Analiza genomskog potencijala za formiranje biofilma bakterije Vibrio gigantis

Vukman, Vana Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:072077

Rights / Prava: Attribution 4.0 International/Imenovanje 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Science

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu
Odjel za biologiju

Vana Marta Vukman

ANALIZA GENOMSKOG POTENCIJALA ZA FORMIRANJE BIOFILMA BAKTERIJE *Vibrio gigantis*

Diplomski rad

Split, 2023.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu
Odjel za biologiju

Vana Marta Vukman

ANALIZA GENOMSKOG POTENCIJALA ZA FORMIRANJE BIOFILMA BAKTERIJE *Vibrio gigantis*

Diplomski rad

Split, 2023.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom doc.dr.sc. Ivice Šamanića, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam diplomski rad s naslovom

ANALIZA GENOMSKOG POTENCIJALA ZA FORMIRANJE BIOFILMA BAKTERIJE *Vibrio gigantis*

izradila samostalno pod voditeljstvom doc. dr. sc. Ivice Šamanića. U radu sam primijenila metodologiju znanstveno-istraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju diplomskog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnom radu na uobičajen, standardan način citirala sam i povezala s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica

Vana Marta Vukman

ZAHVALA

Prije svega, veliko hvala mome mentoru doc. dr. sc. Ivici Šamaniću što mi je pružio čast da izradim ovaj diplomski rad pod njegovim vodstvom. Hvala Vam na prenesenom znanju, utrošenom vremenu, strpljenju, kvalitetnim savjetima, preporukama i ostalim ne tako beznačajnim sitnicama koje ste mi pružali u svakom trenutku izrade ovoga rada.

Također, posebno se zahvaljujem i komentoru dr. sc. Marinu Ordulju koji me srdačno primio u svoj laboratorij te mi pokazao i udijelio dio svog velikog znanja.

Hvala i izv. prof. dr. sc. Ani Maravić na korisnim komentarima, pomoći i prenesenom znanju.

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšavali i uveseljavali studentske dane, bez vas ovo iskustvo ne bi vrijedilo.

I na kraju, hvala mojoj obitelji i momku što su uvijek bili uz mene, podupirali me kad je bilo teško i uvijek vjerovali u mene!

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu

Studij: Biologija i kemija

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

ANALIZA GENOMSKOG POTENCIJALA ZA FORMIRANJE BIOFILMA BAKTERIJE *Vibrio gigantis*

Vana Marta Vukman

SAŽETAK

Stanična komunikacija signalnim molekulama QS (engl. *Quorum sensing*) važan je regulatorni mehanizam koji koriste mnoge bakterijske vrste za koordinaciju ekspresije gena i ponašanja kao odgovor na promjene u gustoći populacije. U kontekstu stvaranja biofilma, stanična komunikacija QS vrlo je složen i strogo reguliran proces koji uključuje proizvodnju i detekciju specifičnih signalnih molekula kao što su autoinduktori. Autoinduktor 2 (AI-2) je od posebne važnosti za bakterijsku komunikaciju i razvoj biofilma. Prisutnost gena stanične komunikacije putem AI-2 kemijskih signalnih molekula (engl. *Lux quorum*) u bakterije *Vibrio gigantis*, uključujući *luxPQ*, *luxU* i *luxO* je intrigantna jer su ti geni općenito uključeni u regulaciju bioluminiscencije u drugim vrstama roda *Vibrio*. Međutim, nepostojanje transkripcijskog aktivatora LuxR i operona luciferaze (*luxCDABEGH*), odgovornih za proizvodnju enzima luciferaze koji su kritični za bioluminiscenciju, sugerira jedinstvenu genetsku konfiguraciju vrste *V. gigantis*. Kombinirani rezultati PICRUSt analize i eksperimentalnog testa bioluminiscencije, kao i promatranje dinamike formiranja mikrokolonija i stanica roja, potvrđuju kako *V. gigantis* ima genetski potencijal za stvaranje biofilmova pomoću sustava QS, ali nema sposobnost bioluminiscencije. Ovo je empirijski dokaz kako *V. gigantis* koristi mehanizme QS različite od drugih bioluminiscentnih vrsta i ukazuje na različite strategije koje bakterije koriste kako bi koordinirali svoje ponašanje u biofilmovima.

Ključne riječi: stanična komunikacija, signalne molekule, rojenje, bioluminiscencija

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 63 + VII stranica, 23 grafičkih prikaza, 2 tablica i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: Dr. sc. Ivica Šamanić, *docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Komentor: Dr. sc. Marin Ordulj, *docent Sveučilišnog odjela za studije mora, Sveučilišta u Splitu*

Ocjenjivači: Dr. sc. Ivica Šamanić, *docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Dr. sc. Marin Ordulj, *docent Sveučilišnog odjela za studije mora, Sveučilišta u Splitu*

Dr.sc. Ana Maravić, *izvanredna profesorica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Rad prihvaćen: **rujan, 2023.**

Basic documentation card

University of Split Graduating thesis

Faculty of Science

Study: Biology and chemistry

Department of biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

ANALYSIS OF GENOMIC POTENTIAL FOR BIOFILM FORMATION OF *Vibrio gigantis*

Vana Marta Vukman

ABSTRACT

Quorum sensing (QS) is an important regulatory mechanism used by many bacterial species to coordinate gene expression and behavior in response to changes in population density. In the context of biofilm formation, quorum sensing is a highly complex and tightly regulated process that involves the production and detection of specific signaling molecules such as autoinducer 2 (AI-2), which is of particular importance for bacterial communication and biofilm development. The presence of genes associated with the Lux quorum-sensing system in *Vibrio gigantis*, including *luxPQ, luxU,* and *luxO*, is intriguing because these genes are generally involved in the regulation of bioluminescence in other *Vibrio* species. However, the absence of the transcriptional activator LuxR and the luciferase operon (*luxCDABEGH*), which are responsible for the production of the enzyme luciferase that is critical for bioluminescence, suggests a unique genetic configuration in *V. gigantis*. The combined results of the PICRUSt analysis and the experimental bioluminescence assay, as well as the observation of the dynamics of microcolony and swarm cell formation, confirm that *V. gigantis* has the genetic potential to form biofilms through quorum sensing, but lacks the ability to bioluminesce. This is empirical evidence that *V. gigantis* uses QS mechanisms distinct from bioluminescent species and sheds light on the different strategies bacteria employ to coordinate their behavior in biofilms.

Key words: quorum sensing, autoinducer-2 (AI-2), swarming, bioluminescence

Thesis deposited in library of Faculty of science, University of Split

Thesis consists of: 63 + VII pages, 23 figures, 2 tables and 30 references

Original language: Croatian

Mentor: Ivica Šamanić, Ph.D. *Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split*

Co-mentor: Marin Ordulj, Ph.D. *Assistant Professor of University Department of Marine Studies, University of Split*

Reviewers: Ivica Šamanić, Ph.D. *Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split*

Marin Ordulj, Ph.D. *Assistant Professor of University Department of Marine Studies, University of Split*

Ana Maravić, Ph.D. *Associate Professor of Faculty of Science, University of Split*

Thesis accepted: **September 2023.**

SADRŽAJ

UVOD **1**

1.1. Opće značajke bakterija roda *Vibrio* 1

1.1.1. Morfologija bakterije *Vibrio gigantis* 1

1.1.2. Domaćin 2

1.2. Biofilm 3

1.2.1. Nastanak biofilma 5

1.3. Detekcija procesa stanične komunikacije QS 9

1.3.1. Mehanizmi detekcije procesa stanične komunikacije QS 10

1.4. Bioluminiscencija **11**

1.4.1. Bioluminiscencija *Vibrio fischeri* 12

1.4.2. Mehanizam bioluminiscencije u *Vibrio harveyi* 13

1.5. Rojenje **15**

1.6. Predviđanje funkcionalnog potencijala bakterijskih zajednica pomoću analize PICRUSt **18**

2. MATERIJALI I METODE **21**

2.1. Podrijetlo uzorka 21

2.2. Kalijev hidroksid test 21

2.3. Promatranje rojenja i testiranje bioluminiscencije u svrhu dokazivanja procesa stanične komunikacije QS 22

2.5. Elektroforeza DNA u pulsirajućem električnom polju (PFGE) 24

2.5.1. Priprema agaroznih blokova za elektroforezu PFG 24

2.5.2. Gel elektroforeza 25

2.5.3. Određivanje relativne brojnosti bakterijskih vrsta u metagenomskim uzorcima 27

3. REZULTATI **29**

3.1. Relativna zastupljenost pionirskih morskih bakterijskih vrsta u metagenomu biofilma u morskoj vodi i na površini uronjenih stakalaca 29

3.2. Predviđeni genetski sadržaj na bazi operona *lux* za proces stanične komunikacije QS 30

3.3. Određivanje veličine genoma bakterije *V. gigantis* metodom PFGE 32

3.4. Ispitivanje indukcije bioluminiscencije utemeljene na procesu bakterijske stanične komunikacije QS (engl. *quorum sensing*) 33

3.5. Formiranje rojeva stanica (engl. *swarmer cells*) bakterije *V. gigantis* 35

4. RASPRAVA **37**

5. ZAKLJUČAK **42**

6. METODIČKI DIO **43**

POPIS SLIKA **57**

POPIS TABLICA **59**

POPIS LITERATURE **59**

LITERATURA S INTERNETA **62**

METODIČKA LITERATURA **62**

SKRAĆENICE **62**

UVOD

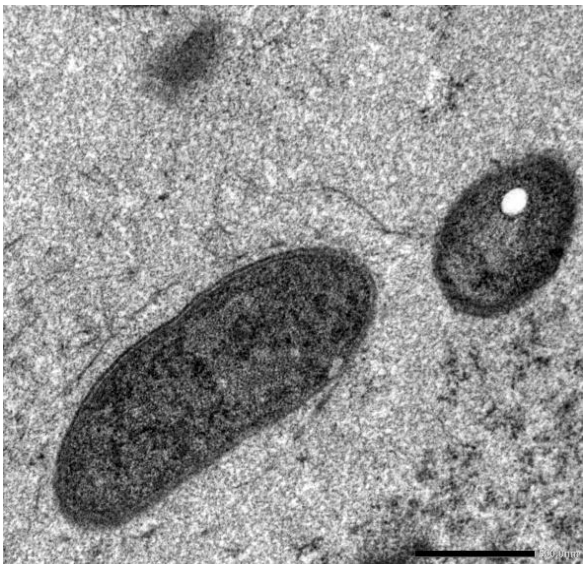
1.1. Opće značajke bakterija roda *Vibrio*

Pripadajući koljenu *Proteobacteria*, razredu *Gammaproteobacteria*, porodici *Vibrionaceae*, rod *Vibrio* uključuje 65 dokumentiraih heterotrofnih bakterijskih vrsta.[1] Rod *Vibrio* predstavljaju bakterije koje pretežito naseljavaju vodene okoliše, s naglaskom na morske i estuarijske vode u kojima često tvore neku vrstu interakcije s organizmima u rasponu od planktona do ribe.[2]

S brojem vrsta koji je uvijek u porastu, unutar ovog roda, valjano objavljena imena porasla su s 20 u 1981. na čak 63 u 2004. godini uključujući saprofitne, simbiotske vrste te one patogene za ljude i životinje.[2]

1.1.1. Morfologija bakterije *Vibrio gigantis*

Vibrio gigantis (gigantis iz Gigasa (div), specifični epitet *Crassostrea gigas*, vrste kamenica iz kojih su izolirani sojevi) karakteriziraju gram-negativne, zakrivljene, 1 μm široke i 2-3 μm duge stanice (Slika 1). Stanice su pokretne kao rezultat jedne ili više polarnih flagela. Na triptikaza soja agaru (TSA) formiraju prozirne, nerojuće, zaobljene kolonije, dok na tiosulfat citrat saharoznom agaru sa žučnim kiselinama (engl. *Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose, TCBS*) tvori žute, saharoza-pozitivne, prozirne kolonije veličine 5 mm.[3]



Slika 1. Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) stanica *Vibrio gigantis*, ultratanki prerez 60 nm (foto: Ivana Bočina, 2022., JEM JEOL 1400 Flash).

1.1.2. Domaćin

Rod *Vibrio* povezan je sa širokim rasponom vodenih životinja, uključujući ribe, rakove i mekušce. Zastupljen je u vodenom stupcu gdje čini dio mikrobne zajednice. Bakterije ovog roda u većini slučajeva su nepatogene te se mogu pronaći u zdravih životinja, njihovim tkivima te kao dio prirodne mikrobiote i sustavima akvakulture.[1] S druge strane određene vrste i sojevi roda *Vibrio* patogene su i izazivaju vibrioze. Vibrioze predstavljaju jedne od najtežih bolesti u akvakulturi, naročito kod rakova. Infekcija uzrokovana patogenim bakterijama iz roda *Vibrio* može biti pogubna, osobito tijekom faze proizvodnje ličinki rakova.[1] Baš sposobnost formiranja biofilma *Vibrio* spp. smatra se glavnim čimbenikom koji omogućava bakterijama preživljavanje široke lepeze uvjeta, od eukariotskih domaćina do vodenih okoliša.[4]

V. gigantis izvorno je izoliran iz hemolimfe uzgojene pacifičke kamenice.[2]

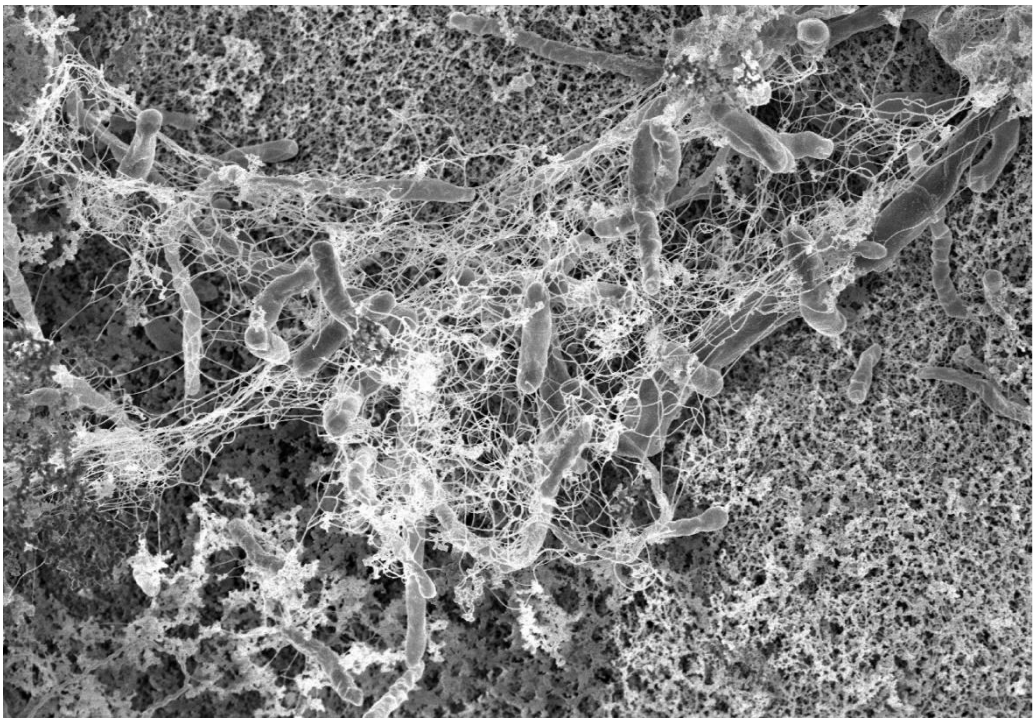
1.2. Biofilm

Već 1683. godine Antonie van Leeuwenhoek, uz pomoć vlastitog primitivnog mikroskopa, promatrao je i opisivao formaciju materije izolirane s vlastitih zubiju.[5] Međutim, u središtu velikih mikrobioloških otkrića, kroz proteklih 50 godina, shvaćanje u kojoj se mjeri rast i razvoj mikroba na različitim površinama pojavljuje u obliku složenih zajednica, odnosno u obliku biofilma, jedan je od najsuptilnijih.[6]

Do sredine dvadesetog stoljeća Claude Zobell i drugi zapazili kako morske bakterije u većini slučajeva nastanjuju čvrste površine spremnika u skupinama, rijetko u obliku pojedinačnih, suspendiranih stanica.[6] Interes za formaciju biofilma potaknut je tek ranih 1970-ih kada je Nils Høiby spoznao korelaciju između etiologije trajne infekcije i agregata bakterija u bolesnika s cističnom fibrozom. Od tada, prihvaćeno je da je formacija biofilma uključena u mnoge kliničke infekcije, a dokazi da biofilmovi doprinose patogenezi, posebno kod kroničnih infekcija, u stalnom su porastu.[5]

Kombinacija trodimenzionalnih tehnika snimanja visoke rezolucije, molekularnih tehnika fluorescentne hibridizacije i sustava (reaktora) za uzgoj biofilma pružili su uvid u biofilmove kao strukturno i dinamički složene biološke sustave, odnosno ne samo pasivne nakupine zalijepljenih stanica što se do tada smatralo.[6]

Gotovo svi mikroorganizmi imaju sposobnost stvaranja biofilma na raznim površinama, bilo biološkim ili inertnim.[5] Prvi korak predstavlja vezanje mikroorganizma za površinu, nakon čega počinje proizvoditi izvanstaničnu polimernu tvar (EPS) i time stvarati biofilm. Biofilm predstavlja skup mikrobnih stanica pričvršćenih jedan na drugog i/ili na površinu, zatvoreni unutar matriksa kojeg su sami proizveli (Slika 2). Matriks je sačinjen od mikrobnih biopolimera, uključujući proteine, izvanstaničnu DNA i egzopolisaharide, čije djelovanje stvara zasebno mikrookruženje. Dakle, za mnoge mikrobe (uključujući bakterije i arheje, kao i jednostanične eukariote kao što su ameba, dijatomeje i jednostanične alge), biofilm predstavlja štit od okolnih stresora. Osim toga, sami biofilm članovima zajednice omogućava olakšanu međusobnu interakciju te prikupljanje resursa.[5]



Slika 2. Elektronska mikrografija bakterijskog biofilma (izvor: https://www.nsf.gov/news/mmg/media/images/staph_biofilm5_f.jpg).

Nedvojbeno je da biofilmovi obavljaju složene funkcije koje nalikuju onima u diferenciranim stanicama višestaničnih organizama. Biofilmovi predstavljaju termodinamički otvorene sustave koji rastu, obrađuju energiju u obliku hranjivih tvari i metaboliziraju. Tijekom životnog ciklusa biofilma, proizvedeni matriks imobilizira stanice te stvara gradijente hranjivih tvari i plinova čiji je produkt mikrookruženje sa specifičnim fizičkim i kemijskim svojstvima. Svako mikrookruženje sadrži stanice specifično prilagođene uvjetima tog mikrookruženja. Stoga biofilmovi predstavljaju dinamične i organizirane mikrobne zajednice sastavljene od stanica koje su heterogene u prostoru i vremenu. Baš svojstva kao što su heterogenost i podjela rada među specijaliziranim tipovima stanica osnovna su obilježja višestaničnih organizama.

U zajednicama biofilma mješovitih vrsta podjela rada prvenstveno se postiže interakcijom različitih taksonomskih skupina, od kojih svaka od njih zauzima određenu nišu unutar biofilma na temelju svoje fiziologije i funkcionalnog profila.

