

**»Mladi za napredek Maribora 2022«
56. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2022**

**NAD BIOFILME BAKTERIJE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* Z NJENIMI
NARAVNIMI SOVRAŽNIKI - BAKTERIOFAGI**

Raziskovalno področje:
Druga področja (Zdravstvo)

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: JULIA KRESSE
Mentor: JURE ŠKRABAN, URŠA MIKLAVČIČ, SANDRA JANEŽIČ
Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, 2022

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	6
ZAHVALA	8
1 UVOD	9
1. 1 Cilji dela	9
1. 2 Delovne hipoteze	10
2 PREGLED LITERATURE	11
2. 1 Bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2. 1. 1 Biofilmi bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
2. 2 Odpornost biofilmov na protimikrobna sredstva in razkužila	14
2. 3 bakteriofagi <i>P. aeruginosa</i>	15
2. 4 Fagna terapija	17
3 PRAKTIČNO DELO	19
3. 1 Organigram (potek praktičnega dela)	20
3. 2 Metode dela	20
3. 2. 1 Določanje števila bakteriofagov z metodo štetja plakov na trdnem gojišču	20
3. 2. 3 Preverjanje učinkovitosti bakteriofagnega uničenja biofilmov bakterije <i>P. aeruginosa</i> s spektrofotometrom	22
3. 3 Seznam materialov	24
3. 3. 1 Delovni mikroorganizmi	24
3. 3. 2 Gojišča, kemikalije in ostale raztopine	24
3. 4 Potek dela	26
3. 4. 1 Priprava kulture bakterije <i>P. aeruginosa</i> in biofilmov na predmetih	26
3. 4. 2 Izolacija bakteriofagov iz vzorcev odpadne vode	26
3. 4. 2 Pridobitev bakteriofagov specifičnih za <i>P. aeruginosa</i> in bogatenje bakteriofagnih suspenzij	27
3. 4. 3 Priprava bakteriofagne suspenzije	27
3. 4. 3 Redčenje suspenzije bakteriofagov	27
3. 4. 4 Določanje števila bakteriofagov, štetje plakov in računanje plakovnih enot	28
3. 4. 5 Uporaba bakteriofagov za dekontaminacijo izbranih materialov	30
3. 4. 5. 5 Določanje absorbance biofilmov na vseh uporabljenih materialih	34
4 REZULTATI IN ANALIZA	35
4. 1 Določanje števila bakteriofagov v suspenzijah pripravljenih predhodno	35
4. 2 Uporaba fagov za dekontaminacijo izbranih materialov	37
4. 2. 1 okuževanje materialov z obogateno kulturo bakterije <i>P. aeruginosa</i>	37
4. 2. 2 Tretiranje nastalih biofilmov z izbranimi fagnimi suspenzijami	38

4. 2. 4 Meritve biofilmske absorbance kristal vijoličnega barvila s spektrofotometrom...	39
5 RAZPRAVA	45
5. 1 Pomen dobljenih rezultatov	47
5. 2 Možne izboljšave in nadaljevanje raziskovanja	48
6 ZAKLJUČEK	49
7 DRUŽBENA ODGOVORNOST	51
8 VIRI IN LITERATURA	52
9 PRILOGE	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Opis postopka redčitvene vrste iz dnevnika laboratorijskega dela (lasten vir)	22
Slika 2: Priprava redčitvene vrste (Principi, Silvestri, Esposito, 2019)	22
Slika 3: Strukturna formula kristal vijoličnega barvila (Pubchem, 2022)	25
Slika 4: Redčitvena vrsta fagne suspenzije in dokazovanje fagov z metodo plakov (Luzon-Hidalgo, Risso, Delgado, Ibarra-Molero, Sanchez-Ruiz, 2021)	28
Slika 5: Shema postopka iz dnevnika laboratorijskega dela - določanja števila bakteriofagov v vodnih vzorcih in pridobitve TSA gojišč s plaki (lasten vir)	29
Slika 6: Hrbtna stran TSA gojišča, razdeljena na četrtine za lažje štetje plakov (lasten vir) ..	29
Slika 7: 2 plošči s 6 vdolbinami, v katerih so predmeti po umetnem okuženju z bakterijsko kulturo in 24 urni inkubaciji (lasten vir)	31
Slika 8: Nastanek biofilmov na plastičnem filtru (1), kovinskem ventilnem vijaku (2) in urinskem katetru (3) po tretiranju z bakterijsko kulturo <i>P. aeruginosa</i> . Biofilmi so vidni kot rumenkaste obloge (označeni z modro puščico) (lasten vir)	31
Slika 9: Primer preparatov po barvanju s kristal vijoličnim barvilom in 6-kratnim spiranjem preparatov s fiziološko raztopino. Več kot je modre barve, večja je količina biofilma na materialu. (lasten vir)	33
Slika 10: Primer 94-vdolbinske plošče (Grabcad community, 2019)	33
Slika 11: Skica 96-vdolbinske plošče z vzorci vseh preparatov v dnevniku laboratorijskega dela (lasten vir).....	34
Slika 12: TSA gojišče - plaki na bakterijski kulturi <i>P. aeruginosa</i> , tretirano z prefiltriranim vzorcem odpadne vode z bakteriofagi (lasten vir)	35

Slika 13: Nastanek plakov na TSA gojišču treturanim z 10^{-4} redčitvijo suspenzije bakteriofaga UP1 (lasten vir)	37
Slika 14: Stanje izbranih materialov po kontaminaciji z prekonočno kulturo bakterije <i>P. aeruginosa</i> (lasten vir)	38
Slika 15: Intenziteta barvila kristal vijolično po spiranju z očetno kislino - večja kot je intenziteta več je biofilma na posameznem materialu	39

KAZALO TABEL

Tabela 1: Število nastalih plakov na TSA gojiščih bakterije <i>P. aeruginosa</i> po tretiranju z različnimi redčitvami bakteriofagnih suspenzij bakteriofaga UP1 in mešanice bakteriofaga PMu ter izračunane posamezne in povprečne vrednosti PFU/ml.	36
Tabela 2: Procent od celotne povprečne absorbance kontrole, ki ga predstavlja povprečna absorbanca pri posameznem materialu	41
Tabela 3: Tabela povprečnih vrednosti absorbanc pri posameznih materialih, tretiranih s določeno bakteriofagno suspenzijo in fiziološko raztopino (kontrola).....	41

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Povprečna absorbanca biofilmov posameznih materialov, tretiranih z 100-krat redčeno suspenzijo mešanice bakteriofaga PMu, neredčeno suspenzijo bakteriofaga UP in fiziološko raztopino (kontrola)	40
Graf 2: Povprečna absorbanca vzorcev dela cevi po tretiranju s suspenzijo mešanice bakteriofagov PMu, bakteriofagov UP in fiziološko raztopino (kontrola)	42
Graf 3: Povprečne vrednosti absorbanc vzorcev filtra za pipe po tretiranju s suspenzijo samega bakteriofaga (UP), mešanice bakteriofagov (PMu) in fiziološko raztopino (kontrola)	43
Graf 4: Povprečne vrednosti absorbanc biofilmov na vzorcih katetrov po tretiranju s suspenzijo samega bakteriofaga (UP) oz. mešanice bakteriofagov (PMu) in fiziološko raztopino.....	43
Graf 5: Povprečna vrednost absorbance biofilmov na vzorcih praznih cilindričnih jamic po tretiranju s suspenzijo samega bakteriofaga (UP) oz. mešanico bakteriofagov (PMu) in fiziološko raztopino - kontrola	44

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Enačba za izračun plakotvornih enot v določeni količini vzorca	21
Enačba 2: Izračun procenta povprečne vrednosti vzorcev kontrole materiala, ki ga predstavlja povprečna vrednost vzorcev istega materiala	41

UPORABLJENE KRATICE

PFU – plakotvorne enote, ang. Plaque forming unite

TSA – gojišče triptični soja agar

TSB – gojišče triptični soja bujon

DNK – deoksiribonukleinska kislina

SM – fagni pufer

POVZETEK

Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* je zelo pogosta v zdravstvenih ustanovah in se nahaja v vodnih virih, na tekstilu osebja, zdravniških aparataturah in pogosto tudi v ranah pacientov. V naravi se nahaja v prsti, vodnem okolju in drugih površinah. V zdravstvu povzroča velike probleme, zaradi tvorbe biofilmov, ki so odporni proti številnim dezinfekcijskim sredstvom in tudi antibiotikom. Biofilmi so posebne strukture, ki jih tvorijo celice bakterij in matriks, ki bakterije ščiti pred stresom in zunanjimi dražljaji. Biofilmi so na zunanji strani obdani z zaščitnim matriksom in so močno pritrjeni na površino, zato so izjemno odporni proti številnim biokemijskim in fizikalnim dejavnikom. V tej raziskovalni nalogi smo se osredotočili na rezistenco na dezinfekcijska sredstva in poskušali ugotoviti, ali lahko nastale biofilme omenjene bakterije reduciramo z uporabo njihovih naravnih sovražnikov – bakteriofagov. Suspenzije bakteriofagov, izoliranih iz vode iz čistilne naprave, ki tarčno okužijo izbrani sev bakterije *P. aeruginosa* so pripravili v laboratoriju NLZOH. Za poskuse smo uporabili dve različni suspenziji bakteriofagov, v eni smo imeli samo eno vrsto bakteriofaga, v drugi pa mešanico različnih bakteriofagov. Najprej smo različnih materiale, kovinski vijak, plastični vodni filter, urinski kateter ter prazna plastična cilindrična jamica, torej materiale, kjer bakterija *P. aeruginosa* pogosto tvori biofilme, umetno kontaminirali z bakterijo *P. aeruginosa* in pustili, da so se tvorili biofilmi. Na te biofilme smo nato nanесли suspenziji bakteriofagov z namenom, da preverimo ali le ti lahko uničijo bakterijske celice znotraj biofilma in tako zmanjšajo njegovo količino. Količino ostalega biofilma smo preverili tako, da smo celice v biofilmu najprej pobarvali s kristal vijoličnim, ki se veže v bakterijske celice, sprali odvečno, nevezano, barvilo ter nato opazovali količin preostalega biofilma. Da smo količino lahko tudi kvantificirali smo v celice vezano kristal vijolično barvilo sprali z očetno kislino in izmerili absorbanco. Na podlagi tega smo potem lahko tudi izračunali količino preostalega biofilma in primerjali učinkovitost redukcije med materiali in med uporabljenima fagnima suspenzijama.

Ugotovili smo, da bakteriofagi lahko delno uničijo celice znotraj biofilma in tako zreducirajo njegovo količino. Učinkovitost pa je odvisna predvsem od materiala. Najbolj uspešno smo količino biofilma zmanjšali na plastičnem urinskem katetru, sledili sta prazna cilindrična jamica ter filter za pipo. Na kovinskem vijaku pa ni prišlo do zmanjšanje količine biofilma po treniranju z bakteriofagi. Malenkost boljše se je pri redukciji količine biofilma izkazala mešanica različnih bakteriofagov v primerjavi s posameznim bakteriofagom. Pokazali smo, da bi fagi lahko bili primerni za dekontaminacijo površin na katerih se nahajajo biofilmi bakterije *P. aeruginosa* zato bi v nadaljevanju temu bilo smotrno posvetiti več raziskav, da se razišče ali bi

bakteriofagni lahko bili uporabni v vsakdanji praksi kot način dekontaminacije različnih površin kontaminiranih z bakterijami, predvsem tistimi, ki so odporna na razkužila.

Ključne besede: bakteriofagi, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilmi, dekontaminacija, razkužila, redukcija bakterijske kontaminacije

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorjem za vso pomoč in spodbudo ter za predano znanje, ki sem ga potrebovala za izvedbo raziskovalne naloge.

lelela bi se zahvaliti še Oddelku za mikrobiološke raziskave na Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano v Mariboru za pripravo izolatov bakterije *P. aeruginosa* in suspenzij bakteriofagov ter omogočeno opravljanje praktičnega dela raziskovalne naloge.

Prav tako se zahvaljujem Centralni čistilni napravi Maribor, ki nam je omogočila pridobitev vzorcev odpadne vode pri iztoku.

1 UVOD

Pseudomonas aeruginosa je ubikvitarna bakterija, ki jo najdemo v mnogih, predvsem vlažnih, okoljih. Je tudi oportunistično patogena bakterija, kar pomeni, da povzroča okužbe pri ljudeh, predvsem v bolnišničnem okolju in pri ljudeh z oslabeлим imunskim sistemom. Pogosto bakterijo najdemo prav na različnih površinah v bolnišničnem okolju; aspiratorjih, inhalatorjih in vodovodnih sistemih. Na teh površinah se pogosto nahaja v obliki biofilma. Biofilm je odporna struktura sestavljena iz bakterijskih celic ter zunajceličnih metabolitov, ki bakteriji nudijo dodatno zaščitno pred zunanjimi dejavniki. Celice, ki se nahajajo v biofilmu so, v primerjavi s planktonskimi celicami, tudi bolj odporne proti antibiotikom in razkužilom.

Za boj proti bakterijam, ki so odporne na antibiotike in razkužila bi lahko uporabili njihove naravne sovražnike, to so bakteriofagi ali na kratko fagi. Bakteriofage občasno že uporabljajo za zdravljenje bakterijskih okužb, ki jih z antibiotiki več ne morejo zdraviti. V okviru prejšnjih raziskovalnih nalog smo pokazali, da fagi lahko učinkovito preprečimo razmnoževanje bakterij, ter pri bakteriji *Serratia marcescens* tudi, da lahko preprečijo nastanek biofilma. V tej nalogi želimo razširiti pridobljeno znanje ter preveriti ali lahko bakteriofagi preprečijo nastanek že nastajajočega biofilma, oziroma ali lahko bakteriofagi okužijo in uničijo bakterije v že nastalem biofilmu, kar bi nenazadnje lahko uporabili za odstranjevanje biofilmov na različnih površinah. Za testni organizem smo si izbrali bakterijo *P. aeruginosa*, zaradi njene pogostnosti v bolnišničnem okolju ter odpornosti na številne antibiotike in razkužila je preprečevanje nastanka biofilmov in učinkovito odstranjevanje le tega precej težavno.

1. 1 Cilji dela

Bakterija *P. aeruginosa* je znana po svoji rezistenci na številne dezinfekcijske učinkovine in protimikrobna sredstva. Ta razvita rezistenca v zdravstvenih ustanovah, kjer je ena izmed najpogostejših bakterij, povzroča velike probleme. Razvila je rezistenco na veliko različnih antibiotikov in razkužil, zato se raziskovalci ukvarjajo z iskanjem novih alternativnih načinov preprečevanja in zdravljenja okužb s to bakterijo. Cilj te raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali lahko s pomočjo bakteriofagov, reduciramo oziroma popolnoma uničimo že nastale biofilme bakterije *P. aeruginosa*, ki so vzrok za odpornost na določena razkužilna sredstva in antibiotike.

Bakteriofage najdemo povsod, kjer se nahajajo tudi njihove gostiteljske bakterije. Sklepali smo, da jih bomo lahko izolirali iz odpadne vode, saj je v njej pogosta bakterija *P. aeruginosa*. Torej cilj prvega dela raziskovalne naloge je bil izolirati bakteriofage iz vzorcev odpadne vode, ki smo jih pridobili ob iztoku iz Centralne čistilne naprave Maribor in določiti število le-teh v ustvarjeni suspenziji z metodo redčitvene vrste oz. izračunati PFU/ml (plaque forming unit v določeni količini vzorca). Za bakteriofage vemo, da povzročajo lizo bakterijskih celic in ustvarjajo plake (cone zbistritve). S predpostavko, da en bakteriofag povzroči lizo ene bakterije smo želeli določiti število bakteriofagov z metodo štetja plakov na petrijevkah z agarjevim gojiščem, okuženim s prekonočno kulturo bakterije *P. aeruginosa*.

V drugem delu raziskovalne naloge smo s pomočjo merjenja absorbance s spektrofotometrom želeli ugotoviti, efektivnost suspenzije posameznega bakteriofaga in suspenzije mešanice bakteriofagov proti že nastalim biofilmom na različnih materialih (filter za pipe, kovinski vijak, urisni kateter, prazna cilindrična jamica plošče s 6 vdolbinami). V ta namen smo materiale najprej umetno okužili z bakterijsko kulturo, tretirali s fagnimi suspenzijami in še pobarvali s kristal vijoličnim barvilom, ki so ga bakterijske celice *P. aeruginosa* v nastalih biofilmih absorbirale. Iz izmerjene absorbance, ki nam pove količino preostalega biofilma smo nato primerjali učinkovitost delovanja bakteriofagne suspenzije na redukcijo biofilma na različnih materialih.

