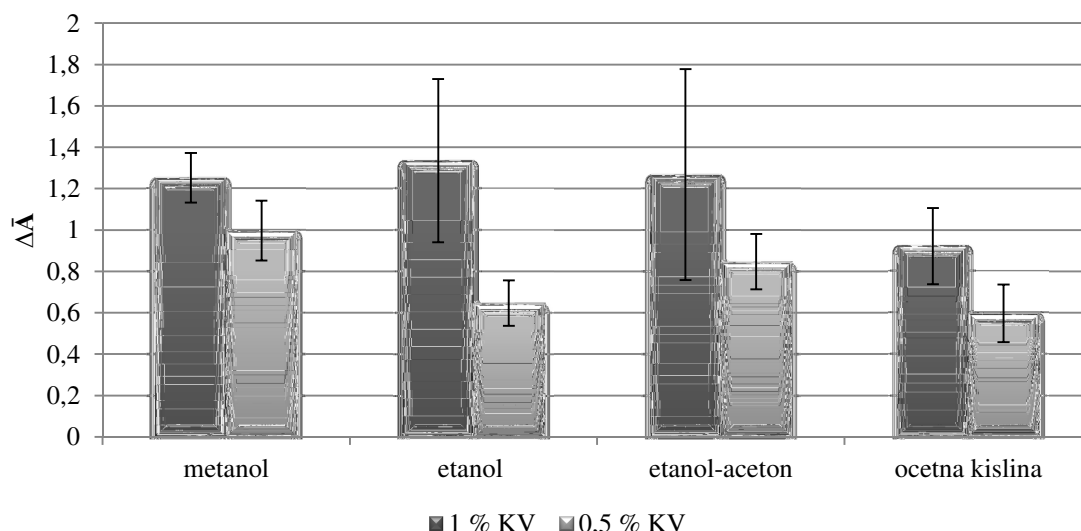
adhezije, ne glede na uporabljeno topilo, neodvisna od koncentracije barvila KV (0,5 in 1 %) ($P > 0,05$). Ker je bila stopnja adhezije po daljši inkubaciji – 115 ur večja pri uporabi 1 % kot pri 0,5 % barvila KV, smo se odločili, da v nadaljnjih raziskavah določanja stopnje adhezije grampozitivnih bakterij uporabljamo 1 % KV.



Slika 12: Vpliv koncentracije barvila kristal violet na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 po 24-urni in 115-urni inkubaciji, določen z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: $\Delta \bar{A}$: povprečna razlika absorbanc, 1 in 0,5 % KV: koncentracija barvila kristal violet, h: čas inkubacije v urah, 24 in 115 h: čas (ura) inkubacije kulture v MTP.

Pri gramnegativnih bakterijah vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 je bila povprečna razlika absorbanc kot merilo adhezije, ne glede na izbrano topilo, večja pri uporabi 1 % raztopine barvila KV in zato smo se odločili, da bomo tudi v nadaljnjih raziskavah določanja adhezije gramnegativnih bakterij uporabljali 1 % KV (slika 13, priloga H).



Slika 13: Vpliv koncentracije barvila kristal violet na stopnjo adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 po 24-urni inkubaciji, določen z metodo barvanja s kristal violetom.

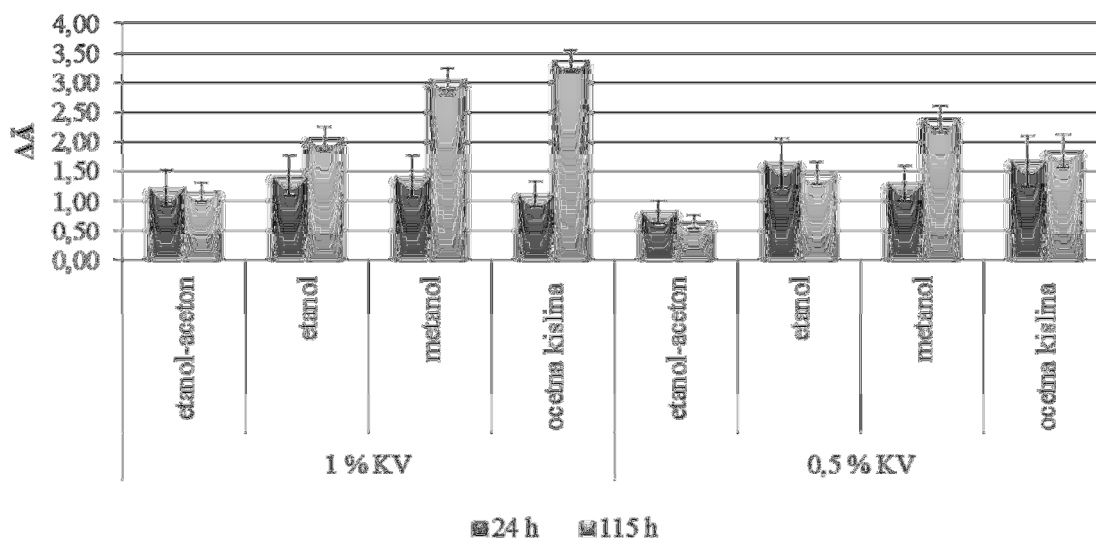
Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc, 1 in 0,5 % KV: koncentracija barvila kristal violet.

V strokovni literaturi lahko zasledimo, da so raziskovalci uporabljali različne koncentracije barvila KV, na primer Rivas in sod. (2007) in Harvey in sod. (2007) 1 % KV, Extremina in sod. (2011) in Peeters in sod. (2008) 0,5 % KV, Chavant in sod. (2007) 0,1 % KV in Rodrigues in sod. (2010) 2 % KV. Peeters in sod. (2008) so preverjali 0,5–2,5 % KV in določili optimalno koncentracijo barvila za vsak bakterijski sev posebej. Povprečno absorbanco so določali dvema sevoma bakterij *P. aeruginosa* (PAOI in ATCC 9027) in dvema sevoma bakterij *Staph. aureus* (ATCC 6538 in ATCC 700699). Za optimalno koncentracijo so za bakterije *Staph. aureus* ATCC 6538 določili 0,1 % KV, za *Staph. aureus* ATCC 700699 pa 0,5 % KV. Ugotovili so, da je kvantifikacija biofilma z metodo barvanja s KV manj primerna za seve bakterij vrste *P. aeruginosa*, saj je prihajalo do velikih variacij v rezultatih, ne samo znotraj paralelek v posameznem poskusu, ampak tudi med poskusi. Od vseh bakterij so najnižjo absorbanco pomerili ravno pri sevih bakterij *P. aeruginosa*, pri tem so za oba seva uporabili 0,5 % KV. Razlog temu pripisujejo neustrezni fiksaciji biofilma ob dejstvu, da je v matrici biofilma bakterij vrste *P. aeruginosa* prisotna velika količina vode.

4.1.7 Vpliv vrste topila

Določanje adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja s kristal violetom je potekalo po postopku, opisanem v podpoglavju 3.3.3, ločeno za grampozitivne bakterije vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 in gramnegativne bakterije vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87. Poizkuse smo izvajali z 10^3 CFU/ml v eksponentni fazi rasti, v 24 paralelkah in z uporabo 0,5 in 1 % KV. Za določitev vpliva vrste topila smo preizkusili metanol, etanol, očetno kislino in etanol-aceton.

Naše raziskave so bile sicer usmerjene v zgodnjo fazo razvoja biofilma – v bakterijsko adhezijo, vendar smo vpliv topila na stopnjo adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 po 24-urni inkubaciji določili tudi po 115-urni inkubaciji v MTP. Rezultate analize vpliva vrste topila na določanje adhezije grampozitivnih bakterij *Staph. aureus* ŽMJ72 smo predstavili na sliki 14 in 16 ter v prilogah I, J in K.

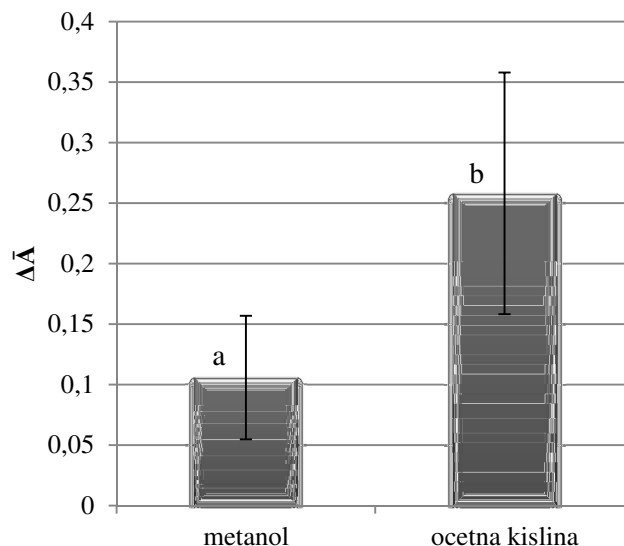


Slika 14: Vpliv vrste topila na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 z metodo barvanja s kristal violetom po 24- in 115-urni inkubaciji.

Legenda: ΔA : povprečna razlika absorbanc kot merilo adhezije, 24 in 115 h: čas inkubacije kulture v MTP.

Po 24-urni inkubaciji kulture v MTP smo z 1 % barvilom KV najvišjo stopnjo adhezije določili pri uporabi etanola, vendar se rezultat ni statistično značilno razlikoval od ostalih topil. Pri uporabi 0,5 % barvila KV smo najvišjo stopnjo adhezije na polistiren določili z očetno kislino, ki je statistično gledano dala enak rezultat kot etanol in metanol (priloga I). Po 115-urni inkubaciji bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 smo pri uporabi 1 % KV najvišjo povprečno razliko absorbanc kot merilo adhezije ocenili pri vzorcih, kjer smo kot topilo barvila uporabili očetno kislino. Topilo očetna kislina se v tem primeru statistično značilno razlikuje od vseh ostalih topil. Pri detekciji adhezije z 0,5 % KV smo najmočnejšo adhezijo določili pri vzorcih, kjer smo za raztapljanje barvila uporabili topilo metanol, ki se je prav tako statistično gledano razlikoval od ostalih treh topil (priloga J).

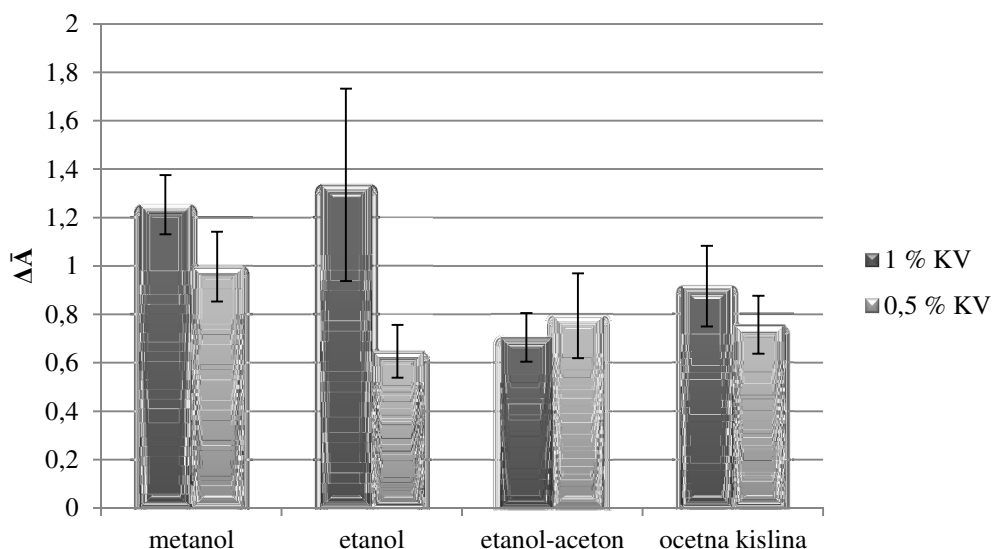
Na podlagi rezultatov analiz predstavljenih v prilogah I in J smo se odločili za ponovitev analize vpliva topila – metanol in očetna kislina na stopnjo pomejene adhezije. Rezultati teh analiz (priloga K in slika 15) so pokazali, da je bila stopnja adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 višja pri uporabi očetne kisline, ki se je tudi statistično razlikovala od topila metanol. Zato smo za nadaljnje analize adhezije grampozitivnih bakterij z metodo barvanja s kristal violetom kot topilo uporabljali očetno kislino.



Slika 15: Vpliv metanola in očetne kisline na določitev stopnje adhezije bakterij *Staph. aureus* ŽMJ72 z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo adhezije, a: rezultati z enako oznako se statistično značilno ne razlikujejo ($P > 0,05$).

Rezultate vpliva vrste topila na določitev stopnje adhezije gramnegativnih bakterij *P. aeruginosa* ŽMJ87 po 24-urni inkubaciji smo predstavili na sliki 16 in v prilogi L.



Slika 16: Vpliv vrste topila na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo adhezije, 1 % in 0,5 % KV: koncentracija barvila kristal violet.

Pri uporabi 0,5 % KV smo najvišjo adhezijo določili z metanolom. Pri uporabi 1 % KV pa smo najvišjo stopnjo adhezije določili z uporabo etanola in metanola. V nadaljevanju smo kot topilo za 1 % KV pri gramnegativnih bakterijah uporabljali etanol.

