

»Mladi za napredek Maribora 2014«
31. srečanje

**Vpliv podlage in gojitvenega medija na sposobnost tvorbe biofilmov pri
rdeči kvasovki (*Rhodotorula mucilaginosa*)**

Raziskovalna naloga
Področje: Biologija

PROSTOR ZA NALEPKO



Maribor, februar 2014

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	3
KAZALO SLIK.....	5
KAZALO GRAFOV	5
KAZALO TABEL.....	5
POVZETEK	6
ZAHVALA.....	7
1 UVOD	8
1.1 Izhodišča in namen dela	8
1.2 Raziskovalno vprašanje.....	9
1.3 Hipoteze	9
2 PREGLED OBJAV	10
2.1 Biofilmi	10
2.2 Kvasovke.....	13
2.2.1 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	13
3 MATERIALI IN METODE DE LA	15
3.1 Materiali	15
3.1.1 Delovni mikroorganizem.....	15
3.1.2 Osnovni material	15
3.1.3 Kemikalije	16
3.1.4 Laboratorijski pribor.....	16
3.1.5 Laboratorijske aparature.....	17
3.2 METODE	17
3.2.1 Priprava gojišč.....	17
3.2.2 Priprava podlag.....	18
3.3 Priprava umeritvenih krivulj	18
3.3.1 Priprava umeritvene krivulje za polisaharide	18
3.3.2 Priprava umeritvene krivulje za proteine	19
3.4 Priprava prekonočne kulture <i>Rhodotorule mucilaginose</i>	20
4 NASTAVITEV POSKUSA	21
4.1 Spremljanje razvoja biofilma	21

4.1.1 Meritve optične gostote	21
5 REZULTATI	23
5.1 Poskus.....	25
6 RAZPRAVA	29
6.2 Ocena metode in možni viri napak.....	31
6.3 Izboljšave, smernice za delo.....	32
7 DRUŽBENA ODGOVORNOST	33
8 ZAKLJUČEK.....	34
9 UPORABLJENI VIRI IN LITERATURA.....	35
10 VIRI SLIK.....	40
11 PRILOGE	41
Priloga 1: Primer meritve s programom Logger Pro	41
Priloga 2: Primer grobih rezultatov meritev	42
Priloga 3: Povprečne vrednosti meritev	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Sestavljanje puzzlov	7
Slika 2: Faze razvoja rasti biofilma pod elektronskim mikroskopom (Medscape)	11
Slika 3: A: Rhodotorula mucilaginosa (redčitvena vrsta) (lasten vir); B: Rhodotorula mucilaginosa pod mikroskopom pri 400× povečavi (lasten vir)	14
Slika 4: Shema poteka dela	15
Slika 5: Priprava redčitvene vrste (Methods in Microbial Ecology)	20
Slika 6: Tvorba biofilma na hrapavi plastiki v sojinem mleku.....	25
Slika 7: Primer meritve s programom Logger Pro	41

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Umeritvena krivulja za proteine (meritve absorbance pri 595,2 nm)	23
Graf 2: Umeritvena krivulja za polisaharide (meritve absorbance pri 485,8 nm)	24
Graf 3: Časovno spreminjanje optične gostote vzorcev iz različnih medijev na hrapavi plastiki	26
Graf 4: Časovno spreminjanje količine polisaharidov v različnih medijih na hrapavi plastiki	26
Graf 5: Časovno spreminjanje količine beljakovin v različnih medijih na hrapavi plastiki.....	27
Graf 6: Časovno spreminjanje optične gostote vzorcev iz različnih podlag v gojišču YEPD	27
Graf 7: Časovno spreminjanje količine polisaharidov na različnih podlagah v gojišču YEPD	28
Graf 8: Časovno spreminjanje količine beljakovin na različnih podlagah v gojišču YEPD	28

KAZALO TABEL

Tabela 1: Slikovna uprizoritev nastavitve poskusa	22
Tabela 2: Sprememba pH medijev med poskusom	25
Tabela 3: Grobi podatki o opravljenih meritvah (6. dan)	42
Tabela 4: Spreminjanje vrednosti pri kontrolah (grobi podatki)	43
Tabela 5: Časovno spreminjanje optične gostote vzorcev iz različnih medijev na hrapavi plastiki	44
Tabela 6: Spreminjanje količine polisaharidov in beljakovin v različnih medijih, na hrapavi plastiki.	44
Tabela 7: Optična gostota vzorcev iz različnih medijev.....	45
Tabela 8: Spreminjanje količine polisaharidov in beljakovin na različnih podlagah, v mediju YEPD	45

POVZETEK

Biofilmi so zelo odporni skupki mikroorganizmov, ki se razvijajo na trdnih podlagah, kjer so na voljo hranilne snovi. Predstavljajo velik problem v medicini in industriji. Namen te raziskovalne naloge je bil spremljanje rasti biofilma glive rdeče kvasovke (*Rhodotorula mucilaginosa*) v različnih medijih (gojišče YEPD, sojino in navadno mleko, jabolčni in breskov sok) in na različnih podlagah (gladka in hrapava plastika, alufolija, tetrapak in steklo). Razvoj biofilma na ploščicah smo ovrednotili z določanjem optične gostote, z merjenjem količine polisaharidov ter proteinov. Rezultati potrjujejo hipotezo o najhitrejši razvoju biofilma na hrapavi plastiki. Najmanj ugodni površini za rast biofilma sta bili aluminijasta folija in steklo. Za najugodnejši medij se je izkazalo sojino mleko, najmanj ugoden pa sadni sok. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da je najugodnejša embalaža za hrano steklo, kar bi lahko upoštevali tudi v prehrambeni industriji.