1. 2 Delovne hipoteze

Pred začetkom dela smo si zastavili tri hipoteze:

1. Iz vzorcev odpadne vode bomo uspeli izolirati bakteriofage, ki okužijo bakterijo *P. aeruginosa*, ki smo jo osamili iz kliničnega vzorca.
2. S tretiranjem materialov, umetno okuženih z bakterijo *P. aeruginosa*, z bakteriofagno suspenzijo bomo reducirali nastale biofilme *P. aeruginosa*.
3. Koktejl bakteriofagov (mešanica različnih, nedefiniranih bakteriofagov), izoliranih iz vzorcev odpadne vode, bo uspešnejša pri redukciji biofilmov bakterije *P. aeruginosa*, kot posamičen bakteriofag omenjene bakterije, pridobljen iz istega vzorca odpadne vode.

2 PREGLED LITERATURE

2. 1 Bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je po Gramu negativna, paličasta, nesporogena in monoflagelirana človeška patogena bakterija. Bakterijo uvrščamo v rod *Pseudomonas*, družino *Pseudomonadaceae*, red *Pseudomonadales*, razred *Gamma-proteobacteria*, deblo *Proteobacteria* in domeno *Bacteria* (Bennik, 1999), (Fojkar, 2014). Kolonije (skupki bakterijskih celic), ki jih bakterija tvori na trdnih gojiščih imajo biserni videz in sladkoben vonj po, grozdju ali tortilji. Nekateri sevi *P. aeruginosa* izločajo velike količine ekstracelularnih polisaharidov, ki dajejo kolonijam sluzast videz. Viskozen, sluzen ekstracelularni sloj polisaharidov posreduje adherenco organizma na epitelijske celice oz. druge površine, kjer se nahaja (Fojkar, 2014). Te lastnosti *P. aeruginosa* so kritični dejavniki za njen ekološki uspeh, kar tudi pomaga razložiti vseprisotno naravo organizma in njegovo pomembnost kot bolnišničnega patogena (Bennik, 1999). Bakterija *P. aeruginosa* je približno 1,5–3,0 µm dolga in 0,5–0,8 µm široka, pojavlja se posamično, v parih ali pa v kratkih verigah (Fojkar, 2014).

P. aeruginosa dobro raste pri 25°C do 37°C, njena sposobnost rasti pri 42°C pa jo pomaga razlikovati od mnogih drugih vrst *Pseudomonas* (Bennik, M. H. J., 1999). Ima krožni kromosom in velik genom v primerjavi z ostalimi prokariotskimi celicami. Je izredno prilagodljiva in odporna na razkužila (Mulcahy, Isabella, Lewis, 2014).

Potrebuje preprosto prehrano, zato jo lahko gojimo na osnovnih mikrobioloških gojiščih. Preživi in raste lahko celo v destilirani vodi (Fojkar, 2014). *P. aeruginosa* lahko dobro raste tudi v mediju, ki vsebuje acetat (vir ogljika) in amonijev sulfat (vir dušika). Se prilagaja razmeram, ki jih drugi organizmi ne prenašajo. Ne fermentira laktoze ali drugih ogljikovih hidratov, ampak oksidira glukozo in ksilozo. Organizmi omenjene bakterije rastejo aerobno ali anaerobno, če je nitrat na voljo kot anorganski akceptor elektronov, kot je primer v pljučih bolnikov s cistično fibrozo (Bennik, 1999).

P. aeruginosa pogosto najdemo v tleh, v običajni hrani, zlasti zelenjavi, kjer je pogosto v velikem številu, v sladkih vodah in morskem okolju (Michel-Briand, Baysse, 2002), (Bassetti, Vena, Croxatto, Righi, Guery, 2018), (Bennik, 1999). Pogosta je v bolnišničnem okolju, najdemo jo lahko na različnih površinah, zato so bolniki, ki se dalj časa zdravijo v bolnišnicah v večji nevarnosti, da se okužijo s to bakterijo. *P. aeruginosa* je ena izmed najpogostejših povzročiteljev bolnišničnih okužb pri ljudeh, vendar lahko povzroča okužbe tudi pri živalih in

rastlinah (Mulcahy, Isabella, Lewis, 2014), (Wu, Jin, Bai in Jin, 2015). Med ljudmi v zdravstvenih ustanovah se najpogosteje širi preko rok medicinskega osebja in vode iz vodovodnih cevi. Pogosti viri so bolnišnične tekstilije, umetni oz. dolgi nohti zdravstvenih delavcev, geli pri uporabi ultrazvoka in zadržano kirurški inštrumenti. Ker sta življenjski prostor *P. aeruginosa* zemlja in voda, je v povezavi z *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* in plesnimi razvila odpornost na različna protimikrobna sredstva, ki izvirajo iz teh bakterij in plesni in tudi različna razkužila (Bennik, 1999).

P. aeruginosa ima sposobnost tvorbe biofilma, pritrjenega na trdne biotične (npr. epitelij) ali na nebiotične (npr. medicinski kateter, vijak ipd.) površine (Fojkar, 2014). Najpogosteje zasledimo biofilme omenjene bakterije na cilindričnih in okroglih površinah. Prav tako pa se bakterija nahaja v planktonski obliki, kot enocelični organizem, ki aktivno plava s svojim bičkom.

Biofilmi omenjene bakterije, ki se nahajajo v sistemih pitne vode lahko služijo kot okoljski rezervoar za *P. aeruginosa*, ki predstavlja možen vir onesnaženja vode, kar ima za posledico potencialno tveganje za zdravje ljudi (Bennik, 1999). Zaradi njene sposobnosti tvorbe biofilmov je površine, kontaminirane s to bakterijo, zelo težko dekontaminirati, saj so bakterije znotraj biofilma bolj odporne na številna protimikrobna sredstva in razkužila. Zaradi njene oportunistične patogenosti povzroči okužbe najpogosteje pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom (Barbieri, Sun, 2004). Okužbam podvrženi so torej bolniki, priklopljeni na ventilatorje, bolniki z vstavljenimi urinskimi katetri, ali pa so bili pred kratkim operirani. Bakterija povzroči zelo raznolike okužbe, od okužbe v krvi, okužbe pljuč (pljučnice), urinarnega trakta ali drugih delov telesa (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Šestnajst odstotkov vseh bolnišničnih okužb predstavljajo pljučnice in 12 % okužbe sečil (Barbieri, Sun, 2004).

Genom bakterije *P. aeruginosa* je sestavljen iz enega kromosoma. *P. aeruginosa* ima relativno velik genom in visoko vsebnost G+C (65–67 %). Zaradi velikega genoma *P. aeruginosa* kodira veliko število encimov za različne presnovne poti, kar daje visoko prehransko vsestranskost. Poleg tega približno 8 % genoma kodira regulativne gene, kar bakteriji omogoča, da se prilagodi neugodnim rastnim okoljem (Bennik, 1999).

P. aeruginosa ima dva različna topna pigmenta, fluorescenčni pigment pioverdin in modri piocianin. Piocianin npr. lahko povzroči modro obarvanja gnoja, ki izteka iz rane okužene z bakterijo *P. aeruginosa*. Piohelin (derivat piocianina) je siderofor in lahko pridobi železo od gostitelja, moti normalno delovanje človeških nosnih cilij in respiratornega epitelija, s čimer sproži vnetne odzive (Bennik, 1999).

Za zdravljenje okužb s *P. aeruginosa* se najpogosteje uporabljajo antibiotiki. A žal je pri ljudeh, predvsem tistih, ki so izpostavljeni zdravstvenim ustanovam, kot so bolnišnice ali domovi za ostarele, okužbe s *Pseudomonas aeruginosa* vse težje zdraviti zaradi vse večje odpornosti na antibiotike. Ker je bakterija *P. aeruginosa* lahko odporna, predvsem če se nahaja v obliki biofilma, tudi na številna razkužila, ki se uporabljajo v vsakodnevni praksi pa je težava tudi dekontaminacija površin, a oboje močno vpliva in omejuje možnosti prenosa in zdravljenja okužb s *P. aeruginosa* ter počasi postajajo kritičen problem v zdravstvu (Bassetti, Vena, Croxatto in drugi, 2018).

2. 1. 1 Biofilmi bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Biofilmi so posebne strukture, sestavljene iz bakterijskih celic in matriksa, ki bakterije ščitijo pred stresom in zunanji dražljaji. Biofilmi so na zunanji strani obdani z zaščitnim matriksom iz eksopolisaharidnega matriksa (alginatni polisaharid, proteini, nukleinske kisline), DNA in proteinov. So močno pritrjeni na površino in so izjemno odporni proti številnim biokemijskim in fizikalnim dejavnikom. Pri celicah biofilmov se opažajo fenotipske in transkripcijske razlike v primerjavi z planktonskimi celicami. Občutljivost fenotipa teh celic se lahko povrne, če so celice odvzete iz biofilma. Vzdržijo stresne pogoje, kot je pritisk protimikrobnega sredstva ter jih je zato zelo težko uničiti. Posledično so bolezni, katerih povzročitelji so bakterije, sposobne tvorbe biofilmov, običajno kronične narave in jih je težko preprečiti oz. ozdraviti (Fojkar, 2014).

Oblikovanih je bilo že več hipotez, ki pojasnjujejo zmanjšano občutljivost biofilmov na protimikrobna sredstva. Hipoteza o omejitvi penetracije trdi, da so le površinske plasti biofilma izpostavljene smrtonosnim ravnom antibiotikov zaradi fizikalnih, mehanskih ali biokemičnih mehanizmov, ki omejujejo transport antiseptičnih sredstev in antibiotikov v notranjost biofilma. Ta hipoteza namiguje, da biofilmi bakterij protimikrobna sredstva zaužijejo, deaktivirajo ali absorbirajo s komponentami zunajceličnega matriksa biofilma. Poleg tega se lahko prodiranje protimikrobnih sredstev skozi biofilm upočasni (Mulcahy, Isabella, Lewis, 2014). Torej osnovni mehanizmi odpornosti biofilmov so: omejena penetracija protimikrobnih sredstev prek ekstracelularnega matriksa; encimi kot so npr. β -laktamaza, ki se vgradi v matriks in inaktivira

protimikrobna sredstva; anaerobna rast, ki zelo vpliva na rezistenčnost na antibiotike, saj so ti manj aktivni v anaerobnih pogojih. Nekateri mehanizmi odpornosti biofilmov na protimikrobna sredstva in med drugim tudi antibiotike so povezani s samo strukturo biofilma (Fojkar, 2014). Biofilmi predstavljajo tudi rezervoarje celic posamezne bakterije, ki se v valovih sproščajo v okolje in povzročajo kronične okužbe. Bakterija *P. aeruginosa* najpogosteje tvori biofilme na katetrah in ceveh bolnišniških ventilatorjev. Posledično ogroža zdravje pacientov, ki so priklopljeni na te naprave (Mulcahy, Isabella, Lewis, 2014).

2. 2 Odpornost biofilmov na protimikrobna sredstva in razkužila

Za preprečevanje širjenja bakterij je potrebno paziti, da le te na raznašamo z umazanimi rokami ali drugimi predmeti ter preko umazanih površin. Za čiščenje površin in predmetov uporabljamo razkužila. Vendar razkužila, podobno kot velja za antibiotike, deluje dobro na posamezne, planktonske celice, slabše pa učinkuje na celice, ki se nahajajo v biofilmih. Verjetnih je več mehanizmov, ki potencialno povzročajo odpornost biofilmov na biocide (razkužila), a točni mehanizmi še do danes niso znani.

Odpornost biofilmov na dezinfekcijska sredstva je lahko zaradi delovanja večih mehanizmov: (i) slaba penetracija ali inaktivacija učinkovin v matriksu, (ii) spremenjeno presnovno stanje bakterij, (iii) tvorba perzistentnih celic, (iv) povečanju regulacije obtočnih črpalk (Toté, Horemans, Vanden Berghe, Maes, Cos, 2010).

Na biofilme bakterije *P. aeruginosa* zelo dobro učinkuje perocetna kislina. Sredstva v bolnišnicah, ki so manj koncentrirana in močna, na biofilme bakterije *P. aeruginosa* običajno ne delujejo. Tretiranje površin, okuženih z bakterijo *P. aeruginosa*, s podobnimi razkužili kot je perocetna kislina, povzroči morfološke spremembe v celicah biofilma in vitro, kar nakazuje, da ima perocetna kislina hitro delujoče antibakterijske učinke proti biofilmom. Za učinkovito odstranjevanje biofilmov *P. aeruginosa* je priporočena 5 min izpostavljenost 0,3 % perocetni kislini, a priporočen čas izpostavljenosti varira glede na koncentracijo specifičnega dezinfekcijskega sredstva. Do sedaj mehanizem, povezani z aktivnostjo perocetne kisline (zlasti njene sposobnosti fiksiranja/odstranjevanja biofilmov iz materialov) ni popolnoma znan.

Poleg perocetne kisline deluje na biofilme *P. aeruginosa* antimikrobno tudi natrijev hipoklorit, a so znanstveniki K. Toté, T. Horemans, D. Vanden Berghe, L. Maes, P. Cos v študiji (2020) dokazala, da je perocetna kislina najbolj učinkovita proti biofilmom dane bakterije. Izopropanol

je dosegel 99,99% reduciranje celic *P. aeruginosa* v biofilmih po 30 min stika. Študija je pokazala, da je kljub specifičnim mehanizmom delovanja biocidov večina aktivna samo proti biofilmskim bakterijam, biofilmski matriks pa ostaja nemoten. Le natrijev hipoklorit in vodikov peroksid sta izrazito zmanjšala tako matriks bakterijskih biofilmov kot živo maso, zaradi česar sta do sedaj najboljša sredstva proti biofilmom bakterije *P. aeruginosa* (Abdallah, Benoliel, Ferreira-Theret, Drider, Dhulster, Chihib, 2015), (Toté, Horemans, Vanden Berghe, Maes, Cos, 2010). V mislih pa moramo imeti, da gre v tem primeru le za zelo močna dezinfekcijska sredstva, ki imajo omejeno uporabnost v vsakdanji praksi in se jih za čiščenje površin v bolniških sobah, ob prisotnosti bolnikov, ne more uporabljati. Učinki šibkejših, a pogosteje uporabljenih sredstev so veliko slabši oz je rezistenca biofilmov dane bakterije nanje veliko večja.

Sposobnosti protimikrobnih sredstev pri uničevanju biofilmov in so bile obsežno raziskane, s poudarkom na delovanju antibiotikov. Vendar pa je nedavna študija pokazala, da je možnost uporabe samo antibiotikov za doseg popolnega uničenja biofilmov omejena, saj je matriks biofilma vzdržljiv, zato so začeli raziskovati alternativne terapije, med katerimi so se kot uspešni pokazali bakteriofagi (Toté, Berghe, Deschacht, de Wit, Maes, Cos, 2009).

2. 3 bakteriofagi *P. aeruginosa*

Bakteriofag (ali kratko kar fag) je vrsta virusa, ki okuži bakterije. Pravzaprav beseda "bakteriofag" dobesedno pomeni "jedec bakterij", ker bakteriofagi uničijo svoje gostiteljske celice. Vsi bakteriofagi so sestavljeni iz molekule nukleinske kisline, ki je obdana z beljakovinsko strukturo. Bakteriofag naj bi bil eden najbolj pogostih bioloških entitet na planetu. Skupaj naj bi jih bilo okoli 10^{31} . V primerjavi z bakterijskimi celicami, ki jih je približno $2-6 \times 10^{30}$ so bakteriofagi v razmerju 10:1 z bakterijami. Zaradi te prevlade ni presenetljivo, da so fagi izjemnega pomena in igrajo pomembno vlogo v biosferi - kljub nesposobnosti samo repliciranja. Domneva je bila, da so fagi glavni vzrok za bakterijsko smrt v okolju, zato imajo pomemben vpliv na kroženje hranil zaradi bakterijske lize. Ena od pomembnih vlog bakteriofagov je tudi prenos genetskega materiala med bakterijami, zato predstavljajo pomemben dejavnik pri evoluciji bakterij in tudi prenosu in širjenju genov, ki posredujejo protimikrobne odpornosti (Intermediapub).