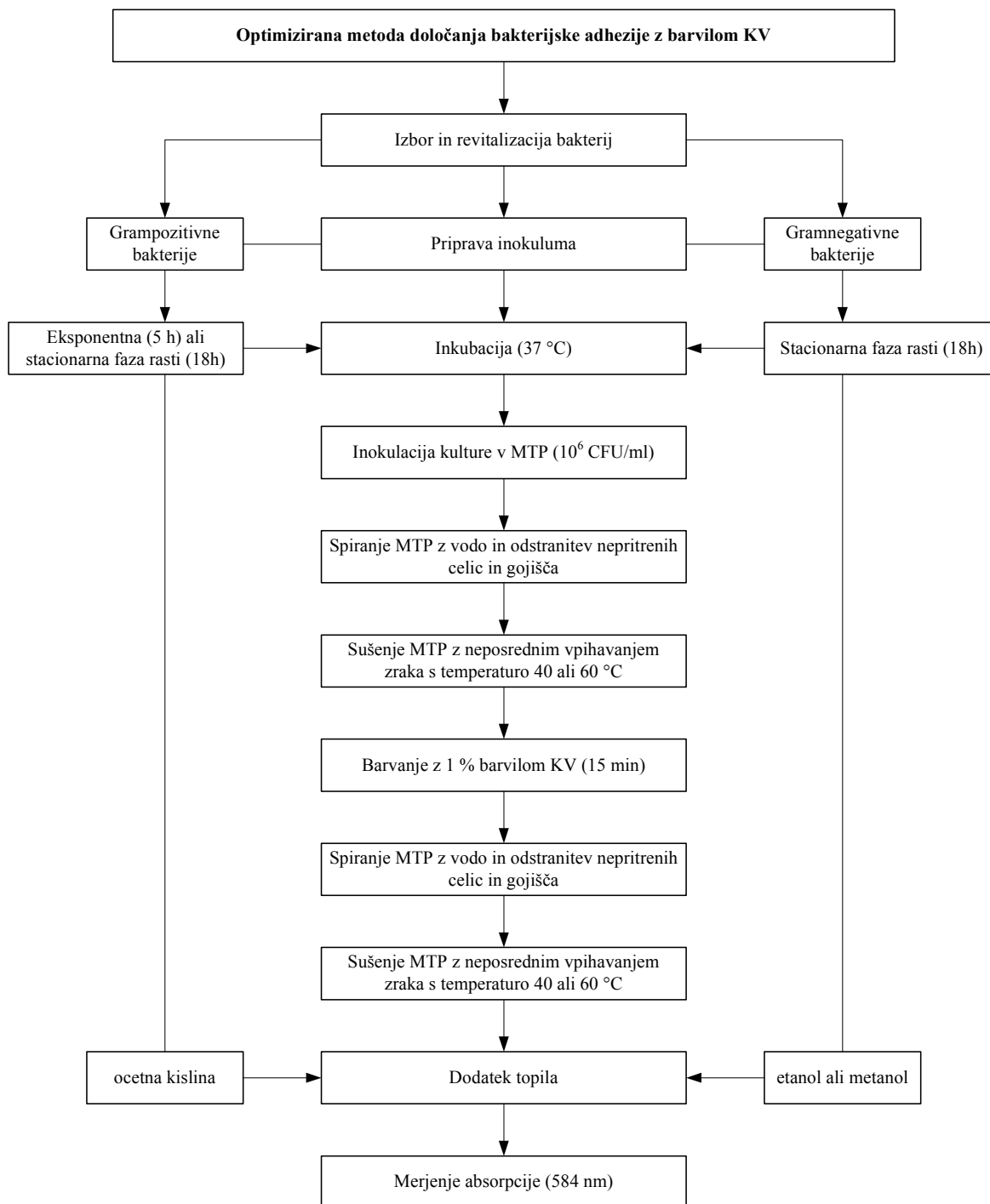
Tram in sod. (2013) so v svojem protokolu opisali vpliv topila na raztapljanje KV (1 %). Med drugimi bakterijami so za raziskavo tako kot mi uporabili bakterije vrst *P. aeruginosa* (12-urno kulturo) in *Staph. aureus* (čeznočno kulturo). Uporabili so 4 topila, in sicer: 95 % etanol, 5 % natrijev dodecil sulfat (SDS), 10 % SDS z 80 % etanolom in vodo (MBDS) in destilirano vodo. Ugotovili so, da pri določitvi biofilma z metodo barvanja s KV pri uporabi 95 % etanola biofilm ostane skoraj nepoškodovan in določen v največji možni meri glede na druga preizkušena topila. Pri tem nekaj KV ostane v matriksu biofilma, ki etanolu ni dostopen in zato so rezultati določitve stopnje adhezije lažno nižji od dejanske stopnje adhezije. Avtorji zaključujejo, da čeprav gre za široko uporabljeno metodo z uporabo etanola (95 %), je metoda pogosto opisana kot nezanesljiva. To je posledica le delnega razbarvanja KV in prisotnosti obarvanih netopnih fragmentov biofilma v raztopini. Zato Tram in sod. (2013) zaključujejo, da bi moral izbor topila pri metodi barvanja s KV temeljiti tudi na različnosti sestave biofilma grampozitivnih in gramnegativnih bakterij. Grampozitivne bakterije imajo v primerjavi z gramnegativnimi manjšo sposobnost sinteze lipidnih molekul, ki omogočajo učinkovitejšo prehajanje etanola v biofilm.

Peeters in sod. (2008) so pri določanju bakterijske adhezije/biofilma z metodo barvanja s KV uporabili 0,5–2,5 % KV in določili optimalno koncentracijo barvila za vsak sev posebej. Poleg tega so med povprečnimi rezultati šestih poizkusov (za vsak poizkus so imeli 24 vzorcev) opazili le manjše razlike, kar pomeni visoko ponovljivost metode. Ugotovili so še, da je metoda manj primerna za kvantifikacijo bakterij vrste *P. aeruginosa*, saj je pri vrednotenju prihajalo do večjih odstopanj med poizkusi in med posameznimi vzorci/paralelkami znotraj istega poizkusa.

Stepanović in sod. (2000) so za določanje tvorbe biofilma stafilokokov (2 referenčna seva *Staph. aureus* ATCC25923 in *Staph. aureus* NCTC8325) in 12 kliničnih izolatov *Staph. aureus* uporabili metodo barvanja s kristal violetom, izvedeno z nekaterimi spremembami po Christensenu in sod. (1985). Modifikacije so bile: fiksacija z metanolom, barvanje z 2 % KV in očetna kislina (33 %) kot topilo za KV. Njihovi rezultati so podobno kot naši pokazali, da je uporaba različnih sprememb v protokolu pomenila spremembe v določitvi stopnje adhezije. Na primer, ko so uporabili metodo po Christensen in sod. (1985), (brez dodatka glukoze) so 6 sevom določili slabo adhezijo, 24 sevov pa ni imelo sposobnosti adhezije na polistiren. Enake bakterijske seve so analizirali z modificirano metodo in rezultati so pokazali, da je bil le 1 sev nesposoben adhezije, pri 17 sevih so določili nizko stopnjo adhezije, pri 6 sevih srednje močno in pri 6 zelo močno adhezijo.

4.2 ADHEZIJA BAKTERIJ DOLOČENA Z METODO BARVANJA S KRISTAL VIOLETOM

Z optimizirano metodo barvanja s kristal violetom (slika 17) smo 16 sevom (preglednica 4) določili stopnjo adhezije na polistiren (slika 18, priloga M).

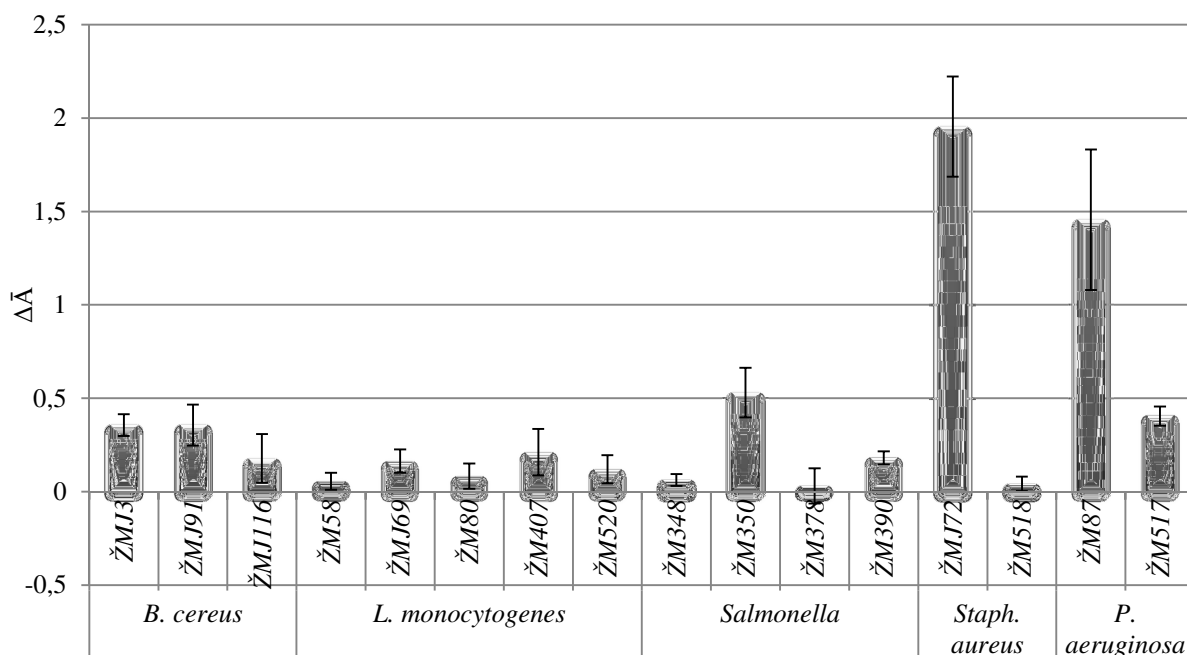


Slika 17: Shema optimizirane metode določanja bakterijske adhezije z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: MTP: mikrotitrski ploščica, h: ura, CFU: število kolonijskih enot, KV: kristal violet.

Harvey in sod. (2007) so z metodo barvanja s KV (1 % KV) 138 sevom bakterij *L. monocytogenes* po 48-urni inkubaciji pri 20 °C določili stopnjo tvorbe biofilma na polistiren. Seve bakterij so na podlagi rezultatov meritev – povprečne razlike absorbanc kot merila adhezije oz. tvorbe biofilma ($\Delta\bar{A}$) razvrstili na: šibke tvorce biofilma ($\Delta\bar{A} \leq 0,6$), srednje močne ($\Delta\bar{A} \leq 0,6 \geq 1,2$) in zelo močne tvorce biofilma ($\Delta\bar{A} \leq 1,2$). Pri tem so ugotovili, da je od 138 izbranih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* bilo 127 (92,0 %) sevov šibkih tvorcev biofilma, 9 sevov srednje močnih (6,5 %) in 2 seva (1,5 %) zelo močna tvorca biofilma.

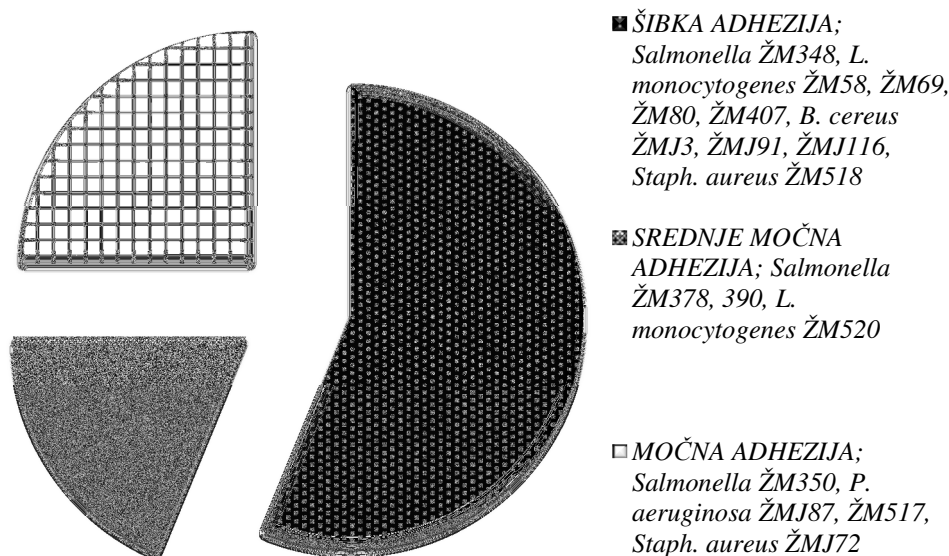
Na podlagi naših rezultatov (slika 18, priloga M) lahko povzamemo, da je stopnja adhezija odvisna tako od vrste kot od seva bakterij. Izmed vseh preizkušenih vrst bakterij smo najvišjo povprečno razliko absorbanc določili ravno pri sevih bakterij, s katerimi smo metodo optimizirali – grampozitivne bakterije vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 in gramnegativne bakterije vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87. To potrjuje naše domneve, da bi bilo pri določanju adhezije z metodo barvanja s KV potrebno približati vsakemu mikroorganizmu posebej.



Slika 18: Vpliv vrste in seva bakterij na stopnjo adhezije določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo adhezije, ŽM in ŽMJ: oznaka seva

Na sliki 19 smo predstavili razvrstitev bakterijskih sevov glede na jakost adhezije. Pri določanju adhezije z metodo barvanja s KV smo bakterije glede na rezultate povprečne absorbance vzorcev ($\bar{A}$) in povprečne absorbance kontrolnih vzorcev ($\bar{A}_K$) razvrstili po sistemu, ki ga navajajo Rodrigues in sod. (2010) (opis v 4.1.3) (priloga U). Pri tem smo ugotovili, da so vsi izbrani sevi bakterij sposobni adhezije na polistirenske MTP. Od 16 sevov bakterij je bilo 9 sevov šibkih, 3 sevi so bili srednje močni in 4 sevi zelo močni («adherentni») tvorca biofilma.