ZAHVALA

Zelo naju veseli raziskovanje, še posebej v smeri biologije, vendar sama radovednost ni dovolj. Potrebuješ nekoga, ki te usmerja, daje navodila in te spodbuja k cilju. Radi bi se zahvalili najinima mentorjema, ki sta imela potrpljenje, da sta naju vodila do zastavljenega cilja. Dajala sta nama napotke, pomagala pri mikrobioloških tehnikah, ki jih prej nisva poznali. Še posebej bi se rade zahvalile mentorici, ki je z nama dolge ure preživela v šolskem laboratoriju in nama pomagala pri delu. Rade bi se zahvalile tudi šoli, ki jo obiskujeva, ker je bila pripravljena odstopiti šolski laboratorij.

Zahvalili se bi tudi ostalim profesoricom, ki so z nama delile svoje znanje.

Fakulteta za medicino je bila pripravljena odstopiti nekatere kemikalije, ki sva jih potrebovali za izvedbo.

In na vse zadnje, rade bi se zahvalile tudi staršem, ki naju podpirajo že od samega začetka.

Z Vašo pomočjo nama je uspelo sestaviti še tako ne mogoče puzzle. Hvala!



S pomočjo vseh zahvaljenecv



Slika 1: Sestavljanje puzzlov

1 UVOD

1.1 Izhodišča in namen dela

Vlažne površine so pomembno prebivališče mikroorganizmov, saj nudijo lažji dostop do hranil, zaščito in omogočajo, da celice ostanejo na istem, ugodnem mestu in jih ne odplavi. Mikroorganizmi, kot so bakterije in enocelične glive, na trdni podlagi pogosto tvorijo biofilme – skupke celic, pritrjenih na podlago. Celice izločajo zunajcelični matriks, ki jim omogoča, da ostanejo zlepljene med seboj in pritrjene na podlago (Madigan, 2012). Biofilmi so zelo obstojni in težko odstranljivi, zato predstavljajo velik problem v bolnišnicah, kjer se mikrobne kolonije ustvarijo na katetrih in v intravenoznih cevkah, kar lahko povzroči resne klinične okužbe. Otežijo postopke čiščenja, dezinfekcije, težave povzročajo tudi v industriji, saj zmanjšajo toplotno prevodnost (Shi, 2009) in povzročijo mehanične okvare (AquaFit4Use, 2010). Pomembno vlogo imajo tudi v živilski industriji, kjer so pogosto vzrok za kontaminacijo hrane, kar bilo je glavno izhodišče za naše raziskovalno delo.

Bakterijski biofilmi so bolj raziskani kot biofilmi, ki jih tvorijo glive. Eden izmed razlogov je gotovo ta, da jih težje kultiviramo kot bakterije, saj rastejo počasneje in so bolj podvržene kontaminaciji z bakterijami (Saithong, 2009) in drugimi glivami (Kronlof in Haikara, 1991). Zato smo se odločili, da se v raziskovalni nalogi ukvarjamo s sposobnostjo tvorbe biofilma pri rdeči kvasovki *Rhodotorula mucilaginosa*, ki jo omenjajo kot eno izmed najpogostejših vzrokov za kontaminacijo hrane (Deak, 1996).

Namen raziskovalne naloge je bil spremljanje rasti biofilma glive rdeče kvasovke *Rhodotorula mucilaginosa* v izbranih medijih (gojišče YEPD, sojino mleko, navadno mleko, jabolčni sok in breskov sok) in na izbranih podlagah (gladka in hrapava plastika, aluminijasta folija, tetrapak in steklo). Razvoj biofilma smo spremljali z merjenjem optične gostote z biofilma odlepljenih celic, količine polisaharidov in količine proteinov.

1.2 Raziskovalno vprašanje

V raziskovalni nalogi smo želeli ugotoviti, katera podlaga (gladka in hrapava plastika, aluminijasta folija, steklo, tetrapak) in kateri medij (sojino in kravje mleko, jabolčni in breskov sok, YEPD tekoče gojišče) v odvisnosti od časa sta najugodnejša za razvoj biofilma rdeče kvasovke *Rhodotorula mucilaginosa*.

1.3 Hipoteze

Pričakovali smo, da bo pri hrapavi plastiki povprečna rast biofilma v odvisnosti od časa najuspešnejša, saj hrapava plastika nudi osebkom večjo varnost in oprijemljivost (Gattlen, 2011). Pričakujemo tudi, da bo rast biofilma na plastiki boljša kot na ostalih podlagah (steklo, tetrapak, alufolija), saj nanjo močneje vplivajo korozivni produkti kvasovk (AquaFit4Use, 2010). Biofilmi bodo na steklu in alufoliji rasli občutno najpočasneje, saj se kvasovke ne morejo dobro oprijeti.

Pričakovali smo tudi, da se bo biofilm najboljšje razvijal v gojišču YEPD, saj je to optimalno gojišče za kvasovke, sledilo mu bo sojino mleko in kravje mleko, zaradi nevtralne pH vrednosti, najslabše pa se bo razvijal v jabolčnem in breskovem soku, kljub temu da vsebujeta precej sladkorjev.

Biofilm se bo boljše razvijal v breskovem soku kot v bistrem jabolčnem soku, saj je gostejši in zunanje sile manj vplivajo na celice v mediju. Vrednost pH-ja močno vpliva na rast biofilma. Najbolj optimalen pH za rast kvasovke *R. mucilaginosa* naj bi bil okrog 7 (Aksu, 2005).