U primjeru mikrobnih agregata koji život provode u plitkim vodenim okolišima, mikrobne vrste organizirane su ovisno o svojim metaboličkim i energetskim svojstvima, pri čemu u najvišim slojevima dominiraju aerobni fotosintetski organizmi izloženi svjetlu i kisiku, dok se dublji slojevi uglavnom sastoje od anaerobnih mikroorganizama. Prisutnost jedne skupine

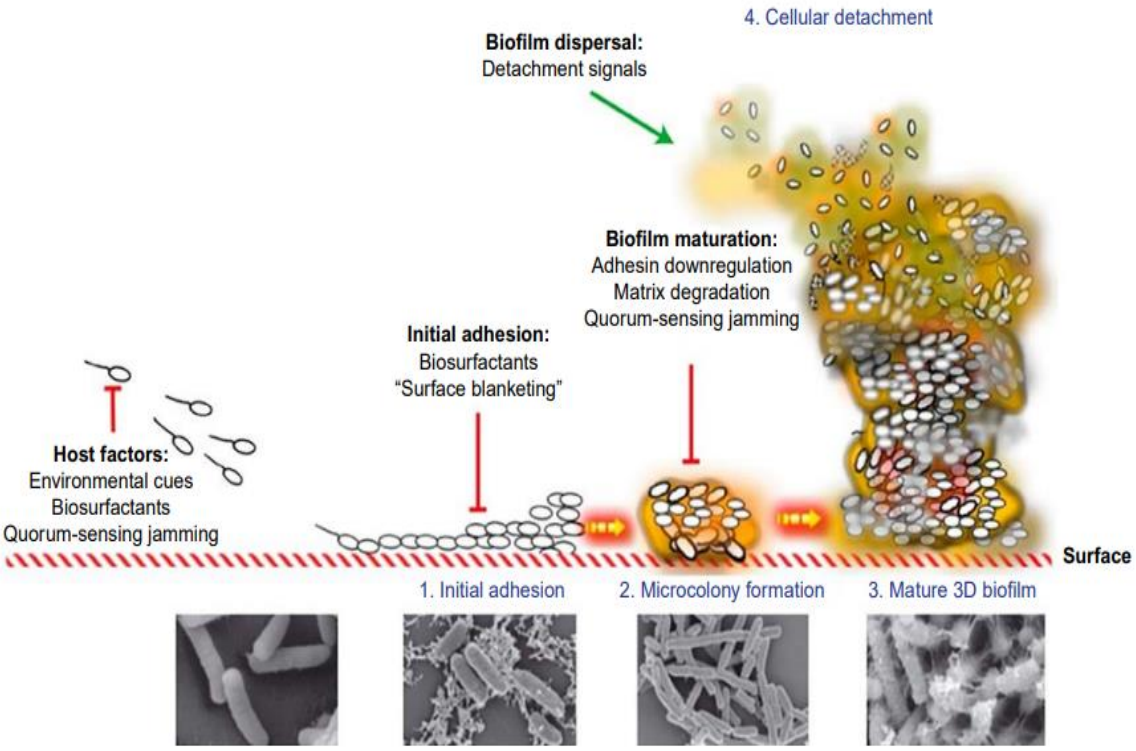
organizama rezultira stvaranjem pogodnih životnih uvjeta za drugu i obratno, što je ilustrirano aktivnim metaboliziranjem aerobnih organizama koji konzumiraju kisik čineći okoliš ispod sebe prikladnim za rast anaerobnih organizama.[7]

1.2.1. Nastanak biofilma

Naše trenutno poznavanje biofilma zasniva se na pretpostavci da biofilmovi predstavljaju sesilnu razvojnu fazu u životu jednostaničnih mikrobnih organizama. Shodno tome, organizmi koji tvore biofilm prolaze kroz životni ciklus koji uključuje i sesilne i pokretne faze.[7] Zajednice bakterija koje tvore biofilm od planktonskih stanica razlikuju se u mnogim aspektima, kao što su primjerice, stopa rasta, ekspresija gena, transkripcija kao rezultat različitih uvjeta mikrookruženja, a ta su veća osmolarnost, oskudica hranjivih tvari i veća gustoća stanica heterogenih bakterijskih zajednica.[8]

Formiranje biofilma započinje pričvršćivanjem stanica na podlogu od interesa, nakon čega slijedi njihova proliferacija te regrutiranje stanica iz okoline. Ovaj stadij predstavlja formiranje mikrokolonija, koje zatim sazrijevaju te se na kraju se raspršuju kao pokretne stanice i/ili stanični agregati oslobođeni iz mikrokolonija. Raspršene stanice se šire i predstavljaju temelj za stvaranje i razvoj novog biofilma.[7]

Također, smatra se da stvaranje biofilma ovisi o ekspresiji specifičnih gena koji vode uspostavljanje biofilma. Proces stvaranja biofilma odvija se kroz niz koraka koji dovode do prilagodbe mikroorganizama u različitim prehrambenim i okolišnim uvjetima, a sastoji se od sljedećih ključnih koraka (Slika 3) : (a) pričvršćivanje na površinu od interesa (b) formiranje mikrokolonije (c) trodimenzionalno formiranje strukture (d) stvaranje biofilma, sazrijevanje i odvajanje (raspršivanje).[9]



Slika 3. Faze procesa formiranja biofilma i prikaz svake elektronskim mikroskopom.[10]

1. korak – **PRIJANJANJE**

Kada bakterijska stanica dosegne površinu/nosač dovoljno blizu da je njezino kretanje vrlo sporo, uspostavlja reverzibilnu vezu s površinom i/ili s već prilijepljenim drugim mikroorganizmom na površini. Sustav čvrste i tekuće površine može pružiti idealno okruženje za pričvršćivanje i rast mikroorganizama (npr. krv, voda). Najčešće, pričvršćivanje i stvaranje biofilma na grube, hidrofilne i obložene površine osigurava bolje okruženje. Do povećanog prijanjanja dolazi i zbog povećanja, ali ne i prekoračenja kritične razine u brzini protoka, temperaturi vode ili koncentraciji hranjivih tvari. Prisutnost lokomotornih struktura na staničnim površinama kao što su flagele, pili, fimbrije, proteini ili polisaharidi također mogu pružiti prednost u stvaranju biofilma kada postoje mješovite zajednice.[9]

2. korak – **STVARANJE MIKROKOLONIJA**

Stvaranje mikrokolonija odvija se nakon što bakterije prione na fizičku površinu/biološko tkivo i to vezanje tada postaje stabilno što rezultira stvaranjem mikrokolonije. Bakterijsko umnožavanje u biofilmu počinje djelovanjem kemijskih signala, iniciranjem bakterijske stanične diobe unutar egzopolisaharidnog matriksa, što konačno rezultira stvaranjem mikrokolonija.[9] Genetski mehanizam proizvodnje egzopolisaharida aktivira se u trenutku kada intenzitet signala prijeđe određeni prag.

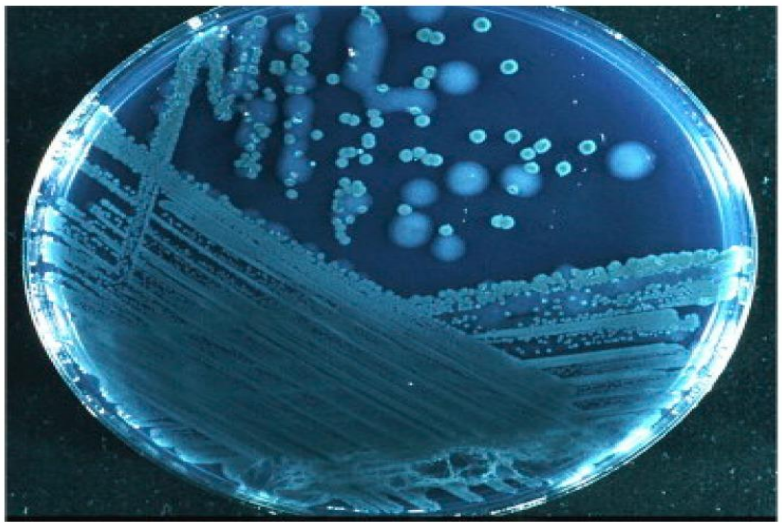
3. korak – **TRODIMENZIONALNO FORMIRANJE I SAZRIJEVANJE STRUKTURE**

Nakon faze formiranja mikrokolonija biofilma dolazi do ekspresije određenih gena potrebnih EPS-u koji je glavni strukturni materijal biofilma. Priopćeno je da vezanje bakterije samo po sebi može potaknuti stvaranje izvanstaničnog matriksa. S oformljenim matriksom slijedi stvaranje kanala ispunjenih vodom za transport hranjivih tvari unutar biofilma. Predložena je analogija krvožilnog sustava u usporedbi s vodenim kanalima u biofilmu, s ulogom distribucije različitih hranjivih tvari i uklanjanje otpadnih materijala iz zajednica u mikrokolonijama biofilma.[9]

4. korak – **ODVAJANJE**

Kada je formacija biofilma ustrojena, istraživači su primijetili da bakterije redovito napuštaju same biofilmove. Na taj način mogu biti podvrgnute brzom umnožavanju i raspršivanju. Odvajanje planktonskih bakterijskih stanica od biofilma programirano je, ima prirodni obrazac. Ponekad se pod utjecajem mehaničkih stresova bakterije odvajaju od kolonije u okolinu. Ali u većini slučajeva bakterije zaustavljaju proizvodnju EPS-a i odvajaju se u okoliš. Raspršivanje biofilmskih stanica odvija se odvajanjem novih formiranih stanica od rastućih stanica ili disperzijom biofilmskih agregata kao učinak toka ili zbog postizanja kritične gustoće stanica bakterijske populacije (engl. *quorum sensing*, QS). U biofilmu stanice se uklanjaju enzimskim

djelovanjam koje uzrokuje probavu alginata (Slika 4). Raspršene stanice iz biofilma imaju sposobnost zadržavanja određenih svojstava biofilma, kao što je neosjetljivost na antibiotike. Stanice raspršene iz biofilma kao rezultat rasta mogu se brzo vratiti u svoj normalni planktonski fenotip.[9]



Slika 4. *P. aeruginosa* iz ispljuvka pacijenta s cističnom fibrozom. Mukoidne (velike) i nemukoidne (male) kolonije. Mukoidna varijanta sluznice prekomjerno proizvodi alginat, koji je matriks u biofilmu *P. aeruginosa* u respiratornom traktu bolesnika s cističnom fibrozom. Mukoidne kolonije nalaze se samo u bolesnika s kroničnom biofilmskom infekcijom, a alginat iz kolonija sluznica stoga je antigen specifičan za biofilm.[5]

1.2.2. Značaj biofilma

Zajednice biofilma od velike su važnosti za funkcioniranje ekosustava, poticanje biogeokemijskih procesa, kruženje hranjivih tvari i bioremedijaciju. Korisni mikroorganizmi tvore biofilmove povezane s ljudskim, životinjskim i biljnim domaćinima kao bitan dio holobionta.[7]

Tvorba biofilma mikroorganizmima omogućava prilagodbu na promjenjive uvjete okoline kao što su promjena pH, osmolarnosti, oskudice hranjivih tvari, mehaničkih sila. S druge strane matriks biofilmu, odnosno bakterijama u njemu, omogućava dodatnu otpornost zbog čega ne samo da podnose otežavajuće uvjete, već postaju otporne i na antibiotike čime dovode do pojave infekcija bakterija rezistentnih na više vrsta lijekova, odnosno višestruko rezistentnih, ili čak panrezistentnih (neosjetljivi na sve dostupne antibiotike).[8]

1.3. Detekcija procesa stanične komunikacije QS

Značajke složnosti i života u zajednici krucijalne su komponente koje uvelike utječu na opstanak i razvoj ljudskih bića. Za razliku od ljudskih bića bakterije posjeduju sposobnost prilagodbe u različitim uvjetima okoline što im je omogućilo današnju široku rasprostranjenost na Zemlji te puno dužu egzistenciju od ljudi. Još ne tako davno prokariotske stanice bile su smatrane „gluhim organizmima“, čak tri stoljeća nakon njihova otkrića od strane Leeuwenhoeka.

Novija otkrića pak ukazuju da prilagodljivost bakterija uvjetima koji ih okružuju nije rezultat samostalnog djelovanja jedne bakterijske stanice, već da bakterijske stanice imaju razvijenu sposobnost međusobne komunikacije koja im omogućava adaptaciju. Taj biokemijski sustav komunikacije odvija se putem signalnih molekula (engl. *quorum sensing*, QS).[10]

U procesu stvaranja biofilma mnoge vrste bakterija međusobno komuniciraju baš putem sustava QS. To je sustav poticaja koji omogućava koordinaciju ekspresije gena s drugim stanicama i odgovor povezan s gustoćom njihove lokalne populacije. Tijekom stanične komunikacije QS, otpuštene signalne molekule vežu se za receptore novih bakterija te pomažu u transkripciji gena unutar jedne vrste bakterija, kao i između različitih bakterijskih vrsta.

Mehanizam QS omogućava komunikaciju između stanica istih i različitih vrsta koja uključuje stvaranje biofilma, odgovor na nestašicu hrane i stresna stanja u okolišu, kao što su antibiotici, dezinficijensi, identifikacija nepoželjnih vrsta, bakterijska kolonizacija, uspostavljanje normalne crijevne flore kao i prevencija štetne crijevne flore te mnoge druge (Slika 4).[9]

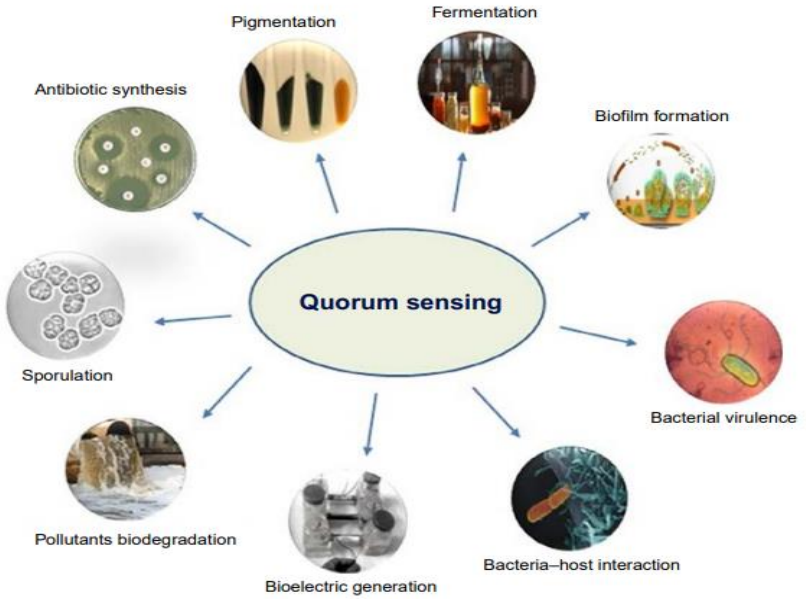
Signalne molekule koje sudjeluju u staničnoj komunikaciji QS nazivaju se "autoinduktori" (AI) i oslobađaju se u mikrookruženje, njihova koncentracija proporcionalna je s gustoćom bakterijskih stanica. Biološki odgovor (npr. ekspresija gena) inducira se nakon što AI dosegnu određeni koncentracijski prag, tzv. "kvorum", što dovodi do njihova vezivanja na specifične receptore.[11]

Autoinduktori se nakupljaju u okolišu s povećanjem gustoće bakterijske populacije. Promjene u koncentraciji autoinduktora bakteriji omogućavaju praćenje promjene u broju stanica, a samim time i kolektivnu promjenu globalnih obrasca ekspresije gena. Ovaj mehanizam populaciji bakterija omogućava kolektivnu regulaciju ekspresije gena te na kraju i ponašanje.

Bakterijama ovakva komunikacija omogućava ekspresiju sprecifičnih gena na samo određenim populacijskim gustoćama.

Procesi kontrolirani pomoću sustava QS neproduktivni su i neisplativi kada se odvijaju u pojedinačnim bakterijama, ali postaju učikoviti kada se radi o skupini bakterija.[12]

Sustavi QS kontroliraju stvaranje biofilma, sporulaciju, potencijal rasta, ekspresiju otpornosti na antibiotike, ekspresiju virulencije, autolizu, prijenos DNA, oksidativnu toleranciju na stres, metaboličku aktivnost, pokretljivost, sintezu antibiotika bakterijama koje proizvode antibiotike, sesilno naspram planktonskog ponašanja i - što je najvažnije - genetske odrednice virulencije.[13] Dakle, bakterijama omogućava da djeluju kao višestanični organizam.[11]

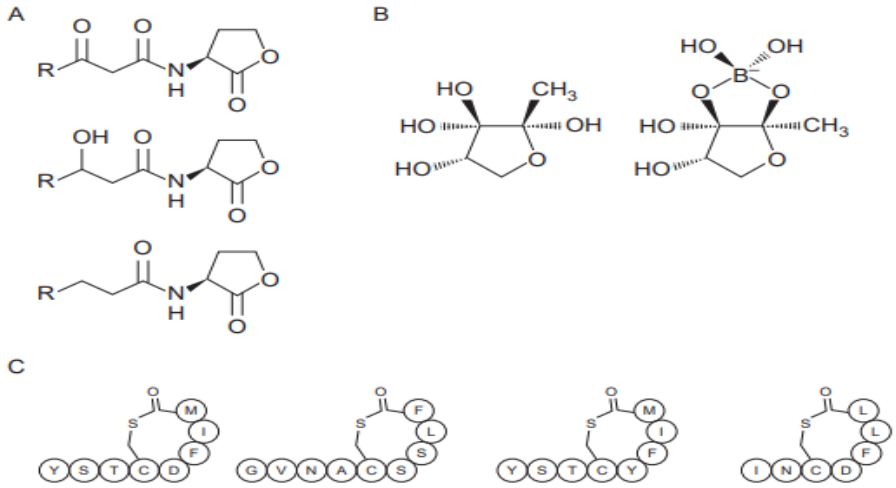


Slika 5. Glavni biološki procesi regulirani mehanizmom QS.[10]

1.3.1. Mehanizmi detekcije procesa stanične komunikacije QS

Sustavi uključeni u staničnu komunikaciju QS dijele se na tri glavne skupine: (a) LuxI/R sustav u Gram-negativnim bakterijama, općenito koristi acilirani homoserin lakton (AHL) kao signalnu molekulu, (b) sustav koji koristi modificirani oligopeptid (poznat kao autoinducirajući peptid (AIP)) i A-faktor; i (c) međuvrsna stanična komunikacija QS posredovana autoinduktorom-2 (AI-2) u gram-pozitivnim bakterijama i hibridnim sustavima. Stoga su identificirane različite obitelji signalnih molekula (Slika 6), uključujući dvije obitelji koje se često nalaze u mnogim vrstama: autoinduktori tipa 1 i tipa 2 (AI-1 i AI-2). AI-1 uglavnom se

nalaze u gram-negativnim vrstama koje pripadaju proteobakterijama, dok su AI-2 čini se univerzalni.[10]



Slika 6. Strukture nekih reprezentativnih QS signalnih molekula: (A) AHL, (B) AI-2, i (C) AIP (I, II, III, i IV).[10]

1.4. Bioluminiscencija

Pojam bioluminiscencija odnosi se na proizvodnju svjetlosti od strane živih organizama. Bioluminiscentne bakterije s različitim karakteristikama emisije bioluminiscencije identificirane su u porodicama *Vibrionaceae, Shewanellaceae i Enterobacteriaceae.*

Bioluminiscencija predstavlja fenomen emisije svjetlosti koja je rezultat reakcija oksidacije katalizirane enzimima u živim organizmima. Ovaj fenomen nalazimo u gotovo svim carstvima života koji posjeduju razne luciferaze i luciferine, enzime i molekule uključene u emisiju svjetlosti.

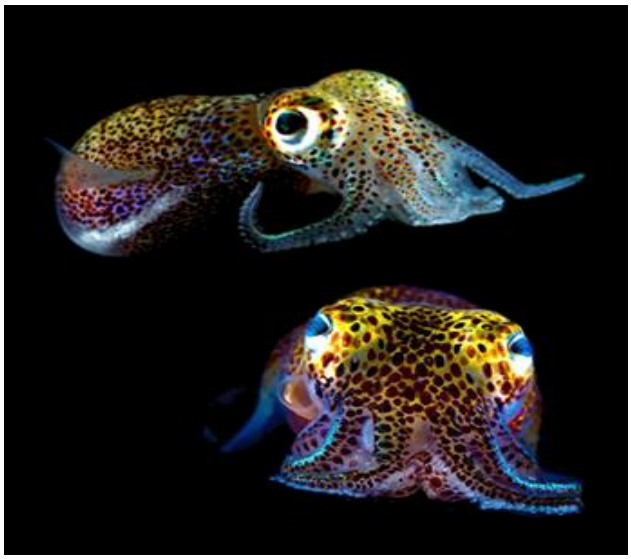
Bakterije s ovom sposobnošću uglavnom zauzimaju morska staništa kao sesilne, slobodno živuće ili u simbiozi s drugim morskim organizmima. Na molekularnoj razini, bioluminiscenciju omogućava kaskada kemijskih reakcija kataliziranih enzimima kodiranim *lux* operonom s redom gena *luxCDABEG*. Geni *luxA* i *luxB* kodiraju α odnosno β podjedinice enzima luciferaze zaslužnog za bioluminiscenciju u vrsta koje emitiraju svjetlost. Geni *luxC*, *luxD* i *luxE* čine kompleks reduktaze masnih kiselina, odgovoran za sintezu dugolančanog supstrata aldehida, a *luxG* kodira flavin reduktazu.[14]

1.4.1. Bioluminiscencija *Vibrio fischeri*

Neobičan oblik simbioze razvio se između halofilne bakterije *Vibrio fischeri* i havajske bobtail lignje (*Euprymna scolopes*).

Kao što je već spomenuto sustav stanične komunikacije QS jedan je od mehanizama koji omogućava bioluminiscenciju što je otkriveno baš uz pomoć ove simbioze. Bioluminiscentni *V. fischeri* predstavlja strateški postavljeni svjetlosni organ duž vanjske površine lignje (Slika 7). Kada bakterijska populacija dosegne graničnu koncentraciju aktivira operon luciferaze pri čemu se stvara vidljiva svjetlost. Koristi ovog odnosa za bakterije su te što imaju stalan izvor hranjivih tvari kao i utočište. S druge strane, izvor svjetlosti koji stvaraju bakterijski enzimi lignji omogućava kamuflažu i zaštitu od predatora. Tamni obris lignje silueta je uz zvjezdano nebo u vedrim noćima, čineći ih lako vidljivima odozdo grabežljivim ribama. Svjetlosni organi lignje pružaju zvjezdanu nebesku kamuflažu zahvaljujući izvoru svjetlosti koji pružaju veliki agregati *V. fischeri*. Bioluminiscencija ove vrste iz roda *Vibrio* i srodne vrste *Vibrio harveyi* aktivira se samo kada su prisutne velike koncentracije bakterija.[13]

Utvrđeno je da bakterijske stanice *V. fischeri* osjećaju kada je njihova gustoća naseljenosti dovoljna za stvaranje bioluminiscencije uz pomoć proizvodnje topljive molekule QS-a koja transkribira operon luciferaze onda kada su susjedne bakterijske populacije iznad unaprijed određene koncentracije praga.[13]



Slika 7. Simbioza između halofilne bakterije *V. fischeri* i havajske bobtail lignje (izvor: hawaiin-bobtail-squid.jpg (345×345) (nerdbot.com)).

1.4.2. Mehanizam bioluminiscencije u *Vibrio harveyi*

U srodnoj bioluminiscentnoj morskoj bakteriji *Vibrio harveyi*, dva različita autoinduktora (AI-1 i AI-2) reguliraju emisiju svjetlosti. U odnosu s eukariotima, *V.harveyi* obično je član komenzalne mikroflore, no u škampa *V. harveyi* predstavlja opasnog patogena.[12]

Većina gram-negativnih bakterijskih za staničnu komunikaciju QS koristi signalnu molekulu acilnog homoserina laktona (AHL) koja je ovisna o LuxI i LuxR tipu transkripcijskog regulatornog proteina. Nasuprot tome, sustav QS u bakterije *V. harveyi* sastoji se od višekanalnog dvokomponentnog puta transdukcije fosforelejnog signala.[12] Ovaj zamršeni krug predlaže se kako bi se olakšala komunikacija unutar istih i međuvrsnih stanica te kako bi *V.harveyi* pružio mehanizam za praćenje gustoće naseljenosti i sastava vrsta bakterijske zajednice.