Bakteriofag se pritrdi na občutljivo bakterijo in okuži gostiteljsko celico. Po okužbi bakteriofag ugrabi celični stroj bakterije, da prepreči tvorbo bakterijskih komponent in namesto tega prisili celico, da proizvaja virusne komponente. Novonastali bakteriofagi povzročijo lizo (propad) celice in se sprostijo izvencelični prostor kjer lahko potem napadejo nove celice. Bakteriofagi lahko med procesom okužbe občasno in pomotoma zapakirajo tudi del bakterijske DNK, ki jo nato prenesejo v nove gostiteljske celice. Če ti deli DNK vsebujejo tudi gene, ki kodirajo antibiotske rezistence, lahko nova gostiteljska celica postane odporna na antibiotike na katerega prej ni bila. Ta proces je znan kot transdukcija in je eden od pomembnih načinov širjenja genov, ki kodirajo antibiotske rezistence (Nature Education, 2014).

Obstajata dve vrsti bakterijske okužbe z bakteriofagom: virulentna (litična) in zmerna (lizogena). Pri virulentni okužbi bakteriofag vbrizga svojo nukleinsko kislino v bakterijo in v nekaj urah nastane več sto novih delcev bakteriofaga, ki se sprostijo iz propadle (lizirane) celice. Druga vrsta okužbe je zmerna interakcija bakteriofaga z gostiteljsko bakterijsko celico. Pri tej vrsti okužbe se nukleinska kislina bakteriofaga integrira v bakterijski genom in se sinhrono replicira z bakterijskim kromosomom, generacijo za generacijo, brez takojšnje škode za bakterijo. Čez čas se lahko DNK bakteriofaga iz bakterijskega genoma izključi in preide v litični cikel, kjer pride do uničenja bakterijske celice (Rifkind, Freeman, 2005), (Moineau, 2013).

Obstaja na tisoče vrst fagov, od katerih lahko vsak okuži samo eno vrsto ali nekaj vrst bakterij ali arhej. Fagi so razvrščeni v številne družine virusov; nekateri primeri vključujejo Inoviridae, Microviridae, Rudoviridae in Tectiviridae.

Obstajajo tri osnovne strukturne oblike faga: ikozaedrična (20-stranska) glava z repom, ikozaedrična glava brez repa in nitasta oblika (Britannica, 2014).

Leta 1952 sta Alfred Day Hershey in Martha Chase uporabila bakteriofag T2 v znamenitem poskusu, v katerem sta dokazala, da so za njihovo razmnoževanje v bakterijah potrebne samo nukleinske kisline faga. Rezultati eksperimenta so podprli teorijo, da je DNK genetski material. Hershey je za svoje delo z bakteriofagi leta 1969 prejel Nobelovo nagrado za fiziologijo ali medicino. Nagrado si je delil z biologoma Salvadorjem Luriam in Maxom Delbrückom, katerih poskusi s fagom T1 leta 1943 (test fluktuacije) so pokazali, da je odpornost na fage pri bakterijah je bil produkt spontane mutacije in ni neposreden odziv na okoljske dejavnike.

2. 4 Fagna terapija

Bakteriofagi so virusi, ki lahko okužijo in ubijejo bakterije brez kakršnega koli negativnega učinka na človeške ali živalske celice. Iz tega razloga bi jih lahko uporabljali samostojno ali v kombinaciji z antibiotiki za zdravljenje bakterijskih okužb.

So najpogostejša biološka entiteta. Najdemo jih lahko v tleh in morski vodi, oceanskih in kopenskih površinah ter ekstremnih okoljih, kot so tista, za katera so značilne zelo visoke ali zelo nizke temperature. Poleg tega so jih odkrili v bolnišnicah, v odpadnih vodah in tam, kjer lahko živijo bakterije, vključno z živalskimi in človeškimi tkivi (Principi, Silvestri, Esposito, 2019).

Kmalu po odkritju sta Twort in d'Hérelle začela uporabljati fage pri zdravljenju človeških bakterijskih bolezni, kot sta bubonska kuga in kolera. Terapija s fagi ni bila uspešna, po odkritju antibiotikov v štiridesetih letih prejšnjega stoletja pa so jo tako rekoč opustili. S porastom bakterij, odpornih na antibiotike, pa je ponovno pozornost namenila terapevtskemu potencialu fagov (Principi, Silvestri, Esposito, 2019).

Pregled literature je pokazal, da so zaradi hitrega porasta bakterij, odpornih na več zdravil po vsem svetu, skupaj z upadom razvoja in proizvodnje novih antibakterijskih sredstev znanstveniki razmislili o bakteriofagih za zdravljenje bakterijske okužbe. Uporaba fagov za premagovanje problema povečanja odpornosti bakterij na antibiotike je privlačna in zdi se, da nekateri raziskovalni podatki kažejo, da je to lahko racionalen ukrep. Vendar se zdi, da je trenutno znanje nezadostno, da bi omogočilo široko uporabo bakteriofagov v ta namen. Problem, kako pripraviti formulacije za klinično uporabo in kako se izogniti ali omejiti tveganje za nastanek bakterijske rezistence s prenosom genskega materiala, do danes nista povsem rešena problema. Preden se lahko bakteriofagi uporabljajo pri ljudeh, so potrebne nadaljnje študije (Principi, Silvestri, Esposito, 2019).

Uporaba bakteriofagov za zdravljenje bakterijskih okužb sega pred približno stoletje, predvsem na podlagi študij francoskega raziskovalca Felixa d'Herellea. V Sovjetski zvezi se je fagna terapija v veliki meri uporabljala pri bolnikih, ki so trpeli za širokim spektrom bolezni. Rezultati so bili ocenjeni kot zelo zadovoljivi in so bili objavljeni v več poročilih, in sicer v poročilu d'Herelleja iz leta 1931 in poročilu Summersa, iz leta 2001 (Britannica, 2014).

Vse večja razpoložljivost varnih in učinkovitih protimikrobnih zdravil po drugi svetovni vojni je prispevala k nizkemu zanimanju za bakteriofage na zahodu do osemdesetih let prejšnjega stoletja. Toda predvsem zato, ker večina antibiotikov ni bila na voljo, so se bakteriofagi še naprej uporabljali v Rusiji in Vzhodni Evropi, zlasti v tistih državah, ki so bile prej vključene v Sovjetsko zvezo (Britannica, 2014).

Zadnjih 30 letih, zlasti v zadnjem desetletju, so se razmere korenito spremenile, kar je posledica hitrega porasta bakterij, odpornih na več zdravil po vsem svetu, skupaj z upadom razvoja in proizvodnje novih antibakterijskih sredstev. Težave pri zdravljenju številnih življenjsko nevarnih bakterijskih okužb so znanstvenike pripeljale do ponovnega razmisleka o bakteriofagih. Novo zanimanje za bakteriofage ponazarja njihova široka uporaba v proizvodnji hrane in govedoreji ter, kar zadeva zdravljenje pri ljudeh, aktiviranje projekta, ki ga financira Evropska komisija za oceno fagnih koktajlov za zdravljenje opeklin, okuženih z bakterijo *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa*. Vendar pa številni problemi v zvezi z uporabo fagov za zdravljenje okužb niso rešeni in to pojasnjuje, zakaj noben pripravek za uporabo v človeku ni licenciran s strani Evropske agencije za zdravila ali Upravi za hrano in zdravila (Principi, Silvestri, Esposito, 2019).

3 PRAKTIČNO DELO

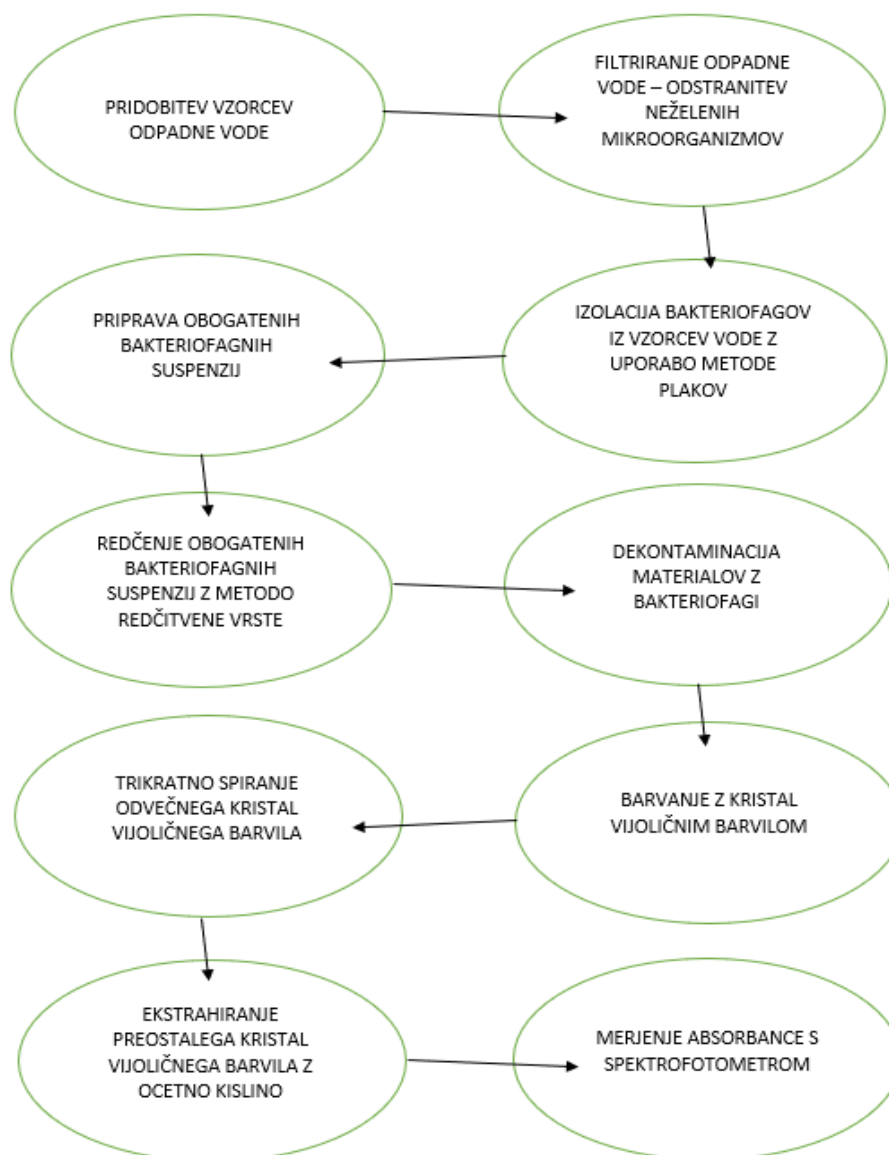
Suspenziji koktejlja in posameznega bakteriofaga so pripravili v laboratoriju Oddelka za mikrobiološke raziskave na NLZOH. Prav tako je še od prejšnjih raziskovalnih nalog hranil odvzete vzorce bakterije *P. aeruginosa* - pridobljene od bolnikov. Bakteriofage, za bakterijo *P. aeruginosa* smo namnožili tako, da smo suspenziji koktejlja bakteriofagov in suspenziji enega faga dodali suspenzijo bakterije *P. aeruginosa* in inkubirali 24 ur pri 37°C, da so se bakteriofagi namnožili v zadostni količini, da smo jih lahko uporabili v načrtovanih poskusih. Bakteriofage smo nato očistili, pomeni, da smo s filtriranjem skozi filtre s premerom pro 0,2 µm odstranili bakterijske celice, tako da so v filtratu ostali samo bakteriofagi. Da smo izračunali število oziroma koncentracijo bakteriofagov v suspenziji smo najprej naredili redčitveno vrsto obeh namnoženih fagov.

Za štetje bakteriofagov v posamezni redčitvi pa smo uporabili metodo štetja plakov in določevali plakotvorne enote (PFU, ang. plaque forming units) tako za koktejl bakteriofagov kot tudi za suspenzijo posameznega faga.

Za določanje rasti in redukcije biofilmov pa smo z dano bakterijo umetno okužili določene materiale in jih pustili 24h inkubirati pri 37°C, da so se razvili biofilmi. Nato smo jih tretirali s suspenzijo bakteriofagov in inkubirali nadaljnjih 24 ur pri istih pogojih. Za vse materiale smo uporabili enako koncentracijo bakteriofagov (tako za suspenzijo posameznega bakteriofaga kot tudi za koktejl bakteriofagov), da so bili rezultati med seboj primerljivi. To smo dosegli tako, da smo koktejl bakteriofagov redčili na enako koncentracijo kot je bila koncentracija posameznega bakteriofaga. Enega od petih vzorcev posameznega materiala nismo tretirali z fagnimi suspenzijami, ampak z fiziološko raztopino, kar nam je predstavljalo kontrolo. S kontrolo smo želeli dokazati, da se biofilmi izbrane bakterije ne reducirajo sami od sebe, vendar more biti prisoten bakteriofag.

Da smo ocenili koliko biofilma je ostalo smo ga pobarvali z kristal vijoličnim barvilom. To je barvilo, ki se veže v celično steno. Del barvila, ki ga celice v biofilmu niso absorbirale smo sprali z destilirano vodo. Barvilo, ki pa so ga absorbirale, smo pridobili s spiranjem z ocetno kislino, ki je to barvilo ekstrahirala iz biofilma. Izločeno barvilo smo pipetirali v 96-kanalno ploščo. Za določanje absorbance smo uporabili spektrofotometer. Absorbanca nam pove, kakšna je učinkovitost koktejlja bakteriofagov in posameznega faga na biofilme bakterije *P. aeruginosa*. Učinkovitost smo kasneje še primerjali med posameznimi redčitvami fagnih suspenzij in med koktejlom ter posameznim bakteriofagom.

3. 1 Organigram (potek praktičnega dela)



Organigram 1: Potek praktičnega dela raziskovalne naloge

3. 2 Metode dela

3. 2. 1 Določanje števila bakteriofagov z metodo štetja plakov na trdnem gojišču

Določanje števila bakteriofagov z metodo štetja plakov oz. čistin je gojitvena metoda, s katero določimo število bakteriofagov, ki so v preiskovanem vzorcu in so specifični na izbrano bakterijo.

Pri tej metodi na trdno gojišče nacepimo vzorec izbrane bakterije, ki je v našem primeru *Pseudomonas aeruginosa* skupaj s suspenzijo bakteriofagov. To smo naredili tako, da smo v poltrdo gojišče zmešali prekonočno bakterijsko kulturo *P. aeruginosa* in suspenzijo bakteriofagov ter razlili po trdnem gojišču. Počakali smo 10 minut, da se je strdilo in gojišča inkubirali 24 h pri 37° C. Kjer smo na ploščah, naslednji dan opazili cone zbistritve t.i. plake, so bakteriofagi lizirali bakterijske celice. Torej lahko po inkubaciji iz števila plakov preštejemo in izračunamo število bakteriofagov v vzorcu. Pri tem predpostavimo, da en plak nastane kot posledica lize enega bakteriofaga. Število bakteriofagov v izhodiščnem vzorcu podajamo kot število plakov na posamezni plošči množimo z redčitvijo na dani plošči (Enačba 10). Število bakteriofagov v vzorcu nam je neznano, zato uporabimo redčitveno vrsto, saj za štetje plakov potrebujemo t.i. "števne plošče", na katerih se nahaja od 30 do 300 plakov.

$$\frac{PFU}{ml} = \text{št. plakov} \times \text{redčitev}$$

Enačba 1: Enačba za izračun plakov na posamezni plošči v določeni količini vzorca

Redčitveno vrsto smo naredili tako, da 270 µl fiziološke raztopine damo 30 µl bakteriofagne suspenzije in s pipeto dobro premešamo, tako dobimo 10⁻¹ redčitev. Od te redčine odpipetiramo 30 µl v svežih 270 µl fiziološke raztopine ter ponovno dobro premešamo s pipeto. Tako dobimo 10⁻² redčitev. Postopek smo ponavljali vse dokler nismo dobili redčitev do 10⁻⁶.

Naredili smo dve redčitveni vrsti, in sicer eno za suspenzijo koktejlja bakteriofagov ter eno za suspenzijo posamičnega bakteriofaga. Vsa redčenja niso enakovredna, saj se napaka z vsakim višjim redčenjem veča, število PFU ugotavljamo tako, da ima najnižje redčenje največjo težo.