Slika 19: Razvrstitev bakterijskih sevov v skupine glede na jakost adhezije, določene z metodo barvanja s kristal violetom.

Legenda: ŽM, ŽMJ: oznaka seva.

4.3 OPTIMIZACIJA METODE DOLOČANJA ADHEZIJE Z REAGENTOM XTT

Pri določanju stopnje adhezije živih bakterijskih celic z reagentom XTT igrajo pomembno vlogo 3 med seboj povezane spremenljivke in sicer: koncentracija reagenta, čas presnove in število živih mikroorganizmov.

Pri metodi določanja adhezije z reagentom XTT smo optimizirali naslednje dejavnike:

- ❖ vpliv volumna reagenta XTT,
- ❖ vpliv časa inkubacije vzorcev z reagentom XTT,
- ❖ vpliv koncentracije reagenta XTT.

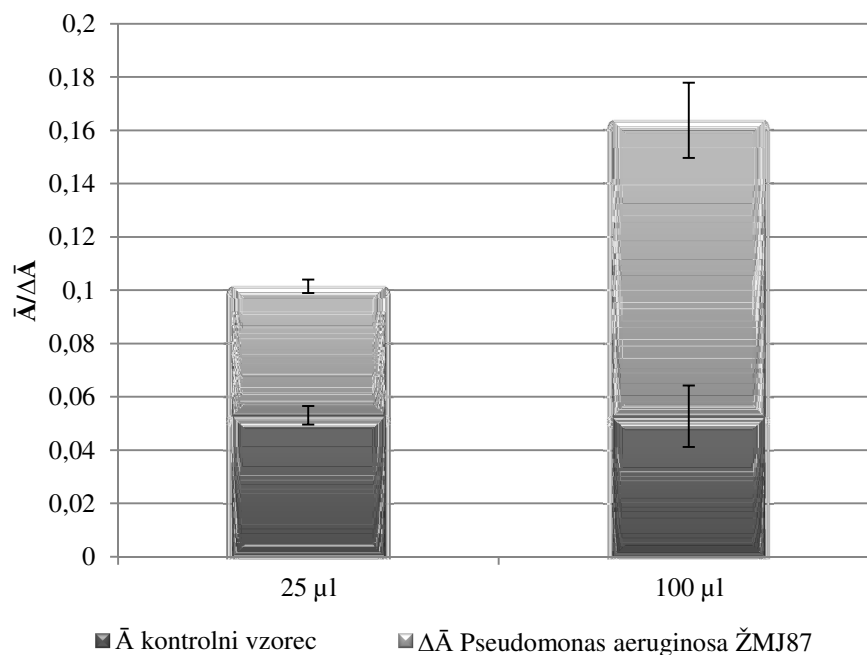
4.3.1 Vpliv volumna reagenta XTT

Z metodo barvanja z reagentom XTT po protokolu Pettit in sod. (2005) smo določili vpliv volumna reagenta XTT na določitev stopnje adhezije živih bakterijskih celic na polistiren.

Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C so se bakterije lahko na polistiren adherirale po celotni prostornini prostorčka MTP, kjer jim je bil razpoložljiv substrat (200 µl). Zato smo predvidevali, da je količina reagenta XTT, kot jo navajajo Pettit in sod. (2005) (25 µl) prenizka, za pridobitev realne slike o količini na polistiren adherirane kulture. Volumen reagenta XTT v prostorčku MTP smo povečali iz 25 µl (Pettit in sod. 2005) na 100 µl. Vzporedno smo izmerili absorbanco kontrolnega vzorca, v katerem ni bilo inokulirane bakterijske kulture.

Iz rezultatov, predstavljenih na sliki 21 in v prilogi N je razvidno, da volumen reagenta XTT pomembno vpliva na določitev stopnje adhezije živih bakterijskih celic, saj je bila stopnja adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 pri dodatku 25 µl reagenta XTT

znatno nižja kot pri dodatku 100 μl reagenta. Absorbanca kontrolnega vzorca se pri detekciji ni spreminjala glede na dodan volumen reagenta.

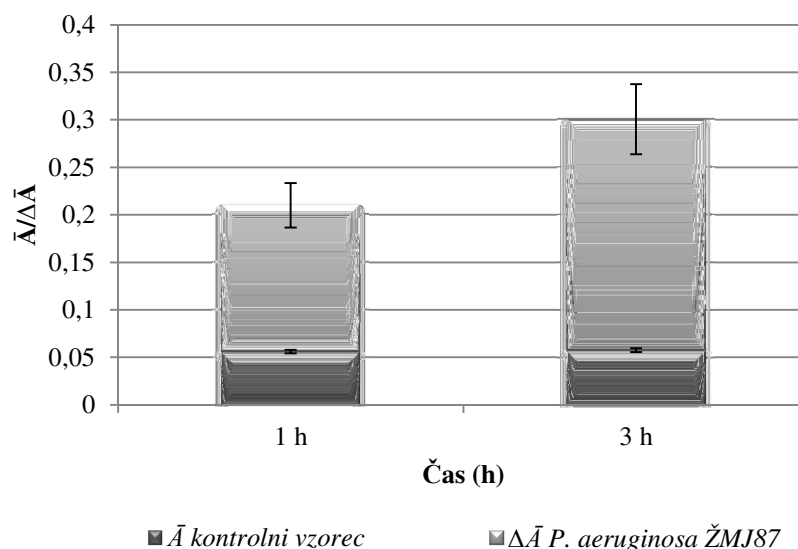


Slika 20: Vpliv volumna reagenta XTT na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87.

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo stopnje adhezije, $\bar{A}$: povprečna absorbanca, 25 in 100 μl : volumen reagenta XTT.

4.3.2 Vpliv časa inkubacije vzorcev z reagentom XTT

Pettit in sod. (2005) so absorbanco nastalega presnovnega produkta reagenta XTT – formazona, pomerili eno uro po dodatku reagenta, saj naj bi bila absorbanca vzorca v intervalu od 1 do 4 ure po dodatku reagenta XTT konstantna. Da bi zadostili temu pogoju, smo absorbanco formazana pomerili po eni in po treh urah po dodatku (100 μl) reagenta XTT. Pri tem smo ugotovili, da je za razliko od konstantne vrednosti absorbance kontrolnega vzorca, absorbanca vzorca s kulturo *P. aeruginosa* ŽMJ87 po triurni inkubaciji z reagentom XTT še vedno naraščala (slika 22 in priloga O).

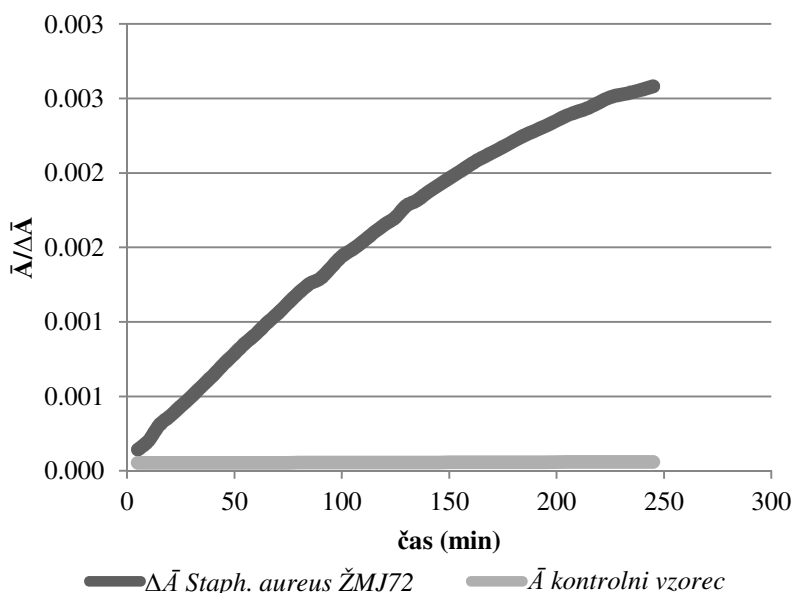


Slika 21: Stopnja adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 1 h in 3 h po dodatku reagenta XTT.

Legenda: $\Delta \bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo stopnje adhezije, $\bar{A}$: povprečna absorbanca, 1 in 3 h: čas (merjen v urah) inkubacije z reagentom XTT.

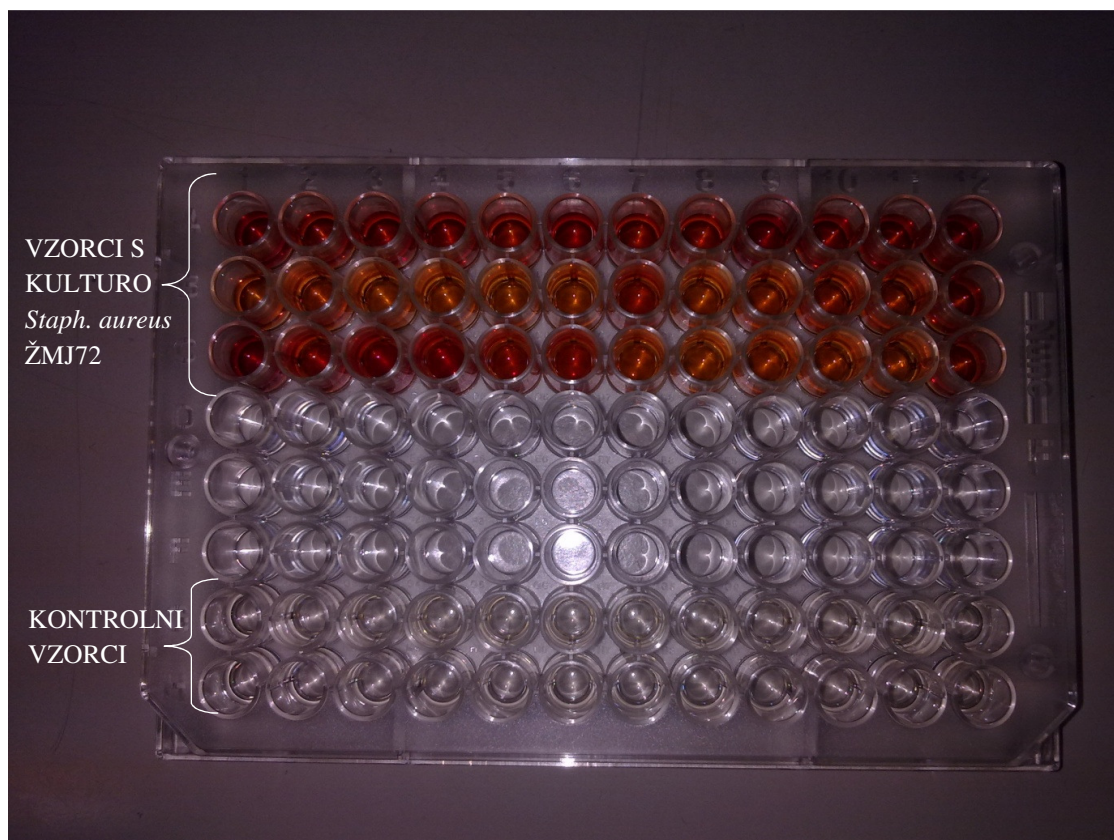
Na podlagi rezultatov (slika 21, priloga O) smo se odločili, da bomo hitrost bakterijske presnove reagenta XTT spremljali z merjenjem spremembe absorbance do konstantne vrednosti.

Rezultati meritev spremembe absorbance do konstantne vrednosti (slika 23, priloga P) kažejo, da je povprečna absorbanca vzorca s kulturo *S. aureus* ŽMJ72 po 4 urah inkubacije z 1 mg/ml reagenta XTT še vedno naraščala. Zato smo preverili še vpliv koncentracije reagenta XTT in pri tem časovno spremljali absorbanco do konstantne vrednosti.



Slika 22: Povprečna razlika absorbanc bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 v času od 5 min do 245 min po dodatku reagenta XTT.

Legenda: $\Delta \bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo stopnje adhezije, $\bar{A}$: povprečna absorbanca.