U *V.harveyi*, bioluminiscencija ovisi o proizvodnji i detekciji dva različita autoinduktora, AI-1 i AI-2.[12]

Autoinduktorska sintaza LuxLM proizvodi AI-1, koji je 4-hidroksil C4 HSL. AI-2, sintetiziran LuxS enzimom, je furanosil borat diester 3A-metil-5,6-dihidro-furo [2,3-D][1,3,2] dioksa borole-2,2,6,6A tetraol. AI-1 i AI-2 otkrivaju se putem njihovih srodnih senzora LuxN i LuxPQ. LuxP je homologan periplazmatskom riboza vezajućem proteinu u *Escherichie coli*.[12] LuxP veže AI-2 u periplazmi, a podaci upućuju na to da kompleks LuxP-AI-2 komunicira s LuxQ-om kako bi transducirao signal AI-2.[12] LuxN i LuxQ su hibridne dvokomponentne senzorske kinaze koje sadrže periplazmičke osjetilne domene histidinske kinaze i citoplazmatskog regulatora odgovora.[12]

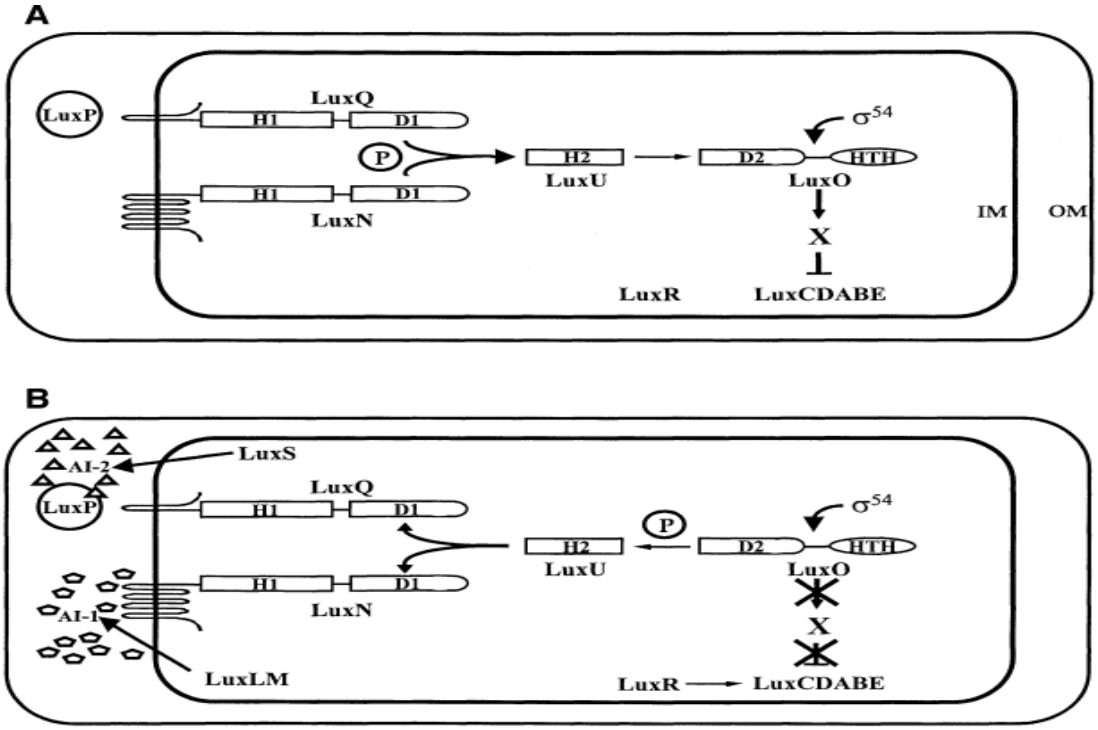
Pri niskoj gustoći stanica LuxN i LuxQ djeluju kao kinaze i prenose fosfat na zajednički protein fosfo transferaze LuxU (Slika 8A).[12]

LuxU prenosi fosfat proteinu regulatora odgovora LuxO. Zajedno s alternativnim faktorom sigme 54, pretpostavlja se da LuxO aktivira još neidentificiranog represora 'X', koji negativno regulira ekspresiju *luxCDABE* (luciferaza), a *V.harveyi* ne stvara svjetlo.[12]

Pri visokoj gustoći stanica senzori LuxN i LuxPQ otkrivaju svoje srodne autoinduktore, AI-1 i AI-2, koji pretvaraju LuxN i LuxQ iz kinaza u fosfataze (Slika 8B)[12]. Ova radnja preokreće tok

fosfata kroz put, od LuxO-a do LuxU-a, te na kraju do LuxN i LuxQ, gdje je fosforilna skupina hidrolizirana. Defosforilacija LuxO-a ga inaktivira i prekida ekspresiju represora X.[12]

Transkripcijski aktivator, LuxR (koji nije sličan drugim QS proteinima LuxR tipa) veže LuxCDABE promotor, aktivira transkripciju i proizvodi se svjetlost. Korištenje dva autoinduktora za kontrolu sustava QS u *V.harveyi* je intrigantan, jer je jedan autoinduktor dovoljan za regulaciju gena ovisnu o gustoći. Poznato je kako dva autoinduktora igraju različite uloge u staničnoj komunikaciji *V.harveyi*. Ova tvrdnja proizlazi iz dva otkrića: (i) AI-1 je vrlo specifičan i njegova poznata proizvodnja do sada je ograničena na *V. harveyi* i usko povezanu vrstu *Vibrio parahaemolyticus*; i (ii) proizvodnja AI-2 i AI-2 sintaze, LuxS, raširene su kod bakterija i do danas se pokazalo da postoje u >40 Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterijskih vrsta.[12]



Slika 8. *V. harveyi* sustav stanične komunikacije QS. Prikazana su stanja niske (A) i visoke (B) gustoće stanica sustava QS. Komponente i njihove pretpostavljene interakcije opisane su u tekstu. H, D, IM, OM i H-T-H označavaju histidin, aspartat, unutarnju membranu, vanjsku membranu i helix-turn-helix, redom. 'P' u krugu označava prijenos signala pomoću fosforelaja. Tijek fosfata u smjeru naprijed ide od histidina (H1) do aspartata (D1) do histidina (H2) do aspartata (D2). AI-1 i AI-2 prikazani su kao peterokuti i trokuti.[12]

1.5. Rojenje

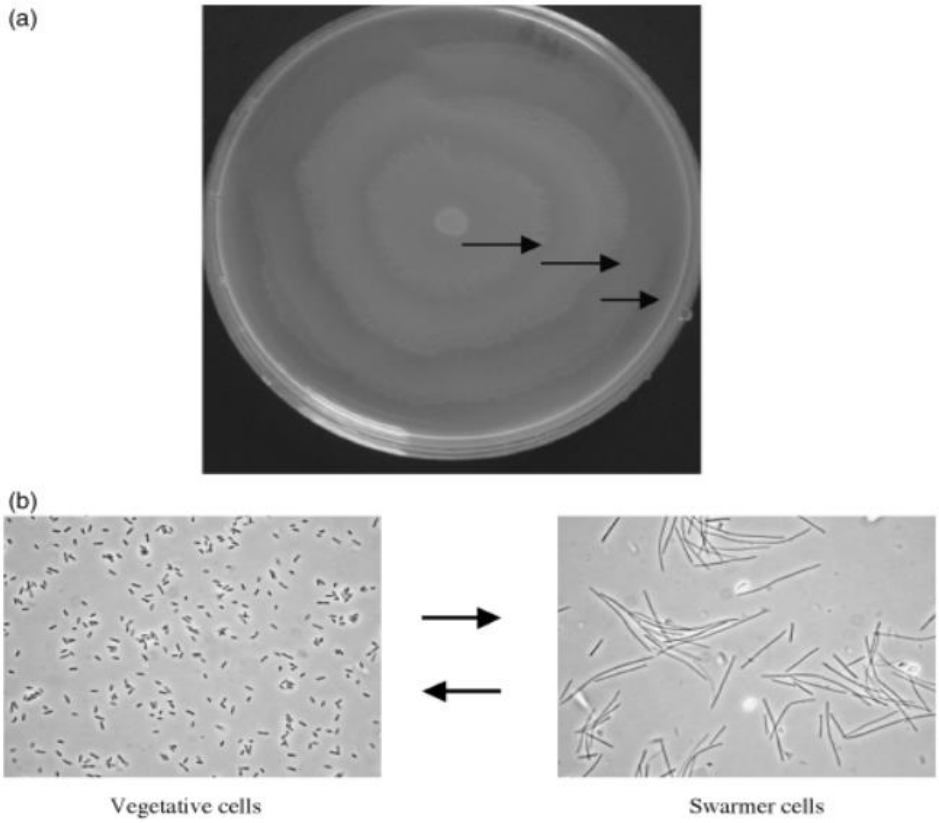
S obzirom na konstantne promjene kojima su bakterijske stanice izložene, kao odgovor na iste razvile su različite strategije koje im omogućavaju prilagodbu na novonastale uvjete, jedna od strategija predstavlja diferencijaciju u specijalizirane tipove stanica prilagođene tim uvjetima. Diferencijacija stanica uključuje velike promjene u staničnom ciklusu, morfologiji stanica te prostorno-temporalnoj organizaciji stanica.

Mnoge vrste bakterija, uključujući vrste iz rodova *Serratia, Aeromonas, Salmonella, Proteus* i *Vibrio* koriste se diferencijacijom stanica između planktonskih plivajućih stanica i rojućih stanica specijaliziranih za pokretanje čvrstom podlogom i u otežavajućim uvjetima.[15] Flagelarna pokretljivost u bakterijama visoko je reguliran i složen stanični proces koji zahtijeva visoka energetska ulaganja za kretanje i kolonizaciju domaćina. Pokretljivost igra važnu ulogu u načinu života *Vibrio* spp. kako vodenom okolišu tako i tijekom kolonizacije domaćina. Flagelarna pokretljivost kod vibriona povezana je s nekoliko staničnih procesa, kao što su kretanje, prijanjanje, kolonizacija, stvaranje biofilma i virulencija.[4]

Rojenje predstavlja koordiniranu brzu migraciju bakterijskih stanica preko površina, važan je ali slabo shvaćen aspekt bakterijskog višestaničnog ponašanja. Istraživanja rojenja otkrivaju osnovne mehanizme i funkcije ove razvojne faze i pružaju uvid u biomedicinsku važnost s obzirom da je rojenje povezano je s virulentnošću patogena kao što je *Proteus mirabilis, Salmonella* Typhimurium *i Clostridium septicum*.[16]

Kada je uzgajan na krutim hranjivim medijima, *P.mirabilis* pokazuje upečatljiv oblik pokretljivosti, odnosno rojenje, koji rezultira formiranjem valova pokretljivosti koji tvore različite „terase“ (Slika 9). Ovo karakteristično ponašanje rojenja omogućuje brzu identifikaciju bakterije *P. mirabilis* u kliničkim mikrobiološkim laboratorijima po karakterističnom uzorku bikova oka u kolonijama uzgojenim na agaru (Slika 9).[17]

Osim toga, svojstvo rojenja stanicama omogućuje povišenu otpornost na antibiotike u usporedbi s populacijom u mirovanju.[16]



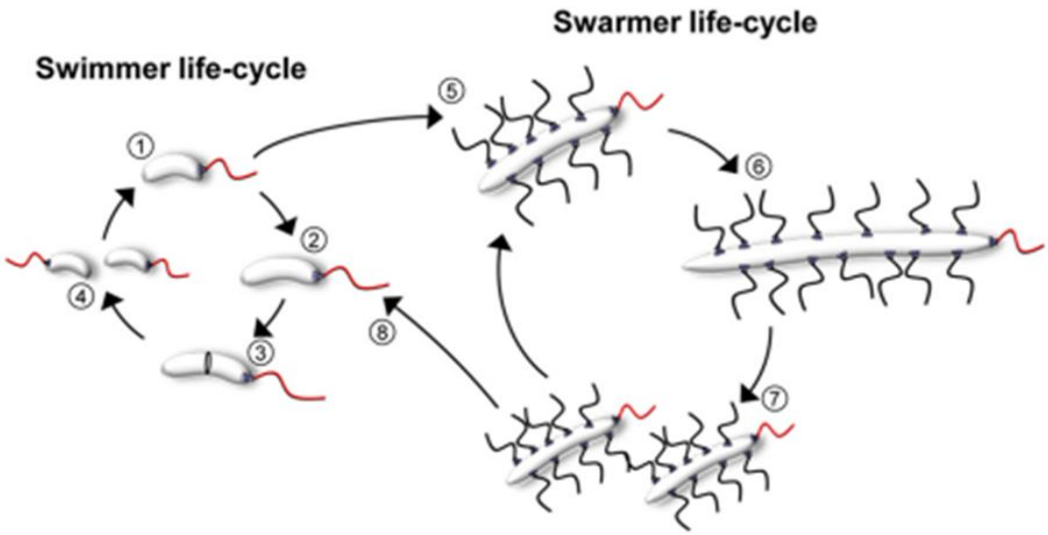
Slika 9. Fenotip rojenja bakterije *Proteus mirabilis*. (a) Prikaz strukture kolonija bakterije *P. mirabilis* na 1.5% agaru. Mala kap preko noći uzgojene kulture *P. mirabilis* smještena je u središte čvrste podloge uz inkubaciju na 37 °C preko noći. Strelice označavaju pojedinačne terase koje predstavljaju jedan ciklus diferencijacije i rojenja nakon kojeg slijedi konsolidacija i dediferencijacija. (b) Morfologija vegetativnih i rojećih stanica prikazana pomoću mikroskopije faznog kontrasta. Vegetativne stanice dobivene su iz stanica uzgojenih u bujonu dok su rojeće stanice dobivene su iz najudaljenijeg dijela svježeg prstena rojećih stanica.[17]

Još jedan primjer organizma koji prolazi spomenute diferencijacije, između plivajućih i rojućih stanica, je *V. parahaemolyticus,* široko rasprostranjen oportunistički humani patogen koji najčešće uzrokuje gastroenteritis povezan s konzumacijom sirove morske hrane.

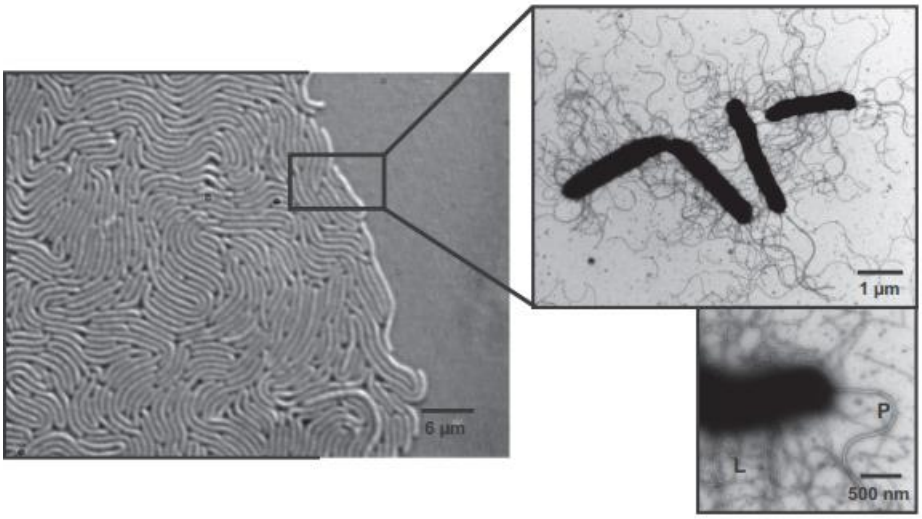
Plivajuće stanice *V. parahaeomlyticus* kratke su stanice oblika štapića optimizirane za plivanje u tekućem mediju (Slika 10). Međutim, kada iste stanice dođu u dodir s čvrstom površinom pokreće se proces diferencijacije u rojuću stanicu (engl. *swarmer cell*). Unutar rojućih kolonija postoje razlike u veličini stanica, a vjerojatno i tipu stanica.[15]

Na periferiji kolonije roja, stanice se okupljaju u izrasline koje se protežu prema van iz kolonije i stanica složenih u nekoliko slojeva. Bliže središtu stanice su složene u više slojeva te su znatno kraće od stanica u izraslinama. Stanice rojeva mogu održavati način života roja, gdje podjela poslova rezultira dvjema novim stanicama rojeva; alternativno, rojevi se mogu dediferencirati natrag u stanice plivača, ovisno o uvjetima.[15] Jedan od prvih koraka u diferencijaciji rojućih stanica je inhibicija stanične diobe, što rezultira vrlo izduženim nitastim stanicama rojeva u obliku štapića. Druga velika promjena tijekom diferencijacije rojućih stanica je proizvodnja mnoštva bočnih flagela važnih za rojenje koje se vjerojatno koriste za površinski kontakt, kontakt između stanica i interakciju između skupina stanica radi koordinacije njihova kretanja po površinama (Slika 10). Zanimljivo je da su flagelarni sustavi korišteni od plivačkih i rojućih stanica različiti, ali čini se da oba dijele središnji sustav kemotaksije koji je potreban za reguliranje kemotaktičkog ponašanja i flagelarne rotacije.[15]

Bakterije *Vibrio alginolyticus* i *V. parahaemolyticus* koriste jednu polarnu flagelu za plivanje u tekućem mediju, ali na čvrstim površinama diferenciraju se u izdužene rojuće stanice s više bočnih flagela (Slika 11).



Slika 10. Stanični ciklusi *V. parahaemolyticus*.
Tijekom plivaćkog oblika, stanice se izdužuju (1–3) i na kraju se dijele po sredini stanice što rezultira s dvije stanice plivača potomaka (4). Nakon površinskog dodira, stanice plivača mogu prerasti u nitaste bočno flagelirane stanice roja (5). Stanice rojeva mogu nastaviti životni stil roja, gdje se događaju podjele poslova koje mogu rezultirati novim stanicama potomstva roja (5–7); alternativno rojevi mogu dediferencirati natrag u stanice plivača (8) i ponovno ući u ciklus stanice plivača (1–4).[15]

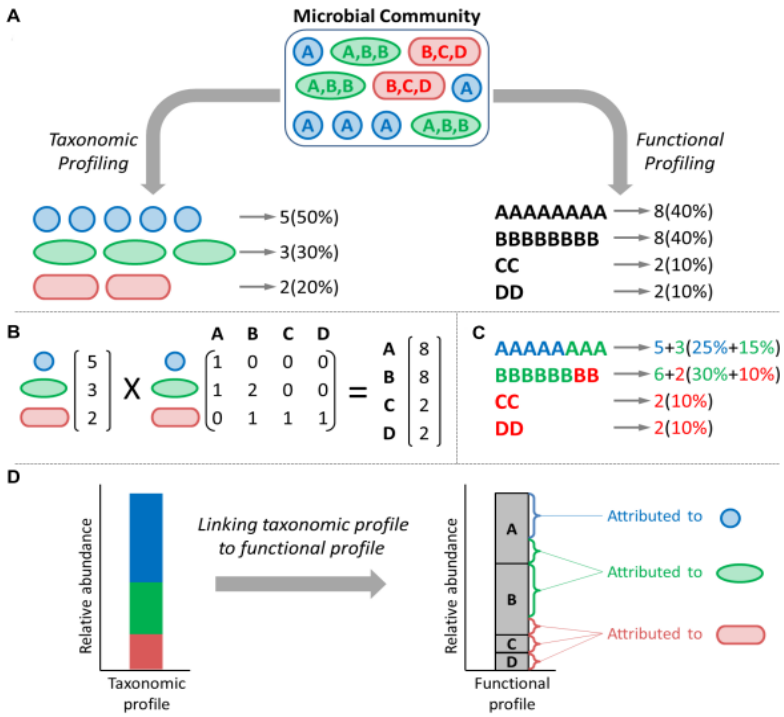


Slika 11. TEM mikrografija stanica s polarnim (P) i lateralnim (L) flagelama.[16]

1.6. Predviđanje funkcionalnog potencijala bakterijskih zajednica pomoću analize PICRUSt

PICRUSt (engl. *Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*) je bioinformatički softverski paket dizajniran za predviđanje funkcionalnog sadržaja ili potencijala mikrobnih zajednica na temelju njihovog taksonomskog sastava, koji se obično izvodi iz marker gena poput gena *16S* r*RNA*.[18] Djeluje pod pretpostavkom da je funkcionalni potencijal zajednice povezan s genetskim sadržajem mikroorganizama koji je čine (Slika 12).

Funkcionalni profil kao linearna kombinacija odnosi se na ideju da se funkcionalni sadržaj mikrobne zajednice može procijeniti kao linearna kombinacija taksonomskog sastava i genomskog sadržaja svakog taksona unutar zajednice. Drugim riječima, svaki takson doprinosi ukupnom funkcionalnom potencijalu zajednice na temelju svog genomskog sadržaja i relativnog obilja. PICRUSt dekonvoluira funkcionalne profile u funkcionalne profile specifične za takson.[19] To znači da pokušava pripisati zastupljenost svake funkcije određenim svojstvima u zajednici. Procjenjuje koji se udio zastupljenosti svake funkcije može pripisati svakom taksonu.



Slika 12. Funkcionalni sadržaj mikrobne zajednice može se procijeniti kao linearna kombinacija taksonomskog sastava i genomskog sadržaja svakog taksona unutar zajednice.[30]

Kako bi se odredila uključenost određenog taksona u cjelokupni funkcionalni potencijal i metaboličke putove, PICRUSt koristi informacije iz genomskih baza podataka kao što je KEGG (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).[20] KEGG je opsežan izvor koji mapira gene u putove i pruža informacije o metaboličkim funkcijama i drugim biološkim procesima.

Opći pregled kako PICRUSt radi i kako koristi podatke iz KEGG baze podataka uključuje sljedeće postupke:

1. Referentna baza genomskih podataka: PICRUSt se oslanja na referentnu genomsku bazu podataka koja povezuje gene s funkcionalnim svojstvima, kao što su metabolički putovi i biološke funkcije. KEGG se obično koristi za ovu svrhu.

2. Konstrukcija filogenetskog stabla: PICRUSt konstruira filogenetsko stablo na temelju sekvenci gena *16S rRNA* mikroorganizama u zajednici. Ovo stablo predstavlja evolucijske odnose među organizmima.

3. Predviđanje funkcionalnih profila: PICRUSt zatim predviđa funkcionalni sadržaj mikrobne zajednice korištenjem filogenetskog stabla i baze podataka referentnog genoma. Zaključuje o

prisutnosti specifičnih gena u genomu svakog organizma na temelju njegovog položaja u filogenetskom stablu i gena za koje se zna da su prisutni u blisko srodnim organizmima.

4. Funkcionalni doprinos: Kombiniranjem predviđenog sadržaja gena svakog taksona s njihovom relativnom zastupljenošću u zajednici, PICRUSt procjenjuje doprinos svakog taksona ukupnom funkcionalnom potencijalu i metaboličkim putevima zajednice.

5. Mapiranje puta KEGG-a: PICRUSt može dodatno dodijeliti funkcionalna predviđanja određenim metaboličkim putovima koristeći informacije iz KEGG putova. To omogućuje istraživačima da razumiju koji će metabolički putovi vjerojatno biti aktivni u zajednici na temelju predviđenog sadržaja gena.