- 1.] 270 μL iz. rastopine v 94-well ploščo + 30 μL bakteriofag. solutiona $\rightarrow$ s pipeto premešamo = 10^{-1} redčitev
- 2.] 270 μL fiz. razst. + 30 μL razst. iz 1.] $\rightarrow$ s pipeto premešamo = 10^{-2} redčitev
- 3.] 270 μL fiz. razst. + 30 μL razst. iz 2.] $\rightarrow$ s pipeto premešamo = 10^{-3} redčitev
- 4.] 270 μL fiz. razst. + 30 μL razst. iz 3.] $\rightarrow$ s pipeto premešamo = 10^{-4} redčitev
- 5.] 270 μL fiz. razst. + 30 μL razst. iz 4.] $\rightarrow$ s pipeto premešamo = 10^{-5} redčitev
- 6.] 270 μL fiz. razst. + 30 μL razst. iz 5.] $\rightarrow$ s pipeto premešamo = 10^{-6} redčitev

Slika 1: Opis postopka redčitvene vrste iz dnevnika laboratorijskega dela (lasten vir)

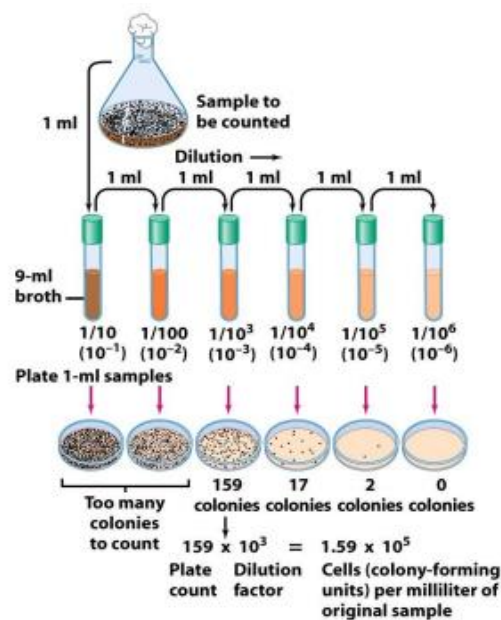


Figure 6-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Slika 2: Priprava redčitvene vrste (Principi, Silvestri, Esposito, 2019)

3. 2. 3 Preverjanje učinkovitosti bakteriofagnega uničenja biofilmov bakterije *P. aeruginosa* s spektrofotometrom

Bakterija *P. aeruginosa* že po 24 h inkubacije pri 37° C dokazano tvori biofilme (Mulcahy L. R., Isabella V. M., Lewis K., 2014). V ploščo s šestimi vdolbinicami, smo položili:

- filter za vodo,
- kovinsko ventilni vijak in
- kos medicinskega katetra.

Predmete smo predhodno avtoklavirali. V vdolbine s predmeti in eno prazno vdolbino, smo dodali 8 ml TSB gojišča in 0,5 ml prekonočne kulture *P. aeruginosa*. Plošče z vdolbinicami smo inkubirali 24 ur pri 37°C. Predmetom smo nato dodali različno redčeno bakteriofagno suspenzijo (neredčeno suspenzijo samega faga - UP1, 100-krat redčeno suspenzijo mešanice bakteriofagov, to smo redčili, da smo na materiale nanесли obe suspenziji v enaki koncentraciji) in ponovno inkubirali 24 ur pri 37°C.

En vzorec posameznega materiala smo tako kot ostale okužili s prekonočno kulturo bakterije *P. aeruginosa*, a jih po inkubacijski dobi (24 ur) pri 37°C nismo tretirali z bakteriofagnima suspenzijama (neredčena suspenzija samega bakteriofaga – UP1, 100-krat redčena suspenzija mešanice bakteriofagov – PMu), ampak s fiziološko raztopino. Tako smo pripravili kontrolo, s katero smo želeli dokazati, da se biofilmi ne bodo reducirali sami od sebe, tudi če jim zmanjka hranil, ampak morajo biti za to prisotni bakteriofagi, ki bakterijske celice napadajo in povzročijo njihovo lizo. Po tretiranju z bakteriofagi smo predmete 3x sprali s fiziološko raztopino in jih nato barvali s kristal vijoličnim barvilom, ki se veže na celice v biofilmih. Biofilmi ne absorbirajo celotnega barvila, zato smo odvečno odstranili s 3x spiranjem s fiziološko raztopino.

Nato smo predmetes sterilno pinceto prestavili v novo ploščo s 6 vdolbinami in dodali 8 ml 33% očetne kisline, ki barvilo kristal vijolično spere iz celičnih sten. Vdolini, v kateri ni bilo predmeta smo prav tako dodali barvilo, spirali s fiziološko raztopino in na koncu sprali barvilo z očetno kislino. Očetno kislino, v kateri je bilo raztopljeno barvilo smo s pipeto odpipetirali v plošče s 96 vdolbinicami.

Nato smo s spektrofotometrom izmerili, koliko barvila so biofilmi posameznih vzorcev absorbirali. Manjša kot je, večja je bila učinkovitost bakteriofagov proti biofilmom, saj so povzročili lizo večjih bakterijskih celic, ki se posledično niso obarvale oz. so se odstranile med spiranjem.

3. 3 Seznam materialov

3. 3. 1 Delovni mikroorganizmi

V raziskovalni nalogi smo uporabljali bakterijo *Pseudomonas aeruginosa*. Sev, ki smo ga uporabili je bil izoliran v okviru predhodne raziskovalne naloge iz 2019 na Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano iz ran hospitaliziranih bolnikov.

3. 3. 2 Gojišča, kemikalije in ostale raztopine

Preden smo začeli z eksperimentalnim delom v laboratoriju NLZOH, so tam poskrbeli vzorce bakterij in pripravili suspenziji bakteriofagnega koktejla in posamičnega faga, gojišča, kemikalije, druge raztopine, aparature, laboratorijski pribor in drugi materiali, ki smo jih pri raziskovalnem delu potrebovali.

Gojišča:

- TSA (gojišče triptični soja agar, proizvajalec BioLife), trdo gojišče v petrijevkah
- TSB (gojišče triptični soja, proizvajalec BioLife), tekoče gojišče v epruvetah
- 0,4 % TSA, poltrdo gojišče, z 0,4 % agarja

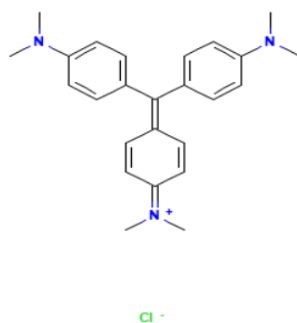
Pred uporabo sterilizirani z avtoklaviranjem – pri temperaturi 121°C, pritisku 1 atmosfere od 15 do 30 min.

Mikroorganizmi in drugi vzorci:

- bakterija *Pseudomonas aeruginosa*
- suspenzija bakteriofagnega koktejla – PMu
- suspenzija posamičnega bakteriofaga – UP1

Kemikalije in druge raztopine:

- kristal vijolično barvilo
- 33 % očetna kislina
- destilirana voda
- fiziološka raztopina (0,9% raztopina NaCl)
- fagni pufer SM



Slika 3: Strukturna formula kristal vijoličnega barvila (Pubchem, 2022)

Fiziološka raztopina:

9 g NaCl raztopino v 1 L destilirane vode in s 15 minutnim avtoklaviranjem pri 121°C steriliziramo.

Laboratorijski pribor:

- 20 ml brizgalka
- plastične petrijevke
- avtomatske pipete 10-100 µl, 100-1000 µl
- sterilni tipsi
- 50 ml centrifugirke
- 1,5 mikrocentrifugirke
- gorilnik
- plošče s 6 vdolbinicami in
- plošče s 24 vdolbinicami

Laboratorijske aparature:

- inkubator (37°C)
- vibracijski stresalnik
- spektrofotometer

Drugi materiali:

- kovinski ventilni vijak
- filter za vodo
- medicinski kateter

Pred začetkom dela sem se na laboratoriju NLZOH seznanila z pravili in navodili varnega dela z potencialno patogenimi organizmi v mikrobiološkem laboratoriju.

Varnostna oprema za zaščito med delom:

- zaščitna halja
- zaščitne rokavice
- sredstvo za razkuževanje rok
- sredstvo za sterilizacijo laboratorijskih površin - varikina

V raziskovalnem delu smo želeli ugotoviti ali so bakteriofagi izolirani iz odpadne vode zmožni lizirati bakterijske celice biofilma *P. aeruginosa* na različnih površinah kot so kovinski ventilni vijak, plastični kateter in filter za vodo.

Pred začetkom laboratorijskega dela je bilo potrebno pridobiti vzorce odpadne vode, v katerih se nahajajo bakteriofagi. Vzorce smo pridobili iz Centralne čistilne naprave v Mariboru, in sicer 500 ml odpadne vode pri iztoku. Na laboratoriju NLZOH so iz vzorcev odpadne vode izolirali bakteriofage.

3. 4 Potek dela

3. 4. 1 Priprava kulture bakterije *P. aeruginosa* in biofilmov na predmetih

Najprej so na laboratoriju Oddelka za mikrobiološke raziskave na NLZOH pripravili delovne kulture bakterijskih izolatov *P. aeruginosa*. Izolat je bil hranjen v zamrzovalniku pri - 80°C, od koder so z ezo nacepili izolat na ploščo TSA in inkubirali pri 37°C preko noči. Eno od nastalih kolonij so nato prenesli v 5 ml tekočega gojišča TSB ter inkubirali 18 ur pri 37°C. Kulturo smo nato, nacepili na predmete, kjer je nastal biofilm.

3. 4. 2 Izolacija bakteriofagov iz vzorcev odpadne vode

Izolate bakteriofagovso prav tako priskrbeli zo Oddelka za mikrobiološke raziskave na NLZOH. Odpadno vodo so filtrirali skozi filtre s 0,22 µm porami, po sledečem postopku: 20 – 30 ml vode se najprej prefiltrira skozi 0,22 µm membranske filtre v 50 ml centrifugirke. S filtriranjem so odstranili vse bakterije in ostale nezaželene delce v vodi, ki bi lahko motili izvedbo eksperimentalnega dela. Bakteriofagi so dovolj majhni, da so prešli pore filtra.

3. 4. 2 Pridobitev bakteriofagov specifičnih za *P. aeruginosa* in bogatenje bakteriofagnih suspenzij

Da so pridobili bakteriofage specifične za *P. aeruginosa*, so pripravili tekočo prekonočno kulturo in nato vanjo dodali enako količino fagne suspenzije. Po 24 h inkubacije pri 37°C so celotno gojišče ponovno filtrirali skozi filtre s 0,22 µm porami.

To so naredili tako, da so v 1,5 ml mikrocentrifugirke odpipetirali 100 µl bakteriofagne suspenzije prefiltrirane vode, v kateri so potencialni fagii, in dodali 100 µl tekoče prekonočne bakterijske kulture *P. aeruginosa* in skupaj premešali na stresalniku. Suspenzijo so inkubirali 10 min pri sobni temperaturi, da so se fagi vezali na receptorje bakterijske celice. Inkubirano suspenzijo so nato prenesli v 4 ml pol trdega gojišča - 0,4 % TSA. Poltrdo gojišče so imeli pripravljeno v epruvetah, ki so jih skuhali, da se je agar raztopil in nato inkubirali gojišče pri temperaturi 56°C, da je ostalo tekoče. Mešanico so premešali in jo zlili po trdnem gojišču, pustili 10 minut na sobni temperaturi, da se je strdilo. Trdna agar gojišča smo pustili inkubirati 24 ur pri 37°C.

3. 4. 3 Priprava bakteriofagne suspenzije

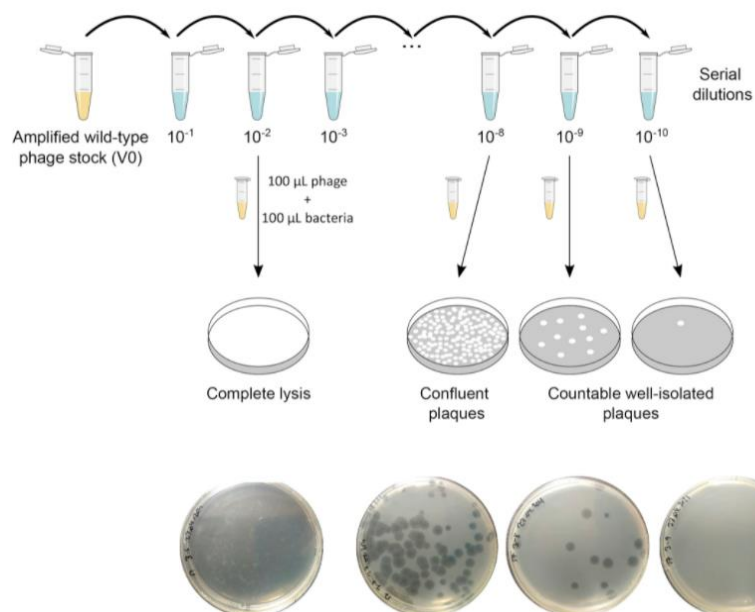
Iz plakov so izolirali posamezne bakteriofage in jih shranili v fagnem pufru SM za nadaljevanje eksperimentalnega dela. Fage so izolirali tako, da so s pipetnim tipsom zajeli nastale plake in jih prenesli v 1,5 ml epico s 1 ml fagnega pufra SM. Tako so izolirali posamičen fag. Koktejl bakteriofagov so pridobili tako, da so na ploščo s plaki odpipetirali 1 ml pufra SM, zavrteli ploščo okoli in nato odpipetirali pufer v svežo epico. Suspenzijo enega faga so označili PU1 in suspenzijo fagnega koktelja pa PMu (Oznake niso imenabakteriofagov,, pač pa oznake za lažje razlikovanje med vzorci; P- ime bakterije, številka je številka faga, M - mešanica, U - inicialka mentorice, ki je izolirala). Do uporabe so jih shranili pri temperaturi 4°C.

3. 4. 3 Redčenje suspenzije bakteriofagov

S štetjem plakov na trdnih agar ploščah, smo želeli ugotoviti število bakteriofagov v posamezni suspenziji. Kljub predvidevanju, da en bakteriofag povzroči nastanek enega plaka, pa število fagov v suspenziji podajamo s PFU/ml.

Odpipetirali smo 270 µl fiziološke raztopine v ploščo s 24-vdolbinicami in nato v prvo vdolbinico dodali 30 µl suspenzije posamičnega bakteriofaga oz. bakteriofagni koktejl. Tako smo dobili 10⁻¹ redčitev. Od te smo odpipetirali 30 µl in dali v drugo vdolbino, kjer smo prej že

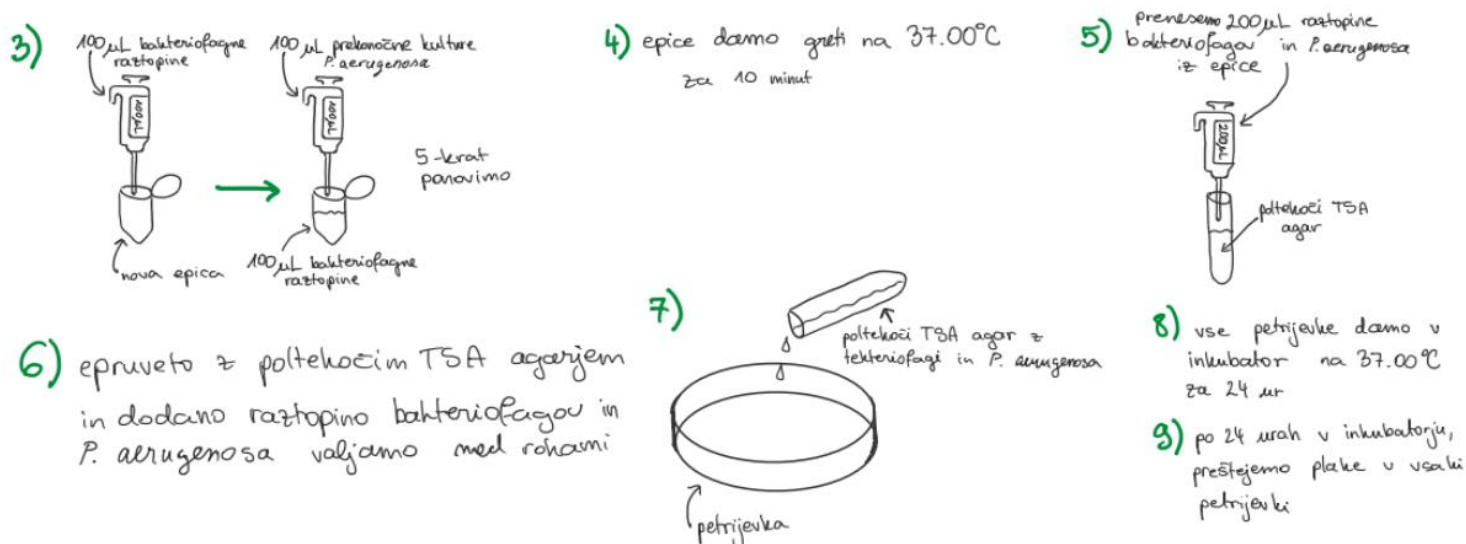
dodali 270 μl fiziološke raztopine in tako dobili 10^{-2} redčitev. Postopek smo ponavljali pri suspenziji posamičnega bakteriofaga (P1) in pri suspenziji fagnega koktejla (PM1) vse dokler nismo pri obeh dobili redčitvene vrste do vključno 10^{-6} redčitve.