2 PREGLED OBJAV

2.1 Biofilmi

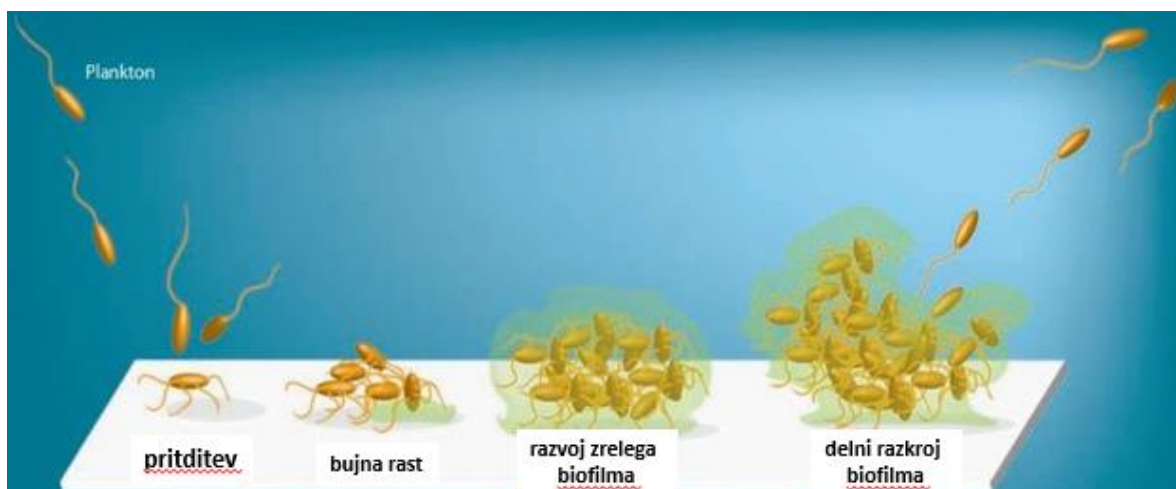
Mnogo je znanega o bakterijskih biofilmih, saj se z njimi ukvarjajo številni raziskovalci (Davies, 1997; Gavin, 2009; Webb, 2003), manj pa o glivnih biofilmih (Jabra-Rizk, 2004; Douglas, 2002; Douglas, 2003; Ramage, 2001, Ramage, 2002). Najverjetnejši vzrok je pogostost pojavljanja biofilmov v naravi - bakterijski so veliko pogostejši – in pa seveda hitrost rasti mikroorganizmov – glive rastejo počasneje in so bolj podvržene kontaminaciji z bakterijami (Saithong, 2009) in drugimi glivami (Kronlof in Haikara, 1991).

Površina za nastanek biofilma je lahko bodisi »organska« (na primer koža, sluznica, površina rastlin) bodisi anorganska (kamnine v hidrotermalnih vrelih, sediment v solinah). Vsaka naravna ali umetna površina obdana s hranili, ki je izpostavljena mikroorganizmom, bo prej ali slej kolonizirana. Biofilmi so dinamične strukture mikroorganizmov in njihovih zunajceličnih produktov (zunajceličnega matriksa, ki je produkt mešanice polisaharidov, proteinov in nukleinskih kislin), ki se prilagajajo okolju in so sestavljeni iz ene, dveh ali več vrst mikroorganizmov (Madigan, 2012).

Glive lahko rastejo neposredno na različnih vrstah plastike, gumi, silikonu (Reynolds, 2001) ali na neobarvanem steklu (Brugnoni, 2007), lahko pa tudi na bakterijskem (Jenkinson, 2007) ali glivnem biofilmu (Webb, 2000) kot sekundarni kolonizator.

Od okolja (oblike in zgradbe podlage, dostopnost hranil, hidrodinamike) je odvisna tudi struktura. Pritrjeni mikroorganizmi oblikujejo makro kolonije, v katerih je na tisoče celic. Ko se posamezne celice pritrdijo na podlago, pričnejo komunicirati z drugimi mikroorganizmi (t.i. quorum sensing) in izražati gene, ki so potrebni za izločanje zunajceličnega matriksa in posledično razvoj biofilma. Mehanizem, kako celice zaznajo primerno podlago v mnogih primerih še ni natančno raziskan. Prehod iz planktonskega načina življenja v tvorbo biofilma naj bi bil sprožen s tvorbo cikičnega dimernega gvanozin monofosfata (c-di-GMP), ki kot sekundarni sporočevalec v celici ustvari ustrezni »odgovor«, med drugim vpliva na encime, ki sodelujejo pri tvorbi ekstracelularnega matriksa (Madigan, 2012).

Razvoj glivnega biofilma je podoben bakterijskemu. Faze razvoja biofilma so: reverzibilna in ireverzibilna pritrnitev glivnih celic na površino, bujna rast in tvorba mikrokolonij, razvoj zrelega biofilma in delni razkroj biofilma, ter sprostitvev dela mikrobnih celic, ki si poiščejo nove površine za ponovni razvoj (Harding, 2009) (Slika 2). Da se del biofilma sprostí, so potrebni encimi. K procesom ločevanja od površine pripomorejo intenzivnost pretoka in vrtinčenje tekočin na površini biofilma, prisotnost kemičnih snovi v tekočini in spremembe na površini materiala, na kateri raste biofilm (Madigan, 2012).



Slika 2: Faze razvoja rasti biofilma pod elektronskim mikroskopom (Medscape)

Glede na starost biofilma delimo tri faze razvoja: zgodnjo (0-11 h), vmesno (12-30 h) in zrelo fazo (38-72 h). Glavna razlika v rasti biofilma je v morfološkem prehodu nekaterih celic v fazi dozorevanja biofilma. Kvasovke, kot sta na primer *Candida albicans* in *Saccharomyces cerevisiae*, se najprej oprimejo podlage in izgradijo eno plast kroglastih celic, nato tekom dozorevanja biofilma tvorijo še tako imenovane pseudohife. (Vopalenska, 2010).