PICRUSt uzima u obzir varijacije u broju kopija gena *16S rRNA* u različitim taksonima kako bi poboljšao točnost svojih predviđanja.[18] Neki mikroorganizmi imaju višestruke kopije gena *16S rRNA* u svojim genomima, dok drugi imaju samo jednu kopiju. Ova varijacija broja kopija može utjecati na procjenu brojnosti mikroorganizama na temelju podataka o sekvenciranju *16S rRNA*. Kako bi se to uskladilo, PICRUSt koristi informacije o broju kopija gena *16S rRNA* za različite taksone.[18] Te se informacije obično dobivaju iz baza podataka koje daju procjene broja kopija gena za različite mikroorganizme. Tijekom analize, PICRUSt normalizira relativnu zastupljenost operativnih taksonomskih jedinica (OTU) na temelju njihovih odgovarajućih brojeva kopija gena *16S rRNA*. Ovo pomaže u pružanju točnijeg prikaza stvarne zastupljenosti svakog taksona u zajednici, uzimajući u obzir inherentne varijacije u broju kopija gena.

Ukratko, PICRUSt koristi kombinaciju filogenetskih informacija, predviđanja genomskog sadržaja i referentnih baza podataka kao što je KEGG za procjenu funkcionalnog sadržaja mikrobnih zajednica, zaključivanje doprinosa specifičnih za taksone i predviđanje uključenosti u metaboličke putove.

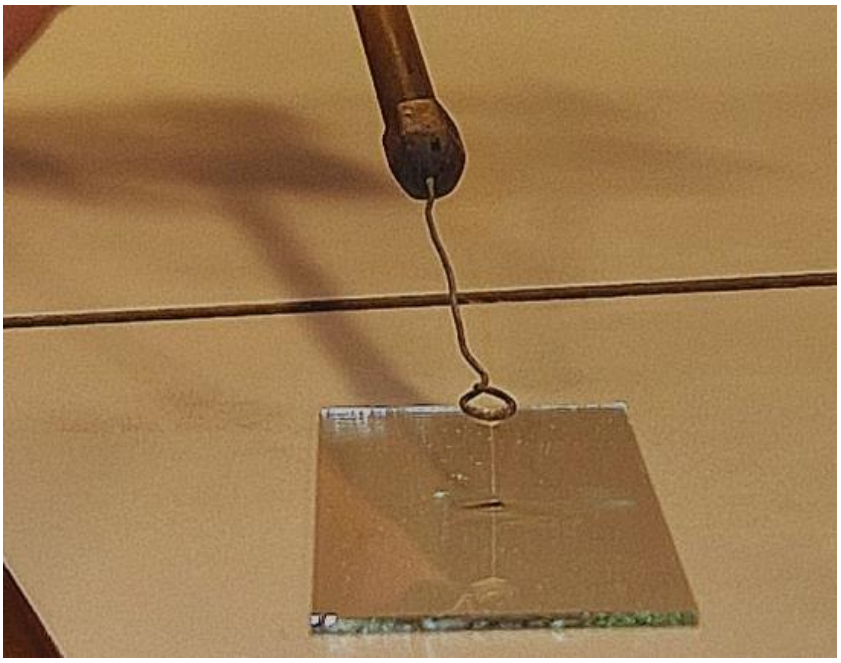
2. MATERIJALI I METODE

2.1. Podrijetlo uzorka

Uzorak mora s bakterijom *V. gigantis* sakupljen je u bazenu sa slobodnom cirkulacijom morske vode, na Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu (43◦30’28.8’’N, 16◦23’18.1’’E), Hrvatska.

2.2. Kalijev hidroksid test

Na čisto predmetno stakalce postavljena je kap otopine 3% kalijeva hidroksida. Nekoliko kolonija bakterije *V. gigantis* emulgirano je u kapi kalijeva hidroksida dok nije dobivena gusta suspenzija (Slika 13). Smjesa je kontinuirano miješana 60 sekundi nakon čega je eza uronjena u suspenziju i lagano povučena.



Slika 13. Kalijev hidroksid test (foto: Vana Marta Vukman).

Test s kalijevim hidroksidom koristi se za otkrivanje prisutnosti gram-negativnih bakterija. Kada se gram-negativne bakterije pomiješaju s KOH, dolazi do kemijske reakcije koja uzrokuje lizu ili pucanje staničnih stijenki bakterija. To rezultira oslobađanjem staničnog sadržaja, uključujući DNA. Test se smatra pozitivnim ako nakon uzimanja uzorka iz suspenzije KOH

smjesa postane viskozna ili žilava zbog oslobođene DNA. Ovo je karakteristična značajka gram-negativnih bakterija i pomaže ih razlikovati od gram-pozitivnih bakterija, koje ne pokazuju ovu reakciju s KOH.

2.3. Promatranje rojenja i testiranje bioluminiscencije u svrhu dokazivanja procesa stanične komunikacije QS

Za eksperimentalne potrebe uzgoja bakterija korišten je svježe pripremljeni Marine agar (MA, Difco2216). Agar je raspodijeljen po Petrijevim zdjelicama (po 20mL u svakoj). Uz MA, korišten je Marine bujon (MB, 20 epruveta) (Tablica 2) za namnažanje svježe kulture *V. gigantis*, Luminiscentni agar (LM, 250 ml) te BOSS medij-kruti, za potrebe određivanja luminiscencije.

V. gigantis inokuliran je iz glicerola u bujon i agar MA te inkubiran na 18-20°C 48h. Zatim je presađen na MA, LM i BOSS medij (po tri Petrijeve zdjelice). Praćen je rast na hranjivim podlogama te su promatrane pojave rojenja (engl. *swarming*) i luminiscencije na LM i BOSS medijima.

V. gigantis je inokuliran paralelno sa *Photobacterium* spp. na MA, LM i BOSS medij u triplikatima te su naposlijetku praćeni rast pojava rojenja te luminiscencije *V. gigantis* na LM i BOSS medijima (Tablica 1).

Tablica 1. Sastav hranjivih tvari i soli za pripremu medija LM i BM.

Luminiscentni agar

Volumen	**Kvašćev ekstrkt**	**Tripton**	**CaCO3**	**Agar**	**Glicerol**	**More (mL)**
mL	**5**	**5**	**1**	**15**	**1**	**1000**
50	0.25	0.25	0.05	0.75	0.05	50.0
100	0.50	0.50	0.10	1.50	0.10	100.0
150	0.75	0.75	0.15	2.25	0.15	150.0
200	1.00	1.00	0.20	3.00	0.20	200.0
xqs250	1.25	1.25	0.25	3.75	0.25	250.0
300	1.50	1.50	0.30	4.50	0.30	300.0

BOSS medij

Volumen	Pepton	Goveđi ekstrakt	NaCl	Agar	Glicerol	dH2O (mL)
mL	**10**	**5**	**30**	**15**	**1**	**1000**
50	0.50	0.25	1.50	0.75	0.05	50.0
100	1.00	0.50	3.00	1.50	0.10	100.0
150	1.50	0.75	4.50	2.25	0.15	150.0
200	2.00	1.00	6.00	3.00	0.20	200.0
250	2.50	1.25	7.50	3.75	0.25	250.0
300	3.00	1.50	9.00	4.50	0.30	300.0

Tablica 2. Sastav hranjivih tvari i soli za pripremu medija MB.

Volumen	MB (g)	Agar (g)	dH_2O (mL)
	37.4	**15**	**1000**
100	3.74	1.5	100
200	7.48	3	200
250	9.35	3.75	250
300	11.22	4.5	300
350	13.09	5.25	350
400	14.96	6	400
500	18.7	7.5	500

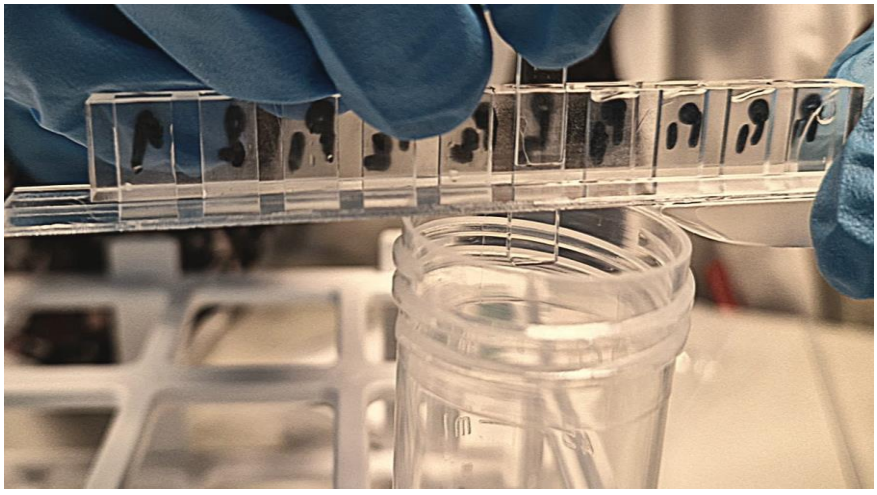
2.5. Elektroforeza DNA u pulsirajućem električnom polju (PFGE)

Genomska DNA bakterije *V. gigantis* podvrgnuta je elektroforezi u pulsirajućem električnom polju (PFGE) kako bi se odredila približna veličina u parovima baza (bp).

2.5.1. Priprema agaroznih blokova za elektroforezu PFG

Za pripremu agaroznih blokova 50 µL 2% agaroze s niskim talištem (invitrogen, UltraPureTM 136 LMP Agaroza) pomiješano je 50 µL osnovne otopine genomske DNA bakterije *V. gigantis* i prebačeno u kalup za blokove (BIO-RAD, CHEF Mapper XA System). Pomiješani su jednaki volumeni (200 µL) bakterijske genomske DNA i otopljene 2% agaroze, a smjesa je pipetom (vrhovi pipete od 200 µL) raspoređena u kalupe za izradu agaroznih blokova. Kalup za izradu agaroznih blokova pohranjen je u zamrzivač (-20°C) na dvije minute.

Nadalje, kada je gel očvrsnuo (1 h) traka s dna kalupa za agarozne blokove uklonjena je, a blokovi su gurnuti iz kalupa u 5mL pufera za lizu (Slika 14). Inkubirani su u modificiranom SM puferu s natrijevim dodecil sulfatom (SDS) (0.5%) i proteinazom K (Macherey-Nagel, 0.26 U/mL) na 56°C tijekom 24 sata. Nakon završene inkubacije pufer za lizu je uklonjen i 2 mL pufera za ispiranje (20 mM tris HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0) dodano je agaroznim blokovima. Nakon 1 sata pufer za ispiranje je, dekantiran te su obavljena tri daljnja koraka ispiranja s 30 minuta između svakog ispiranja kako bi se osiguralo potpuno uklanjanje pufera za lizu.



Slika 14. Izbacivanje agaroznih blokova iz kalupa za izradu (foto: Vana Marta Vukman).

2.5.2. Gel elektroforeza

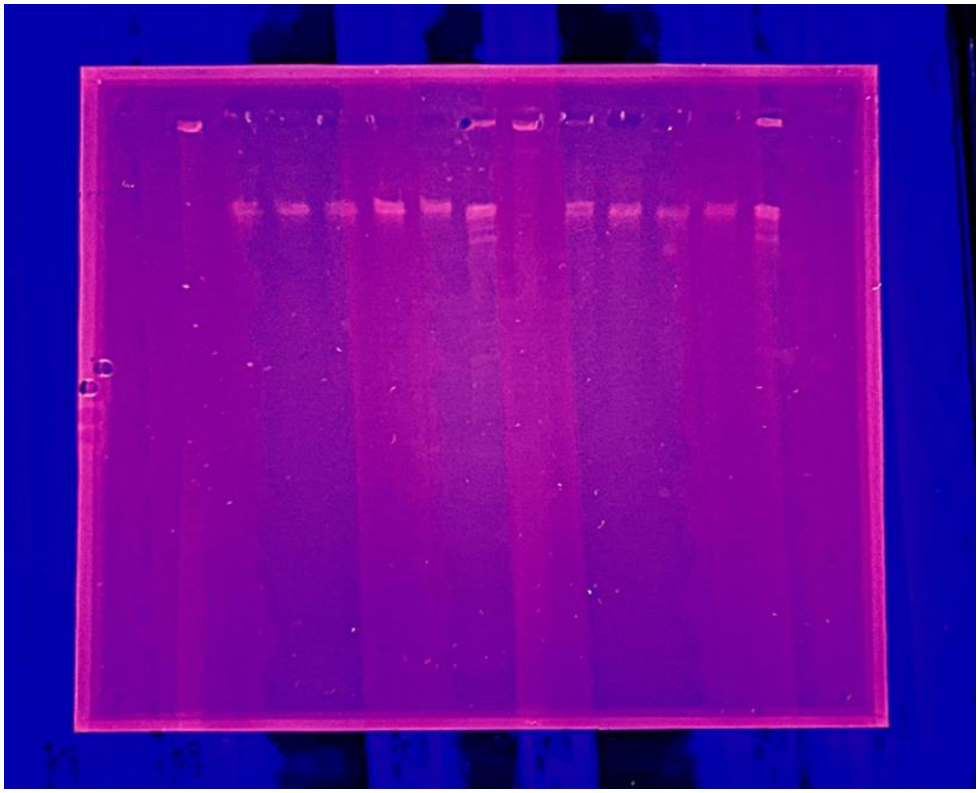
Agarozni blokovi tj. fragmenti koji sadrže standarde molekulskih masa i uzorke genomske DNA bakterije *V. gigantis* naneseni su u jažice te zatim prekriveni 1% rastopljenom agarozom (Slika 15). Zatim je dodan 1% gel za elektroforezu u izmjeničnom polju (BIO-RAD) koji je pripremljen otapanjem 1,3 g agaroze u sterilnom 0,5 x TBE puferu (0.045 M Tris, 0.045 M borna kiselina, 0.001 M EDTA) pri temperaturi od 55 ˚C.

Slika 15. Nanošenje agaroznih blokova u jažice (foto: Vana Marta Vukman).

Elektroforeza u promjenjivom električnom polju je provedena pomoću CHEF-DR III sustava sa rashladnim modulom (BIO-RAD) prema sljedećim parametrima: početno vrijeme prebacivanja 0,3 sekunde, napon 6 V/cm, kut električnog polja 120° pri 14°C u trajanju od 19.5 sati (Slika 16).

Slika 16. Uređaj za PFGE elektroforezu (foto: Vana Marta Vukman).

Po završenoj elektroforezi PFGE gel je obojan etidijevim bromidom preko noći, nakon čega je kratko odbojan u Mili-Q vodi. Uspješnost razdvajanja uzoraka genomske DNA bakterije *V. gigantis* i standarda za određivanje veličine utvrđena je pregledom gela na UV transiluminatoru (Slika 17).



Slika 17. Agarozni gel s vidljivim fragmentima (engl. *DNA bands*) uzoraka genomske DNA bakterije *V. gigantis* nakon izlaganja na UV transiluminatoru (foto: Vana Marta Vukman).

2.5.3. Određivanje relativne brojnosti bakterijskih vrsta u metagenomskim uzorcima

Relativna brojnost bakterijskih vrsta u metagenomskim uzorcima izračunava se na temelju broja amplikona gena *16S rRNA*, korištenjem podataka sekvenciranja sljedeće generacije (NGS).

1. Analiza podataka:

• sekvence DNA (engl. ***raw sequence***) dobivene sekvenciranjem sljedeće generacije (NGS) obrađuju se i analiziraju kako bi se identificirale prisutne bakterijske vrste i njihova relativna brojnost u svakom uzorku.

2. Grupiranje u operativne taksonomske jedinice (engl: ***operational taxonomic unit***, OTU):

• u analizi gena 16S rRNA, sekvence se obično grupiraju u operativne taksonomske jedinice (OTU)

• OTU-ovi predstavljaju skupine sekvenci koje su međusobno slične na unaprijed definiranoj razini sličnosti (npr. 97% sličnosti).

• svaki OTU je taksonomski klasificiran kako bi se odredilo kojoj bakterijskoj vrsti odgovara. To se često radi pomoću referentnih baza podataka i algoritama za poravnanje (engl. *alignment*).

3. Brojanje amplikona:

• Za svaku identificiranu bakterijsku vrstu (OTU), broj odgovarajućih amplikona gena 16S rRNA se broji u podacima sekvenciranja. Time se mjeri brojnost te vrste u uzorku.

4. Normalizacija:

• kako bi se izračunala relativna brojnost, brojanje se obično normalizira kako bi se uzele u obzir razlike u dubini sekvenciranja između uzoraka. Uobičajene metode za normalizaciju uključuju razrjeđivanje ili skaliranje kumulativnog zbroja (engl. ***cumulative sum scaling***, CSS***).***

5. Izračunavanje relativne brojnosti vrsta:

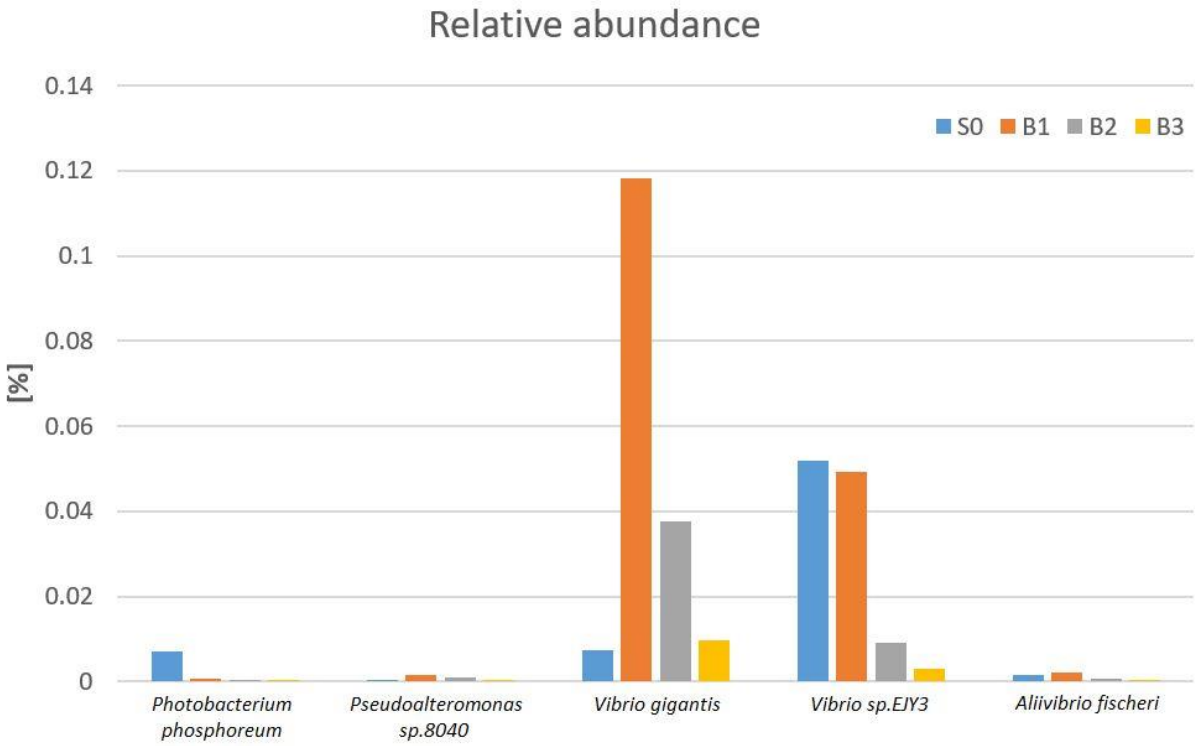
• na kraju, relativna brojnost svake bakterijske vrste u uzorku izračunava se kao udio ukupnih amplikona gena 16S rRNA u uzorku. Ovo se često izražava kao postotak ili relativna brojnost.

Slijedeći ove korake i stvarajući grafikone ili dijagrame kako bi vizualno predstavili relativnu brojnost bakterijskih vrsta tijekom vremena (S0, B1, B2, B3), može se dati jasno objašnjenje dinamike bakterijskih zajednica tijekom procesa stvaranja biofilma.

3. REZULTATI

3.1. Relativna zastupljenost pionirskih morskih bakterijskih vrsta u metagenomu biofilma u morskoj vodi i na površini uronjenih stakalaca

Relativna zastupljenost (brojnost) bakterijskih vrsta u metagenomskim uzorcima morske vode i biofilma izraslog na površini uronjenih stakalaca određena je na temelju broja amplikona gena *16S rRNA*, korištenjem podataka sekvenciranja sljedeće generacije (NGS). Dobiveni podaci važni su za razumijevanje dinamike bakterijskih zajednica tijekom stvaranja biofilma i uloge pojedinih bakterija u procesu. Relativna brojnost označava udio svake vrste unutar mikrobne zajednice u određenoj vremenskoj točki, odnosno uzorku (S0, B1, B2, B3).



Slika 18. Relativna zastupljenost pionirskih bakterijskih vrsta u morskoj vodi (S0) i tijekom prva tri dana formiranja biofilma na površini uronjenih stakalaca (B1, B2 i B3). Relativna zastupljenost utemeljena je na broju amplikona gena *16S rRNA* u metagenomu (uz suglasnost Luke Gujinovića) .

V. gigantis pokazuje intenzivno prianjanje tijekom prvog dana stvaranja biofilma (B1), koje se znatno smanjilo u narednim danima (B2 i B3) (Slika 18). Jedna je mogućnost da je apsolutni broj sekvenci *V. gigantis* u uzorcima stagnirao, a druge apsolutne vrijednosti porasle, uzrokujući smanjenje njegove relativne brojnosti. Druga je mogućnost da se postupno odvojio nakon prianjanja. U svakom slučaju, njegova prisutnost prvog dana biofilma (B1) čini ga vrlo poželjnim modelom za proučavanje dinamike adhezije. S druge strane, brojnost *Vibrio* sp. *EJY3* pokazuje veću zastupljenost u uzorku morske vode (S0), 1. dana (B1) polako opada dok je 2. (B2) i 3. (B3) dana slabije zastupljena (slika 18).