Slika 4: Redčitvena vrsta fagne suspenzije in dokazovanje fagov z metodo plakov (Luzon-Hidalgo, Risso, Delgado, Ibarra-Molero, Sanchez-Ruiz, 2021)

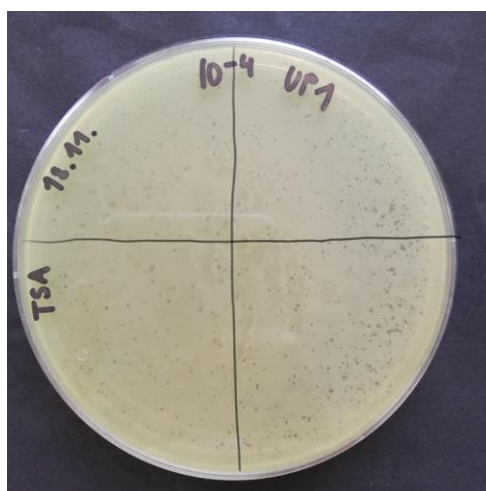
3. 4. 4 Določanje števila bakteriofagov, štetje plakov in računanje plaketovnih enot

Po narejenih redčitvenih vrstah suspenzije faga UP1 in PMu smo 100 μl vsake redčitve dodali 100 μl kulture bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Epice smo dali za 10 – 15 minut v inkubator pri 37°C. Medtem smo pripravili epruvete s poltrdno gojišče agarja (TSA), ki je imel 54°C. Po inkubiranju smo vsako posamezno mešanico redčitev fagne suspenzije faga UP1 in fagnega koktejla PMu in bakterije prelili v epruvete s tekočim poltrdim TSA gojiščem. Pred in po prenašanju z epruveto smo ustje epruvete obžgali na plamenu, da smo sterilizirali in s tem omogočili, da je prišlo do okužbe z drugimi mikroorganizmi, ki bi eksperiment motili. Epruvete s tekočim agarjem smo rahlo premešali med dlanmi ali pa vorteksirali, da sta se agar in suspenzija fagov s kulturo bakterije premešala. Na koncu smo zmes iz epruvet razlili po trdnih TSA gojiščih in vsakega označili z imenom bakterije, bakteriofagno suspenzijo (UP1, PMu), vrsto redčitve in datumom. Po 10 minutah se je poltrdo TSA gojišče na trdnem gojišču strdilo. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 37°C (Slika 5).



Slika 5: Shema postopka iz dnevnika laboratorijskega dela - določanja števila bakteriofagov v vodnih vzorcih in pridobitve TSA gojišč s plaki (lasten vir)

Naslednji dan smo vzeli plošče s TSA gojišči iz inkubatorja, jih poslikali in prešteli plake. Plake smo prešteli tako, da smo hrbtno stran gojišč razdelili na četrtine in v vsakem predelu prešteli plake in na jih na koncu sešteli (Slika 6). Po zgoraj navedeni enačbi (Enačba 3), smo izračunali PFU/ml in tako določili količino bakteriofagov v prvotnih neredčenih suspenzijah posameznega faga in koktejlja fagov.



Slika 6: Hrbtna stran TSA gojišča, razdeljena na četrtine za lažje štetje plakov (lasten vir)

3. 4. 5 Uporaba bakteriofagov za dekontaminacijo izbranih materialov

S tem se začne drugi del eksperimentalnega dela, ki zajema umetno kontaminacijo treh različnih materialov iz vsakdanje uporabe, tretiranje le-teh z neredčeno suspenzijo bakteriofaga P1 in 100-krat redčeno suspenzijo mešanice bakteriofagov - PMu ter s fiziološko raztopino (kontrola), barvanjem nastalih biofilmov bakterije *P. aeruginosa* na okuženih materialih. Cilj drugega dela je bil ugotoviti, ali lahko suspenziji namnoženega faga UP1 in bakteriofagnega koktejlja PMu uporabimo za uničenje že nastalih biofilmov bakterije *P. aeruginosa* na izbranih materialih – torej, če imajo dekontaminacijske sposobnosti in bi jih lahko uporabili v ta namen. Po namnožitvi bakterij v prekonočni kulturi je bilo v njej 10^8 bakterijskih celic *P. aeruginosa*. Bakteriofagne suspenzije pa smo redčili do enake koncentracije, za primerljivost rezultatov.

Uporabili smo 5 kovinskih vijakov, 5 filtrov za pipo, 5 katetrov in 5 praznih cilindričnih jamic. Za biofilme bakterije *P. aeruginosa* je znano, da pogosto nastanejo površinah, ki so okrogle oz. cilindrične. Predmete smo razdelili v 5 plošč s 6 vdolbinami, tako da so bili en kovinski vijak, en filter, en kateter in ena prazna cilindrična jamica vsak skupaj v eni plošči, kot je na Sliki 7. Plošče smo še označili z imenom bakterijske kulture *P. aeruginosa*, vrsto faga (UP1, fagni koktejl PM1) in številko ponovitve (kontrola, 1, 2).

Vse predmete v vseh 5 ploščah smo okužili s 500 μ l bakterijske kulture *P. aeruginosa*. Sledila je 24 urna inkubacija pri 37°C. Po inkubacijski dobi smo opazili, da so na preparatih nastali biofilmi.



Slika 7: 2 plošči s 6 vdolbinami, v katerih so predmeti po umetnem okuženju z bakterijsko kulturo in 24 urni inkubaciji (lasten vir)



Slika 8: Nastanek biofilmov na plastičnem filtru (1), kovinskem ventilnem vijaku (2) in urinskem katetru (3) po tretiranju z bakterijsko kulturo *P. aeruginosa*. Biofilmi so vidni kot rumenkaste obloge (označeni z modro puščico) (lasten vir)

Predmete v prvi plošči s 6 vdolbinami smo tretirali s 10 ml fiziološke raztopine. Ti preparati so predstavljali kontrolo, s katero smo kasneje dokazali, da se biofilmi izbrane bakterije ne reducirajo brez prisotnosti bakteriofagnih suspenzij oz. sami od sebe. Predmete v drugi in tretji plošči s 6 vdolbinami smo tretirali s 10 ml neredčene fagne suspenzije samega bakteriofaga (UP1) in tako naredili dve ponovitve.

Predmete v četrti in peti plošči smo tretirali s 100-krat redčeno fagno suspenzijo bakteriofagnega koktejlja PMu. 10^{-2} redčitev te suspenzije smo naredili tako, da smo s pipeto zmešali 10 μ l fagne suspenzije mešanice bakteriofagov PMu in 90 μ l sterilne fiziološke raztopine. Od te mešanice smo vzeli 10 μ l in zmešali z novih 90 μ l fiziološke raztopine in tako dobili 10^{-2} redčitev. Bakteriofagno suspenzijo smo redčili, ker smo želeli da sta obe fagni suspenziji v enaki koncentraciji.

Vse vzorce smo inkubirali 24 h pri 37°C.

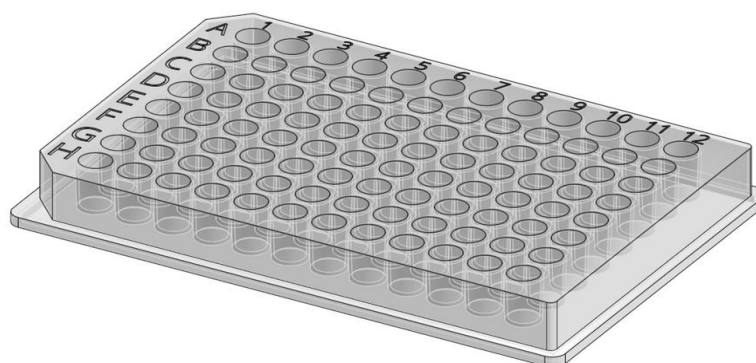
Po inkubaciji smo vse preparate (tretirane z neredčeno in neredčeno suspenzijo faga P1, 100-krat redčeno suspenzijo fagnega koktejlja PMu in kontrolo) 3x spirali s fiziološko raztopino, saj smo želeli odstraniti vse bakterijske celice, ki se niso pritrdile/niso postale del biofilmov. Sledilo je barvanje s kristal vijoličnim barvilom. Barvilo smo pripetirali v plošče s 6 vdolbinami in se je vezalo v celično steno in matriks biofilma na predmetih. Pripetirano barvilo, bakterijsko kulturo *P. aeruginosa* in neredčeno suspenzijo bakteriofaga UP1 oz. 100-krat redčeno suspenzijo fagnega koktejlja PMu smo v ploščah s 6 vdolbinami dobro premešali in inkubirali 10 min, da se je barvilo absorbiralo v celice.

Po končanem inkubiranju smo s kapalko odstranili odvečno barvilo. Le-to se ni absorbiralo v biofilme, zato je bilo za nadaljno eksperimentalno delo odvečno. Ko smo dokončno odstranili neabsorbirano barvilo smo preparate še 6-krat sprali s fiziološko raztopino in se s tem znebili vseh planktonskih bakterijskih celic in ostankov kristal vijoličnega barvila na njih. Preparate smo na koncu še s steriliziranimi pincetami premestili v nove čiste in sterilne plošče s 6 vdolbinami.



Slika 9: Primer preparatov po barvanju s kristal vijoličnim barvilom in 6-kratnim spiranjem preparatov s fiziološko raztopino. Več kot je modre barve, večja je količina biofilma na materialu. (lasten vir)

Vse preparate smo po barvanju in izpiranju razbarvali z očetno kislino. To smo naredili tako, da smo s pipeto dodali preparatom v ploščah s 6 vdolbinami 8 ml očetne kisline. Razbarvanje poteka takoj, zato smo le še dobro premešali s tipsi pipete. Od vsakega preparata posameznega materiala (kovinski vijak, filter za pipo, kateter, prazna cilindrična jamica in kontrole) smo vzeli 3 alikvotne sproščene barvila in jih pipetirali v ploščo s 96 vdolbinami. Kopijo plošče s 96 vdolbinami smo si še narisali v dnevnik laboratorijskega dela in označili, kje so 3 ponovitve, katerega vzorca (slika 10).



Slika 10: Primer 94-vdolbinske plošče (Grabcad community, 2019)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	ime vzorc
A	P	P	P	C	C	C	K	K	K	E	E	E	PMu 1
B	P	P	P	C	C	C	K	K	K	E	E	E	PMu 2
C	P	P	P	C	C	C	K	K	K	E	E	E	UP 1
D	P	P	P	C	C	C	K	K	K	E	E	E	UP 2
E	P	P	P	C	C	C	K	K	K	E	E	E	KONTROLA
F													
G													
H													

LEGENDA:
P... plastični filter na pipi
C... kovinski vodovodni vijak
K... plastični kateter
E... empty (prazna jamica)

sest

Slika 11: Skica 96-vdolbinske plošče z vzorci vseh preparatov v dnevniku laboratorijskega dela (lasten vir)

3. 4. 5. 5 Določanje absorbance biofilmov na vseh uporabljenih materialih

Predvidevali smo, da če bakteriofagi napadejo in reducirajo bakterijske celice v biofilmih, bo biofilmska absorbanca kristalvijoličnega barvila manjša, saj bomo mrtve bakterije, ki se ne držijo biofilma sprali in tako ne bodo absorbirale nobenih barvil. Absorbirano barvilo smo iz biofilmov na materialih ekstrahirali z očetno kislino. Absorbanco smo merili z spektrofotometrom pri 630 nm.

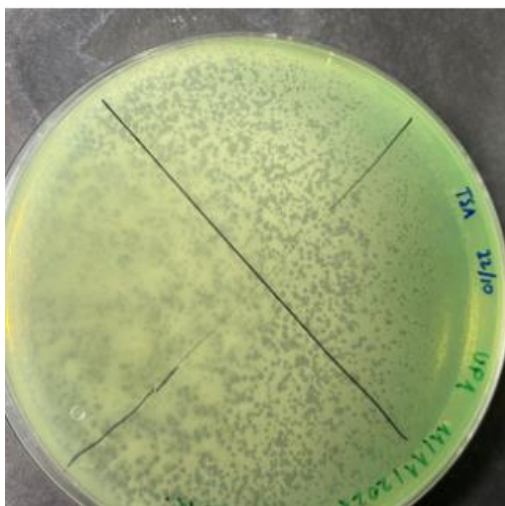
V spektrofotometer smo vstavili ploščo s 96 vdolbinicami z vsemi vzorci ekstrahiranega kristal vijoličnega barvila iz biofilmov na obdelanih in tretiranih materialov oz. preparatov.

4 REZULTATI IN ANALIZA

4. 1 Določanje števila bakteriofagov v suspenzijah pripravljenih predhodno

Cilj prvega dela laboratorijskega dela je bil ugotoviti, ali se v vzorcih odpadne vode nahajajo bakteriofagi. Izolat izbrane bakterije je pred začetkom dela priskrbel Oddelek za mikrobiološke raziskave na NLZOH, ki jih je pridobil od bolnišničnih pacientov in jih do začetka dela hranil pri -80°C . Iz enega od izolatov so pripravili prekonočno bakterijsko kulturo *P. aeruginosa*. Prav tako so pripravili suspenzije bakteriofagov iz odpadne vode.

Redčitve suspenzij izoliranih bakteriofagov (samega bakteriofaga – UP1, mešanice bakteriofagov –PMu) smo zmešali s prekonočno kulturo *P. aeruginosa* v poltrdo gojišče in nato prelili po trdem TSA gojišču. Sledila je 24 urna inkubacijska doba pri 37°C . Cilj tega je bil določiti, koliko bakteriofagov je v posamezni suspenziji oz. izračinati PFU/ml – z metodo štetja plakov ploščah (Slika 12).



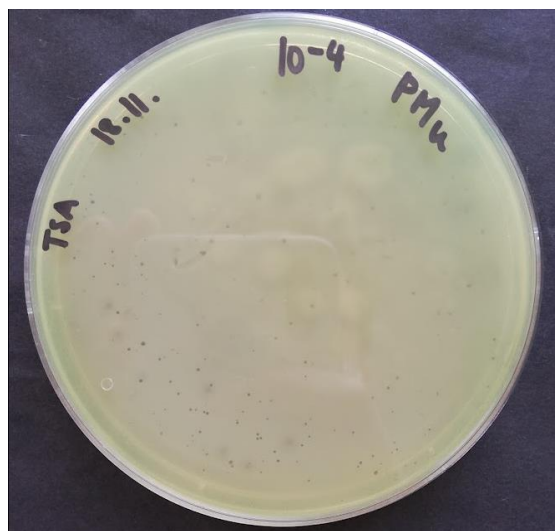
Slika 12: TSA gojišče - plaki na bakterijski kulturi *P. aeruginosa*, tretirano z prefiltriranim vzorcem odpadne vode z bakteriofagi (lasten vir)

Slika 12 prikazuje gojišče, čigar hrbtno stran smo razdelili na četrtine in v vsakem predelu šteli plake. Na gojišču je očitno več kot 300 plakov, kar pomeni, da ta TSA plošča ni števna in z njo nismo mogli izračunati PFU/ml. Zaradi nejasnih mej plakov, ki so posledica njihovega prekrivanja nismo mogli niti jasno prešteti, koliko jih je. Gre za TSA gojišče, ki je bilo tretirano z neredčeno suspenzijo izoliranega bakteriofaga UP1. Števne plošče (med 30 in 300 plako) so bile tiste, ki so bile tretirane z bolj redčenimi fagnimi suspenzijami (Slika 13).