Po neločljivi pritrnitvi na podlago nekateri mikroorganizmi ustvarijo zaščitne plasti iz eksopolisaharidov, ki jih varujejo pred vplivi okolja. So prepustni za transport kisika in hranilnih snovi iz okolice in ogljikovega dioksida in razgrajenih snovi v nasprotni smeri. Ugotovili so obstoj t. i. vodnih kanalčkov, preko katerih se z okolico izmenjujejo hranilne snovi, presnovki in plini (Madigan, 2012).

Razlogov, zakaj celice tvorijo biofilm je več. Rast v skupnosti – biofilmu omogoča obrambo pred zunanji dejavniki, torej silami, ki bi celice sicer odstranile, zaščitene so pred toksičnimi molekulami in celice si med sabo lažje izmenjavajo hranila. Celice so tako povezane in izmenjava genov je zelo pogosta. Biofilmi predstavljajo eno najuspešnejših oblik življenja. Raziskave so pokazale, da so bakterijske celice v biofilmu 10-1000-krat bolj odporne na antibiotike, kot planktonske celice (Donlan, 2002). Le malo antibiotikov je bilo uspešnih pri uničevanju mladega biofilma (Olson, 2002).

Glivni biofilmi so vzrok mnogih težko ozdravljivih bolezni, prav zaradi izjemne odpornosti na antimikotike (Jabra-Rizk, 2004). So pogost vzrok mikrobnih okužb kot so vnetje srednjega ušesa, povzročajo zobne obloge, tudi ledvične kamne (Madigan, 2012), pojavljajo se tudi na medicinskih vsadkih, kot so katetri in umetni sklepi (Douglas, 2002; Madigan, 2012). Najbolj so podvrženi imunsko oslabljeni ljudje (okuženi z virusom HIV, bolniki z rakom in po presaditvi organov, starostniki in novorojenčki) (Jabra-Rizk, 2004). Podatki kažejo, da pride v Združenih državah Amerike do kar 10 milijonov okužb letno zaradi biofilmov (Madigan, 2012). Pomemben faktor so tudi v množičnih izbruhih bolezni. Običajno se v vodnih pipah in ceveh razvijejo biofilmi neškodljivih mikroorganizmov, v primerih, ko kolonizirajo patogeni mikroorganizmi pa lahko pride do množičnih, periodičnih izbruhov bolezni, ko se patogene celice ločijo od biofilma. Takšne vrste so nekateri izbruhi kolere (Madigan, 2012).

V industriji biofilmi povzročijo izgube v vrednosti nekaj milijard dolarjev letno zaradi propadlih produktov (Kumar, 1998), zmanjšujejo toplotno prevodnost (Shi, 2009), povzročajo počasnejši pretok tekočin in korozijo pip (Madigan, 2012), povečajo potrošnjo goriva (Chambers, 2006) in uporabo kemikalij za nadzor in odstranjevanje biofilmov (Lyon, 2008). Najdemo jih tudi v domačem okolju kot so kuhinjske gobe, krpe za brisanje posode (Rayner, 2004) in v pomivalnih strojih (Gattlen, 2010). Biofilmi v gospodinjstvih ovirajo higieno, sploh v primerih umivanja pri nižjih temperaturah in brez uporabe belila (Munk, 2001).

Biofilme najdemo na prehranski mehanizaciji (Brugnoni, 2007), kjer močno vplivajo na kvaliteto in okus produktov, zato je zelo pomembna izbira materiala, aseptično delo, oprema in primerna uporaba detergentov (Ganesh Kumar, 1998). Biofilmi, ki se pojavijo v živilstvu, so lahko vzrok kvarjenja hrane, mnogi pa so lahko tudi patogeni (Chmielewski, 2006).

Tvorbo biofilmov lahko proučujemo v mikrotitrskih ploščah, vendar je to omejeno na mlade biofilme (24 - 48 h). Kasnejši dotok hranil ni mogoč, kar pa niso primerni pogoji za razvoj biofilma, ki se razvije v industrijskih napravah ali v napravah, ki jih uporabljamo doma (Harding, 2009). Alternativa preučevanja zrelih biofilmov je razvoj biofilmov v bioreaktorjih. To je že bilo uspešno izvedeno z bakterijskimi biofilmi, ki so jih gojili na vrtljivih diskah (Pitts, 2001) ali v bioreaktorju, ki ga je razvil Center za nadzor bolezni (CDC- Centers of Disease Control) (Goeres, 2005; Hadi, 2010). Proučevanje s pomočjo bioreaktorja je primerno za raziskave, ki se osredotočajo na razvoj biofilma, ne pa toliko za študij protimikrobnega delovanja posameznih snovi (Ramage, 2001).

Poleg kemikalij je na razpolago kar nekaj postopkov odstranjevanja biofilmov, kot je na primer soniciranje (raba ultrazvoka) (Muller, 2007). Še vedno je težko določiti uspešnost odstranjevanja biofilmov, saj obstaja le nekaj sistemov, ki to zmorejo (Hamilton, 2002; Pitts, 2003; Bloss, 2004).

2.2 Kvasovke

Kvasovke so netaksonomska kategorija gliv, definirana z ozirom na morfološke in fiziološke značilnosti. So filogenetsko raznorodna skupina organizmov in pripadajo dvema glavnima taksonoma in sicer Ascomycotina in Basidiomycotina (Raspor, 1996).