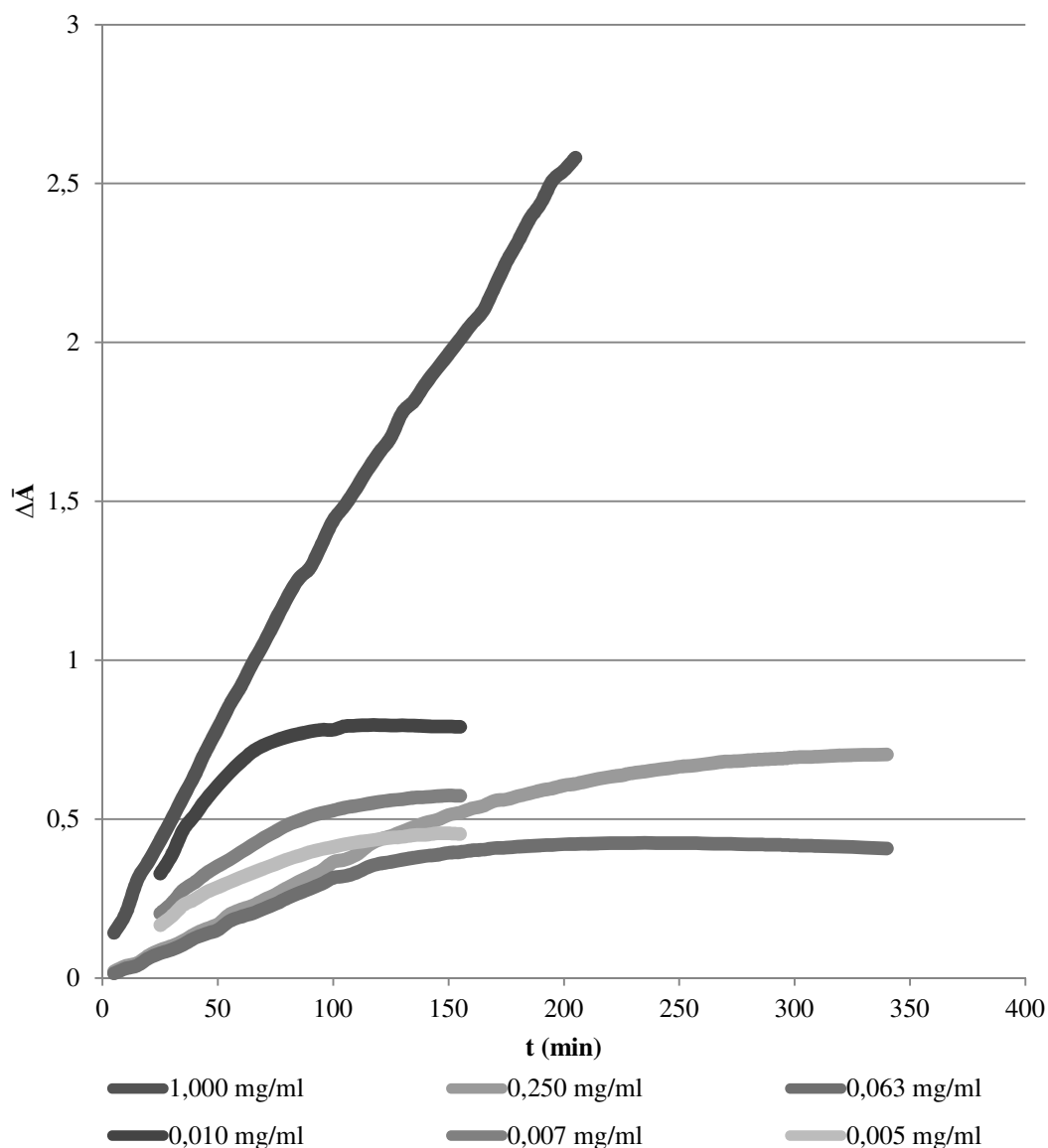
Slika 23: Primer določanja stopnje adhezije bakterij *Staph. aureus* ŽMJ72 v mikrotitrski ploščici z reagentom XTT.

Na sliki 23 smo ponazorili določanje stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 po končani (245-minutni) inkubaciji z reagentom XTT (določanje vpliva časa inkubacije z reagentom XTT). V prvih treh vrsticah MTP so vzorci s kulturo, v zadnjih dveh pa kontrolni vzorci (brez bakterijske kulture). Glede na intenzivnost obarvanja, ki je nastala pri pretvorbi reagenta XTT in primerjavo v barvi vzorcev – brez bakterijske kulture in z njo, lahko že vizualno potrdimo adhezijo in živost na polistiren adheriranih bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72.

4.3.3 Vpliv koncentracije reagenta XTT

V nadaljevanju optimizacije metode določanja adhezije z reagentom XTT smo določili vpliv koncentracije reagenta XTT na čas bakterijske pretvorbe. Preverili smo 6 koncentracij reagenta XTT (1,00 mg/ml, 0,25 mg/ml ter 0,063 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,007 mg/ml in 0,005 mg/ml). Rezultate analize smo predstavili na sliki 24 in v prilogi Q.

Največjo absorbanco kot merilo živosti adherirane kulture smo določili pri uporabi 1,00 mg/ml reagenta XTT (slika 24, priloga Q), pri kateri presnova reagenta po treh urah od dodatka reagenta še ni bila končana. Pričakovali smo, da bomo najnižjo absorbanco izmerili pri uporabi najnižje koncentracije reagenta XTT (0,005 mg/ml), toda najnižjo absorbanco smo izmerili pri uporabi 0,063 mg/ml XTT.



Slika 24: Vpliv koncentracije reagenta XTT na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72.

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo stopnje adhezije, 1,000, 0,250, 0,063, 0,010, 0,007 in 0,005 mg/ml: koncentracija reagenta XTT, t (min): čas, merjen v minutah.

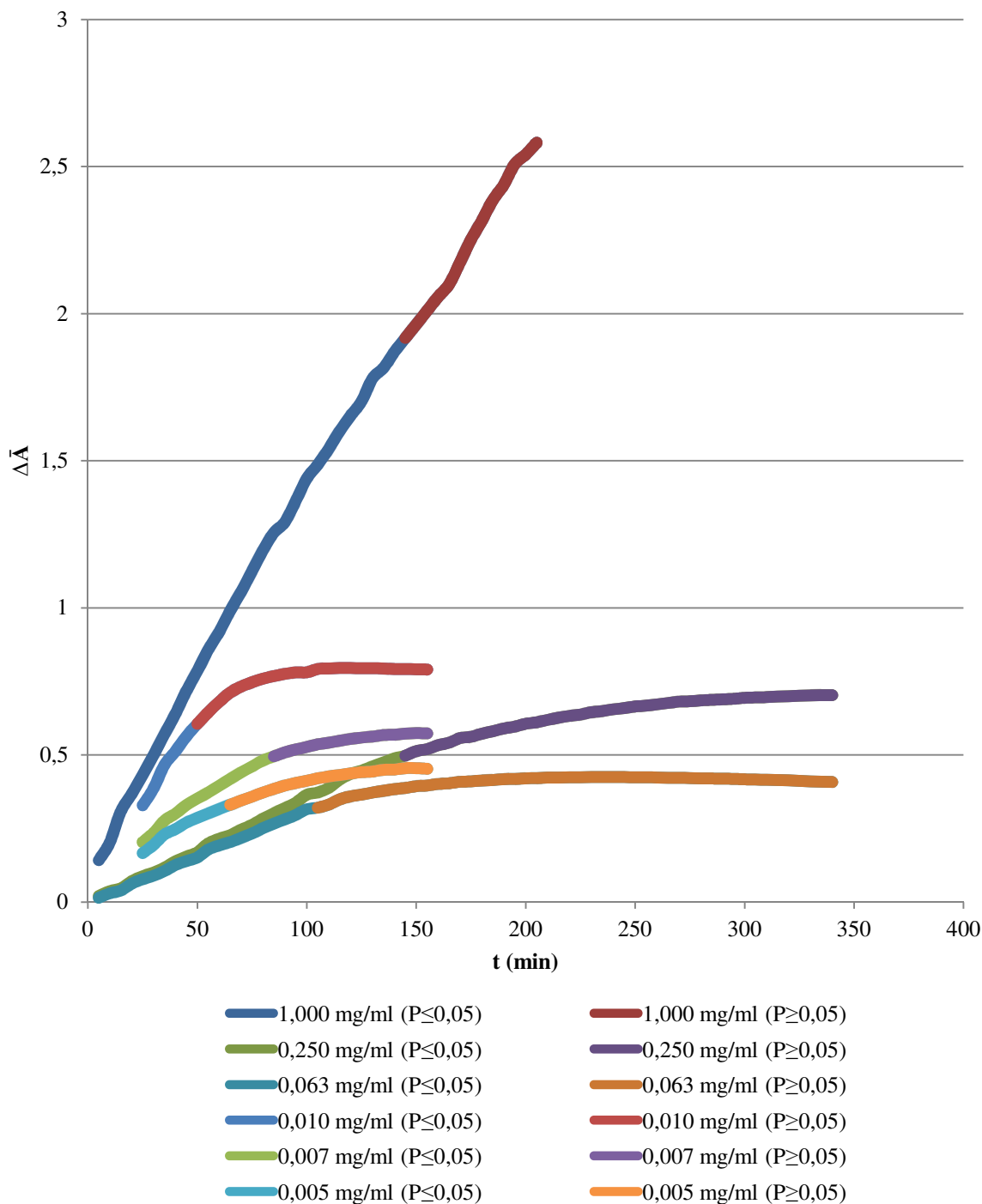
Meletiadis in sod. (2001) so v svojem protokolu zapisali, da je koncentracija reagenta XTT ključnega pomena pri izvedbi metode. Rezultat visoke koncentracije reagenta je lahko zaviranje produkcije formazana, medtem ko pri nizki koncentraciji reagenta lahko pride do slabe pretvorbe. Prav tako so naredili analizo vpliva koncentracije reagenta XTT na detekcijo živosti plesni rodu *Aspergillus*. Uporabili so koncentracije 0,005, 0,01 in 0,2 mg/ml reagenta XTT z različno vsebnostjo menadiona (0,39, 1,56, 6,25, 25 in 100 μM). Pri tem so ugotovili, da se je tvorba formazana najhitreje povečevala pri 0,2 mg/ml reagenta XTT z enako vsebnostjo menadiona v reagentu XTT, kot smo ga uporabili mi (100 μM). Absorbanco vzorcev so pomerili 1 h, 2 h in 4 h po dodatku reagenta XTT.

Rezultati analize vpliva koncentracije reagenta XTT na določitev stopnje adhezije kažejo, da koncentracija reagenta XTT vpliva na čas njegove presnove. Z enofaktorsko analizo variance smo določili časovni interval, na katerem lahko s 95 % gotovostjo ocenimo, da je

absorbanca vzorca konstantna (slika 25, priloga R). To pomeni, da bi absorbanco vzorca, pri uporabi 1,00 mg/ml in 0,25 mg/ml XTT lahko izmerili po 145 minutah od dodatka XTT. Vendar v primeru uporabe 1,00 mg/ml to ne drži povsem, kajti pri koncentraciji reagenta 1,00 mg/ml presnova ni bila povsem končana (slika 26) in lahko morda govorimo samo o intervalu na eksponentni fazi presnove, kjer je razlika v $\Delta\bar{A}$ v času manjša od 5 %. Za realno določitev časa presnove 1,00 mg/ml reagenta XTT, pri katerem je absorbanca konstanta, bi morali spremljati spremembo $\Delta\bar{A}$ še nekaj ur. Pri koncentraciji 0,063 mg/ml reagenta XTT bi absorbanco vzorca lahko pomerili po 105 minutah po dodatku reagenta XTT. Pri uporabi 0,010 mg/ml reagenta XTT po 50 minutah, pri 0,007 mg/ml reagenta XTT po 85 minutah in pri 0,005 mg/ml reagenta XTT po 65 minutah od dodatka reagenta XTT.

Kot vidimo iz rezultatov (priloga R), se čas presnove XTT z nižanjem koncentracije krajša, vse do koncentracije 0,01 mg/ml. Pri uporabi 0,007 mg/ml in 0,005 mg/ml pa se čas presnove spet podaljša, kar bi lahko glede na zapis Meletiadis in sod. (2001) pomenilo, da je bila koncentracija reagenta že prešibka in je prišlo do slabše pretvorbe reagenta XTT.

Iz rezultatov analize vpliva koncentracije reagenta XTT na določitev adhezije smo zaključili, da je optimalna koncentracija reagenta XTT 0,01 mg/ml, kajti absorbanca vzorca bi bila (pri 95 % stopnji zaupanja, $\alpha = 0,05$) z uporabo te koncentracije v intervalu od 1 do 4 ure po dodatku reagenta XTT res konstantna.



Slika 25: Vpliv koncentracije reagenta XTT na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 z grafičnim prikazom prehoda presnove reagenta XTT iz eksponentne v stacionarno fazo.

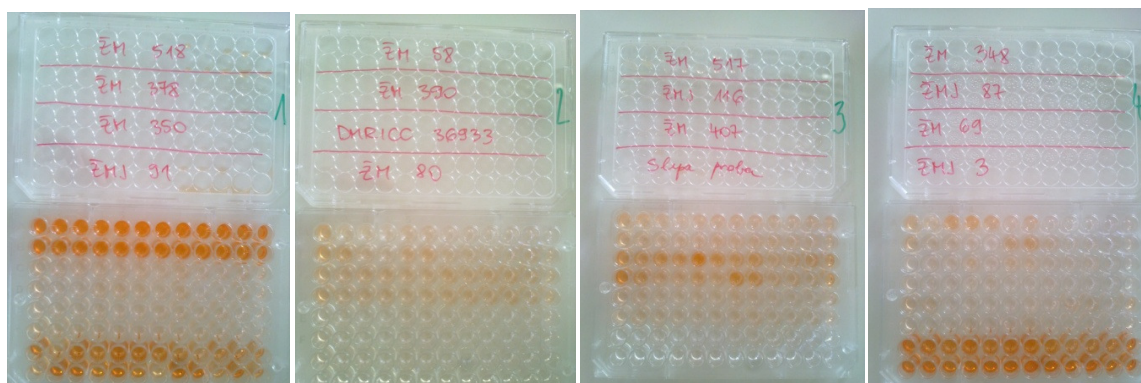
Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo stopnje adhezije, 1,000, 0,250, 0,063, 0,010, 0,007 in 0,005 mg/ml: koncentracija reagenta XTT, t (min): čas, merjen v minutah, P: verjetnost, ($P \leq 0,05$: povprečne razlike absorbanc vzorcev se statistično značilno razlikujejo, $P \geq 0,05$: povprečne razlike absorbanc vzorcev se statistično značilno ne razlikujejo).

4.4 ADHEZIJA BAKTERIJ DOLOČENA Z METODO DOLOČANJA ADHEZIJE Z REAGENTOM XTT

Namen določitve stopnje adhezije z reagentom XTT je bil ovrednotiti stopnjo adhezije živih bakterijskih celic v mikrotitrski ploščici.