*Tabela 1: Število nastalih plakov na TSA gojiščih bakterije *P. aeruginosa* po tretiranju z različnimi redčitvami bakteriofagnih suspenzij bakteriofaga UP1 in mešanice bakteriofaga PMu ter izračunane posamezne in povprečne vrednosti PFU/ml.*

Bakteriofagna suspenzija	Redčitev	Plaki	PFU/ml	povprečni PFU/ml
PMu	1000x	2365	$2,4 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
	10000x	207	$2,1 \times 10^6$	
	100000x	20	$2,0 \times 10^6$	
	1000000x	2	$2,0 \times 10^6$	
UP1	1000x	nemogoče prešteti	/	$1,7 \times 10^7$
	10000x	1336	$1,3 \times 10^7$	
	100000x	193	$1,9 \times 10^7$	
	1000000x	18	$1,8 \times 10^7$	

Tabela 1 prikazuje število nastalih plakov na gojiščih bakterije *P. aeruginosa* pri posamezni redčitvi suspenzije bakteriofaga UP1 in bakteriofagne mešanice PMu. Razvidno je, da je na gojiščih, tretiranih z suspenzijo bakteriofagnega koktejlja PMu, nastalo največ plakov pri največji redčitvi – 1000-kratni. Na TSA gojiščih, tretiranih s suspenzijo bakteriofaga UP1, pa je največ plakov nastalo pri 10000-kratni redčitvi. Pri redčitvi 10^{-3} ni bilo mogoče prešteti plakov, saj meje med enim in drugim niso bile jasne, ker so se med seboj prekrivali, kot kaže Slika 13. Iz vrednosti v Tabeli 1 je še razvidno, da je nižanje števila nastalih plakov na gojiščih obeh bakteriofagnih suspenzij sorazmerno s stopnjo redčitve le-teh.



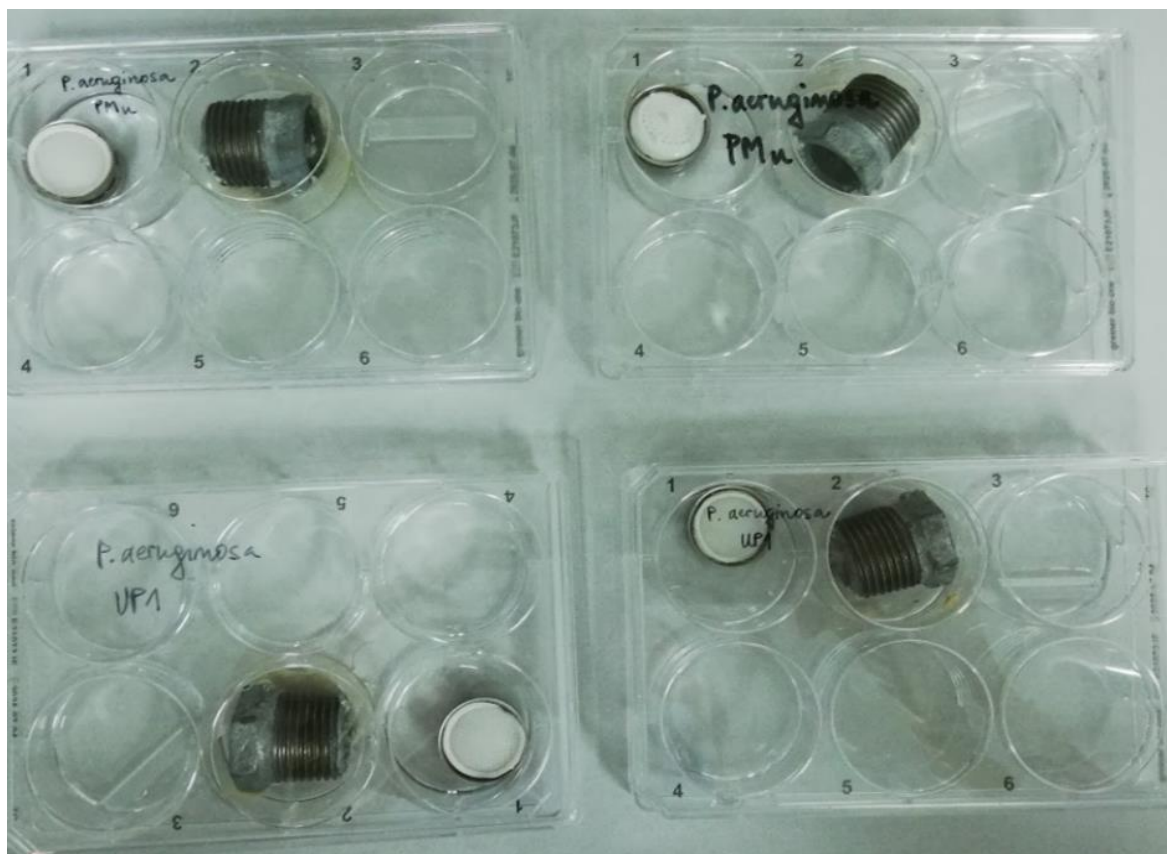
Slika 13: Nastanek plakov na TSA gojišču treturanim z 10^{-4} redčitvijo suspenzije bakteriofaga UP1 (lasten vir)

V Tabeli 1 je naveden tudi izračun vrednosti PFU/ml za vsako od redčitev posamezne suspenzije in izračun povprečne vrednosti PFU/ml za vsako posamezno suspenzijo. Vrednosti smo izračunali po Enačbi 1. Iz povprečnih vrednosti PFU/ml lahko razberemo, da je pri redčitvah suspenzije bakteriofaga UP1 nastalo več plakov in ima zato večjo vrednost PFU/ml – torej tvori več plaketovnih enot v določeni količini vzorca suspenzije. Da smo lahko nadaljnje rezultate primerjali, smo to suspenzijo redčili pred dodatkom k biofilmom.

4. 2 Uporaba fagov za dekontaminacijo izbranih materialov

4. 2. 1 okuževanje materialov z obogateno kulturo bakterije *P. aeruginosa*

Cilj je bil ugotoviti, ali bakteriofagi reducirajo že nastale biofilme izbrane bakterije na različnih materialih, zato smo izbrane materiale okužili z prekonočno kulturo bakterije *P. aeruginosa*. Izbrali smo si naslednje materiale: kovinski ventilni vijak, plastični filter za pipe, plastične medicinske katetre in cilindrično vdolbino plošče s 6 vdolbinicami. Materiale smo inkubirali 24 ur pri 37°C. Na Sliki 14 je prikazano stanje materialov po 24 urnem inkubiranju.



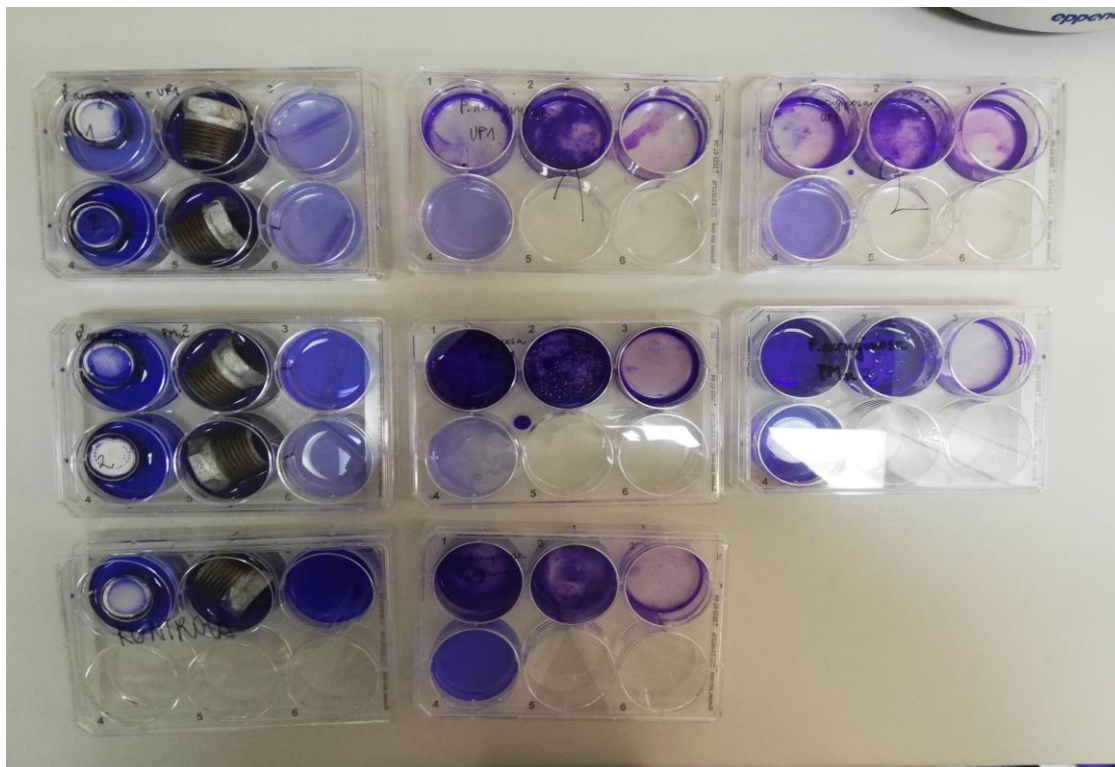
Slika 14: Stanje izbranih materialov po kontaminaciji z prekonočno kulturo bakterije *P. aeruginosa* (lasten vir)

Na Sliki 14 so štiri plošče s 6 vdolbinicami z izbranimi materiali, na katerih so v 24 ur v inkubatorju pri 37°C nastali biofilmi izbrane bakterije. Zaradi svetlo bele barve biofilmov jih na površini plastičnih filtrov za pipe in cilindričnih jamicah slabše vidimo. Najbolj so opazni na kovinskih ventilnih vijakih, saj so temnejši in prozorno bela barva izstopa. Na prvi pogled, bi lahko trdili, da je na teh materialih nastalo največ biofilma – torej da bakterija *P. aeruginosa* tvori več biofilmov na kovinski podlagi, kot na plastični, vendar tega ne moremo niti potrditi niti ovreči, zato smo jih v nadaljevanju pobarvali z kristal vijoličnim barvilom.

4. 2. 2 Tretiranje nastalih biofilmov z izbranimi fagnimi suspenzijami

Izbrali smo si neredčeno mešanico bakteriofagov in 10-krat redčeno bakteriofagno suspenzijo bakteriofaga UP1. S temi suspenzijami smo tretirali predhodno umetno okužene materiale s prekonočno kulturo bakterije *P. aeruginosa*. Z bakteriofagnimi suspenzijami pa nismo tretirali enega od vsake posamezne vrste materialov, da so nam služili kot kontrola. S to kontrolo smo želeli dokazati, da se brez dodajanja bakteriofagnih suspenzij predhodno nastali biofilmi na

materialih ne reducirajo sami od sebe, tudi če ostanejo brez gojišča (hranil). Po inkubaciji pri 37°C za 24 ur, smo vse preparate še pobarvali s kristal vijoličnim barvilom, ki se absorbira v bakterijske celice biofilmov bakterije *P. aeruginosa*.



Slika 15: Intenziteta barvila kristal vijolično po spiranju z očetno kislino - večja kot je intenziteta več je biofilma na posameznem materialu

Slika 15 prikazuje izbrane predmete po barvanju s kristal vijoličnim barvilom in odstranitvijo odvečnega (neabsorbiranega) barvila, ter dodatku očetne kisline. Materiale v vseh treh ploščah s 6 vdolbinami na skrajni levi strani smo 3-krat sprali in jih premestili v svežo ploščo. Na ploščah v sredinskem stolpcu in na skrajni desni vidimo pobarvane biofilme, ki niso nastali na izbranih materialih, ampak na dnu cilindričnih vdolbinah plošč.

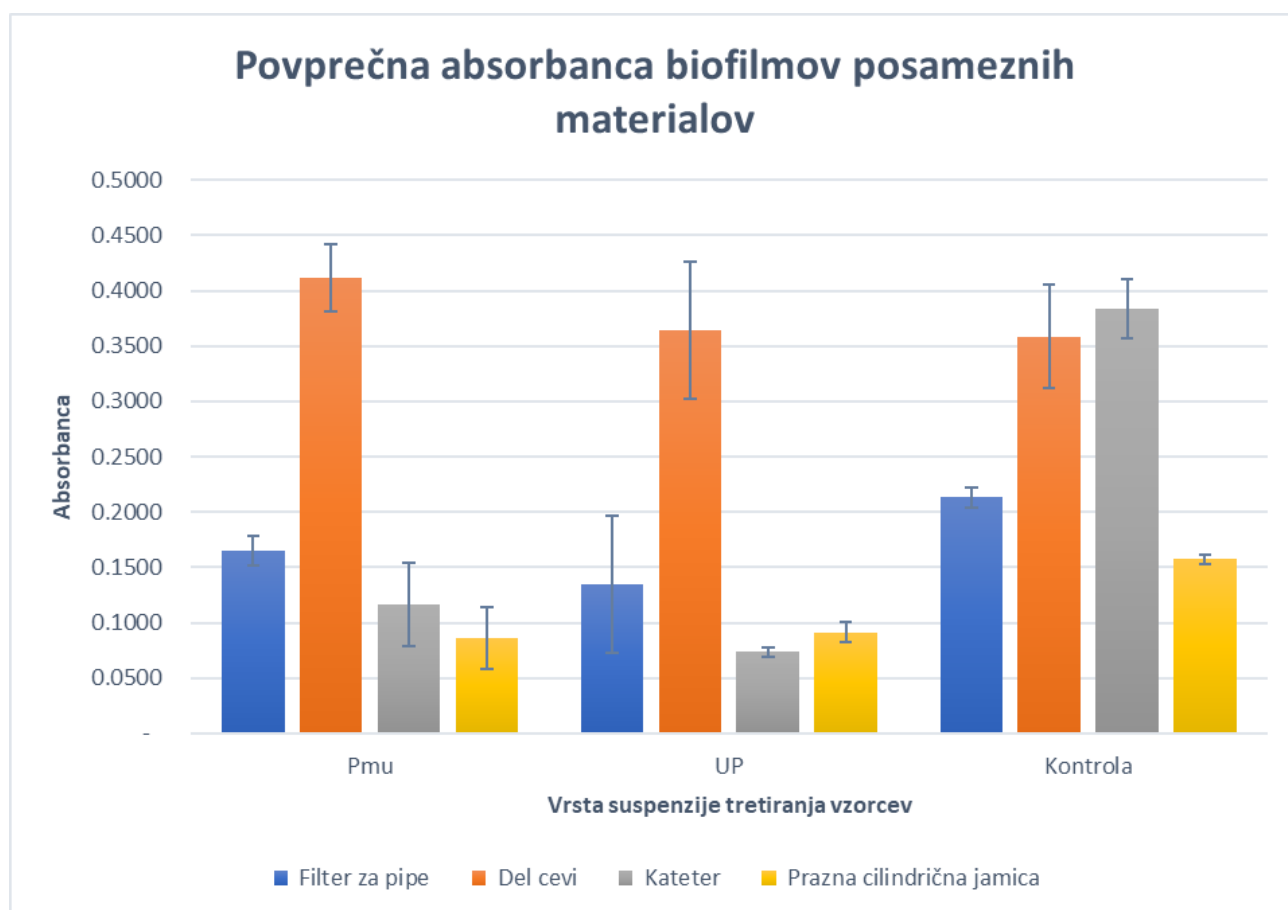
4. 2. 4 Meritve biofilmske absorbance kristal vijoličnega barvila s spektrofotometrom

Z merjenjem absorbance biofilmov smo želeli ugotoviti, ali so biofilmi nastali na vseh vzorcih ter, katera bakteriofagna suspenzija je najbolj učinkovita pri reduciranju nastalih biofilmov.

Absorbanca je količina fotonov, ki jih snov absorbira. Vir svetlobe oz. fotonov je žarnica, ki skozi vzorec emitira svetlobo. Spektrofotometer ima na drugi strani vzorca senzor, ki zaznava

količino fotonov, ki jih vzorec ni absorbiral - transmitanco.. S pomočjo tega potem naprava izračuna absorbirano svetlobo – absorbanco.