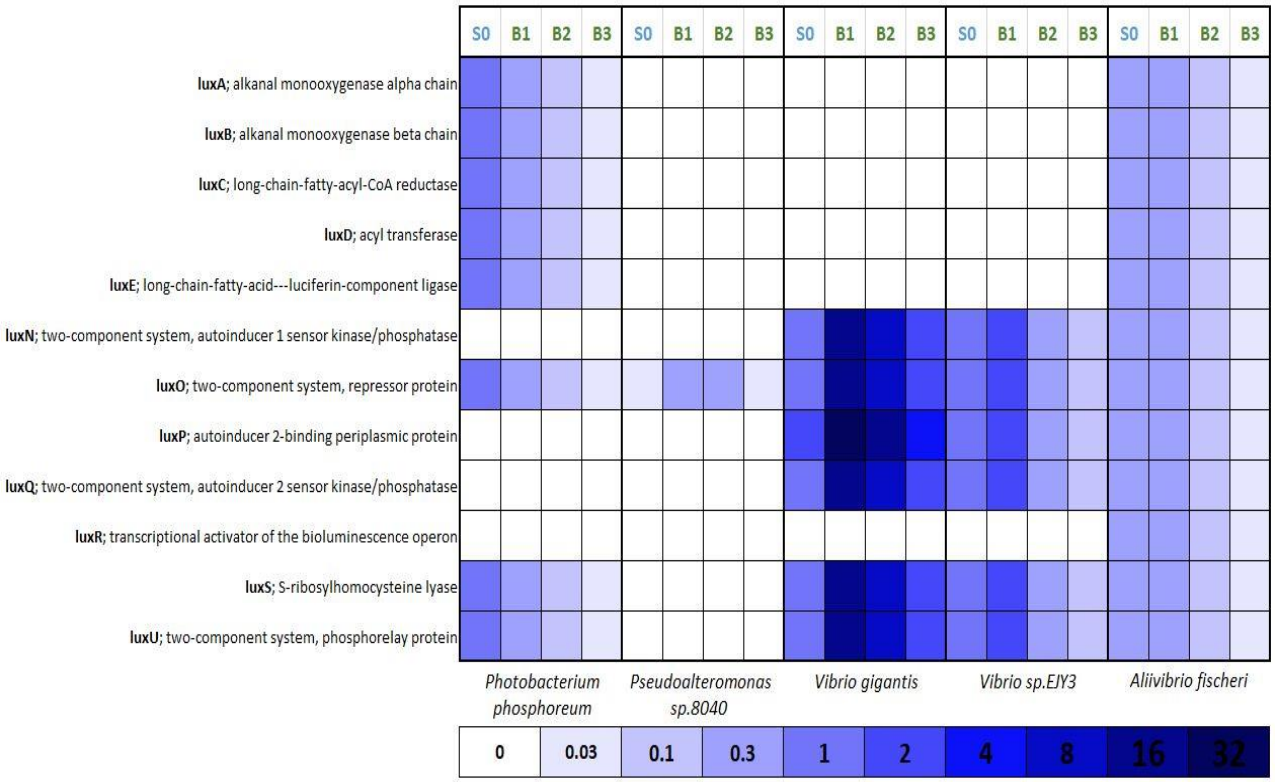
3.2. Predviđeni genetski sadržaj na bazi operona *lux* za proces stanične komunikacije QS

Koristili smo PICRUSt analizu za predviđanje genetskog potencijala *V. gigantis*, posebno se fokusirajući na gene povezane sa staničnom komunikacijom preko AI-2 kemijskih signalnih molekula, poznatih kao sustav Lux quorum. Sustav Lux quorum obično igra ključnu ulogu u regulaciji bioluminiscencije u različitim vrstama roda *Vibrio*.

Naša PICRUSt analiza (Slika 19) otkrila je prisutnost gena uključenih u sustav Lux quorum, uključujući gene *luxPQ*, *luxU* i *luxO*, unutar genoma *V. gigantis*. Ti su geni ključne komponente signalnog puta Lux quorum, što ukazuje na sposobnost bakterije da se uključi u komunikaciju između stanica putem molekula AI-2.

Međutim, važno je napomenuti da naša analiza nije otkrila prisutnost dviju kritičnih komponenti bitnih za bioluminiscenciju kod vrsta *Vibrio*: transkripcijski aktivator luxR i operon luciferaze (l*uxCDABEGH*). LuxR služi kao transkripcijski regulator, dok je operon luciferaze odgovoran za proizvodnju enzima luciferaze, koji su ključni za reakciju bioluminiscencije. Odsutnost tih komponenti sugerira kako *V. gigantis* možda nema genetske preduvjete za bioluminiscenciju, što ga razlikuje od nekih drugih vrsta *Vibrio*.

Kako bismo pružili komparativnu perspektivu, ispitali smo genetski sadržaj *V. gigantis* u odnosu na dvije druge bakterijske vrste: *Photobacterium phosphoreum* i *Aliivibrio fischeri*, a obje su poznate po svojoj genetskoj predispoziciji za bioluminiscenciju u morskoj vodi (Slika 19). PICRUSt analiza je pokazala da te bioluminiscentne vrste pokazuju relativno veći udio gena *lux* operona (*luxCDABEGH*) u svojim genomima, što ukazuje na njihovu sposobnost bioluminiscencije. Ovo zapažanje je u skladu s njihovom poznatom sposobnošću da proizvode svjetlost kroz enzimski put luciferaze, što je ključno za njihova bioluminiscentna svojstva.



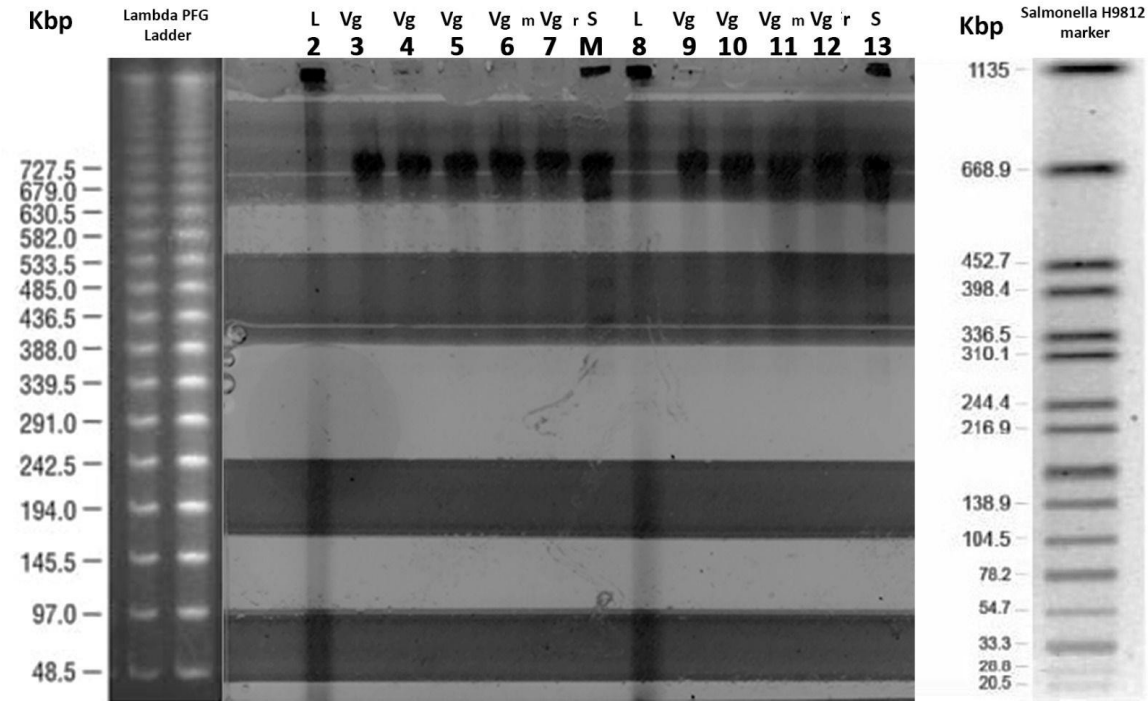
Slika 19. Predviđeni genski potencijal stanične komunikacije putem AI-2 kemijskih signalnih molekula u pionirskih bakterijskih vrsta u morskoj vodi (S0) i prva tri dana formiranja biofilma na površini uronjenih stakalaca (B1, B2 i B3) (uz suglasnost Luke Gujinovića).

Naša PICRUSt analiza (Slika 19) predvidjela je genetski sastav *V. gigantis*, otkrivajući posjedovanje gena povezanih sa sustavom Lux quorum (*luxN*, *luxO*, *luxP*, *luxQ*, *luxS* i *luxU*), uz nedostatak gena *luxR* i *lux* operona (*luxCDABEGH*). Ovo razlikuje *V. gigantis* od *Photobacterium phosphoreum* i *Aliivibrio fischeri*, koji pokazuju genetsku predispoziciju za bioluminiscenciju zbog prisutnosti ovih ključnih gena povezanih s bioluminiscencijom. Ova otkrića nude vrijedan uvid u genetsku raznolikost i funkcionalne sposobnosti ovih morskih bakterija, pridonoseći našem razumijevanju njihove ekološke uloge u morskom okolišu.

3.3. Određivanje veličine genoma bakterije *V. gigantis* metodom PFGE

PICRUSt analiza predvidjela je sadržaj gena *V. gigantis* na temelju taksonomskog sastava. Predviđena je prisutnost gena povezanih sa sustavom Lux quorum, ali bez dvije kritične komponente za bioluminiscenciju: *luxR* i operon luciferaze (*luxCDABEGH*). Kako PICRUSt analiza daje predviđanja genskog sadržaja i funkcionalnog potencijala bakterijske zajednice, bitno je potvrditi stvarni sadržaj gena u genomu *Vibrio gigantis* sekvenciranjem cijelog genoma. Ovom metodom provjerit će se prisutnost ili odsutnost specifičnih gena, uključujući *luxR* i operon luciferaze, koje PICRUSt analiza nije identificirala.

Kako bi uzorke genomske DNA bakterije *V. gigantis* pripremili za sekvencioniranje cijelog genoma tehnikom NGS (engl. *next-generation sequencing*), odredili smo približnu veličinu genoma *V. gigantis* koristeći tehniku elektroforeze u promjenjivom električnom polju (PFGE) (Slika 20). Poznavanje veličine genoma i određivanje pomoću elektroforeze PFGE ključni su preliminarni koraci za optimizaciju procesa sekvenciranja, učinkovitu raspodjelu resursa i osiguranje uspjeha sekvenciranja genoma.

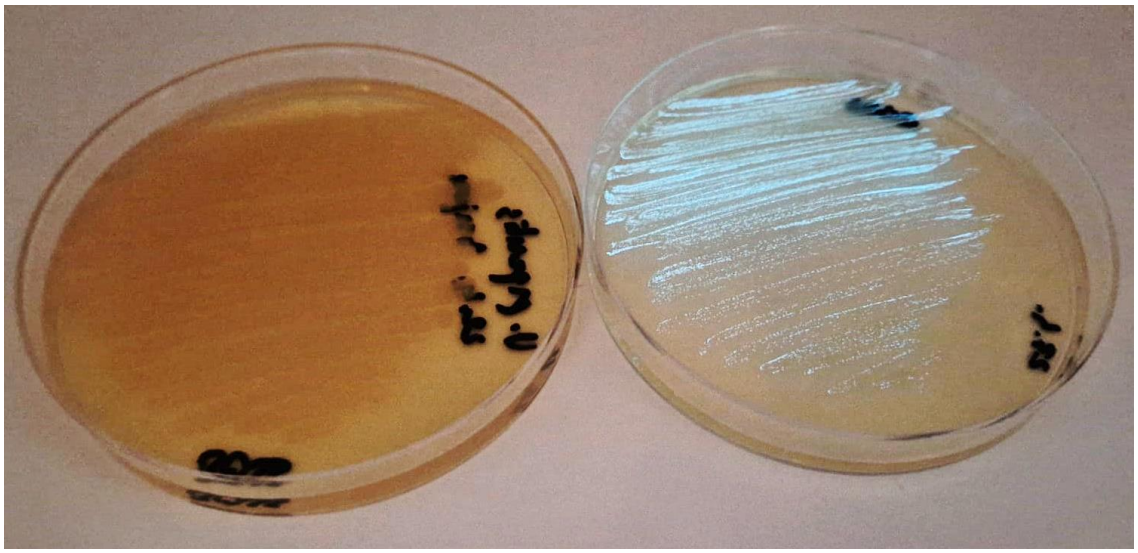


Slika 20. Prikaz PFGE gela s predviđenom veličinom genoma bakterije *V. gigantis*. Stupci 3-7, 9-12 sadrže uzorak bakterije *V. gigantis*, stupci 2 i 8 Lambda PFG Ladder, a stupci M i 13 Salmonella H9812 marker (foto: Marin Ordulj, 2023.).

Elektroforeza PFGE genomske DNA *V. gigantis* pokazala je kako se razdvojeni fragmenti genoma bakterije grupiraju u vrpce (engl. DNA *bands on a gel*) približne veličine oko 700 kb (Slika 20). Ovo određivanje je napravljeno usporedbom migracije fragmenata genomske DNA sa standardima za određivanje veličine fragmenata DNA, uključujući markere Lambda PFG Ladder i Salmonella H9812. Činjenica da su fragmenti genomske DNA iz *V. gigantis* usklađeni s ovim standardima sugerira da je procijenjena veličina od 700 kb pouzdana. Ove informacije vrijedne su za planiranje i optimiziranje naknadnog sekvencioniranja cijelog genoma *V. gigantis*.

3.4. Ispitivanje indukcije bioluminiscencije utemeljene na procesu bakterijske stanične komunikacije QS (engl. *quorum sensing*)

Kako bismo eksperimentalno potvrdili rezultate PICRUSt analize i provjerili mogućnost stvaranja bioluminiscencije bakterije *V. gigantis* u nedostatku gena *luxR* i operona luciferaze (*luxCDABEGH*), proveli smo test bioluminiscencije koristeći luminiscentni agar (LM) i BOSS agar. Rezultati su pokazali da *V. gigantis* nije pokazivao luminiscenciju kada se uzgajao na LM agaru (Slika 21). Nasuprot tome, kao pozitivna kontrola, bakterija *Photobacterium* spp. formirala je plave luminiscentne kolonije, u skladu s njihovim poznatim bioluminiscentnim sposobnostima (Slika 21).



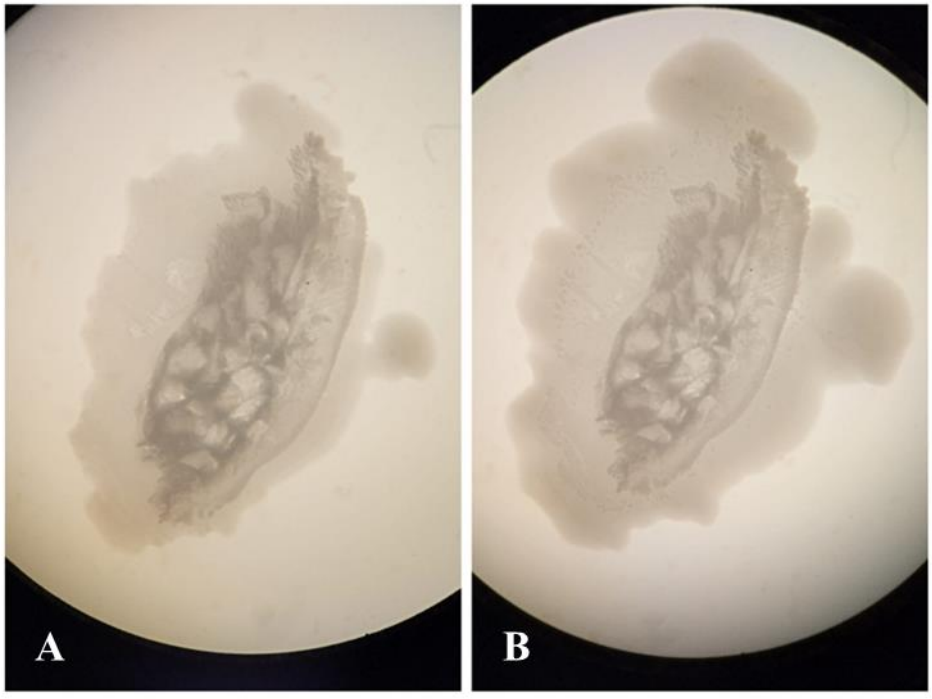
Slika 21. Neposjedovanje svojstva bioluminiscencije *V. gigantis* u usporedbi s *Photobacterium* spp. (foto: Vana Marta Vukman).

Kombinirani rezultati PICRUSt analize i eksperimentalnog testa bioluminiscencije snažno sugeriraju da *V. gigantis* nema potrebne genetske komponente za bioluminiscenciju. Iako su potvrđeni geni *luxPQ*, *luxU* i *luxO*, nedostatak *luxR* i operona luciferaze daje prihvatljivo objašnjenje za opaženi neluminiscentni fenotip. Ovo odstupanje od tipičnog bioluminiscentnog uzorka roda *Vibri*o naglašava genetsku raznolikost unutar ove bakterijske skupine i baca svjetlo na jedinstvene fiziološke karakteristike *V. gigantis*. Ovi rezultati pridonose našem razumijevanju genetskih determinanti bioluminiscencije kod vrsta *Vibrio* i naglašavaju važnost eksperimentalne validacije u studijama mikrobne genetike. Daljnja istraživanja ekološke uloge i prilagodbe *V. gigantis* unutar njegove specifične niše mogu pružiti dragocjene uvide u značaj ovih genetskih varijacija u kontekstu mikrobnih zajednica.

3.5. Formiranje rojeva stanica (engl. *swarmer cells*) bakterije *V. gigantis*

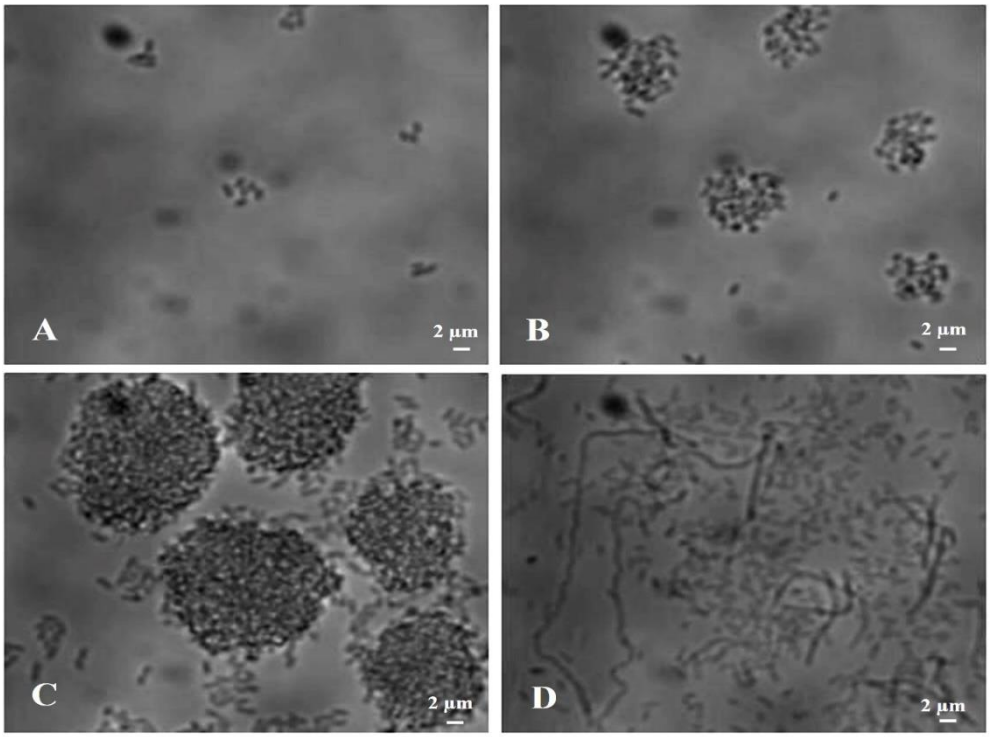
Kako bismo istražili mogućnost pokretanja rojenjem gram-negativne bakterije *V. gigantis,* odnosno definirali oblik kolonija koje bakterija *V. gigantis* stvara rojenjem (engl. *swarm phenotype*) prekonoćna kultura inokulirana je u centar hranjive podloge MA i inkubirana preko noći na 37 ˚C. Kretanje rojenjem (engl. *swarming motility*) karakterizira brzo, koordinirano kretanje bakterijskih stanica pomoću rotirajućih bičeva na polučvrstoj površini. Konačni cilj nam je opisati ponašanje bakterije *V. gigantis* prilikom kretanja rojenjem pod kontrolom procesa stanične komunikacije QS.

Bakterija *V. gigantis* ima sposobnost pokretanja stanica rojenjem koje se najčešće javlja nakon stvaranja biofilma (Slika 22). Kolonija bakterije ima karakterističnu morfološku promjenu koja se manifestira stvaranjem izbočine nalik na prst (Slika 22). Takva promjena oblika kolonije tipična je manifestacija pokretljivosti rojenjem.



Slika 22. Mikrofotografija kolonije bakterije *V. gigantis* na hranjivoj podlozi Marine agar. (A) Rast bakterije 24 sata nakon inokulacije. Na desnom dijelu kolonije zamjetna je stršeća struktura poput prsta karakteristična za rojenje. (B) Rast bakterije *V. gigantis* 48 sati nakon inokulacije (foto: Marin Ordulj, 2023.).

Također pratili smo vremenski slijed formiranja kolonija bakterije *V. gigantis* na površini stakalca unutar mikrokapilarnog kanala (Slika 23). Nakon 1,5 sata došlo je do početne akumulacije stanica (Slika 23 A) dok su se brojnije mikrokolonije pojavile nakon 3,5- 6 sati (Slika 23 B i C). Nakon 9 sati, opažene su produžene stanice roja (engl. *swarmer cells*), potaknute rojenjem i migracijom stanica (Slika 23 D).



Slika 23. Vremenski slijed stvaranja kolonija bakterije *V. gigantis* na površini stakalca u mikrokapilarnom kanalu. (A) početno nakupljanje stanica nakon 1,5 h. (B) Nakupljene stanice nakon 3,5 h. (C) Stanice nakupljene u mikrokoloniju nakon 6h. (D) Izduljene stanične strukture (engl. *swarmer cells*) koje se pokreću rojenjem nastale nakon migracije stanica (9 h) (foto: Luka Gujinović, 2023.).