Z metodo določanja adhezije z reagentom XTT smo določili stopnjo adhezije na MTP (slika 29) sevom bakterij vrst *L. monocytogenes* (ŽM520, ŽM58, ŽM69, ŽM80, ŽM407), *Bacillus cereus* (ŽMJ116, ŽMJ3, ŽMJ91), *Salmonella* (ŽM348, ŽM350, ŽM378, ŽM390), *Staph. aureus* (ŽMJ72, ŽM518) in *P. aeruginosa* (ŽMJ87, ŽM517) (slika 29).

VMTP smo nacepili 200 µl suspenzije gojišča TSB in 10^6 CFU / ml kulture v logaritemski fazi rasti. Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C smo na sprane mikrotitrne ploščice z adherirano kulturo dodali 100 µl 0,01 mg/ml reagenta XTT. Detekcijo spremembe absorbance smo spremljali po 75 minutah od dodatka reagenta XTT, v 10-minutnih intervalih (do 155 min).

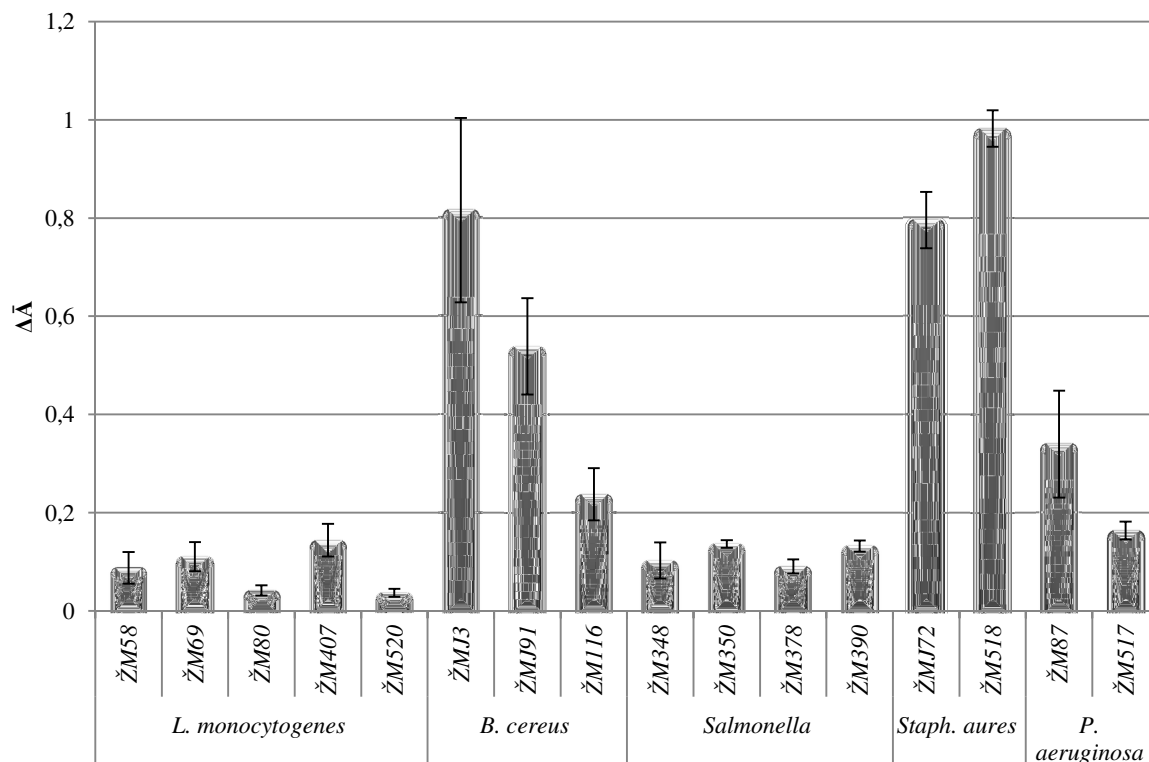


Slika 26: Primeri mikrotitrskih ploščic za določitev stopnje adhezije živih bakterijskih celic z reagentom XTT.

Rezultati določanja stopnje adhezije živih celic različnih sevov bakterij adheriranih v MTP z reagentom XTT so predstavljeni na sliki 27 in v prilogah S in T.

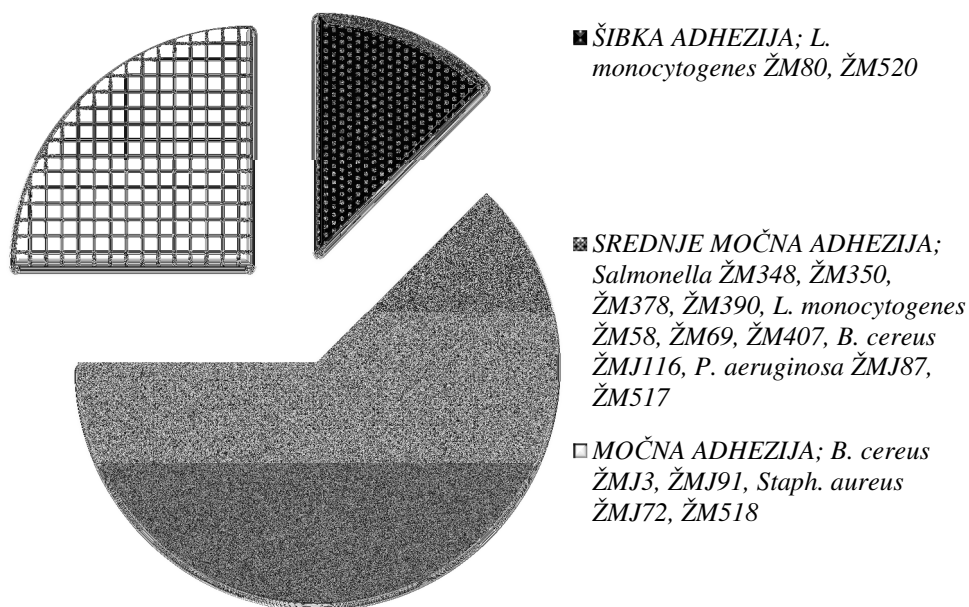
V prilogi T smo zbrali najvišje pomejane povprečne razlike absorbanc kot merila adhezije oz. živosti adherirane kulture, določene v stacionarnem časovnem intervalu presnove reagenta XTT (od 75 do 155 minut), ki je predstavljen v prilogi S. Najvišjo stopnjo adhezije smo z reagentom XTT določili pri sevih bakterij vrste *Staph. aureus* (ŽM518 in ŽMJ72) in *B. cereus* (ŽMJ3) (slika 27, priloga T).

Adhezijo oz. živost adherirane kulture lahko za nekatere seve tudi optično potrdimo na podlagi slike 26. Močno obarvanost vzorca kot posledico presnove reagenta XTT lahko opazimo pri sevih bakterij vrste *Staph. aureus* ŽM518 in *B. cereus* ŽMJ3 in ŽMJ91.



Slika 27: Določitev stopnje adhezije živih bakterijskih celic z reagentom XTT.

Legenda: : ΔA: povprečna razlika absorbanc kot merilo stopnje adhezije, ŽM in ŽMJ: oznaka seva.



Slika 28: Razvrstitev bakterijskih sevov v skupine glede na jakost adhezije, določene z reagentom XTT.

Legenda: ŽM, ŽMJ: oznaka seva

Na sliki 28 smo predstavili razvrstitev bakterijskih sevov glede na jakost adhezije. Pri določanju adhezije z reagentom XTT smo bakterije glede na rezultate pomerjene povprečne absorbance vzorcev ($\bar{A}$) in povprečne absorbance kontrolnih vzorcev ($\bar{A}_K$) razvrstili po sistemu Rodrigues in sod. (2010), ki je že opisana v podpoglavju 4.1.3 (priloga U). Pri tem smo ugotovili, da so vsi izbrani sevi bakterij sposobni adhezije na polistirenske MTP. Od 16 sevov bakterij, ki smo jim določili stopnjo adhezije na polistiren, sta bila 2 seva šibka, 10 sevov srednje močnih in 4 sevi zelo močni (»adherentni«) tvorci biofilma.

5 SKLEPI

Pri določanju bakterijske adhezije v mikrotitrski ploščici z metodo barvanja z barvilom kristal violet (KV), smo dokazali, da:

- ❖ mešanje (150 rpm/min) vsebine pri spiranju nepritrjene kulture in/ali reagentov ni potrebno,
- ❖ sta način in temperatura sušenja dejavnika, ki vplivata na občutljivost in reprezentativnost rezultatov,
- ❖ dodatek glukoze v gojišče TSB vpliva na določitev stopnje adhezije v odvisnosti od vrste bakterij,
- ❖ je koncentracija KV odvisna od vrste bakterij in uporabljenega topila za KV,
- ❖ je stopnja adhezije višja, če je inokulum gramnegativnih bakterij v stacionarni fazi rasti, medtem ko pri grampozitivnih bakterijah starost bakterijske kulture ne vpliva na stopnjo adhezije,
- ❖ ima začetno število celic vpliv na stopnjo adhezije,
- ❖ je stopnja adhezije odvisna od vrste in seva bakterijske kulture.

Pri določanju bakterijske adhezije v mikrotitrski ploščici z reagentom XTT smo dokazali, da:

- ❖ je 25 µl reagenta XTT premajhna količina reagenta za določitev stopnje adhezije na površini prostorčka MTP,
- ❖ je optimalna koncentracija reagenta XTT 0,10 mg/ml.

6 POVZETEK

Namen našega raziskovalnega dela je bila optimizacija metode za določanje adhezije oz. tvorbe bakterijskega biofilma v MTP z barvilom kristal violet (KV). Glede na objavljene strokovne članke s področja uporabe KV za določanje biofilma smo analizirali protokole dela in pri tem ugotovili, da med njimi obstajajo velike razlike. Naše delo je potekalo po sistemu izločanja, kar pomeni, da smo preizkušali posamezen parameter in se glede na statistično ovrednotenje rezultata odločili za najbolj ustrezno izvedbo metode. Pri optimizaciji metode smo testirali naslednje dejavnike: faza bakterijske rasti, začetno število bakterij, obogatitev gojišča z dodatkom glukoze, učinek mešanja pri spiranju MTP, koncentracija KV, temperaturni režim sušenja in toplotno fiksiranje kulture ter uporaba različnih topil (etanol, metanol, očetna kislina in raztopina etanol-acetona). Optimizacijo smo izvajali ločeno za grampozitivne bakterije, katerih predstavnik je bila kultura bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 in gramnegativne bakterije, ki jih je zastopala kultura bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87.

Pri optimizaciji določanja bakterijske adhezije z metodo barvanja s KV smo ugotovili, da je stopnja adhezije odvisna tako od vrste kot od seva bakterijske kulture. Ugotovili smo tudi, da je stopnja adhezije po 24-urni inkubaciji višja, če je inokulum gramnegativnih bakterij v stacionarni fazi rasti, medtem ko pri grampozitivnih bakterijah starost bakterijske kulture ni vplivala na stopnjo adhezije. Poleg načina in temperature sušenja smo potrdili, da ima na določitev stopnje adhezije z metodo barvanja s KV pomemben vpliv na občutljivost in reprezentativnost rezultatov začetno število celic v MTP. Dodatek glukoze v gojišče TSB, koncentracija KV in izbor topila, vplivajo na določitev stopnje adhezije v odvisnosti od vrste bakterij.

Glavna pomanjkljivost metode določanja biofilma z barvilom kristal violet je ta, da ne poda informacije o živosti celic. Barvilo KV namreč obarva tako žive kot mrtve celice in izvencelični matriks. Zato smo za razlikovanje med živimi in mrtvimi celicami uporabili metodo, ki temelji na metabolni aktivnosti živih celic z reagentom XTT (natrijev 2,3-bio-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid), pri kateri je pomerna absorbanca sorazmerna številu metabolično aktivnih mikrobnih celic. Analize z XTT se v veliki meri uporabljajo za kvantifikacijo živih celic planktonskih kultur in za količinsko ovrednotenje bakterijskih in kvasnih biofilmov. Določanje živosti pritrjene kulture v MTP z reagentom XTT smo določili po protokolu Pettit in sod. (2005). Za pridobitev reprezentativnih in ponovljivih rezultatov smo določili optimalen volumen, koncentracijo reagenta XTT in določitev časa inkubacije kulture z reagentom XTT.

Na podlagi rezultatov analiz smo ugotovili, da je za detekcijo živosti adherirane kulture v MTP z reagentom XTT najprimernejša uporaba 100 μ l, 0,1 mg/ml reagenta XTT, saj je bila absorbanca (merilo živosti/adhezije) presnovnega produkta reagenta XTT po 50 minutah inkubacije z reagentom konstantna ($P > 0,05$).