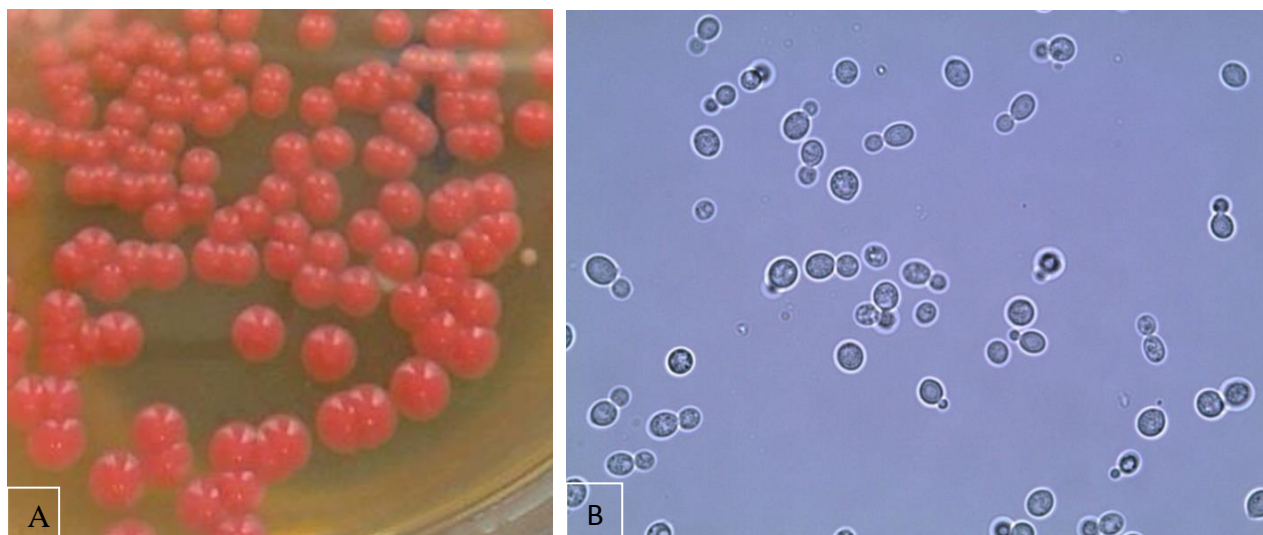
Večinoma so fakultativni anaerobi. To pomeni, da kadar imajo na voljo kisik, presnavljajo sladkor (glukozo) z aerobnim celičnim dihanjem. Ko pa jim kisika zmanjka, sladkor presnavljajo anaerobno, z alkoholnim vrenjem (Vičar, 2011).

Razlikujemo prave kvasovke in neprave kvasovke. Pri nepravih kvasovkah poznamo samo nespolni način razmnoževanja. K nepravim kvasovkam uvrščamo rodove: *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* in vinsko kvasovko. (SSKJ, 2000)

2.2.1 *Rhodotorula mucilaginosa*

Sevi vrste *Rhodotorula mucilaginosa* so bazidiomicetne kvasovke (Slika 3 B), za katere je značilna rdeča pigmentacija (Slika 3 A), ki je rezultat pigmentov karotenoidov, ki jih kvasovka proizvaja kot zaščito pred določenimi valovnimi dolžinami, ki bi lahko škodile celicam (Gattlen, 2011). Pri 25 °C so lahko kolonije oranžne, rožnate ali koralne barve,

gladke ali hrapave. Starejše ime zanjo je *Rhodotorula rubra*. Najdemo jo v zraku, jezerih in oceanih. Naseli se v rastlinah in sesalcih. Je pogost vzrok okužb pri imunsko oslabljenih ljudeh (Dworecka-Kaszak, 2011). Vrsta *Rhodotorula mucilaginosa* je striktno aeroben organizem, nesposoben fermentacije (Dworecka-Kaszak, 2011, Sponholz, 1992) in je med najpogostejšimi vzroki kontaminacije hrane. (Deak, Beuchat, 1996; Venturini, 2002)