4. RASPRAVA

Bakterijska stanična komunikacija signalnim molekulama QS kritičan je regulatorni mehanizam koji koriste mnoge bakterijske vrste za koordinaciju ekspresije gena i ponašanja kao odgovor na promjene u gustoći populacije. Ima ključnu ulogu u raznim biološkim procesima, uključujući stvaranje biofilma, proizvodnju faktora virulencije i prilagodbu okolišu. U kontekstu stvaranja biofilma, stanična komunikacija QS je vrlo zamršen i strogo reguliran proces koji uključuje proizvodnju i detekciju specifičnih signalnih molekula, kao što su autoinduktori. Jedan takav autoinduktor je autoindukter 2 (AI-2), koji je od posebnog značaja u bakterijskoj komunikaciji i razvoju biofilma.

AI-2 je signalna molekula koja olakšava komunikaciju između vrsta, a ponekad i unutar vrsta među bakterijama. Ova molekula igra ključnu ulogu u koordinaciji ponašanja bakterija, uključujući stvaranje biofilmova. Biofilmovi su složene zajednice mikroorganizama obavijenih izvanstaničnim matriksom i sveprisutni su u raznim prirodnim okruženjima, uključujući morske ekosustave. Stanična komunikacija posredovan AI-2 omogućuje bakterijama da prate lokalnu gustoću populacije i sukladno tome sinkroniziraju svoje aktivnosti, potičući stvaranje biofilma kroz nekoliko mehanizama:

Stanična agregacija: AI-2 signalizacija dovodi do povećane bakterijske agregacije i vezivanja za površine, što je temeljni korak u stvaranju biofilma. Ova agregacija je posredovana specifičnim adhezijskim molekulama i izvanstaničnim polimernim tvarima.

Proizvodnja polimernog zaštitnog sloja (engl. *extracellular matrix)*: Kao odgovor na AI-2 signalizaciju, bakterije u zajednici biofilma proizvode EPS, uključujući polisaharide i proteine, koji doprinose strukturnom integritetu biofilma. Ovaj sloj pruža fizičku zaštitu i podršku bakterijskoj zajednici.

Regulacija faktora virulencije: AI-2 također utječe na ekspresiju faktora virulencije. U nekim slučajevima može potisnuti virulenciju, preusmjeravajući bakterijski fokus prema stvaranju biofilma, umjesto da uzrokuje bolest.

Poboljšana tolerancija: bakterije unutar biofilma pokazuju povećanu otpornost na stresove iz okoliša, uključujući antibiotike i imunološku obranu domaćina. Stanična komunikacija QS

posredovana AI-2 pomaže u koordinaciji ekspresije gena uključenih u odgovor na stres i održavanje biofilma.

Prisutnost gena stanične komunikacije QS putem signalnih molekula (engl. *Lux quorum*) u bakterije *V. gigantis*, uključujući *luxPQ*, *luxU* i *luxO* je intrigantna, budući da su ti geni tipično uključeni u regulaciju bioluminiscencije u drugim vrstama roda *Vibrio*.[21–23] Međutim, nepostojanje transkripcijskog aktivatora LuxR i operona luciferaze (*luxCDABEGH*) odgovornih za proizvodnju enzima luciferaze koji su ključni za proces bioluminiscencije, upućuje na jedinstvenu genetsku konfiguraciju bakterije *V. gigantis*.

LuxR proteinski kompleksi s autoinduktorom induciraju *luxICDABEG* operon, što dovodi do indukcije luminiscencije.[24] Luciferaza, heterodimer s molekularnom težinom od oko 80 000 Daltona, kodirana je *luxCDABEG* operonom.[25] Geni *luxA* i *luxB* odjeljuju gene *luxCD* i *luxEG* i odgovorni su za kodiranje α (oko 42 000 daltona) i β podjedinica (oko 38 000 daltona) luciferaze. Luciferaza katalizira reakciju oksidacije između reduciranog flavomononukleotida (FMNH2) i masnog aldehida, a produkti reakcije su oksidirani flavomononukleotid (FMN), alifatska kiselina, voda i plavozeleno svjetlo.[26,27] Geni *luxC*, *luxD* i *luxE* kodiraju redom acil-reduktazu, acil-transferazu i acil-protein sintazu, a ovi spojevi djeluju kao reduktaza alifatske kiseline za stvaranje aldehida dugog lanca potrebnog za reakciju proizvodnje svjetlosti.[28]

Nemogućnost bakterije *V. gigantis* da pokaže bioluminiscenciju unatoč tome što posjeduje ključne komponente Lux sustava postavlja nekoliko intrigantnih pitanja:

Funkcionalna divergencija: Moguće je da je bakterija *V. gigantis* prošla genetsku divergenciju i specijalizaciju, što je dovelo do gubitka bioluminiscencije uz zadržavanje drugih aspekata sustava stanične komunikacije QS putem signalnih molekula AI-2. To može odražavati prilagodbu njegovoj specifičnoj ekološkoj niši i načinu života.

Alternativne funkcije: komponente sustava Lux u *V. gigantis* mogu služiti alternativnim funkcijama izvan regulacije bioluminiscencije. LuxR, na primjer, može regulirati širok raspon gena uključenih u razne stanične procese. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnile specifične uloge koje ove komponente sustava Lux imaju u *V. gigantis*.

Interakcije s drugim signalnim sustavima: *V. gigantis* može koristiti dodatne signalne putove ili preklapanje s drugim regulatornim sustavima za postizanje kritičnog broja bakterija (gustoće populacije) u zajednici (engl. *quorum sensing*) i stvaranje biofilma. To bi moglo uključivati kompenzacijske mehanizme koji su se razvili kao odgovor na gubitak bioluminiscencije.

Ukratko, prisutnost gena stanične komunikacije QS putem signalnih molekula AI-2, pod kontrolom gena sustava Lux u bakterije *V. gigantis* i bez sposobnosti induciranja bioluminiscencije je intrigantno otkriće. Ističe složenost bakterijskih regulatornih sustava i potrebu za daljnjim istraživanjem kako bi se razumjele specifične uloge ovih gena u kontekstu stvaranja biofilma, stanične signalizacije QS i bakterijske komunikacije u ovoj autohtonoj morskoj bakteriji. Ova studija otvara vrata istraživanju novih aspekata ponašanja i prilagodbe bakterija u prirodnim ekosustavima. Gujinović i sur. potvrdili su *V. gigantis* kao ranog i vrlo brojnog kolonizatora biofilma, također funkcionalno povezanog s genima povezanim s pokretljivošću stanica, površinskim pričvršćivanjem i komunikacijom putem signalnih molekula QS, što je sve ključno za stvaranje biofilma.[29] Analiza dinamike adhezije *V. gigantis* u morskoj sredini i kontroliranim laboratorijskim uvjetima pružila je uvid u ponašanje ove bakterijske vrste u kontaktu s uronjenim staklom, ističući ovu autohtonu morsku vrstu kao vrijedan model za proučavanje ranog stvaranja biofilma.[29] Primjena lako ponovljivog protokola koji kvantificira postotak površine prekrivene bakterijama i brojčano interpretira dinamiku formiranja biofilma koristit će se kao osnova za buduće eksperimente koji uključuju površinske modifikacije i premaze, s ciljem sprječavanja prianjanja uronjenih površina.

Vremenski slijed formiranja kolonija bakterije *V. gigantis* na površini stakalca unutar mikrokapilarnog kanala (Slika 23) indirektno ukazuju kako bakterijska stanična komunikacija signalnim molekulama QS igra ulogu pri kretanju rojenjem *V. gigantis*. Početna akumulacija stanica (Slika 23 A) ukazuje kako je na početku bakterijska populacija niska i kako su signali QS vjerojatno ispod praga. Kako vrijeme odmiče, nakuplja se više stanica (Slika 23 B), što može dovesti do povećanja koncentracije signalnih molekula. Formiranje mikrokolonije (Slika 23 C) sugerira kako su signalne molekule QS dosegle razinu na kojoj je pokrenuto koordinirano ponašanje, što rezultira stvaranjem mikrokolonije. Konačno, proširene stanice roja (Slika 23 D) dokaz su stvarne pokretljivosti rojenjem, što obično zahtijeva visoku gustoću stanica i aktivno detektiranje kvoruma.

Ovi rezultati daju potporu uključenosti signalnih molekula QS u regulaciji kretanja rojenjem kod *V. gigantis*. Vremenski slijed koji smo promatrali odražava progresivno povećanje bakterijske populacije i koncentracije signala QS, što u konačnici dovodi do pokretanja ponašanja rojenja. Ova studija pridonosi našem razumijevanju uloge senzora QS u društvenom ponašanju bakterija i mogla bi imati implikacije na kontrolu pokretljivosti bakterija u različitim kontekstima, uključujući klinička okruženja.

Vibrio gigantis je bakterijska vrsta, a razumijevanje njegovog kompletnog genskog sastava ključno je za dobivanje uvida u njegove funkcionalne sposobnosti. PICRUSt analiza dala je predviđanja o prisutnosti specifičnih gena povezanih sa sustavom Lux quorum u genomu bakterije *V. gigantis* (Slika 19). Međutim, kako bi se potvrdio stvarni sadržaj gena i identificirali svi drugi potencijalni geni uključeni u razne biološke procese, potrebno je sekvenciranje cijelog genoma. To omogućuje sveobuhvatan pogled na genetsku strukturu organizma.

PICRUSt analiza nije otkrila prisutnost dviju kritičnih komponenti bitnih za bioluminiscenciju kod vrste *V. gigantis*: aktivatora transkripcije *luxR* i operona luciferaze (*luxCDABEGH*). Sekvenciranjem cijelog genoma možemo potvrditi nedostaju li ti geni doista ili postoje varijacije ili drugi čimbenici koji utječu na njihovo otkrivanje. Sekvenciranje cijelog genoma omogućuje identificirati sve genetske varijacije, poput mutacija ili preuređivanja gena koje bi mogle utjecati na funkcionalnost gena povezanih sa sustavom Lux quorum. Ova informacija je ključna za razumijevanje sposobnosti bioluminiscencije.

Poznavanje kompletnog sastava gena omogućuje detaljniju funkcionalnu analizu. Istraživačima omogućuje ne samo utvrđivanje prisutnosti ili odsutnosti specifičnih gena, već i proučavanje njihove organizacije, potencijalnih regulatornih elemenata i drugih genomskih značajki koje bi mogle utjecati na njihovu funkcionalnost. Sekvenciranje cijelog genoma daje neobrađene podatke o sekvenci DNA koji se mogu koristiti za funkcionalnu anotaciju. Ovaj proces uključuje identifikaciju i označavanje gena njihovim funkcijama i ulogama u staničnim procesima. Pomaže istraživačima razumjeti kako geni doprinose različitim biološkim funkcijama. Sekvenciranje genoma *V. gigantis* također otvara mogućnosti za komparativnu genomiku. Istraživači mogu usporediti njegov genom s genomom srodnih vrsta kako bi identificirali očuvane gene, jedinstvene prilagodbe i potencijalne evolucijske veze. To može pružiti vrijedan uvid u ekološku nišu i evolucijsku povijest organizma.

Tehnika PFGE koristi se za procjenu veličine fragmenata DNA, uključujući cijeli genom organizma. Razdvajanjem DNA *V. gigantis* tehnikom PFGE odredili smo kako se fragmenti genoma bakterije grupiraju u vrpce približne veličine oko 700 kb (Slika 20). Ove informacije vrijedne su za planiranje procesa sekvenciranja jer pomažu u odabiru odgovarajućih platformi za sekvenciranje i određivanju potrebne dubine pokrivenosti. Različite platforme za sekvenciranje sljedeće generacije (NGS) imaju različite mogućnosti u smislu duljine čitanja i propusnosti. Poznavanje približne veličine genoma omogućuje istraživačima da odaberu

najprikladniju strategiju sekvenciranja i osiguraju da je pokrivenost sekvenciranjem dovoljna za točno sastavljanje genoma i predviđanje gena. Sekvenciranje genoma može zahtijevati mnogo resursa, stoga poznavanje veličine genoma pomaže u raspodjeli resursa i planiranju proračuna. Pomaže u određivanju broja sekvencioniranja i količine podataka o sekvenciranju potrebnih za dobivanje visokokvalitetnog sklopa genoma.

Ukratko, sekvenciranje cijelog genoma *V. gigantis* bitno je za potvrdu sastava gena, identifikaciju kritičnih gena koji nedostaju, provođenje funkcionalne analize i omogućavanje komparativne genomike. Određivanje približne veličine genoma pomoću PFGE ključni je preliminarni korak za optimizaciju procesa sekvenciranja i učinkovitu raspodjelu resursa.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata vlastitog istraživanja te korištene literature izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Kalijev hidroksid potvrdio je *V. gigantis*, bakterijsku vrstu roda *Vibrio*, kao gram-negativnu bakteriju.

2. Bakterija *V. gigantis* dokazano posjeduje sposobnost formiranja biofilma, gdje je za agregaciju bakterijskih stanica, njihova vezivanja za površinu, sazrijevanje te raspršivanje esencijalno djelovanje autoinduktora tipa 2, signalnih molekula stanične komunikacije.

3. PICRUSt analiza ukazala je na nedostatak dviju kritičnih komponenti bitnih za bioluminiscenciju kod vrsta *Vibrio*: transkripcijski aktivator *luxR* i operon luciferaze (*luxCDABEGH*). LuxR služi kao transkripcijski regulator, dok je operon luciferaze odgovoran za proizvodnju enzima luciferaze, koji su ključni za bioluminiscentnu reakciju. Odsutnost tih komponenti sugerira kako *V. gigantis* možda nema genetske preduvjete za bioluminiscenciju, što ga razlikuje od nekih drugih vrsta *Vibrio*.

4. Test bioluminiscencije kojim *V. gigantis* nije pokazivao luminiscenciju kada se uzgajao na LM i BOSS agaru, dok je bakterija *Photobacterium* spp. kao pozitivna kontrola, formirala plave luminiscentne kolonije u skladu s njihovim poznatim bioluminiscentnim sposobnostima, potvrđuje predviđanja PICRUSt analize i daje prihvatljivo objašnjenje za opaženi neluminiscentni fenotip.

5. Promatranje vremenskog slijeda formiranja kolonija bakterije *V. gigantis* na površini stakalca unutar mikrokapilarnog kanala, odnosno formiranje proširene stanice roja, potvrđuje njenu sposobnost pokretanja rojenjem. Isto tako, nakupljanje stanica i formiranje mikrokolonije daje naslutiti kako je povećanje broja i gustoće bakterijskih stanica rezultiralo postignutom razinom signalnih molekula QS-a čime je potaknuto koordinirano ponašanje bakterijskih stanica.

6. Elektroforeza PFGE genomske DNA *V. gigantis* pokazala je kako se razdvojeni fragmenti DNA grupiraju u vrpce približne veličine oko 700 kb.

6. METODIČKI DIO

Ime i prezime učitelja	**Predmet**	**Razred**
Vana Marta Vukman	Biologija	3. razred gimnazije
Nastavna tema *Odrediti na osnovu godišnjeg izvedbenog kurikuluma (GIK).*		**Datum**
Građa prokariotske stanice		26.9.2023.

Cilj nastavne teme *Odrediti u skladu s ciljem poučavanja dijela nastavne teme.*	
Stjecanje znanja o građi prokariotske stanice.	
Ključni pojmovi *Pojmovi koje učenik treba usvojiti uz poučavanje.*	**Temeljni koncepti** *Ideje koje učenici trebaju usvojiti na razini razumijevanja i/ ili primjene (uz pomoć konceptualnog okvira poučavanja biologije).*
Prokariotska stanica, stanična stijenka, peptidoglikan, gram-pozitivne bakterije, gram-negativne bakterije, pili, bičevi, nukleoid, plazmid, ribosomi, endospora, stanična membrana	Prokariotske stanice imaju jednostavnu građu, veličine od 0,2 do 10 μm. Nemaju pravu jezgru ni organele omeđene membranom. Prokariotska stanica obavijena je staničnom stijenkom koja joj daje oblik i pruža zaštitu od okoline. Izgrađena je od peptidoglikana, makromolekule koja se sastoji od linearo poredanih polisaharidnih lanaca međusobno povezanih peptidnim mostom. Ovisno o debljini sloja peptidoglikana, bakterije dijelimo na gram-pozitivne i gram-negativne. Gram-pozitivne imaju deblji sloj peptidoglikana i postupkom bojenja po Gramu oboje se plavoljubičasto. Gram-negativne bakterije imaju tanji sloj peptidoglikana i po Gramu se oboje crveno. Vezanje bakterija za različite površine omogućuju pili. Bičevi ili flagele duge su proteinske izbočine koje omogućuju bakteriji da se kreće u vodenome okružju. Genski materijal čini jedna kružna molekula DNA smještena u dijelu stanice koja se naziva nukleoid. Neke bakterije sadrže i dodatnu malu kružnu molekulu DNA - plazmid, koji bakteriji daje povoljna obilježja. U citoplazmi se nalaze i ribosomi (70 S). Neke vrste bakterija u nepovoljnim uvjetima mogu stvoriti zaštitnu strukturu koju nazivamo endospora. Citoplazmu okružuju stanična membrana koja je polupropusna.
Kontekst poučavanja koncepta *Sadržajni okvir učenja (na kojim će se primjerima učiti).*	
Na temelju mikroskopskog preparata učenici otkrivaju nastavnu jedinicu, građu prokariotske stanice.	

Na temelju slike i modela bakterijske stanice učenici otkrivaju građu prokariotske stanice. Uz pomoć slike učenici uče o bojanju po Gramu i razlikama među gram-pozitivnih i gram-negativnih stanica. Na temelju video isječka učenici shvaćaju ulogu bakterijskih bičeva i pilia. Uz pomoć pretraživanja literature na internetu učenici zaključuju na koji način antibiotici rade i važnosti njihove pravilne uporabe.

Odgojno-obrazovni ishodi *Odabrati i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.*	
BIO SŠ. A.3.1.	Povezuje građu i uloge staničnih dijelova.
BIO SŠ B.3.2.	Povezuje utjecaj životnih navika na zdravlje argumentirajući odgovornost za vlastito zdravlje.
BIO SŠ D.3.1.	Procjenjuje različite literaturne izvore, raspravlja o dobivenim rezultatima u odnosu na njih i pravilno ih citira.
Primjeri: OŠ PRI A.5.1. Učenik objašnjava temeljnu građu prirode BIO OŠ B.8.4. Povezuje različite načine razmnožavanja organizama s nasljeđivanjem roditeljskih osobina i evolucijom. BIO SŠ C.3.2. Analizira principe iskorištavanja energije na razini stanice.	

Očekivanja međupredmetnih tema*Odabrati i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.*	
osr B.5.2.	Suradnički uči i radi u timu.
odr C.5.2.	Predlaže načine unapređenja osobne i opće dobrobiti.
osr B.5.3.	Preuzima odgovornost za svoje ponašanje.
uku A.4/5.1.	Učenik samostalno traži nove informacije iz različitih izvora, transformira ih u novo znanje i uspješno primjenjuje pri rješavanju problema

Br. Ishoda u razradi(RI/IA)	**Razrada ishoda** *Koristiti prema Kurikulumu.* **Ishodi aktivnosti** *Prema potrebi dodati i specifično razraditi ishod iz razrade ishoda.*	**Zadatak/ primjer pitanja za provjeru** *Pitanja trebaju polaziti od razine propisane Kurikulumom (minimum), ali treba planirati i pitanja više razine usvojenosti.*	**KR**	**PU**
BIO SŠ. A.3.1	Povezuje građu i uloge staničnih dijelova	- Koja oznaka predstavlja golu kružnu DNA? - Koja je funkcija nukleoida? - Postoji li neka tvorba u bakterijskoj stanici nalik nukleoidu? - Što omeđuje citoplazmu? - Zašto se stanična membrana opisuje kao selektivno polupropusna?	R1 R1 R1 R1 R2	+ + + + +/-
BIO SŠ B.3.2.	Povezuje utjecaj životnih navika na zdravlje argumentirajući odgovornost za vlastito zdravlje.	- Uz pomoć čega se liječe bakterijske infekcije? - Zašto je Summamed često korišten antibiotik za vrijeme COVID-19 epidemije? - Poznajete li neke nuspojave kao rezultat korištenja antibiotika? - Koji su uzrok i rješenje za te nuspojave? -Zašto je moderno doba ujedno i doba rastuće rezistencije na antibiotike i što možeš učiniti kako bi to spriječio?	R1 R3 R2 R3 R3	+ +/- + +/- +/-
BIO SŠ D.3.1.	Procjenjuje različite literaturne izvore, raspravlja o dobivenim rezultatima u odnosu na njih i pravilno ih citira	- Zašto arktički polarni krug predstavlja visoku opasnost uslijed povećanja koncentracije stakleničkih plinova u atmosferi? - Što je bakterijama omogućilo preživljavanje permafrosta tisućama godina?	R2 R3	+ +/-

Kognitivna razina (KR): I. reprodukcija, II. konceptualno razumijevanje i primjena znanja, III. rješavanje problema
Procjena uspješnosti učenja (PU): – odgovara manje od 5 učenika, +/- odgovara otprilike polovina učenika, + odgovara većina učenika
Br. ishoda u razradi (RI): dodati prema odgovarajućem broju iz dokumenta Kurikuluma Prirode i Biologije – numerirana razrada ishoda(npr. OŠ PRI A.5.1.2 Uočava na temelju praktičnih radova da su tvari građene od sitnih čestica;BIO OŠ B.8.4.9. Povezuje mitozu s razmnožavanjem jednostaničnih te s rastom i obnavljanjem višestaničnih organizama; BIO SŠ C.3.2.2. Analizira prijenos tvari kroz membranu/membranom s aspekta korištenja energije)
(IA): broj ishoda aktivnosti generirati prema nadređenom broju (RI) ishoda u razradi (npr. OŠ PRI A.5.1.2.1.Zaključuje na temelju praktičnog rada da je u morskoj vodi otopljena sol.)

Tijek

Artikulacija (pregledni nacrt nastavnog sata) - Kratki tablični pregled strukture nastavnog sata s iskazanim dominantnim aktivnostima i sociološkim oblicima rada te predviđenim trajanjem za svaki strukturni element sata (po potrebi dodati retke tablice). Uz svaku aktivnost obavezno navesti oznaku ishoda u razradi (prema Kurikulum Prirode i Biologije – numerirana razrada ishoda) koji se njome ostvaruje.