7 VIRI

- Abraham S., Sharon N., Ofek I., Schwartzman J. D. 2015. Adhesion and colonization. V: Molecular medical microbiology. 2nd ed. Tang Y. W., Sussman M., Liu D., Poxton I., Schwartzman J. (eds.). Tokyo, Academic Press: 409–421
- Azeredo J., Visser J., Oliveira R. 1999. Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO theories. Colloids and Surfaces Biointerfaces, 14:141–148
- Biørnstad T. J. 2006. Biofilma formation in *Bacillus cereus* group bacteria – screening of strains and initial molecular studies. Oslo, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Department of Molecular Biosciences: 123 str.
- Boland T., Latour R. A., Stutzenberger F. J. 2010. Molecular basis of bacterial adhesion. V: Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications. An Y. H., Friedman R. J. (eds.). Totowa, Humana Press: 29-41
- Børge K. M. 2014. Problems caused by biofilms. Bönen, Bactoforce GmbH: 5 str. <http://www.bactoforce.com/wp-content/uploads/2014/09/Problems-caused-by-biofilms.pdf> (9. jan. 2016)
- Cabarkapa J., Djuragic O. 2013. Biofilm. V: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Vol. 1. Méndez-Vilas A. (ed.). Badajoz, Formatex Research Center, 42-51
- Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hébraud M., Bernardi T. 2007. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. Journal of Microbiological Methods, 68: 605-612
- Christensen G. D., Simpson W. A., Younger J. J., Baddour L. M., Barrett F. F., Melton D. M., Beachey E. H. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of Clinical Microbiology, 22: 996-1006
- Coenye T., Neils H. J. 2010. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, 83: 89-105
- Das T., Sharma P. K., Busscher H. J., van der Mei H. C., Krom B. P. 2010. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. Environmental Microbiology, 76: 3405–3408
- de Castro Melo P., Ferreira L.M., Filho A. N. , Zafalon L. F., Vicente H. I., de Souza V. 2013. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Brazilian Journal of Microbiology, 44, 1: 119-124
- Denkhaus E., Meisen S., Telgheder U., Wingender J. 2007. Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. Microchemica Acta, 158: 1-27

- Dunne W. M. 2002. Bacterial adhesion-seen any good biofilms lately?. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 155-166
- Extremina C. I., Costa L., Aguiar A. I., Peixe L., Fonseca A. P. 2011. Optimization of processing for the quantification of enterococci biofilms using microtitre plates. *Journal of Microbiological Methods*, 84: 167-173
- Garrett T., Bhakoo M., Zhang Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18: 1049–1056
- Galil K. A. E., Ghani S. M. A. I., Sebak M. A., El-Naggar W. 2013. Detection of biofilm genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* recovered from some Egyptian hospitals. *New Egyptian Journal of Microbiology*, 36: 86-101
- Harvey J., Keenan K. P., Gilmor A. 2007. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24: 38-392
- Hori K., Matsumoto S. 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control, *Biochemical Engineering Journal*, 48: 424–434
- Jesenko J. 2001. Statistika v organizaciji in managementu. Kranj, Moderna organizacija, 333-335
- Katsikogianni M., Missirlis Y.F. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials*, 8: 37-57
- Lianou A., Koutsoumanis K. P. 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 160: 171-178
- Logar N., Verčič D. 2013. Terminološka podatkovna zbirka odnosov z javnostmi. Ljubljana, Fakulteta za družbene vede: 1 str.
<http://www.termania.net/slovarji/termis-terminoloska-podatkovna-zbirka-odnosov-z-javnostmi/7967434/optimizacija?query=OPTIMIZACIJA&SearchIn=All> (7. feb. 2016)
- Meletiadiis J., Mouton J. W., Meis J. F. G. M., Bouman B. A., Donnelly J. P., Verweij P. E., EUROFUNG NETWORK. 2001. Colometric assay for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3402-3408
- Merriitt J. H., Kadouri D. E., O'Toole G. A. 2005. Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*, Unit 1B: 1B.1.1-1B.1.17.
- Myszka K., Czaczyk K. 2011. Bacterial biofilms on food contact surfaces – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 61: 173-180
- Palmer J., Flint S., Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 9: 577–588

- Patanella F., Valenti P., Natalizi, Passeri D., Berlutti F. 2013. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Annali di Igiene*, 25, 1: 31-42
- 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, 2: 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. Microbial almar blue assay for *Staphylococcus epidermis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 49, 7: 2612–2617
- Rivas L., Dykes G. A., Fegan N. 2007. A comperative study of biofilm formation by *Shiga toxigenic Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. *Journal of Microbiological Methods*, 69,1: 44-51
- Rodrigues L. B., Ruschel dos Santos L., Tagliari V. Z., Rizzo N. N., Trenhago G., Picollo de Olivera A., Goetz F., Pinheiro do Nascimento V. 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 1082-1085
- Srey S., Jahid I. K., Ha S. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31: 572–585
- Teh K. H., Flint S., French N. 2010. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 143: 118-124
- Van Houdt R., Michiels C.W. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 1117–1131
- Vesterlund S., Paltta J., Karp M., Ouwehand A. C. 2005. Measurament of bacterial adhesion – *in vitro* evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 60: 225-233

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Barbari Jeršek za strokovno vodenje, vzpodbudo, pomoč, potrpežljivost in predvsem za čas namenjen izdelavi te diplomske naloge.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Tatjani Košmerl, za prijaznost in hitro recenzijo diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi dr. Mariji Kurinčič in Saši Piskernik, za pomoč pri ivedbi praktičnega dela diplomske naloge.

Zahvaljujem se Lini Burkan za temeljit pregled in pomoč pri urejanju diplomske naloge.

Hvala tudi staršem in prijateljem, ki so mi stali ob strani in pomagali v času študija.

PRILOGE

Priloga A: Vpliv faze rasti bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 na stopnjo adhezije.

Faza rasti	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n: 36)	P
logaritemska	$0,1524 \pm 0,10$	0,175
stacionarna	$0,1188 \pm 0,07$	

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo odhezije, SD: standardni odklon, P: verjetnost, n: št. paralelk.

Priloga B: Vpliv faze rasti bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 na stopnjo adhezije pri različnem začetnem številu celic.

Začetno število	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 36)		P
	logaritemska faza rasti	stacionarna faza rasti	
10^3 CFU/ml	$0,7101 \pm 0,35$	$0,9495 \pm 0,70$	0,037
10^6 CFU/ml	$1,3304 \pm 0,62$	$1,4562 \pm 0,75$	0,375

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo odhezije, SD: standardni odklon, P: verjetnost, n: št. paralelk.

Priloga C: Vpliv začetnega števila bakterij vrst *Staph. aureus* ŽMJ72 in *P. aeruginosa* ŽMJ87 na stopnjo adhezije.

SEV	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 24)		P
	10^3 CFU/ml	10^6 CFU/ml	
<i>Staph. aureus</i> ŽMJ72	$1,4754 \pm 0,19$	$1,9546 \pm 0,27$	< 0,001
<i>P. aeruginosa</i> ŽMJ87	$0,7101 \pm 0,35$	$1,3304 \pm 0,62$	< 0,001

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo odhezije, SD: standardni odklon, P: verjetnost, n: št. paralelk.

Priloga D: Vpliv dodatka glukoze v gojišče TSB na stopnjo adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

TOPILO, T sušenja	$\Delta\bar{A}$ Gojišče TSB z glukozo	$\Delta\bar{A}$ Gojišče TSB	P
metanol, 40 °C (n: 24)	$0,0704 \pm 0,13$	$-0,0386 \pm 0,18$	0,021
metanol, 60 °C (n: 24)	$0,1077 \pm 0,09$	$0,1058 \pm 0,10$	0,947
ocetna kislina, 40 °C (n: 24)	$0,2805 \pm 0,22$	$0,0753 \pm 0,46$	0,053
ocetna kislina, 60 °C (n: 24)	$0,1457 \pm 0,38$	$0,2581 \pm 0,51$	0,016

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc, n: št. paralelk, SD: standardni odklon, P: verjetnost.

Priloga E: Vpliv mešanja mikrotitrski ploščice na stopnjo adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

T sušenja / postopek	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 24)		P
	Brez mešanja (0 obr. min ⁻¹)	Z mešanjem (150 obr. min ⁻¹)	
30 °C / inkubator	$0,0811 \pm 0,02$	$0,0860 \pm 0,15$	0.875
40 °C / sušilec	$0,1524 \pm 0,09$	$0,1457 \pm 0,12$	0.826
P	< 0,001	0.013	

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo odhezije, SD: standardni odklon, P: verjetnost, n: št. paralelk.

Priloga F: Vpliv toplotne fiksacije na stopnjo adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽM72 določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

T sušenja	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n: 24)	P
40 °C	0,1013 $\pm$ 0,07	0,113
60 °C	0,1417 $\pm$ 0,10	

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo adhezije, SD: standardni odklon, P: verjetnost, n: št. paralelk.

Priloga G: Vpliv koncentracije barvila kristal violet na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 po 24-urni in 115-urni inkubaciji z metodo barvanja s kristal violet.

24 h inkubacija			
TOPILO	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 12)		P
	1 % KV	0,5 % KV	
etanol-aceton	1,2174 $\pm$ 0,62	0,8235 $\pm$ 0,38	0,074
etanol	1,4225 $\pm$ 0,67	0,8235 $\pm$ 0,38	0,476
metanol	1,4125 $\pm$ 0,67	1,2964 $\pm$ 0,58	0,657
ocetna kislina	1,1185 $\pm$ 0,42	1,6748 $\pm$ 0,86	0,056
115 h inkubacija			
TOPILO	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 12)		P
	1 % KV	0,5 % KV	
etanol-aceton	1,1625 $\pm$ 0,30	0,6596 $\pm$ 0,21	< 0,001
etanol	2,0648 $\pm$ 0,39	1,4665 $\pm$ 0,37	< 0,001
metanol	3,0264 $\pm$ 0,46	2,3894 $\pm$ 0,43	0,002
ocetna kislina	3,3896 $\pm$ 0,33	1,8469 $\pm$ 0,55	< 0,001

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo odhezije, SD: standardni odklon, P: verjetnost, n: št. paralelk, KV: kristal violet.

Priloga H: Vpliv koncentracije barvila kristal violet na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 po 24-urni inkubaciji določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

TOPILO	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 24)		P
	0,5 % KV	1 % KV	
metanol	0,9972 $\pm$ 0,29	1,2529 $\pm$ 0,24	0,002
etanol	0,6468 $\pm$ 0,22	1,3352 $\pm$ 0,79	< 0,001
etanol-aceton	0,8466 $\pm$ 0,27	1,2682 $\pm$ 1,02	0,056
ocetna kislina	0,5976 $\pm$ 0,28	0,9220 $\pm$ 0,37	0,001

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc, SD: standardni odklon, P: verjetnost, n: št. paralelk.

Priloga I: Vpliv topila na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 po 24-urni inkubaciji z metodo barvanja s kristal violetom.

TOPILO		$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 24)	
		1 % KV	0,5 % KV
etanol		1,4225 $\pm$ 0,67	1,6457 $\pm$ 0,83
metanol		1,4125 $\pm$ 0,67	1,2964 $\pm$ 0,58
ocetna kislina		1,1185 $\pm$ 0,42	1,6748 $\pm$ 0,86
etanol-aceton		1,2174 $\pm$ 0,62	0,8235 $\pm$ 0,38
PRIMERJAVA TOPIL		P	
etanol-aceton	etanol	0,444	0,004
etanol-aceton	metanol	0,469	0,028
etanol-aceton	ocetna kislina	0,651	0,005
etanol	ocetna kislina	0,194	0,933
metanol	ocetna kislina	0,212	0,219
metanol	etanol	0,971	0,245

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc, SD: standardni odklon, P: verjetnost, 1 in 0,5 % KV: koncentracija barvila KV.

Priloga J: Vpliv topila na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 po 115-urni inkubaciji z metodo barvanja s kristal violetom.

TOPILO		$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 24)	
		1 % KV	0,5 % KV
etanol		2,0648 $\pm$ 0,39	1,4665 $\pm$ 0,37
metanol		3,0264 $\pm$ 0,46	2,3894 $\pm$ 0,43
ocetna kislina		3,3896 $\pm$ 0,33	1,8469 $\pm$ 0,55
etanol-aceton		1,1625 $\pm$ 0,30	0,6596 $\pm$ 0,21
PRIMERJAVA TOPIL		P	
etanol-aceton	etanol	< 0,001	< 0,001
etanol-aceton	metanol	< 0,001	< 0,001
etanol-aceton	ocetna kislina	< 0,001	< 0,001
etanol	ocetna kislina	< 0,001	0,060
metanol	ocetna kislina	0,038	0,013
etanol	etanol	< 0,001	< 0,001

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc, SD: standardni odklon, P: verjetnost, 1 in 0,5 % KV: koncentracija barvila KV.

Priloga K: Vpliv metanola in ocetne kisline na določiteve stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 z metodo barvanja s kristal violetom.

TOPILO	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 24)	P vrednost
metanol	0,1058 $\pm$ 0,10	0,002
ocetna kislina	0,2581 $\pm$ 0,20	

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc, SD: standardni odklon, P: verjetnost, n: št. Paralelk.

Priloga L: Vpliv topil na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 z metodo barvanja s kristal violetom.

TOPILO		$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 12)	
		1 % KV	0,5 % KV
etanol		$1,3352 \pm 0,79$	$0,6468 \pm 0,22$
metanol		$1,2529 \pm 0,24$	$0,9972 \pm 0,29$
ocetna kislina		$0,9170 \pm 0,33$	$0,7570 \pm 0,24$
etanol-aceton		$0,7052 \pm 0,20$	$0,7941 \pm 0,35$
PRIMERJAVA TOPIL		P	
etanol-aceton	etanol	< 0,001	0,088
etanol-aceton	metanol	< 0,001	0,033
etanol-aceton	ocetna kislina	0,010	0,670
etanol	ocetna kislina	0,021	0,102
metanol	ocetna kislina	< 0,001	0,003
metanol	etanol	0,630	< 0,001

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc, SD: standardni odklon, P: verjetnost, 1 in 0,5 % KV: koncentracija barvila KV.

Priloga M: Vpliv vrste in seva bakterij na stopnjo adhezije določeno z metodo barvanja s kristal violetom.