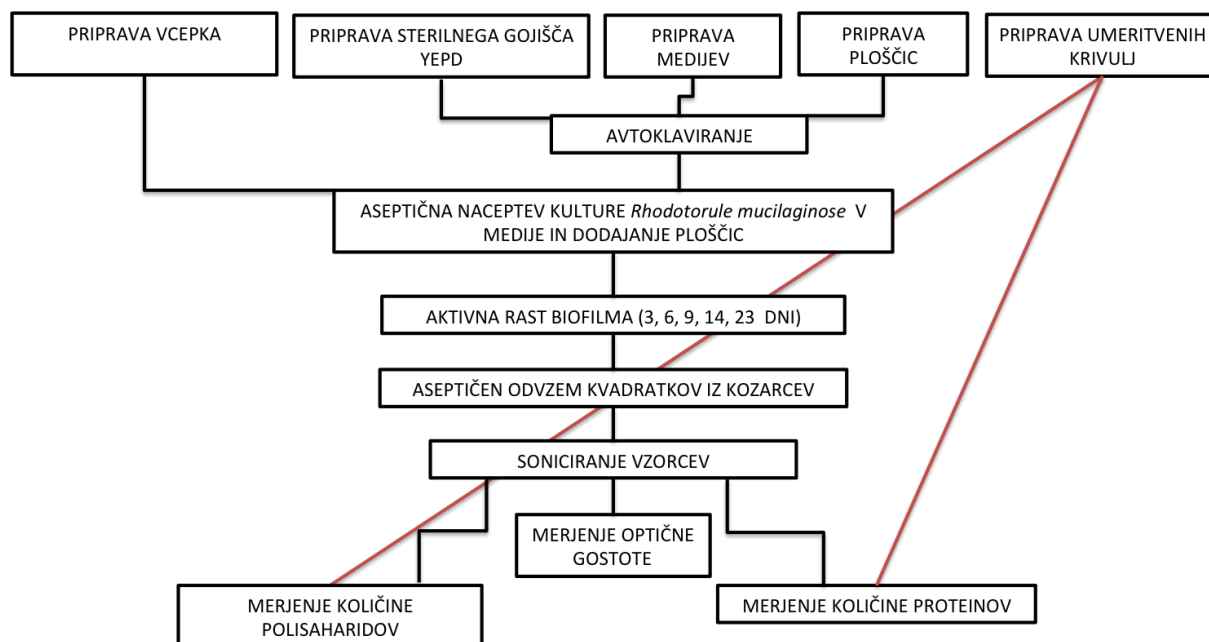


Slika 3: A: *Rhodotorula mucilaginosa* (redčitvena vrsta) (lasten vir); B: *Rhodotorula mucilaginosa* pod mikroskopom pri 400 \times povečavi (lasten vir)

R. mucilaginosa se veliko boljše kolonizira na bolj hrapavi površini, kot na gladki (Quiryneen, 1991; Muller, 2007; Gattlen, 2011), saj omogoča zaščito pred zunanji silami (Zottola, 1994; Palmer, 2007; Gattlen, 2011). Količina polisaharidov, s katerimi lahko spremljamo rast biofilma, se na hrapavi podlagi konstantno večja, čeprav vrednosti variirajo (Gattlen, 2011).

3 MATERIALI IN METODE DE LA

Raziskovalno delo je potekalo v stopnjah prikazanih na sliki 4.



Slika 4: Shema poteka dela

3.1 Materiali

3.1.1 Delovni mikroorganizem

V poskusu smo uporabili sev kvasovke *Rhodotorula mucilaginosa*, ki smo ga prejeli iz interne zbirke Oddelka za mikrobiološke raziskave Centra za mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. Kulturo smo do poskusa vzdrževali pri sobni temperaturi na trdnem gojišču YEPD in precepljali na 5 dni.

3.1.2 Osnovni material

- ploščice 2,2×2,2 cm iz stekla za mikroskopijo (15 kom),
- ploščice 2,2×2,2 cm iz plastike - embalaža od sladoleda (90 kom),
- ploščice 2,2×2,2 cm iz trdne aluminijaste folije (15 kom),
- ploščice 2,2×2,2 cm tetrapaka - embalaža od mleka (15 kom),
- bistri jabolčni sok (Fructal),
- gosti breskov sok (Fructal),

- alpsko mleko, 3,5% maščobe (Ljubljanske mlekarne),
- sojino mleko (Alpro),

3.1.3 Kemikalije

- 96% etanol,
- sterilna 0,9% raztopina NaCl,
- 80% raztopina fenola (Sigma Aldrich),
- 98% žveplova (VI) kislina (Sigma Aldrich),
- glukoza (Fluka),
- kvasni ekstrakt (Kemika, Zagreb),
- pepton ((Fluka),
- Bradford reagent (Sigma Aldrich),
- BSA (goveji serumski protein) – manjša količina, pridobljena iz Medicinske fakultete Maribor.

3.1.4 Laboratorijski pribor

- plastične sterilne cepilne zanke (Golias Labortechnika),
- laboratorijske rokavice (NITRIL),
- čaše (50mL, 100mL, 250mL in 500mL),
- epruvete (18×100 mm),
- merilni valji (100mL, 500mL),
- merilna bučka (25mL, 500mL),
- plastične petrijevke (premera 9 cm),
- avtomatske pipete s pripadajočimi nastavki - LLG Micropipette (100-1000 μ L, 10-100 μ L, 1-10mL),
- avtomatska pipeta Transferpette S (100-1000 μ L)
- pincete,
- spatula Drigalski,
- kivete (Ratiolab, 27110),
- plastični lončki (0,08 L),
- kozaci za vlaganje (750mL),

- aluminijasta folija,
- parafilm,
- plutovinasti zamaški,
- tapetniški nožek in brusilni papir.

3.1.5 Laboratorijske aparature

- spektrofotometer UV/VIS (Vernier),
- prenosni računalnik z računalniškim programom Logger Pro,
- pH meter (Vernier),
- ultrazvočna kopel (Asonic, HOME 750S),
- tehtnica (Kern),
- avtoklav (CertoClav CVEL 12 LGS (LGA, Nurnberg),
- stresalnik za epruvete RS-VA10 (Phoenix),
- telefon HTC,
- mikroskop ICC50 (Leica),
- gorilnik (Campingaz),
- termometer (HANNA Checktemp1).

3.2 METODE

3.2.1 Priprava gojišč

Gojišče smo pripravili po postopku, ki ga je opisal Atlas (1993, povzeto po Pohar, 2006):

Kvasni ekstrakt	10 g
Pepton	20 g
D-glukoza	20 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Zatehtane sestavine smo raztopili v 900 mL destilirane vode in dolili vodo do 1 L. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121°C. Za pripravo trdnega gojišča smo tekočemu pred avtoklaviranjem dodali agar, 20 g/L. Po avtoklaviranju smo trdno gojišče razlili v sterilne petrijevke. Strjeno in ohlajeno gojišče smo hranili pri 4 °C do uporabe.

Breskov in jabolčni sok smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Zaradi visokih temperatur sta sojino in kravje mleko denaturirala, zato smo v nadaljevanju sterilizirali le steklene kozarce, kamor smo nato ob ognju nalili mleko iz originalne embalaže.