Tip sata	**Obrada novog nastavnog sadržaja**	**Trajanje**	Jedan sat

R. NASTAVNOG SATA	STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA	DOMINANTNA AKTIVNOST	BR. ISHODA MPT OČEKIVANJA	KORISTITI	METODA	OBLIK RADA	TRAJANJE (min)
	Početni dio	Učenike srdačno pozdravljam i predstavljam im se. Dijelim učenike u grupe po četvero, dajem im mikroskope te različite marke kefira čije će sadržaje mikroskopirati. Pitam ih da prepoznaju organizam koji promatraju. Ona grupa koja prva odgonetne da je riječ o bakterijama pobjeđuje. Učenike pitam kakve bakterije prema obliku stanice primjećuju na svojim preparatima (koki, bacili, spirili,vibrioni), zatim uspoređujemo odgovore između grupa. Time najavljujem cilj sata i pišem naslov na ploči „Građa prokariotske stanice“.	U	P, M	PR	G	5min
	Središnji dio	Učenike pitam kako dijelimo prokariote (arheje i bakterije, R1). Na slajdu broj 1 prikazana je slika koja uspoređuje veličinu crvene krvne stanice (kao jedne od najmanjih stanica koje izgrađuju ljudski organizam) i bakterijske stanice koja je znatno manja. Tražim od učenika da ih usporede te navodim kako je većina bakterijskih stanica duljine od 0,5 do 2 μm.	U/N	PP	R, I	I. F	35 min
		Slajd broj 2 prikazuje građu bakterijske stanice. Navodim kako naziv prokariota potječe iz grčkih riječi pro-prije i karion-jezgra što znači prije jezgre jer genski matrijal nije zaštićen membranom, već se radi o takozvanoj „goloj DNA“. Tražim učenike da promotre sliku i pretpostave koji naziv predstavlja golu kružnu DNA (nukleoid, R1). Učenici strukture traže i pokazuju na modelu bakterijske stanice. Postavljam pitanje o funkciji nukleoida (nosi sve informacije bitne za preživljavanje i razmnožavanje stanice, R2). Zatim pitam postoji li neka tvorba u bakterijskoj stanici nalik nukleoidu (plazmid, R1). Navodim kako plazmidi predstavljaju male kružne molekule DNA koje stanici nisu nužne za život, ali ga mogu unaprijediti jer osiguravaju dodatna svojstva kao što je otpornost na antibiotike. Što još vidite u citoplazmi bakterijske stanice?	U/N	PP, M D	R	I, F	

		(Ribosome, R1) Tražim da se podsjete što su to ribosomi (sitna tjelešca građena od RNA i proteina te provode sintezu svih stanici potrebnih proteina, R1). Naglašavam da su ribosomi prokariotskih stanica manji od eukariotskih, a oznaka 70S navodi brzinu sedimentacije. Što omeđuje citoplazmu? (stanična membrana, R1) Jednog učenika zadužujem da opiše ulogu stanične membrane (glavna linija komunikacije s okolišem, R1) Zašto se opisuje kao selektivno polupropusna? (Omogućuje ulaz i izlaz iz stanice samo određenim molekulama, R2) Navodim kako se na staničnu membranu nastavlja stanična stijenka te postavljam pitanje s kojim organom u ljudi je možemo usporediti i zašto? (S kožom, jer ljudima koža osigurava oblik i zaštitu kao stanična stijenka bakterijskoj stanici) Navodim kako je građena od peptidoglikana, makromolekule od linearno poredanih polisaharidnih lanaca povezanih peptidnim mostovima.					
		Slajd broj 3 prikazuje bojanje po Gramu. Navodim kako građa stanične stijenke uvjetuje hoće li se ovim bojanjem bakterijska stanica obojati u crveno ili plavoljubičasto. Prozivam učenika i tražim da na temelju slike razluči uzrok obojenja (gram-negativne bakterije bojaju se crveno jer imaju tanji sloj peptidoglikana, a gram-pozitivne bakterije bojaju se plavoljubičasto jer posjeduju deblji sloj peptidoglikana, R2). Navodim da se ova tehnika primjenjuje u dijagnostici zaraznih bolesti i određivanju antibiotskog liječenja jer omogućuje prepoznavanje bakterija prema obliku i načinu rasta. Tražim da na internetu istraže uzročnike zaraznih bolesti koje se boje crveno, a koje se boje plavoljubičasto (crveno se bojaju bakterije uzročnici gonojere i kuge, a plavoljubičasto se bojaju bakterije uzročnici tetanusa i tuberkuloze, R2). Na slajdu broj 4 nalazi se kratki video isječak o bakterijskim pilima. Navodim kako sljedeće strukture ne posjeduju sve bakterije. Nakon odgledanog video isječka učenike pitam koja im je uloga (omogućuju bakteriji vezanje za različite površine, R2). Navodim da su to kratke proteinske strukture nalik dlačicama, a češće su u gram-negativnim bakterijama.	U/N	PP, VL	R, I	F, I	
		Na slajdu broj 5 nalazi se kratki video isječak o bakterijskim bičevima odnosno flagelama koje također ne posjeduju sve bakterije. Nakon što učenici pogledaju video, tražim da objasne funkciju biča u bakterije (omogućuju organizmu kretanje u vodenom okolišu, R2). Zatim prikazujem sliku	U/N	PP, VL	R, I	I, F	

		bakterija s različitim brojem flagela i pitam imaju li sve bakterije isti broj flagela (ne, broj varira, R1). Navodim kako su te proteinske izbočine, flagele, bitne za identifikaciju pojedinih vrsta bakterija.					
		Slajd broj 6 sadrži QR kod koji učenici trebaju očitati te pročitati zadani tekst. Nakon pročitanog teksta postavljam pitanje, uz pomoć čega se liječe bakterijske infekcije? (uz pomoć antibiotika, R1) Pokazujem im Sumamed te pitam zašto je često korišten za vrijeme COVID-19 epidemije (za liječenje infekcije gornjih, donjih dišnih puteva, upale pluća uzrokovane bakterijom, koja je proizašla iz oslabljenog imuniteta djelovanjem virusa, R3). Poznajete li neke nuspojave kao rezultat korištenja antibiotika? (mučnina, povraćanje, proljev, R1) Koji su uzrok i rješenje za te nuspojave? (Uzrok je djelovanje antibiotika koji ubija „dobre bakterije“ u crijevima, a rješenje je konzumacija probiotika, R3) Jednog učenika molim da pročita odgovore (pronađeni u zadanom tekstu) na pitanja postavljena na slajdu. Na koje strukture bakterijske stanice antibiotici djeluju i kako? (Ometanje sinteze stanične stijenke, povećanje propusnosti stanične membrane, ometanje sinteze bjelančevina te inhibicija sinteze nukleinskih kiselina, R1). Zašto se kod uzimanja antibiotika mora poštovati točan vremenski razmak između korištenja? (Svako preskakanje doze ili produljivanje vremena uzimanja pridonosi povećanju rezistencije, R1) Koja struktura bakterijskoj stanici omogućava pojavu rezistencije? (Plazmid, R2)	U	PP, TM, MO	I,R, T	I, F	
		Slajd 7 prikazuje bakterijsku stanicu u obliku endospore. Navodim kako one bakteriji omogućuju preživljavanje u nepovoljnim uvjetima te kad nastanu povoljni uvjeti stanice se pretvaraju u vegetativne stanice sposobne za rast i razmnožavanje. Koji su to nepovoljni uvjeti koji mogu izazvati stvaranje endospore? (ekstremne temperature, promjena pH, suša, R2)	N	PP	I, R	F	
	Završni dio	U završnom dijelu sata učenicima dijelim radne listove s pitanjima za ponavljanje (Pet je pitanja za ponavljanje). Rješavamo jedno po jedno pitanje te provjeravam usvojenost sadržaja i objašnjavam ukoliko postoje nejasnoće.	U	RL	R	I	5min
	Nositelji aktivnosti: N – nastavnik, U - učenici (dodati i mijenjati uloge ukoliko je potrebno uz svaku aktivnost)						

Koristiti u izvedbi: RL – radni listić za učenike, UDŽ – udžbenik, RB – radna bilježnica, P – ploča, PM – prirodni materijal, E – pokus/eksperiment, MD – model, AP – aplikacija, PP – projekcija prezentacije, VL – video lekcija, APP – digitalni alat, P/SU – platforma/sustav učenja na daljinu, V – video zapis, A – animacija, I – igra, IU – igranje uloga, RS – računalna simulacija, M – mikroskop, L – lupa, F – fleks kamera, T – tablet, MO – mobitel, OP – organizator pažnje, AL - anketni listić TM - tekstualni materijali (dodati prema potrebi)

Metode: PR – praktični radovi, D – demonstracija, C – crtanje, I – usmeno izlaganje, R – razgovor, T – rad na tekstu i pisanje

Oblici rada: I – individualno, P – rad u paru, G – grupni rad, F – frontalno

Materijalna priprema *Popis nastavnog materijala, izvora znanja, sredstva i pomagala, odnosno svega što je potrebno pripremiti za uspješno odvijanje nastave prema postavljenom cilju i zamišljenom planu. Treba biti uključena izvora stvarnost kad god je to moguće, kao i nastavna sredstva te nastavna pomagala koja će se koristiti tijekom poučavanja i učenja.*

Izvorna stvarnost: Različiti uzorci kefira, antibiotik, model bakterijske stanice
Nastavna sredstva: PPT prezentacija, list za ponavljanje, internet, živa riječ nastavnika, udžbenik
Nastavna pomagala: LCD projektor, ploča, mobitel

Plan učeničkog zapisa *Može biti plan ploče ili zapis koji nastaje na temelju drugih poticaja.*

GRAĐA PROKARIOTSKE STANICE

- stanična stijenka → peptidoglikan (gram-pozitivne/gram-negativne bakterije)
- pili
- bičevi ili flagele
- nukleoid
- plazmid
- ribosomi

Vrednovanje *Različiti pristupi vrednovanju.*

Vrednovanje za učenje	Vrednovanje kao učenje	Vrednovanje naučenog
Kroz pitanja koja postavljamtijekom nastavnog sata provjeravam razumijevanje učenika te objašnjavam ono što nisu.	Na samom kraju sata učenike pitam je li im sve jasno te treba li im još što pojasniti.	Učenicima na kraju obrade novog nastavnog sadržaja dijelim radne listove. Prozivajući učenike provjeravam točnost odgovora i usvojenosst obrađenog sadržaja.

Prilagodba za učenike s teškoćama u učenju *Navesti način prilagodbe učenja mogućnostima i potrebama učenika te priložiti zadatke prilagodbe.*

Nema učenika s teškoćama u učenju.

Prilagodba za darovite učenike *Navesti način prilagodbe učenja mogućnostima i potrebama učenika te priložiti zadatke prilagodbe.*

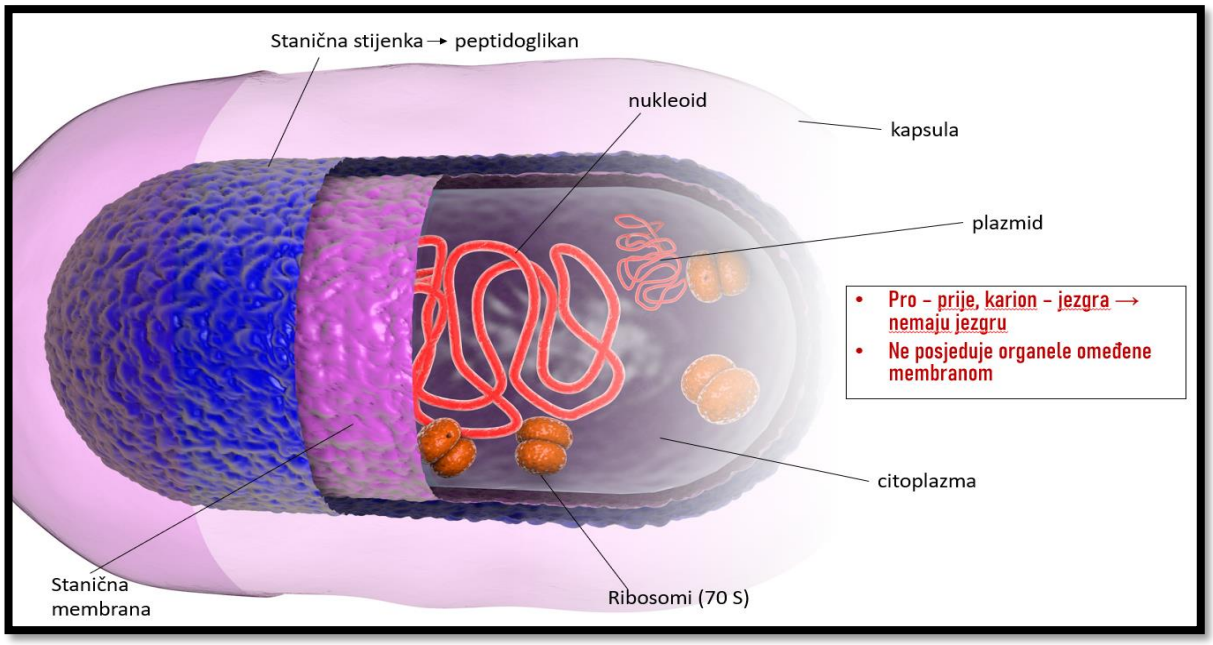
Nema darovitih učenika.

Prilozi *Popis materijala koji će se koristiti u nastavi (radni listovi, ispis PP prezentacije i ostali materijal).*