Bakterije	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 24)	P _(sev)
<i>B. cereus</i> ŽMJ3	$0,3558 \pm 0,12$	0,073
<i>B. cereus</i> ŽMJ91	$0,3556 \pm 0,22$	
<i>B. cereus</i> ŽMJ116	$0,1773 \pm 0,26$	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	$0,0553 \pm 0,09$	< 0,001
<i>L. monocytogenes</i> ŽMJ69	$0,1635 \pm 0,13$	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM80	$0,0824 \pm 0,14$	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM407	$0,2113 \pm 0,25$	
<i>L. monocytogenes</i> ŽM520	$0,1201 \pm 0,15$	
<i>Salmonella</i> ŽM348	$0,0626 \pm 0,06$	< 0,001
<i>Salmonella</i> ŽM350	$0,5304 \pm 0,27$	
<i>Salmonella</i> ŽM378	$0,0303 \pm 0,19$	
<i>Salmonella</i> ŽM390	$0,1804 \pm 0,07$	
<i>Staph. aureus</i> ŽMJ72	$1,9546 \pm 0,45$	< 0,001
<i>Staph. aureus</i> ŽM518	$0,0420 \pm 0,08$	
<i>P. aeruginosa</i> ŽMJ87	$1,4562 \pm 0,75$	< 0,001
<i>P. aeruginosa</i> ŽM517	$0,4043 \pm 0,10$	
P _(kultura)	< 0,001	/

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc, SD: standardni odklon, P: verjetnost, n: št. paralelk.

Priloga N: Vpliv volumna reagenta XTT na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87.

VZOREC	Volumen reagenta XTT		P
	25 μ l	100 μ l	
$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 24) <i>P. aeruginosa</i> ŽMJ87	$0,0434 \pm 0,02$	$0,1110 \pm 0,03$	<0,05
$\bar{A} \pm SD$ (n = 24) kontrolni vzorec	$0,0531 \pm 0,01$	$0,0527 \pm 0,01$	0,84

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo stopnje adhezije, SD: standardni odklon, P: verjetnost, n: št. paralelk.

Priloga O: Stopnja adhezije bakterij vrste *P. aeruginosa* ŽMJ87 določena 1 h in 3 h po dodatku reagenta XTT.

VZOREC	Čas inkubacije z reagentom XTT		P
	1 h	3 h	
$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 24) <i>P. aeruginosa</i> ŽMJ87	$0,1541 \pm 0,05$	$0,2430 \pm 0,07$	<0,05
$\bar{A} \pm SD$ (n = 24) za kontrolni vzorec	$0,0560 \pm 0,00$	$0,0576 \pm 0,00$	0,16

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc, $\bar{A}$: povprečna absorbanca, SD: standardni odklon, P: verjetnost, n: št. paralelk.

Priloga P: Povprečna absorbanca kot merilo adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72 v času od 5 min do 245 min po dodatku reagenta XTT.

Čas (min)	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n: 36)	Čas (min)	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n: 36)
5	$0,1422 \pm 0,11$	110	$1,5408 \pm 0,96$
10	$0,2021 \pm 0,15$	115	$1,6004 \pm 0,98$
15	$0,3069 \pm 0,22$	120	$1,6533 \pm 1,00$
20	$0,3671 \pm 0,23$	125	$1,7020 \pm 1,03$
25	$0,4319 \pm 0,31$	130	$1,7796 \pm 1,06$
30	$0,4993 \pm 0,36$	135	$1,8154 \pm 1,05$
35	$0,5706 \pm 0,41$	140	$1,8699 \pm 1,07$
40	$0,6398 \pm 0,45$	145	$1,9174 \pm 1,07$
45	$0,7174 \pm 0,51$	150	$1,9637 \pm 1,06$
50	$0,7855 \pm 0,55$	155	$2,0101 \pm 1,06$
55	$0,8579 \pm 0,60$	160	$2,0574 \pm 1,06$
60	$0,9185 \pm 0,63$	165	$2,0997 \pm 1,06$
65	$0,9899 \pm 0,68$	175	$2,1743 \pm 1,05$
70	$1,0541 \pm 0,72$	185	$2,2518 \pm 1,05$
75	$1,1259 \pm 0,77$	195	$2,3162 \pm 1,05$
80	$1,196 \pm 0,79$	205	$2,3863 \pm 1,04$
85	$1,2560 \pm 0,84$	215	$2,4382 \pm 1,04$
90	$1,2914 \pm 0,82$	225	$2,5083 \pm 1,05$
95	$1,3645 \pm 0,88$	235	$2,5408 \pm 1,03$
100	$1,4400 \pm 0,94$	245	$2,5813 \pm 1,02$
105	$1,4865 \pm 0,94$	/	/

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc, SD: standardni odklon, n: št. paralelk.

Priloga Q: Vpliv koncentracije reagenta XTT na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72.

t (min)	Koncentracija reagenta XTT (mg/ml)					
	1	0,25	0,063	0,01	0,007	0,005
	$\Delta\bar{A} \pm SD$	$\Delta\bar{A} \pm SD$	$\Delta\bar{A} \pm SD$	$\Delta\bar{A} \pm SD$	$\Delta\bar{A} \pm SD$	$\Delta\bar{A} \pm SD$
5	0,1422 $\pm$ 0,11	0,0206 $\pm$ 0,02	0,0144 $\pm$ 0,02	/	/	/
10	0,2021 $\pm$ 0,15	0,0373 $\pm$ 0,03	0,0295 $\pm$ 0,03	/	/	/
15	0,3069 $\pm$ 0,22	0,0465 $\pm$ 0,04	0,0391 $\pm$ 0,04	/	/	/
20	0,3671 $\pm$ 0,26	0,0708 $\pm$ 0,05	0,0623 $\pm$ 0,06	0,3284 $\pm$ 0,20	0,2033 $\pm$ 0,15	0,1661 $\pm$ 0,13
25	0,4319 $\pm$ 0,31	0,0878 $\pm$ 0,06	0,0776 $\pm$ 0,07	0,3863 $\pm$ 0,23	0,2351 $\pm$ 0,17	0,1942 $\pm$ 0,15
30	0,4993 $\pm$ 0,36	0,1006 $\pm$ 0,07	0,0892 $\pm$ 0,08	0,4661 $\pm$ 0,26	0,2767 $\pm$ 0,19	0,2297 $\pm$ 0,17
35	0,5706 $\pm$ 0,41	0,1171 $\pm$ 0,08	0,1054 $\pm$ 0,09	0,5126 $\pm$ 0,27	0,3007 $\pm$ 0,20	0,2473 $\pm$ 0,18
40	0,6398 $\pm$ 0,45	0,1384 $\pm$ 0,09	0,1254 $\pm$ 0,10	0,5631 $\pm$ 0,27	0,3296 $\pm$ 0,20	0,2698 $\pm$ 0,18
45	0,7174 $\pm$ 0,51	0,1544 $\pm$ 0,10	0,1393 $\pm$ 0,10	0,6056 $\pm$ 0,28	0,3519 $\pm$ 0,20	0,2860 $\pm$ 0,18
50	0,7855 $\pm$ 0,55	0,1691 $\pm$ 0,10	0,1514 $\pm$ 0,11	0,6452 $\pm$ 0,27	0,3725 $\pm$ 0,20	0,3012 $\pm$ 0,18
55	0,8579 $\pm$ 0,60	0,1994 $\pm$ 0,12	0,1786 $\pm$ 0,11	0,6808 $\pm$ 0,27	0,3954 $\pm$ 0,19	0,3164 $\pm$ 0,18
60	0,9185 $\pm$ 0,63	0,2153 $\pm$ 0,12	0,1926 $\pm$ 0,11	0,7119 $\pm$ 0,25	0,4186 $\pm$ 0,19	0,3305 $\pm$ 0,17
65	0,9899 $\pm$ 0,68	0,2273 $\pm$ 0,13	0,2036 $\pm$ 0,12	0,7324 $\pm$ 0,24	0,4409 $\pm$ 0,18	0,345 $\pm$ 0,10
70	1,0541 $\pm$ 0,72	0,2460 $\pm$ 0,14	0,2181 $\pm$ 0,12	0,7471 $\pm$ 0,22	0,4609 $\pm$ 0,17	0,3581 $\pm$ 0,16
75	1,1259 $\pm$ 0,77	0,2625 $\pm$ 0,14	0,2333 $\pm$ 0,12	0,7589 $\pm$ 0,20	0,4810 $\pm$ 0,16	0,3724 $\pm$ 0,15
80	1,196 $\pm$ 0,79	0,2833 $\pm$ 0,15	0,2510 $\pm$ 0,12	0,7680 $\pm$ 0,19	0,4953 $\pm$ 0,15	0,3845 $\pm$ 0,15
85	1,256 $\pm$ 0,84	0,3021 $\pm$ 0,16	0,2667 $\pm$ 0,13	0,7755 $\pm$ 0,17	0,5087 $\pm$ 0,14	0,3959 $\pm$ 0,14
90	1,2914 $\pm$ 0,82	0,3196 $\pm$ 0,17	0,2811 $\pm$ 0,13	0,7808 $\pm$ 0,16	0,5188 $\pm$ 0,13	0,4052 $\pm$ 0,14
95	1,3645 $\pm$ 0,88	0,3379 $\pm$ 0,17	0,2961 $\pm$ 0,13	0,7808 $\pm$ 0,10	0,5268 $\pm$ 0,12	0,4123 $\pm$ 0,13
100	1,4400 $\pm$ 0,94	0,3647 $\pm$ 0,18	0,3152 $\pm$ 0,13	0,7922 $\pm$ 0,14	0,5361 $\pm$ 0,11	0,4204 $\pm$ 0,13
105	1,4865 $\pm$ 0,94	0,3724 $\pm$ 0,19	0,3206 $\pm$ 0,13	0,7940 $\pm$ 0,13	0,5417 $\pm$ 0,10	0,4269 $\pm$ 0,13
110	1,5408 $\pm$ 0,96	0,388 $\pm$ 0,19	0,3310 $\pm$ 0,13	0,7957 $\pm$ 0,12	0,5481 $\pm$ 0,09	0,4317 $\pm$ 0,13
115	1,6004 $\pm$ 0,98	0,4161 $\pm$ 0,20	0,3487 $\pm$ 0,13	0,7958 $\pm$ 0,12	0,5543 $\pm$ 0,08	0,4368 $\pm$ 0,13
120	1,6533 $\pm$ 1,00	0,4357 $\pm$ 0,21	0,3594 $\pm$ 0,13	0,7946 $\pm$ 0,11	0,559 $\pm$ 0,07	0,4415 $\pm$ 0,13
125	1,7020 $\pm$ 1,03	0,4466 $\pm$ 0,21	0,3651 $\pm$ 0,13	0,7949 $\pm$ 0,10	0,5625 $\pm$ 0,06	0,4437 $\pm$ 0,13
130	1,7796 $\pm$ 1,06	0,4612 $\pm$ 0,22	0,3722 $\pm$ 0,13	0,7939 $\pm$ 0,10	0,5675 $\pm$ 0,06	0,4493 $\pm$ 0,13
135	1,8154 $\pm$ 1,05	0,4747 $\pm$ 0,22	0,3781 $\pm$ 0,13	0,7921 $\pm$ 0,10	0,5690 $\pm$ 0,05	0,4505 $\pm$ 0,13
140	1,8699 $\pm$ 1,07	0,4883 $\pm$ 0,23	0,3838 $\pm$ 0,12	0,7915 $\pm$ 0,09	0,5723 $\pm$ 0,05	0,4550 $\pm$ 0,13
145	1,9174 $\pm$ 1,07	0,4975 $\pm$ 0,23	0,3873 $\pm$ 0,12	0,7914 $\pm$ 0,09	0,5741 $\pm$ 0,04	0,4551 $\pm$ 0,13
150	1,9637 $\pm$ 1,06	0,5129 $\pm$ 0,24	0,3937 $\pm$ 0,12	0,7903 $\pm$ 0,09	0,5730 $\pm$ 0,04	0,4530 $\pm$ 0,13
155	2,0101 $\pm$ 1,06	0,5200 $\pm$ 0,24	0,3962 $\pm$ 0,12	/	/	/
160	2,0574 $\pm$ 1,06	0,5330 $\pm$ 0,24	0,4012 $\pm$ 0,12	/	/	/
165	2,0997 $\pm$ 1,06	0,5415 $\pm$ 0,25	0,4038 $\pm$ 0,12	/	/	/
170	/	0,5573 $\pm$ 0,25	0,4087 $\pm$ 0,11	/	/	/
175	2,1743 $\pm$ 1,05	0,5618 $\pm$ 0,25	0,4100 $\pm$ 0,11	/	/	/
180	/	0,572 $\pm$ 0,26	0,4132 $\pm$ 0,11	/	/	/
185	2,2518 $\pm$ 1,05	0,5806 $\pm$ 0,26	0,4151 $\pm$ 0,11	/	/	/

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge Q: Vpliv koncentracije reagenta XTT na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72.

t (min)	Koncentracija reagenta XTT (mg/ml)					
	1	0,25	0,063	0,01	0,007	0,005
	$\Delta\bar{A} \pm SD$	$\Delta\bar{A} \pm SD$	$\Delta\bar{A} \pm SD$	$\Delta\bar{A} \pm SD$	$\Delta\bar{A} \pm SD$	$\Delta\bar{A} \pm SD$
200	/	0,6060 $\pm$ 0,27	0,4207 $\pm$ 0,11	/	/	/
205	2,3863 $\pm$ 1,04	0,6109 $\pm$ 0,27	0,421 $\pm$ 0,11	/	/	/
210	/	0,6191 $\pm$ 0,27	0,4226 $\pm$ 0,11	/	/	/
215	2,4382 $\pm$ 1,04	0,6265 $\pm$ 0,27	0,4234 $\pm$ 0,11	/	/	/
220	/	0,6329 $\pm$ 0,27	0,4241 $\pm$ 0,11	/	/	/
225	2,5083 $\pm$ 1,05	0,6375 $\pm$ 0,28	0,4242 $\pm$ 0,10	/	/	/
230	/	0,6452 $\pm$ 0,28	0,4247 $\pm$ 0,10	/	/	/
235	2,5408 $\pm$ 1,03	0,6493 $\pm$ 0,28	0,4248 $\pm$ 0,10	/	/	/
240	/	0,6549 $\pm$ 0,28	0,4246 $\pm$ 0,10	/	/	/
245	2,5813 $\pm$ 1,02	0,6591 $\pm$ 0,28	0,4247 $\pm$ 0,10	/	/	/
250	/	0,6647 $\pm$ 0,28	0,4242 $\pm$ 0,10	/	/	/
255	/	0,6675 $\pm$ 0,28	0,4243 $\pm$ 0,10	/	/	/
260	/	0,6718 $\pm$ 0,29	0,4231 $\pm$ 0,10	/	/	/
265	/	0,6765 $\pm$ 0,29	0,4224 $\pm$ 0,10	/	/	/
270	/	0,6811 $\pm$ 0,29	0,4223 $\pm$ 0,10	/	/	/
275	/	0,6822 $\pm$ 0,29	0,4213 $\pm$ 0,10	/	/	/
280	/	0,6853 $\pm$ 0,29	0,4205 $\pm$ 0,10	/	/	/
285	/	0,6873 $\pm$ 0,29	0,4199 $\pm$ 0,10	/	/	/
295	/	0,6908 $\pm$ 0,29	0,4187 $\pm$ 0,10	/	/	/
300	/	0,6942 $\pm$ 0,29	0,4170 $\pm$ 0,10	/	/	/
310	/	0,6964 $\pm$ 0,29	0,4155 $\pm$ 0,10	/	/	/
320	/	0,6998 $\pm$ 0,29	0,4133 $\pm$ 0,10	/	/	/
330	/	0,7023 $\pm$ 0,30	0,4104 $\pm$ 0,10	/	/	/
340	/	0,7030 $\pm$ 0,30	0,4077 $\pm$ 0,10	/	/	/

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc, SD: standardni odklon, n: št. Paralelk, t: čas, v minutah.