Pri laboratorijskem delu smo z spektrofotometrom izmerili absorbanco 3 vzorcev ekstrahirane barvila iz biofilmov na vsakem posameznem preparatu in rezultate predstavili v spodnjih tabelami. V vzorcih z večjo absorbanco je bilo več biofilma, pri nižjih absorbancah, pa je več biofilma propadlo (zaradi delovanja bakteriofagov).



Graf 1: Povprečna absorbanca biofilmov posameznih materialov, tretiranih z 100-krat redčeno suspenzijo mešanice bakteriofaga PMu, neredčeno suspenzijo bakteriofaga UP in fiziološko raztopino (kontrola)

Tabela 2: Procent od celotne povprečne absorbance kontrole, ki ga predstavlja povprečna absorbanca pri posameznem materialu

Kontrola vzorca	Procent povprečne absorbance kontrole materiala, ki ga predstavlja dejanska povprečna absorbanca posameznega materiala	
	PMu	UP1
Filter za pipe	77,36	62,92
Del cevi	114,79	101,59
Kateter	30,42	20,76
Prazna cilindrična jamica	54,67	58,04

Povprečna absorbanca materiala po tretiranju z vrsto suspenzije
povprečna vrednost kontrole istega materiala

Enačba 2: Izračun procenta povprečne vrednosti vzorcev kontrole materiala, ki ga predstavlja povprečna vrednost vzorcev istega materiala

Tabela 3: Tabela povprečnih vrednosti absorbanc pri posameznih materialih, tretiranih s določeno bakteriofagno suspenzijo in fiziološko raztopino (kontrola)

Tretma / Predmet	Del cevi	Kateter	Filter	Prazna jamica
UP1	0,3640	0,0735	0,1342	0,0913
PMu	0,4113	0,1168	0,1650	0,0860
Kontrola	0,2133	0,3840	0,2133	0,1573

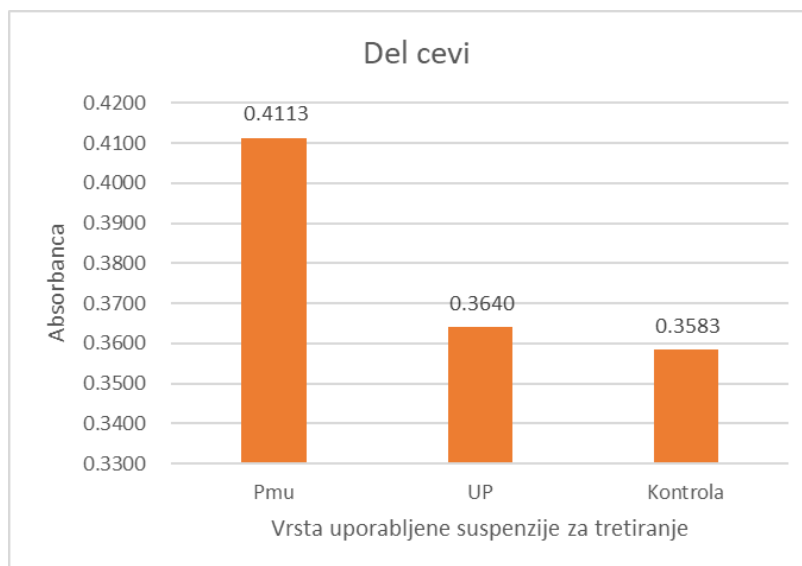
Iz Grafa 1 in Tabele 3 je razvidno, da so bile pri obeh bakteriofagnih suspenzijah in kontroli največje absorbance barvila izmerjene pri biofilmih na kovinskih vijakih, in sicer 0,4113 (PMu), 0,3640 (UP) in 0,3583 (kontrola). Najmanj barvila so v primeru kontrole in PMu absorbirali biofilmi na površini prazne cilindrične jamice (vdolbinice) - pri PMu je bila absorbanca izmerjena 0,0860 µl, pri kontroli pa 0,1573

V primeru UP so najmanjše meritve absorbance pri katetru, in sicer 0,0735 absorbance vzorcev pri kontroli so večje (razen pri kovinskem vijaku) od absorbanc izmerjenih pri vzorcih

tretiranih z eno od bakteriofagnih suspenzij (sam bakteriofag - UP, mešanica bakteriofagov - PMu).

Tabela 2 nam pove, da so absorbance vzorcev filtra za pipe, katetra, in prazne cilindrične jamice po tretiranju z bakteriofagno suspenzijo PMu oz. UP manjše od absorbanc, izmerjenih pri enakih predmetih pri kontroli.

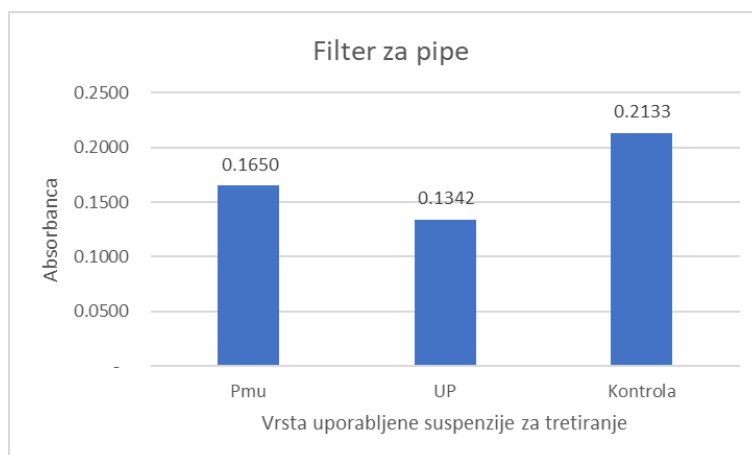
4. 2. 4. 1 Dekontaminacija kovinskih ventilnih vijakov



Graf 2: Povprečna absorbanca vzorcev dela cevi po tretiranju s suspenzijo mešanice bakteriofagov PMu, bakteriofagov UP in fiziološko raztopino (kontrola)

Iz Grafa 2 je razvidno, da je povprečna vrednost absorbance pri kontroli manjša od povprečnih vrednosti absorbanc pri vzorcih tretiranih z eno od bakteriofagnih suspenzij. Torej po tretiranju s suspenzijo samega bakteriofaga UP oz. mešanice bakteriofagov PMu se biofilmi niso reducirali, zato izmerjene absorbance niso manjše od absorbanc vzorcev omenjenega materiala pri kontroli.

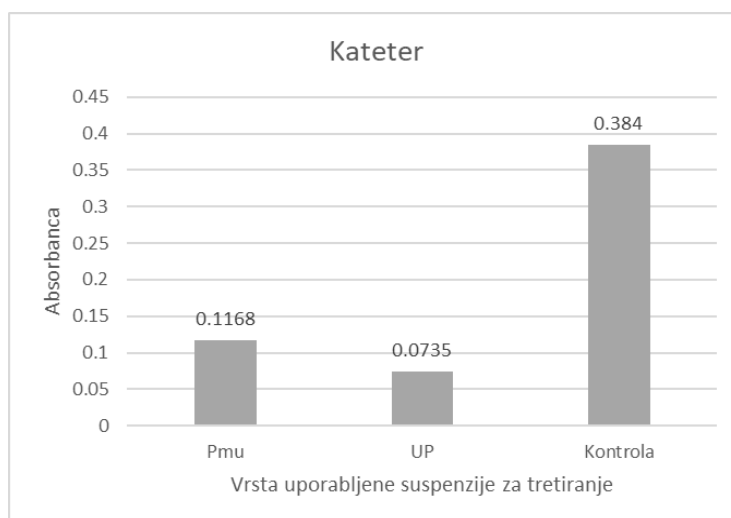
4. 2. 4. 2 Dekontaminacija plastičnih filtrov za pipe



Graf 3: Povprečne vrednosti absorbanc vzorcev filtra za pipe po tretiranju s suspenzijo samega bakteriofaga (UP), mešanice bakteriofagov (PMu) in fiziološko raztopino (kontrola)

Iz Grafa 3 lahko razberemo, da so bile absorbance izmerjene pri biofilmih na vzorcih filtrov za pipe pri kontroli največje. Ker je bila absorbanca pri kontrolah filtra za pipo višja, kot pri vzorcih tretiranih s katerokoli izmed bakteriofagnih suspenzij, lahko trdimo, da so bili bakteriofagi uspešni pri reduciranju biofilma, žal pa ne pri popolnem uničenju. Iz Grafa 3 in Tabele 4 lahko razberemo tudi, da je bil bakteriofag UP1 bolj uspešen pri redukciji biofilma kot koktajl bakteriofagov PMu.

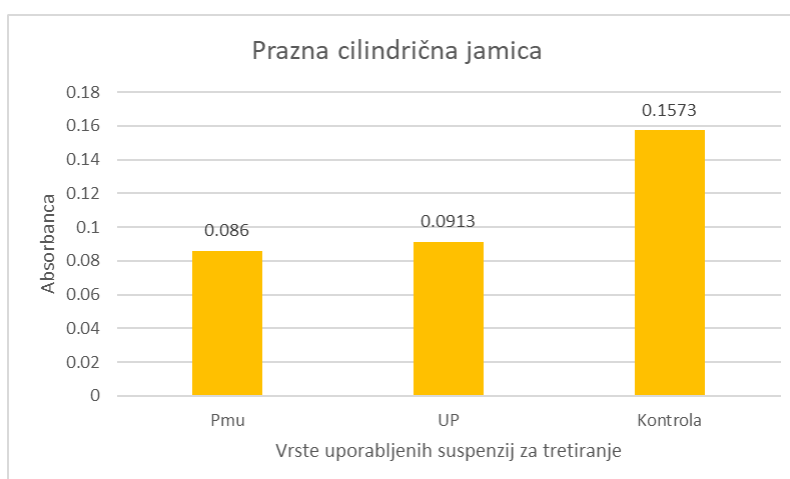
4. 2. 4. 3 Dekontaminacija urinskega katetra



Graf 4: Povprečne vrednosti absorbanc biofilmov na vzorcih katetrov po tretiranju s suspenzijo samega bakteriofaga (UP) oz. mešanice bakteriofagov (PMu) in fiziološko raztopino

Graf 4 prikazuje povprečne vrednosti absorbanc vzorcev urinskega katetra po tretiranju z različnimi snovmi - fagno suspenzijo UP oz. PMu ali fiziološko raztopino (kontrola). Iz meritev vidimo, da so bile najvišje absorbance izmerjene pri vzorcih kontrole, saj je povprečna vrednost tu 0,384, kar je za 69,56 % več od povprečne absorbance pri suspenziji PMu in za 79,24 % več od povprečne vrednosti pri suspenziji UP (Tabela 3). Najmanjša povprečna vrednost absorbance je pri vzorcih, tretiranih s suspenzijo UP1. Tabela 3 nam pove, da ta povprečna vrednost absorbance predstavlja le 20,76 % povprečne vrednosti povprečne absorbance pri kontroli. Povprečna vrednost absorbance pri suspenziji PMu pa predstavlja 30,42%. Torej je Povprečna absorbanca pri UP za 9,66 % manjša od tiste pri fagni suspenziji PMu.

4. 2. 4. 4 Dekontaminacija vdolbine plošče



Graf 5: Povprečna vrednost absorbance biofilmov na vzorcih praznih cilindričnih jamic po tretiranju s suspenzijo samega bakteriofaga (UP) oz. mešanico bakteriofagov (PMu) in fiziološko raztopino - kontrola

Iz Grafa 5 lahko razberemo, da so bile največje meritve absorbance izmerjene pri vzorcih kontrole, saj je tam največja vrednost povprečne absorbance. Iz Tabele 3 lahko razberemo, da je povprečna absorbanca pri kontroli za 46,33 % večja od tiste pri suspenziji PMu in za 42,96 % od tiste pri suspenziji UP. Iz Grafa 5 je tudi očitno, da sta si povprečni vrednosti pri obeh fagnih suspenzijah skoraj enake. Razlika je le za 0,0053, kar je le 3,37 %; povprečna vrednost pri suspenziji je rahlo manjša od povprečne vrednosti suspenzije UP

5 RAZPRAVA

V raziskovalni nalogi smo poskušali ugotoviti, ali lahko obogateno suspenzijo bakteriofaga in mešanice bakteriofagov, pridobljenih iz odpadne vode, uporabimo za reduciranje oz. dekontaminacijo biofilmov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na površinah izbranih materialov – filter za pipe, kovinski vijak/del cevi, urinski kateter, prazna cilindrična jamica. Preden smo začeli z eksperimentalnim delom, smo si postavili tri hipoteze, ki jih bomo v tem poglavju potrdili oz. ovrgli.

Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* se nahaja na različnih okoljih v prsti, na človeškem telesu in v vodnih okoljih. Bakteriofagi, ki specifično okužijo bakterije iz vrste *P. aeruginosa* se nahajajo v istih okoljih kot bakterija. Voda iz čistilne naprave je okolje kjer lahko najdemo številne bakterije, tudi *P. aeruginosa*, zato smo predvidevali, da bo to najprimernejši vzorec za iskanje bakteriofagov. Bakteriofagi so lahko zelo specifični in okužijo samo določene vrste oziroma samo določene seve znotraj vrste. Po bogatitvi prekonočne kulture *P. aeruginosa* z odpadno vodo, v kateri smo predvidevali prisotnost bakteriofagov, so na ploščah TSA nastali plaki (cone z bistrivje), ki so posledica delovanja bakteriofagov, specifičnih na bakterijo *P. aeruginosa*. Torej smo prvo hipotezo, ki pravi, da *bomo iz vzorcev odpadne vode uspeli izolirati bakteriofage, ki okužijo bakterijo P. aeruginosa, ki smo jo osamili iz kliničnega vzorca, potrdili.*

Na podlagi znanja, da bakteriofagi napadejo bakterije, na katere so specifični in povzročajo njihovo lizo, smo oblikovali drugo hipotezo, s katero smo predvidevali, da *bomo s tretiranjem materialov, umetno okuženih z bakterijo P. aeruginosa, z bakteriofagno suspenzijo reducirali nastale biofilme P. aeruginosa.* S pomočjo meritev absorbanc biofilmov na različnih materialih, ki smo jih pobarvali s kristal vijoličnim barvilom, vidimo, da se absorbance niso povsod zmanjšale. Prvotne biofilmske absorbance omenjenega barvila predstavljajo meritve kontrole, saj teh vzorcev nismo tretirali z bakteriofagi, kar pomeni, da se biofilmi niso reducirali. Vemo, da bakteriofagi reducirajo biofilme, torej smo predvidevali, da bodo absorbance teh vzorcev manjše od absorbanc vzorcev kontrole, saj bo manj biofilma na vzorcih, ki bi absorbiral barvilo. To se ni zgodilo v primerih vzorcev kovinskega vijaka (dela cevi). Iz povprečnih vrednosti absorbanc iz Grafa 2 je očitno, da je povprečna vrednost absorbance kontrole najmanjša – 0,3583 – , torej je bilo več biofilma, ki je absorbiral barvilo, po tretiranju z bakteriofagnima suspenzijama. Le-ti očitno nista imeli očinka na biofilme na kovinskem vijaku.

Iz Grafa 1 vidimo, da je v primerih vseh drugih materialov (filter za pipe, kateter, prazna cilindrična jamica) povprečna vrednost kontrole pri posameznem materialu večja od drugih dveh povprečnih vrednosti pri istem materialu (primera po tretiranju z bakteriofagi). Iz Tabele 3 lahko izračunamo procentualne razlike, med povprečnimi vrednostmi kontrol posameznih materialov in dejanskimi povprečnimi vrednostmi posameznih materialov. Pri filtru za pipe je povprečna vrednost kontrole za 22,64 % večja od povprečne vrednosti pri bakteriofagni suspenziji PMu in za 37,08 % večja od povprečne vrednosti pri bakteriofagni suspenziji UP. Pri vzorcih katetra je povprečna vrednost kontrole za 69,58 % večja od tiste pri bakteriofagni suspenziji PMu in za 79,24 % od tiste pri bakteriofagni suspenziji UP. Povprečna vrednost vzorcev praznih cilindričnih jamic, tretiranih z bakteriofagno suspenzijo PMu, je za 45,33 % manjša od povprečne vrednosti kontrole pri istem materialu. Povprečna vrednost vzorcev istega materiala, tretiranega z bakteriofagno suspenzijo UP, pa je za 41,96 % manjša od povprečne vrednosti pri kontroli tega materiala. Odstotek razlike pri obema bakteriofagnima suspenzijama se med samo razlikuje manj kot 5 %, zato lahko trdimo, da so bili bakteriofagi v njima enako učinkoviti proti biofilmom na tem materialu. To pomeni, da so pri vseh materialih (razen na kovinskih vijakih) bakteriofagi reducirali biofilme na površini predmetov v primerjavi s kontrolo. Na podlagi teh ugotovitev lahko drugo hipotezo **delno potrdimo**, saj so res na vseh materialih po umetni okužbi s prekonočno kulturo bakterije *P. aeruginosa* nastali biofilmi, a so bakteriofagi reducirali biofilme le na večini materialov (filter za pipe, kateter, prazna cilindrična jamica), ne pa na vseh (kovinski vijak).