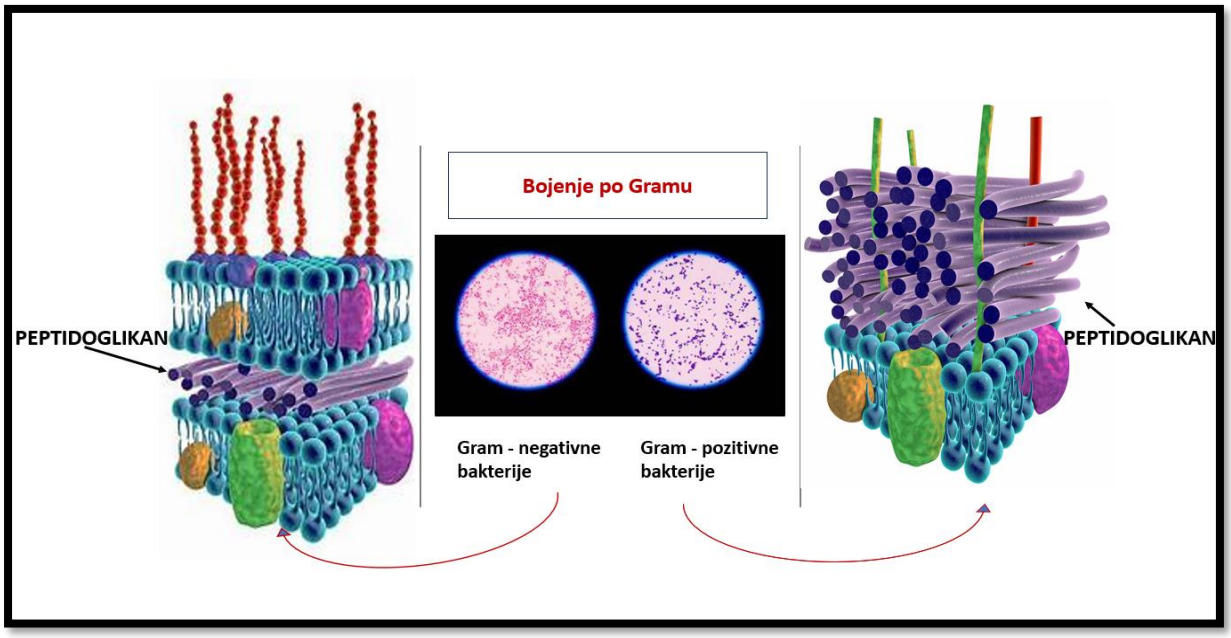
Power Point prezentacija

Kliznica 1

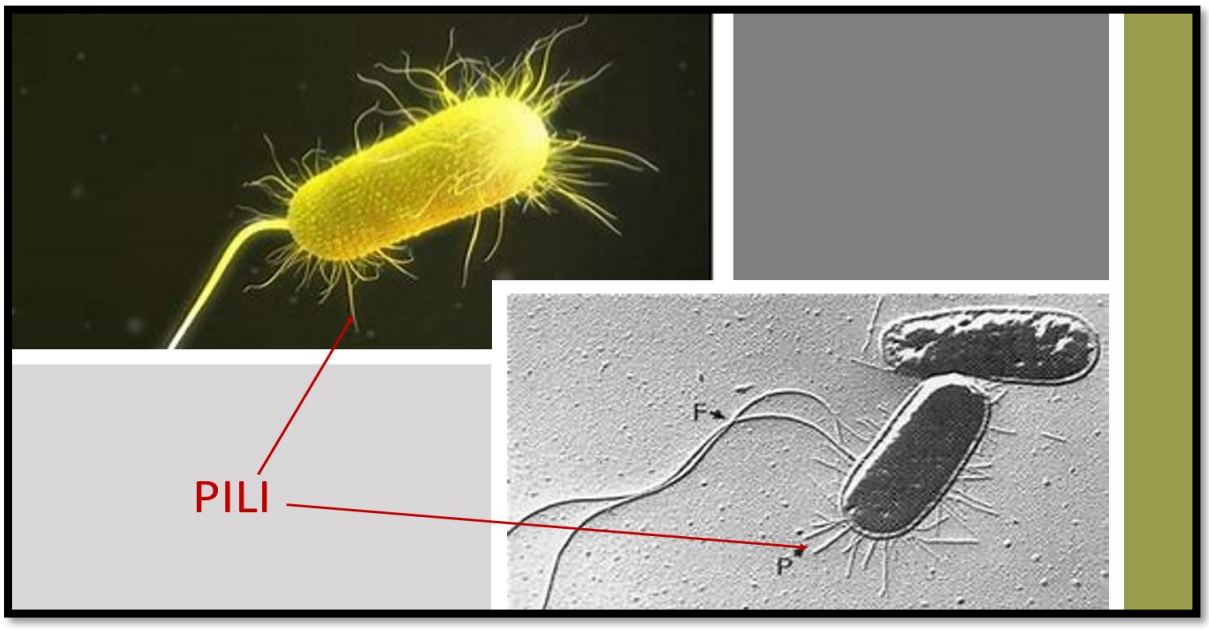
Kliznica 2



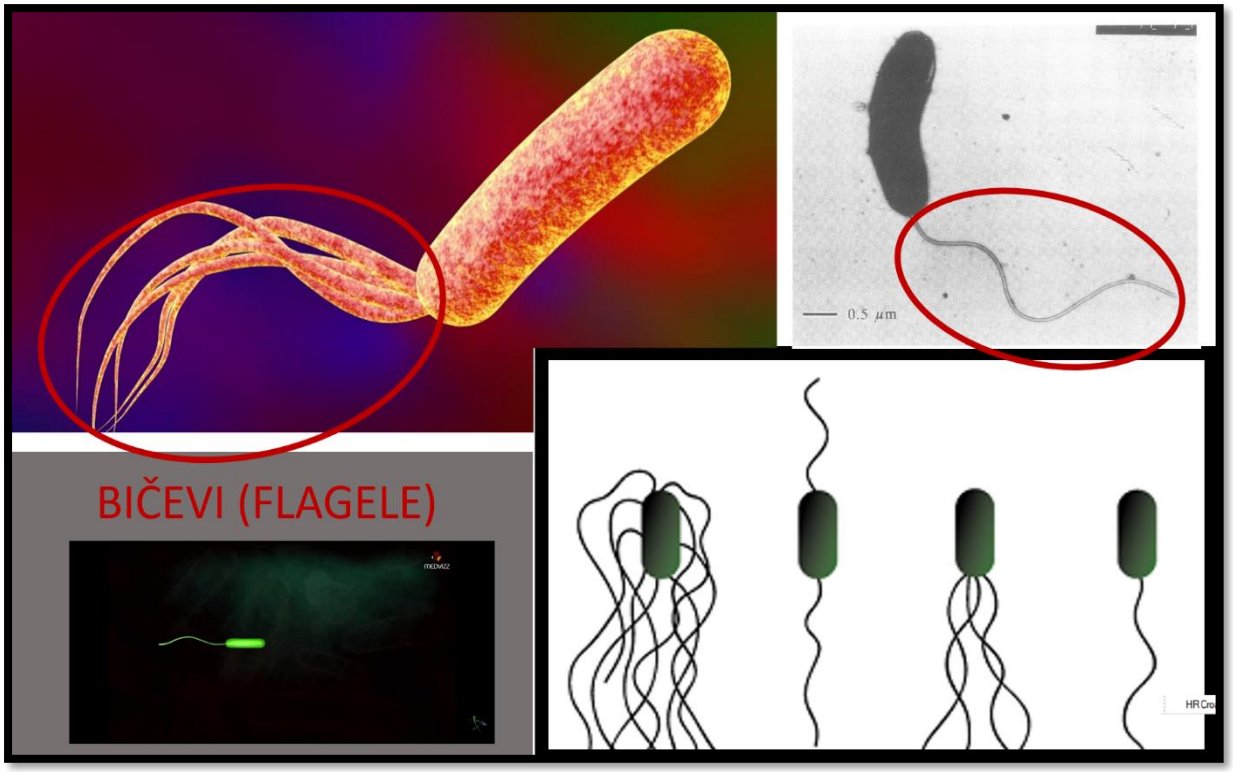
Kliznica 3



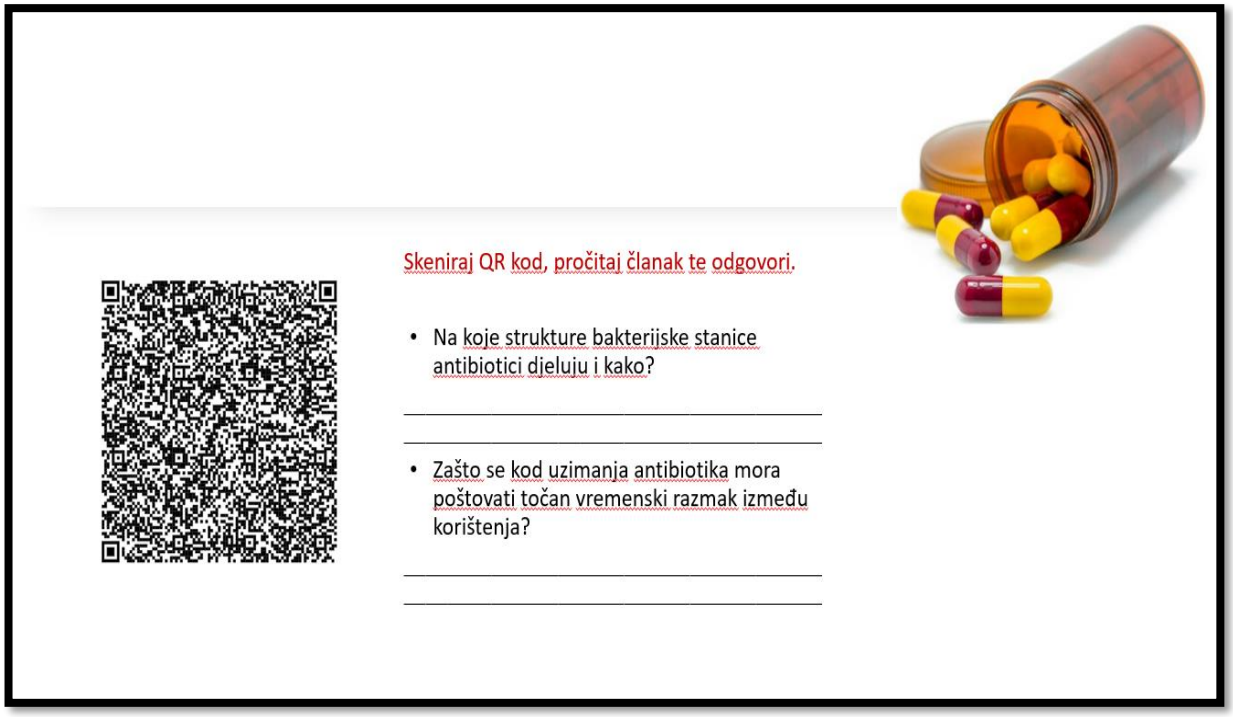
Kliznica 4



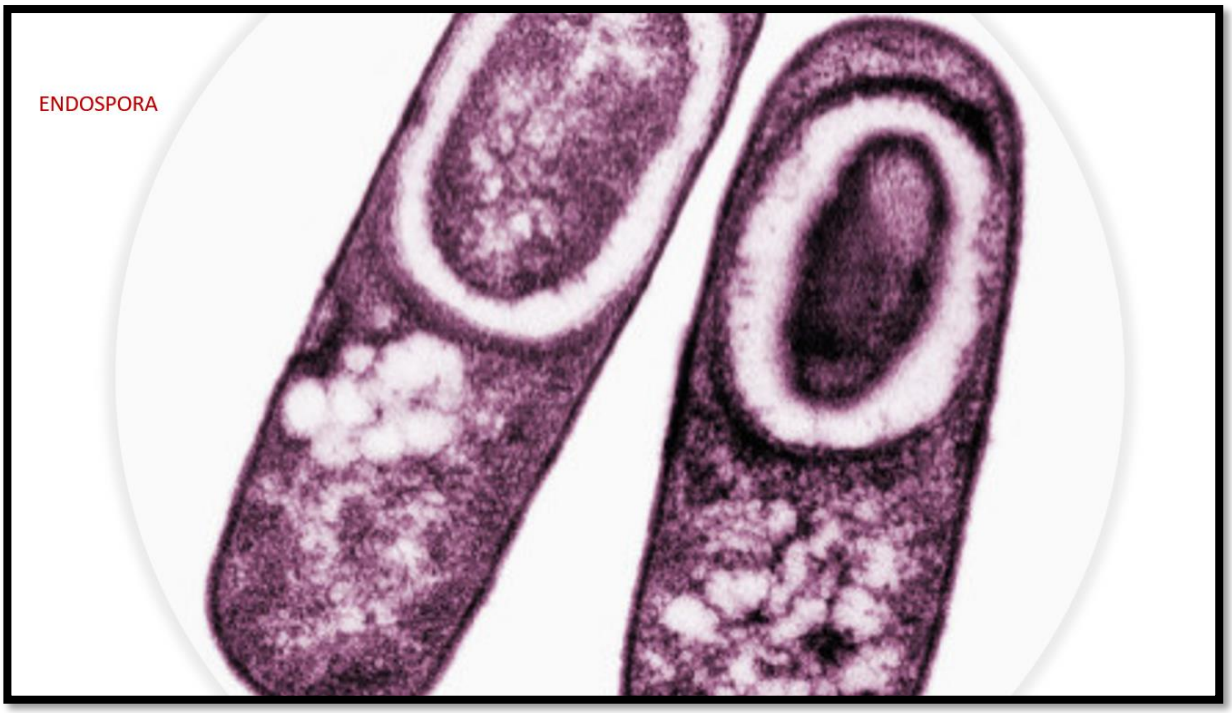
Kliznica 5



Kliznica 6



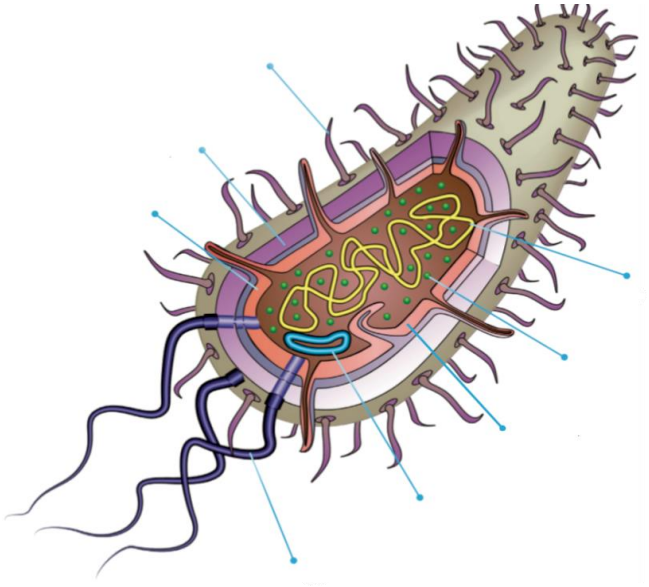
Kliznica 7



Radni list

GRAĐA PROKARIOTSKE STANICE

1. Označi dijelove bakterijske stanice: **nukleoid, stijenka, stanična membrana, bič, ribosom, plazmid, kapsula i pilus.**



2. Poveži stanični dio s ulogom koju opisuje

a) nukleoid

b) stijenka

c) plazmid

d) pilus

1) Održava oblik i strukturu bakterijske stanice i daje joj čvrstoću

2) Proizvodi sve proteine nužne za život i građu stanice

3) Nisu neophodni za život, ali bakterijskoj stanici omogućuju nova svojstva i preživljavanje nepovoljnih uvjeta

4) Struktura koja služi za međusobno povezivanje bakterijskih stanica i/ili za prihvaćanje bakterijskih stanica za neku površinu

5) Kružna molekula DNA koja sadrži sve gene za proizvodnju proteina nužnih za život stanice

3. Tihomir se tjedan dana borio s jakom grloboljom na što mu je doktor pripisao antibiotike. Rekao mu je da ih mora uzimati idućih 10 dana, ali nakon šestog dana Tihomiru je grlobolja prestala te je on odlučio prekinuti terapiju antibioticima. Nakon nekoliko dana grlobolja se vratila snažnija nego prije.

Objasni Tihomiru uzrok ponovne grlobolje.

_____

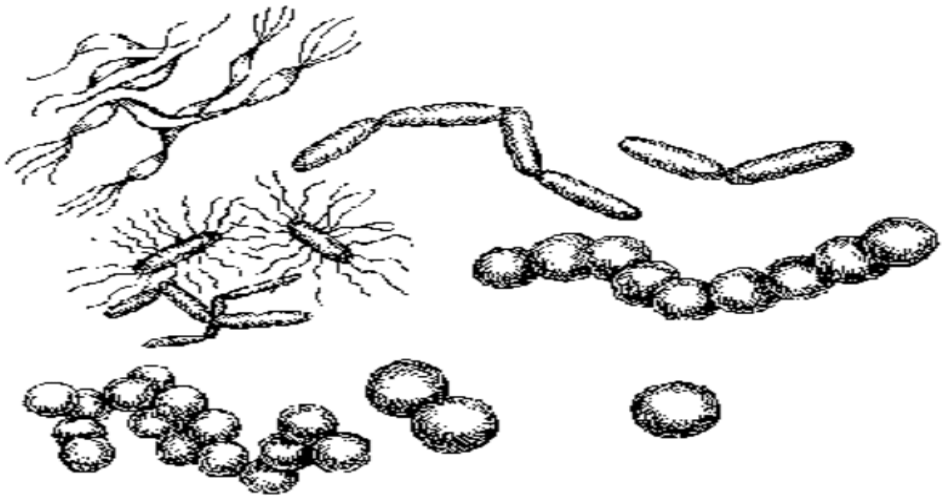
_____

Kako Tihomirova nepromišljena odluka o završetku terapije antibioticima može utjecati i na druge ljude?

_____

_____

4. Zaokruži bakterije prilagođene životu u vodenome okružju.



5. Skeniraj kod, pročitaj članak te odgovori na pitanja.

a) Zašto arktički polarni krug predstavlja visoku opasnost uslijed povećanja koncentracije stakleničkih plinova u atmosferi?

_____

_____

a) Što je bakterijama omogućilo preživljavanje permafrosta tisućama godina?

_____

Literatura *Izvori za učenike i izvori koje je učitelj koristio za pripremu poučavanja.*
Čačev T., Horvat B., Ivandić A., Korač Šubaša A., Marceljak Ilić M., 2021., Biologija 3, Udžbenik iz biologije za treći razred gimnazije, Profil Klett, Zagreb.

Refleksija nakon poučavanja *Zabilješke nakon izvedbe nastavnog sata o uspješnosti sa sugestijama za poboljšanje.*
Ova tema učenicima je vrlo zanimljiva s obzirom da je vezana sa svakodnevnim životom te je poučavanje prožeto učeničkim iskustvima, a stečeno znanje uvijek primjenjivo.

POPIS SLIKA

Slika 1. Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) stanica *Vibrio Gigantis*, ultratanki prerez 60 nm 2

Slika 2. Elektronska mikrografija bakterijskog biofilma Multimedia Gallery - Electron micrograph of bacteria biofilm. | NSF - National Science Foundation 4

Slika 3. Faze procesa formiranja biofilma i prikaz svake elektronskim mikroskopom[10].....6

Slika 4. P. aeruginosa iz ispljuvka pacijenta s cističnom fibrozom. Mukoidne (velike) i nemukoidne (male) kolonije. Mukoidna varijanta sluznice prekomjerno proizvodi alginat, koji je matriks u biofilmu P. aeruginosa u respiratornom traktu bolesnika s cističnom fibrozom. Mukoidne kolonije nalaze se samo u bolesnika s kroničnom biofilmskom infekcijom, a alginat iz kolonija sluznica stoga je antigen specifičan za biofilm.[5] 8

Slika 5. Glavni biološki procesi regulirani mehanizmom QS.[10] 10

Slika 6. Strukture nekih reprezentativnih QS signalnih molekula: (A) AHL, (B) AI-2, i (C) AIP (I, II, III, i IV)[10]. 11

Slika 7. Simbioza između halofilne bakterije *Vibrio fischeri* i havajske bobtail lignje.(izvor: hawaiin-bobtail-squid.jpg (345×345) (nerdbot.com)) 12

Slika 8. V. Harveyi sustav stanične komunikacije QS. Prikazana su stanja niske (A) i visoke (B) gustoće stanica sustava QS. Komponente i njihove pretpostavljene interakcije opisane su u tekstu. H, D, IM, OM i H-T-H označavaju histidin, aspartat, unutarnju membranu, vanjsku membranu i helix-turn-helix, redom. 'P' u krugu označava prijenos signala pomoću fosforelaja. Tijek fosfata u smjeru naprijed ide od histidina (H1) do aspartata (D1) do histidina (H2) do aspartata (D2). AI-1 i AI-2 prikazani su kao peterokuti i trokuti.[12].....14

Slika 9. Fenotip rojenja bakterije Proteus mirabilis. (a) Prikaz strukture kolonija bakterije P. mirabilis na 1.5% agaru. Mala kap preko noći uzgojene kulture P. mirabilis smještena je u središte čvrste podloge uz inkubaciju na 37 °C preko noći. Strelice označavaju pojedinačne terase koje predstavljaju jedan ciklus diferencijacije i rojenja nakon kojeg slijedi konsolidacija i dediferencijacija. (b) Morfologija vegetativnih i rojećih stanica prikazana pomoću mikroskopije faznog kontrasta. Vegetativne stanice dobivene su iz stanica uzgojenih u bujonu dok su rojeće stanice dobivene su iz najudaljenijeg dijela svježeg prstena rojećih stanica[17]..16

Slika 10. Stanični ciklusi *V. parahaemolyticus.* 17

Slika 11. TEM elektronski mikrograf stanica s polarnim (P) i lateralnim (L) flagelama [16] 18

Slika 12. Funkcionalni sadržaj mikrobne zajednice može se procijeniti kao linearna kombinacija taksonomskog sastava i genomskog sadržaja svakog taksona unutar zajednice.[20] 19

Slika 13. Kalijev hidroksid test (foto: Vana Marta Vukman) 21

Slika 14. Izbacivanje agaroznih blokova iz kalupa za izradu (foto: Vana Marta Vukman)....24

Slika 15. Nanošenje agaroznih blokova u jažice (foto: Vana Marta Vukman). 25

Slika 16. Uređaj za PFGE elektroforezu (foto: Vana Marta Vukman). 25

Slika 17. Agarozni gel s vidljivim fragmentima (engl. DNA bands) uzoraka genomske DNA bakterije V. gigantis nakon izlaganja na UV transiluminatoru (foto: Vana Marta Vukman). 26

Slika 18. Relativna zastupljenost pionirskih bakterijskih vrsta u morskoj vodi (S0) i tijekom prva tri dana formiranja biofilma na površini uronjenih stakalaca (B1, B2 i B3). Relativna zastupljenost utemeljena je na broju amplikona gena *16S rRNA* u metagenomu. 29

Slika 19. Predviđeni genski potencijal stanične komunikacije putem AI-2 kemijskih signalnih molekula u pionirskih bakterijskih vrsta u morskoj vodi (S0) i prva tri dana formiranja biofilma na površini uronjenih stakalaca (B1, B2 i B3) 31

Slika 20. Prikaz PFGE gela s predviđenom veličinom genoma bakterije Vibrio gigantis. Stupci 3-7, 9-12 sadrže uzorak bakterije Vibrio gigantis, stupci 2 i 8 Lambda PFG Ladder, a stupci M i 13 Salmonella H9812 marker. 32

Slika 21. Neposjedovanje svojstva bioluminiscencije V. gigantis u usporedbi s Photobacterium spp. (foto: Vana Marta Vukman). 33

Slika 22. Mikrofotografija kolonije bakterije V. gigantis na hranjivoj podlozi Marine agar. (A) Rast bakterije 24 sata nakon inokulacije. Na desnom dijelu kolonije zamjetna je stršeća struktura poput prsta karakteristična za rojenje. (B) Rast bakterije V. gigantis 48 sati nakon inokulacije. 35

Slika 23. Vremenski slijed stvaranja kolonija bakterije *V. gigantis* na površini stakalca u mikrokapilarnom kanalu. (A) početno nakupljanje stanica nakon 1,5 h. (B) Nakupljene stanice nakon 3,5 h. (C) Stanice nakupljene u mikrokoloniju nakon 6h. (D) Izduljene stanične strukture (engl. *swarmer cells*) koje se pokreću rojenjem nastale nakon migracije stanica (9 h).....36

POPIS TABLICA

Tablica 1. Sastav hranjivih tvari i soli za pripremu medija LM i BM.

Tablica 2. Sastav hranjivih tvari i soli za pripremu medija MB.

POPIS LITERATURE

ZNANSTVENI ČASOPISI I ČLANCI:

1. de Souza Valente C, Wan AHL. Vibrio and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *J Invertebr Pathol*. 2021;181. doi:10.1016/j.jip.2020.107527

2. Beleneva IA, Kukhlevskii AD. Characterization of Vibrio gigantis and Vibrio pomeroyi isolated from invertebrates of Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Microbiology (N Y)*. 2010;79(3):402-407. doi:10.1134/S0026261710030173

3. Le Roux F, Goubet A, Thompson FL, et al. Vibrio gigantis sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (Crassostrea gigas). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55(6):2251-2255. doi:10.1099/ijs.0.63666-0

4. Khan F, Tabassum N, Anand R, Kim YM. Motility of Vibrio spp.: regulation and controlling strategies. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(19):8187-8208. doi:10.1007/s00253-020-10794-7

5. Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*. 2020;9(2). doi:10.3390/antibiotics9020059

6. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95-108. doi:10.1038/nrmicro821

7. Penesyan A, Paulsen IT, Kjelleberg S, Gillings MR. Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2021;7(1). doi:10.1038/s41522-021-00251-2

8. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1). doi:10.1186/s13756-019-0533-3

9. Jamal M, Khan AW, Andleeb S. *Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections Mastitis (Bovine and Goat)-Antimicrobial Resistance, and Development of Alternative Therapy for Mastitis View Project Phage Cocktail against Bovine Mastitis View Project*.; 2015. https://www.researchgate.net/publication/285228261

10. Hadla M, Halabi MA. Effect of Quorum Sensing. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Vol 81. Elsevier B.V.; 2018:95-116. doi:10.1016/bs.coac.2018.02.004

11. Papenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(9):576-588. doi:10.1038/nrmicro.2016.89

12. Kenny C.Mok, Ned S.Wingreen1 and Bonnie L.Bassler2. Vibrio harveyi quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. The EMBO Journal Vol. 22 No. 4 pp. 870±881, 2003. doi: 10.1093/emboj/cdg085

13. Asad S, Opal SM. Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Crit Care*. 2008;12(6):236. doi:10.1186/cc7101

14. Brodl E, Winkler A, Macheroux P. Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018;16:551-564. doi:10.1016/j.csbj.2018.11.003

15. Heering J, Ringgaard S. Differential localization of chemotactic signaling arrays during the lifecycle of Vibrio parahaemolyticus. *Front Microbiol*. 2016;7(NOV). doi:10.3389/fmicb.2016.01767

16. Böttcher T, Elliott HL, Clardy J. Dynamics of snake-like swarming behavior of vibrio alginolyticus. *Biophys J*. 2016;110(4):981-992. doi:10.1016/j.bpj.2015.12.037

17. Morgenstein RM, Szostek B, Rather PN. Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in Proteus mirabilis. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(5):753-763. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00229.x

18. Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol*. 2020;38(6):685-688. doi:10.1038/s41587-020-0548-6

19. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol*. 2013;31(9):814-821. doi:10.1038/nbt.2676

20. Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(DATABASE ISS.). doi:10.1093/nar/gkh063

21. Ray VA, Visick KL. LuxU connects quorum sensing to biofilm formation in Vibrio fischeri. *Mol Microbiol*. 2012;86(4):954-970. doi:10.1111/mmi.12035

22. Miyashiro T, Ruby EG. Shedding light on bioluminescence regulation in Vibrio fischeri. *Mol Microbiol*. 2012;84(5):795-806. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08065.x

23. Milton DL. Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology*. 2006;296(2-3):61-71. doi:10.1016/j.ijmm.2006.01.044

24. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:319-346. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001

25. Meighen EA. *ENZYMES AND GENES FROM THE Lux OPERONS OF BIOLUMINESCENT " BACTERIA*.; 1988. www.annualreviews.org

26. A. Eberhard,* A. L. Burlingame, C. Eberhard,* G. L. Kenyon, K. H. Nealson, and N. J. Oppenheimer. Structural Identification of Autoinducer of *Photobacterium fischeri* Luciferase. Biochemistry 1981 20, 2444-2449. doi: 10.1021/bi00512a013

27. Milton DL. Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology*. 2006;296(2-3):61-71. doi:10.1016/j.ijmm.2006.01.044

28. Brodl E, Winkler A, Macheroux P. Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018;16:551-564. doi:10.1016/j.csbj.2018.11.003

29. Gujinović L, Maravić A, Kalinić H, et al. Metagenomic analysis of pioneer biofilm-forming marine bacteria with emphasis on Vibrio gigantis adhesion dynamics. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2022;217. doi:10.1016/j.colsurfb.2022.112619

30. McNally CP, Eng A, Noecker C, Gagne-Maynard WC, Borenstein E. BURRITO: An interactive multi-omic tool for visualizing taxa-function relationships in microbiome data. *Front Microbiol*. 2018;9(MAR). doi:10.3389/fmicb.2018.00365

LITERATURA S INTERNETA

1. https://www.nsf.gov/news/mmg/media/images/staph_biofilm5_f.jpg
2. hawaiin-bobtail-squid.jpg (345×345) (nerdbot.com)

METODIČKA LITERATURA

1. Čačev T., Horvat B., Ivandić A., Korač Šubaša A., Marceljak Ilić M., 2021., Biologija 3, Udžbenik iz biologije za treći razred gimnazije, Profil Klett, Zagreb.

SKRAĆENICE

TSA agar	*Tryptic soy agar*	Triptikaza soja agar
TCBS agar	*Thiosulfate–citrate–bile salts–sucrose agar*	Tiosulfat citrat saharozni agar sa žučnim kiselinama
EPS	*Extracellular polymeric substances*	Izvanstanična polimerna tvar

DNA	*Deoxyribonucleic acid*	Deoksiribonukleinska kiselina
QS	*Quorum sensing*	Detekcija kvoruma
AI	*Autoinducers*	Autoinduktori
AHL	*Acyl homoserine lactones*	Acilirani homoserin lakton
AIP	*Autoinducing peptide*	Autoinducirajući peptid
PICRUSt	*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*	Filogenetsko istraživanje zajednica rekonstrukcijom nezapaženih stanja
KEGG	*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*	Kyoto enciklopedija gena i genoma
rRNA	*Ribosomal ribonucleic acid*	Ribosomska ribonukleinska kiselina
MA	*Marine agar*	Marin agar
MB	*Marine bujon*	Marin bujon
LM	*Lumminiscence agar*	Luminiscentni agar
PFGE	*Pulsed-field gel electrophoresis*	Gel elektroforeza u pulsirajućem polju
kb	*Kilobase*	Kilobaza