Priloga R: Statistična obdelava meritev absorbance pri različnih koncentracijah reagenta XTT za določitev adhezije bakterij vrste *Staph. aureus* ŽMJ72.

XTT (mg/ml)	n	Eksponentna faza presnove ($P \leq 0,05$)			Stacionarna faza presnove ($P \geq 0,05$)				
		t	$\Delta\bar{A} \pm SD$	P	t	$\Delta\bar{A} \pm SD$	P	t	$\Delta\bar{A}_{\max} \pm SD$
1,000	36	140	$1,8700 \pm 1,06$	0,025	145	$1,9174 \pm 1,07$	0,058	245	$2,5813 \pm 1,02$
0,250	24	140	$0,4883 \pm 0,22$	0,023	145	$0,4975 \pm 0,23$	0,079	340	$0,7030 \pm 0,30$
0,063	24	100	$0,3152 \pm 0,13$	0,005	105	$0,3206 \pm 0,13$	0,064	235	$0,4248 \pm 0,10$
0,010	24	45	$0,5631 \pm 0,28$	0,002	50	$0,6452 \pm 0,27$	0,089	115	$0,7958 \pm 0,12$
0,007	24	80	$0,4810 \pm 0,15$	0,041	85	$0,5087 \pm 0,14$	0,129	145	$0,5741 \pm 0,04$
0,005	24	60	$0,3164 \pm 0,17$	0,012	65	$0,3450 \pm 0,16$	0,072	145	$0,4551 \pm 0,13$

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo adhezije, SD: standardni odklon, n: št. paralelk, t: čas v minutah, P: verjetnost ($P \leq 0,05$: povprečne razlike absorbanc vzorcev se statistično značilno razlikujejo, $P \geq 0,05$: povprečne razlike absorbanc vzorcev se statistično značilno ne razlikujejo), $\Delta\bar{A}_{\max}$: najvišja vrednost povprečne razlike absorbanc kot merila adhezije.

Priloga S: Določitev stopnje adhezije živih bakterijskih celic z reagentom XTT v času od 75-155 min po dodatku.

BAKTERIJE	$\Delta\bar{A} \pm SD$								
	75 min	85 min	95 min	105 min	115 min	125 min	135 min	145 min	155 min
<i>Salmonella</i> ŽM348	0,068 ± 0,06	0,072 ± 0,06	0,076 ± 0,07	0,0806 ± 0,07	0,0846 ± 0,07	0,0914 ± 0,07	0,0909 ± 0,07	0,0975 ± 0,07	0,1028 ± 0,07
<i>Salmonella</i> ŽM378	0,063 ± 0,03	0,067 ± 0,03	0,071 ± 0,03	0,0744 ± 0,03	0,0785 ± 0,03	0,081 ± 0,03	0,084 ± 0,03	0,088 ± 0,03	0,0909 ± 0,03
<i>Salmonella</i> ŽM350	0,131 ± 0,02	0,133 ± 0,02	0,132 ± 0,02	0,1324 ± 0,02	0,1331 ± 0,02	0,1328 ± 0,02	0,1339 ± 0,02	0,1346 ± 0,02	0,1362 ± 0,02
<i>Salmonella</i> ŽM390	0,111 ± 0,02	0,115 ± 0,02	0,119 ± 0,02	0,1215 ± 0,02	0,125 ± 0,02	0,1265 ± 0,02	0,1275 ± 0,02	0,1306 ± 0,02	0,1321 ± 0,02
<i>L. monocytogenes</i> ŽM 58	0,075 ± 0,06	0,079 ± 0,06	0,081 ± 0,06	0,0817 ± 0,06	0,0832 ± 0,06	0,0834 ± 0,06	0,0838 ± 0,06	0,0865 ± 0,06	0,0878 ± 0,06
<i>L. monocytogenes</i> ŽM69	0,092 ± 0,05	0,096 ± 0,06	0,099 ± 0,05	0,1024 ± 0,06	0,1029 ± 0,06	0,1042 ± 0,06	0,1059 ± 0,06	0,1084 ± 0,06	0,1107 ± 0,06
<i>L. monocytogenes</i> ŽM80	0,036 ± 0,02	0,039 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,0396 ± 0,02	0,0406 ± 0,02	0,0397 ± 0,02	0,0393 ± 0,02	0,0406 ± 0,02	0,0419 ± 0,02
<i>L. monocytogenes</i> ŽM407	0,121 ± 0,06	0,127 ± 0,06	0,129 ± 0,06	0,131 ± 0,06	0,1346 ± 0,06	0,1363 ± 0,07	0,1376 ± 0,07	0,1398 ± 0,06	0,1443 ± 0,07
<i>L. monocytogenes</i> ŽM520	0,035 ± 0,02	0,038 ± 0,02	0,038 ± 0,02	0,0365 ± 0,02	0,0369 ± 0,02	0,0361 ± 0,02	0,0359 ± 0,02	0,0371 ± 0,02	0,0371 ± 0,02
<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ3	0,644 ± 0,33	0,67 ± 0,30	0,659 ± 0,30	0,7689 ± 0,43	0,8135 ± 0,39	0,7832 ± 0,27	0,8162 ± 0,41	0,7725 ± 0,30	0,816 ± 0,38
<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ91	0,326 ± 0,13	0,36 ± 0,15	0,387 ± 0,16	0,414 ± 0,17	0,4439 ± 0,18	0,4686 ± 0,19	0,4897 ± 0,19	0,5182 ± 0,20	0,5388 ± 0,20
<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ116	0,138 ± 0,06	0,149 ± 0,06	0,158 ± 0,07	0,1691 ± 0,07	0,1813 ± 0,08	0,1931 ± 0,09	0,2037 ± 0,09	0,223 ± 0,10	0,2375 ± 0,11
<i>P. aeruginosa</i> ŽMJ87	0,189 ± 0,09	0,24 ± 0,17	0,268 ± 0,19	0,2855 ± 0,20	0,3074 ± 0,18	0,3264 ± 0,23	0,314 ± 0,19	0,3361 ± 0,21	0,3398 ± 0,22
<i>P. aeruginosa</i> ŽM517	0,157 ± 0,04	0,148 ± 0,04	0,149 ± 0,04	0,154 ± 0,04	0,1546 ± 0,04	0,1565 ± 0,04	0,157 ± 0,04	0,1621 ± 0,04	0,1637 ± 0,04
<i>Staph. aureus</i> ŽMJ72	0,759 ± 0,20	0,776 ± 0,17	0,781 ± 0,16	0,794 ± 0,13	0,7958 ± 0,12	0,7949 ± 0,10	0,7921 ± 0,10	0,7914 ± 0,09	0,7903 ± 0,09
<i>Staph. aureus</i> ŽM518	0,928 ± 0,09	0,982 ± 0,07	0,964 ± 0,06	0,9306 ± 0,05	0,9095 ± 0,05	0,8991 ± 0,05	0,8927 ± 0,05	0,8878 ± 0,05	0,8877 ± 0,05
KONTROLNI VZOREC	0,059 ± 0,02	0,059 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,0602 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,0609 ± 0,02	0,061 ± 0,02	0,0609 ± 0,02	0,0604 ± 0,02

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc kot merilo adhezije, SD: standardni odklon, t: čas v minutah.

Priloga T: Določitev stopnje adhezije živih bakterijskih celic z z reagentom XTT.

kultura (XTT)	sev	$\Delta\bar{A} \pm SD$ (n = 24)	P (sev)
<i>Bacillus cereus</i>	ŽMJ3	0.8160 ± 0.38	< 0,001
	ŽMJ91	0.5388 ± 0.20	
	ŽMJ116	0.2375 ± 0.11	
<i>Listeria monocytogenes</i>	ŽM58	0.0878 ± 0.06	< 0,001
	ŽMJ69	0.1107 ± 0.06	
	ŽM80	0.0419 ± 0.02	
	ŽM407	0.1443 ± 0.07	
	ŽM520	0.0371 ± 0.02	
<i>Salmonella</i>	ŽM348	0.1028 ± 0.07	< 0,001
	ŽM350	0.1362 ± 0.02	
	ŽM378	0.0909 ± 0.03	
	ŽM390	0.1321 ± 0.02	
<i>Staph. aureus</i>	ŽMJ72	0.7958 ± 0.09	< 0,001
	ŽM518	0.9821 ± 0.07	
<i>P. aeruginosa</i>	ŽMJ87	0.3398 ± 0.22	< 0,001
	ŽM517	0.1637 ± 0.04	
P (kultura)	< 0,001		

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna razlika absorbanc, SD: standardni odklon, n: št. paralelk ŽM: oznaka seva.

Priloga U: Razvrstitev bakterijskih sevov v skupine glede na jakost adhezije, določene z metodo barvanja s KV in z reagentom XTT.

BAKTERIJSKA KULTURA	KV			XTT			KV-skupina	XTT-skupina
	$\bar{A}$	$\pm SD$	$\bar{A}_K$	t ($\bar{A}_{MAX}$)	$\bar{A}$	$\bar{A}_K$		
<i>Salmonella</i> ŽM348	0,1985	0,06	0,1359	155	0,1632	0,0604	2	3
<i>Salmonella</i> ŽM350	0,6421	0,27	0,1117	155	0,1966	0,0604	4	3
<i>Salmonella</i> ŽM378	0,3022	0,19	0,1359	155	0,1513	0,0604	3	3
<i>Salmonella</i> ŽM390	0,3163	0,07	0,1359	155	0,1925	0,0604	3	3
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	0,1653	0,09	0,1100	155	0,1481	0,0604	2	3
<i>L. monocytogenes</i> ŽMJ69	0,1704	0,13	0,1100	155	0,1711	0,0604	2	3
<i>L. monocytogenes</i> ŽM80	0,2263	0,14	0,1439	155	0,1023	0,0604	2	2
<i>L. monocytogenes</i> ŽM407	0,2135	0,25	0,1439	155	0,2047	0,0604	2	3
<i>L. monocytogenes</i> ŽM520	0,2301	0,15	0,1100	95	0,0981	0,0599	3	2
<i>B. cereus</i> ŽMJ3	0,1756	0,12	0,1550	135	0,8772	0,0610	2	4
<i>B. cereus</i> ŽMJ91	0,2313	0,22	0,1550	155	0,5992	0,0604	2	4
<i>B. cereus</i> ŽMJ116	0,2761	0,26	0,1550	155	0,2979	0,0604	2	3
<i>P. aeruginosa</i> ŽMJ87	1,7932	0,75	0,3370	155	0,4002	0,0604	4	3
<i>P. aeruginosa</i> ŽM517	0,5160	0,10	0,1117	155	0,2241	0,0604	4	3
<i>Staph. aureus</i> ŽMJ72	2,0593	0,54	0,1047	115	0,8438	0,0481	4	4
<i>Staph. aureus</i> ŽM518	0,1734	0,08	0,1314	85	1,0412	0,0591	2	4

Legenda: $\bar{A}$: povprečna absorbanca kot merilo adhezije, $\bar{A}_K$: povprečna absorbanca kontrolnega vzorca, SD: standardni odklon, t: čas v minutah, 1: $\bar{A}_{seva} \leq \bar{A}$ kontrolnega vzorca; ne formirajo biofilma, 2: $\bar{A}$ kontrolnega vzorca < $\bar{A}_{seva} \leq 2\bar{A}$ kontrolnega vzorca; šibki tvorci biofilma, 3: $2\bar{A}$ kontrolnega vzorca < $\bar{A}_{seva} \leq 4\bar{A}$ kontrolnega vzorca; srednje močni tvorci biofilma, 4: $4\bar{A}$ kontrolnega vzorca < $\bar{A}_{seva}$; močni tvorci biofilma.