3.2.2 Priprava podlag

Podlago za rast biofilma smo pripravili iz sledečih materialov: steklo, tetrapak, aluminijast pladenj in plastika. Material oziroma embalažo smo s tapetniškim nožkom narezali na ploščice velikosti 2,2×2,2 cm. Za spremljanje razvoja biofilma na steklu smo uporabili krovna stekla za mikroskopiranje.

15 ploščic iz plastike smo pustili gladkih, neobdelanih, 75 ploščic pa smo obrusili z brusilnim papirjem tako, da smo preko vsake ploščice potegnili 5×, na vse z približno enako silo, na obeh straneh.

Ploščice smo nato zavili v aluminijasto folijo in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

3.3 Priprava umeritvenih krivulj

3.3.1 Priprava umeritvene krivulje za polisaharide

Standardne raztopine glukoze smo pripravili po naslednji shemi:

Standardna raztopina 40 µg glukoze/mL

Glukoza	0,04 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Standardna raztopina 30 µg glukoze/mL

Raztopina 40 µg glukoze/mL	18,75 mL
Destilirana voda	do 25 mL

Standardna raztopina 20 µg glukoze/mL

Raztopina 40 µg glukoze/mL	12,50 mL
Destilirana voda	do 25 mL

Standardna raztopina 10 µg glukoze/mL

Raztopina 40 µg glukoze/mL	6,25 mL
Destilirana voda	do 25 mL

1 mL posameznega vzorca smo dodali 25 µL 80% fenola. Zaprto epruveto smo stresli. Nato smo dodali 2,5 mL 98% žveplove (VI) kisline (v največjem časovnem razmiku 20-30 s) v center raztopine in premešali. Raztopino smo ohladili pri sobni temperaturi (10 minut), spet stresli s stresalnikom in inkubirali 20 minut v vodni kopeli pri 26 °C. Pred meritvami smo vzorce ponovno premešali s stresalnikom. Izmerili smo absorbanco pri 485,8 nm. Vsako meritev smo opravili le enkrat. Na podlagi rezultatov smo izdelali umeritveno krivuljo (graf 2).

3.3.2 Priprava umeritvene krivulje za proteine

Umeritveno krivuljo za določanje proteinov smo pripravili s standardom BSA (goveji serumski albumin) v razponu koncentracij od 0-40µg/ml (Gattlen, 2011).

Standardna raztopina 40 µg BSA/mL

BSA	0,04 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Standardna raztopina 30 µg BSA/mL

Raztopina 40 µg BSA/mL	18,75 mL
Destilirana voda	do 25 mL

Standardna raztopina 20 µg BSA/mL

Raztopina 40 µg BSA/mL	12,50 mL
Destilirana voda	do 25 mL

Standardna raztopina 10 µg BSA/mL

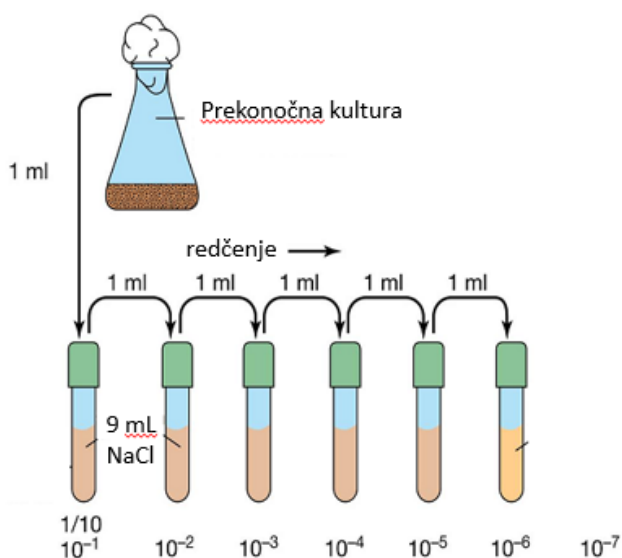
Raztopina 40 µg BSA/mL	6,25 mL
Destilirana voda	do 25 mL

1 mL posameznega vzorca smo dodali 3 mL Bradfordovega reagenta in stresli s stresalnikom. Izmerili smo absorbanco pri 595,2 nm. Na podlagi rezultatov smo izdelali umeritveno krivuljo (graf 1).

3.4 Priprava prekončne kulture *Rhodotorule mucilaginose*

V erlenmajerico s 50 mL sterilnega medija YEPD smo aseptično prenesli eno kolonijo kvasovke *R. mucilaginosa*, dobro pretresli in inkubirali pri sobni temperaturi preko noči.

Naslednji dan smo preverili gostoto celic v mediju s pripravo redčitvene vrste. Pripravili smo serijo epruvet z 9 mL sterilne fiziološke raztopine. Iz dobro premešane prekončne kulture smo prenesli 1 mL kulture v prvo epruveto s fiziološko raztopino ter dobro pretresli s stresalnikom. Tako smo dobili 10-krat manjšo koncentracijo (10^{-1}). Postopek smo ponavljali, dokler nismo dosegli redčitve 10^{-5} (slika 5). 100 μ L posamezne redčitve smo razmazali po površini trdnega gojišča YEPD s spatulo drigalski. Inkubirali smo 3 dni pri sobni temperaturi in nato prešteli število kolonij, ki so zrasle pri posameznih redčitvah. Pri izračunu smo upoštevali le nekatere redčitve kjer je zraslo med 30-300 kolonij.