Iz vzorcev odpadne vode smo s pomočjo disk difuzijske metode in štetja plakov izolirali bakteriofage. Ustvarili smo dve različni suspenziji, in sicer suspenzijo posameznega bakteriofaga UP1 in suspenzijo mešanice bakteriofagom PMu, ki so nedefinirani, a specifični na bakterijo *P. aeruginosa*, saj so na TSA gojišču, okuženem z omenjeno bakterijo, povzročili plake. Predvidevali smo, da bo mešanica večjih različnih, na izbrano bakterijo specifičnih, bakteriofagov, bolj učinkovita proti biofilmom izbrane bakterije zaradi raznolikosti. Na podlagi tega predvidevanja smo tvorili tretjo hipotezo, ki pravi, da *bo koktajl (mešanica različnih, nedefiniranih) bakteriofagov, izoliranih iz vzorcev odpadne vode, uspešnejša pri redukciji biofilmov bakterije P. aeruginosa, kot specifični bakteriofag iste bakterije, pridobljen iz istega vzorca odpadne vode*. Pri primerjavi suspenzije samega bakteriofaga (UP1) in suspenzije mešanice bakteriofagov (PMu) v učinkovitosti proti biofilmom izbrane bakterije bomo zanemarili vzorce materiala kovinskega vijaka (dela cevi), saj smo že zgoraj navedli in dokazali, da nanje

suspenzije bakteriofagov nimajo efekta. Iz Grafa 3 se vidi, da je povprečna absorbanca vzorcev filtra za pipe, tretiranih s suspenzijo mešanice bakteriofagov (PMu) – 0,1650 – večja od povprečne vrednosti absorbance vzorcev istega materiala, tretiranega s suspenzijo samega bakteriofaga (UP) – 0,1342 –, obe pa sta manjši od povprečne vrednosti pri kontroli – 0,2133. To pomeni, da je pri suspenziji PMu obstalo več biofilma po tretiranju, ki je absorbiral kristal vijolično barvilo, zato so bile izmerjene večje absorbance in izračunana večja povprečna absorbanca. Torej je bila suspenzija PMu manj učinkovita proti biofilmom izbrane bakterije kot suspenzija UP1. Enako prikazuje Graf 4, le da za vzorce katetra. Pri tretiranih vzorcih s suspenzijo PMu je povprečna absorbanca 0,1168. Torej je večja od tiste pri suspenziji UP (0,0735), torej je bila suspenzija PMu ponovno manj učinkovita proti biofilmom. Vzorci prazne cilindrične jamice, tretirani s fagno suspenzijo PMu pa imajo rahlo manjšo povprečno vrednost absorbanc (0,086) kot tisti, tretirani s suspenzijo posameznega bakteriofaga (UP) (0,0913). S pomočjo Tabele 3 lahko izračunamo, da je ta razlika le 3,37 %, kar je manj kot 5%, zato lahko zanemarimo to razliko. To pomeni, da obe sta bili obe bakteriofagni suspenziji enako učinkoviti proti biofilmom. Zaradi tega lahko tretjo hipotezo **ovržemo**, saj ne drži ne za vzorce filtra za pipo, ne za vzorce katetrov in niti za vzorce praznih cilindričnih jamic. Kot že omenjeno so vzorci kovinskih vijakov pri tej hipotezi izključeni, saj smo ugotovili, da bakteriofage na biofilme na tem materialu niso delovali.

5. 1 Pomen dobljenih rezultatov

Z našim raziskovalnim delom smo eksperimentalno dokazali, da lahko iz vzorcev odpadnih vod dokaj enostavno izoliramo bakteriofage in iz njih pripravimo suspenzije. Le-te pa je mogoče uporabiti za reduciranje že nastalih biofilmov na površinah nekaterih materialov, kot so filtri za pipe, medicinski katetri in prazne cilindrične jamice plošč s 6 vdolbinicami (primer plastične površine). Torej so se bakteriofagi izkazali za uporabne pri dekontaminaciji teh površin, zato menimo, da bi to raziskovalno delo lahko nadaljevali z ugotavljanjem dekontaminacijskih sposobnosti bakteriofagov proti biofilmom na drugih materialih, uporabljenih v bolnišniških prostorih. Raziskavo bi lahko nadaljevali tudi z uporabo drugih bakterij in njihovih bakteriofagov, ki so tako kot bakterija *P. aeruginosa* odporne na številna dezinfekcijska sredstva in antibiotike, saj je očitno metoda uporabna za boj proti takšnim bakterijam.

5. 2 Možne izboljšave in nadaljevanje raziskovanja

V raziskovalni nalogi smo uporabili samo en sev bakterije *P. aeruginosa*. V nadaljevalnih poskusih bi bilo potrebno preveriti ali lahko redukcijo količine biofilma na različnih material dosežemo tudi pri drugih sevih bakterije. V prihodnje bi bilo dobro poskuse ponoviti tudi na sevu *P. aeruginosa*, ki bi jo izolirali iz biofilma v bolnišničnem okolju, ne iz pacientovih ran. Za testiranjem smo uporabili suspenzijo "čistega bakteriofaga", za katero predvidevamo, da je vsebovala samo eno vrsto bakteriofaga in pa mešanico različnih bakteriofagov, ki pa jih nismo nadalje okarakterizirali in preverili, da so res različni.

V nadaljnjih poskusih bi bilo potrebno preveriti, npr. pod elektronskim mikroskopom ali pa s sekvenciranjem ali naš koktajl res vsebuje različne bakteriofage, ali gre morebiti samo za eno vrsto bakteriofaga.

Prav tako bi v nadaljevanju bilo potrebno ugotoviti kakšna koncentracija bakteriofagov je potrebna za učinkovito redukcijo biofilma, kakšna je njihova obstojnost in kako se inkubacija obnese v vsakdanjem okolju.

6 ZAKLJUČEK

Namen raziskovalnega dela je bil ugotoviti, ali lahko obogateno suspenzijo teh bakteriofagov uporabimo za reduciranje že nastalih biofilmov bakterije *P. aeruginosa* na izbranih predmetih (kovinski vijak, filter za pipe, urinski kateter cilindrična vdolbinica plošče s 6 vdolbinami), ki smo jih v ta namen predhodno umetno okužili s prekonočno kulturo bakterije *P. aeruginosa*.

V prvem delu eksperimentalnega dela so na Oddelku za mikrobiološke raziskave laboratorija NLZOH iz vode iz čistilne naprave izolirali bakteriofage bakterije *P. aeruginosa*, in sicer so pripravili suspenzijo posamičnega bakteriofaga in mešanice bakteriofagov. V nadaljevanju smo naredili redčitveni vrsti posamezne suspenzije, ter z metodo štetja plakov določili koliko bakteriofagov je v pripravljeni suspenzijah. Obe suspenziji smo nato redčili, na isto koncentracijo, da smo v nadaljnjih poskusih uporabili isto količino obeh suspenzij bakteriofagov.

Namen drugega dela eksperimentalnega dela je bil ugotoviti, ali lahko z bakteriofagi iz omenjenih suspenzij reduciramo že nastale biofilme bakterije *P. aeruginosa*. Najprej smo različnih materiale, kovinski vijak, plastični vodni filter, urinski kateter ter prazna plastična cilindrična jamica, umetno kontaminirali z bakterijo *P. aeruginosa* in pustili, da so se tvorili biofilmi. Na te biofilme smo nato nanесли suspenziji bakteriofagov ter po prekonočni inkubaciji preverili količino ostalega biofilma. To smo preverili tako, da smo celice v biofilmu najprej pobarvali z barvilom kristal vijolično, ki se veže v bakterijske celice, sprali odvečno, nevezano barvilo ter nato izmerili količino preostalega biofilma. Da smo količino biofilma lahko tudi kvantificirali smo v celice vezano kristal vijolično barvilo sprali z očetno kislino in izmerili absorbanco. Na podlagi tega smo potem lahko tudi izračunali količino preostalega biofilma in primerjali učinkovitost redukcije med materiali in med uporabljenima fagnima suspenzijama v primerjavi s kontrolo.

Ugotovili smo, da bakteriofagi lahko delno uničijo celice znotraj biofilma in tako zreducirajo njegovo količino. Učinkovitost pa je odvisna predvsem od materiala. Najbolj uspešno smo količino biofilma zmanjšali na plastičnem urinskem katetru, sledili sta prazna cilindrična jamica ter filter za pipo. Na kovinskem vijaku pa ni prišlo do zmanjšanje količine biofilma po treniranju z bakteriofagi. Pokazali smo, da bi fagi lahko bili primerni za dekontaminacijo površin na katerih se nahajajo biofilmi bakterije *P. aeruginosa* zato bi v nadaljevanju temu bilo smiselno posvetiti več raziskav, da se razišče ali bi bakteriofagi lahko bili uporabni v vsakdanji praksi

kot način dekontaminacije različnih površin kontaminiranih z bakterijami, predvsem tistimi, ki so odporna na razkužila.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Vzorci odpadne vode, ki smo jih pridobili od čistilne naprave, smo po končanem laboratorijskem delu odlili nazaj v čistilno napravo. Tam so vodo iz vzorcev po ustaljenem postopku prečistili. S tem smo poskrbeli, da nismo onesnaževali okolje z uporabo vzorcev. Pri eksperimentalnem delu smo imeli opravka z patogeno bakterijo, zato smo delo opravljali na Oddelku za mikrobiološke raziskave na Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano, ki takšnemu delu primerne laboratorije. Pred začetkom dela so me o pravilih dela in rokovanja z bakterijami in drugimi mikroorganizmi natančneje seznanili.

Rezultati raziskovalne naloge so pokazali, da so bakteriofagi sposobni dekontaminirati razne površine, kjer so nastali biofilmi bakterije *P. aeruginosa*, kar ima velik družben pomen. Zaradi velike odpornosti te bakterije na dezinfekcijska sredstva in antibiotike, bi morala biti družba še toliko bolj ozaveščena o možnih načinih okužbe s to bakterijo, o njenem prenašanju in o preventivnih ukrepih, ki jih je priporočeno upoštevati, da ne pride do okužbe s to ali katero koli drugo bakterijo. Raziskavo bi lahko nadaljevali z novimi izolati te bakterije, ki bi jih lahko izolirali iz biofilmov v bolnišničnem okolju, ne iz ran pacientov, s tem bi lahko povečali ozaveščenost o "skriti" kontaminaciji bolnišničnega okolja in posledično prispevali k zmanjšanju bolnišničnih okužb z to in drugimi bakterijami, ki so odporne na številna dezinfekcijska sredstva in antibiotike.

8 VIRI IN LITERATURA

1. Barbieri J.T., Sun J. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. v: Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol 152. Springer, Berlin, Heidelberg, dostupno na: *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT | SpringerLink, (28.02.2022)
2. Michel-Briand, Y., Baysse, C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*, Biochimie, Volume 84, Issues 5–6, str. 499-510, ISSN 0300-9084, dostopno na: The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* - ScienceDirect, (04.02.2022)
3. Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context*, 7, 212527. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>, (12.02.2022)
4. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Healthcare-associated infections (HAIs), *Pseudomonas aeruginosa*. članek, dostopen na: *Pseudomonas aeruginosa* Infection | HAI | CDC, (12.02.2022)
5. Bennik, M. H. J. (1999). PSEUDOMONAS|*Pseudomonas aeruginosa*, Encyclopedia of Food Microbiology, str. 1867-1871, ISBN 9780122270703, dostopno na: PSEUDOMONAS | *Pseudomonas aeruginosa* - ScienceDirect, (13.02.2022)
6. Fojkar, M. (2014). Odpornost bakterij *Pseudomonas aeruginosa* proti izbranim antibiotikom. diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije. str 39, (13.02.2022)
7. Mulcahy L. R., Isabella V. M., Lewis K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microbial ecology*, 68(1), str. 1–12, dostopno na: *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease (nih.gov), (14.02.2022)
8. Wu, W., Jin, Y., Bai, F. in Jin, S. (2015). Molecular Medical Microbiology. Druga izdaja. [PDF] Academic Press, 2216 strani. Dostopno na: *Pseudomonas aeruginosa* - an overview | ScienceDirect Topics, (14.02.2022)
9. Abdallah, M., Benoliel, C., Ferreira-Theret, P., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N. (2015). Effect of culture conditions on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to disinfecting agents. *Biofouling*.; 31(1), str. 49 – 59,

- dostopno na: Effect of culture conditions on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to disinfecting agents - PubMed (nih.gov), (14.02.2022)
10. Toté, K., Horemans, T., Vanden Berghe, D., Maes, L., Cos, P. (2010). Inhibitory Effect of Biocides on the Viable Masses and Matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms, dnevniški članek, vol(76), str. 3135–3142, dostopno na: Inhibitory Effect of Biocides on the Viable Masses and Matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms | Applied and Environmental Microbiology (asm.org), (14.02.2022)
 11. Toté K, Berghe DV, Deschacht M, de Wit K, Maes L, Cos P. (2009). Inhibitory efficacy of various antibiotics on matrix and viable mass of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. 525-31, dostopno na: Inhibitory efficacy of various antibiotics on matrix and viable mass of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms - PubMed (nih.gov), (16.02.2022)
 12. Rifkind, D., Freeman, G. L. (2005). 16 - BACTERIOPHAGE LYSOGENY, The Nobel Prize Winning Discoveries in Infectious Diseases, Academic Press, str. 107-108, ISBN 9780123693532, dostopno na: BACTERIOPHAGE LYSOGENY - ScienceDirect, (16.02.2022)
 13. Moineau, S. (2013). Bacteriophage, Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition), Academic Press, str. 280-283, ISBN 9780080961569, dostopno na: Bacteriophage - ScienceDirect, (16.02.2022)
 14. Nature Education (2014), Scitable: bacteriophages, spletna stran, dostopno na: bacteriophage / phage | Learn Science at Scitable (nature.com)
 15. Britannica, The Editors of Encyclopaedia (2014), "bacteriophage". Encyclopedia Britannica, dostopno na: bacteriophage | Definition, Life Cycle, & Research | Britannica, (15.02.2022)
 16. Intermediapub, časopisni članek, Življenjski cikel biofilma in virulenca *pseudomonas aeruginosa* sta odvisna od filamentoznega profaga, dostopno na: Življenjski cikel biofilma in virulenca *pseudomonas aeruginosa* sta odvisna od filamentoznega profaga - časopis - Časopis 2022 (intermediapub.com), (16.02.2022)
 17. Principi, N., Silvestri, E., Esposito, S. (2019) Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections, Frontiers in

- Pharmacology, vol(10), članek, dostopno na: [Frontiers | Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections | Pharmacology \(frontiersin.org\)](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.841111/full), (17.02.2022)
18. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 11057, Gentian violet, pridobljeno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gentian-violet>, (20.02.2022)
 19. Luzon-Hidalgo, R., Risso, V. A., Delgado, A., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J. M. (2021) A protocol to study bacteriophage adaptation to new hosts, STAR Protocols 2, članek, dostopno na: [A protocol to study bacteriophage adaptation to new hosts: STAR Protocols \(cell.com\)](https://www.cell.com/star-protocols/S0264-410X(21)00400-0), (22.02.2022)
 20. Grabcad community (2019), 96 Well Plate, Flat Bottom, Standards, dostopno na: [96 Well Plate, Flat Bottom, Standard | 3D CAD Model Library | GrabCAD](https://www.grabcad.com/library/96-well-plate-flat-bottom-standard/123456789)

9 PRILOGE