Slika 5: Priprava redčitvene vrste (*Methods in Microbial Ecology*)

Po štetju glede na redčitev smo preračunali število celic v osnovnem vzorcu in rezultat izrazili kot število kolonij tvorečih enot (CFU-Colony Forming Units) v 1 mL suspenzije celic.

4 NASTAVITEV POSKUSA

Na dan začetka poskusa smo v kozarce s sterilnim gojitvenim medijem aseptično nacepili po 1 mL prekonočne kulture rdeče kvasovke in dobro premešali. Sedem do osem ploščic smo aseptično prenesli v kozarce z nacepljenim gojitvenim medijem (tabela 1). S sterilno cepilno zanko smo ploščice razporedili tako, da se niso prekrivale.

Nastavili smo tudi dve kontroli: v prvi kozarec s sterilizirano destilirano vodo in kvasovkami smo dodali 1mL prekonočne kulture rdeče kvasovke in sterilne ploščice hrapave plastike. V drugi kozarec pa sterilnemu YEPD gojišču s ploščicami hrapave plastike nismo dodali kvasovk.

4.1 Spremljanje razvoja biofilma











Poskus je potekal 23 dni. V tem času smo iz kulture v časovnih razmakih tri, šest, devet, štirinajst in triindvajset dni odvzeli po tri ploščice in analizirali prisotnost biofilma.

Pripravili smo si majhne plastične lončke (0,08 L), v katere smo nalili po 5 mL sterilne raztopine 0,9% NaCl. Na dan meritve smo ploščice iz posameznega materiala in posameznega medija aseptično prenesli v 30 mL 0,9% raztopine NaCl, da smo odstranili nepritrjene celice. Sprane ploščice smo prenesli v lonček s 5 mL fiziološke raztopine. Vzorec smo 1 minuto sonicirali v ultrazvočni kopeli. Suspenzije smo hranili pri 4 °C (največ 4 h), pred nadaljnjimi analizami smo vzorce stresli s stresalnikom. Sonicirano suspenzijo smo nato uporabili za analizo koncentracije polisaharidov in proteinov (metoda opisana v poglavju 3.3 Priprava umeritvenih krivulj). Pri vsakem soniciranem vzorcu smo tudi izmerili optično gostoto pri 600 nm.

4.1.1 Meritve optične gostote

S avtomatsko pipeto smo odvzeli 4 mL sonicirane suspenzije, z njo napolnili kivete in s spektrofotometrom izmerili optično gostoto pri 600 nm. Po opravljeni meritvi smo suspenzijo uporabili za določanje količine polisaharidov in beljakovin.

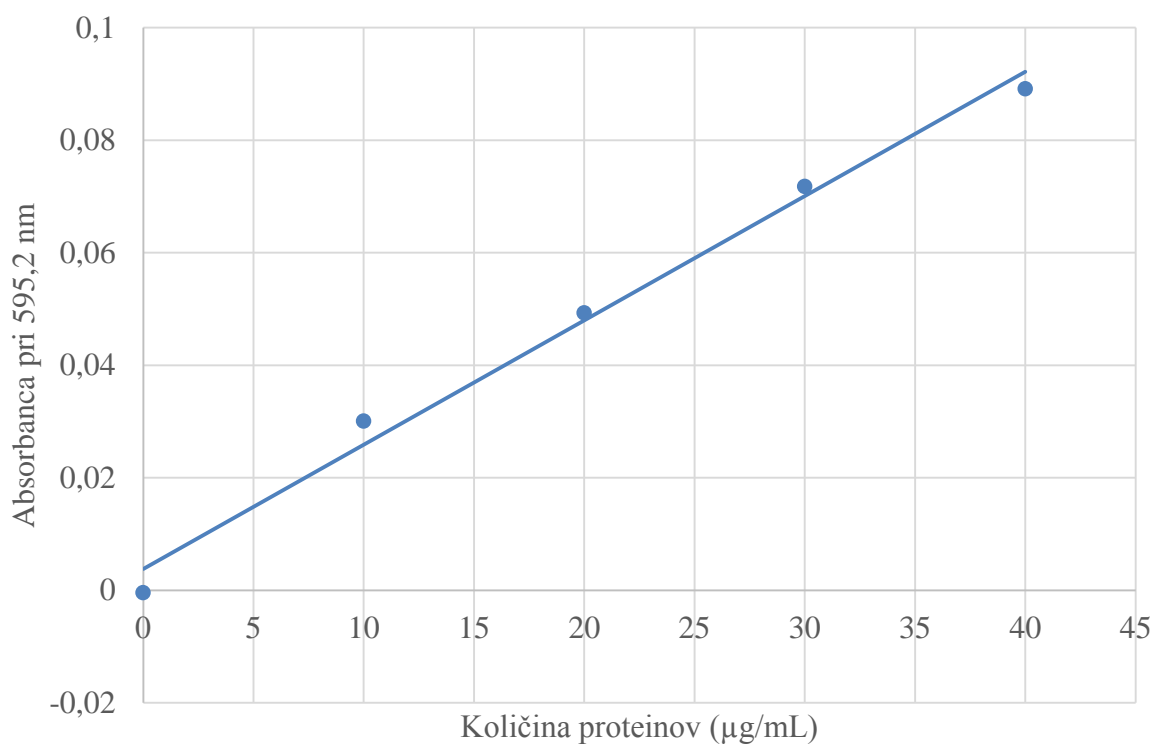
Tabela 1: Slikovna uprizoritev nastavitve poskusa

1. del poskusa: Preizkus podlage Gojitveni medij YEPD		2. del poskusa: Preizkus gojitvenega medija Podlaga groba plastika	
YEPD 2 X 50 mL Gladka plastika – 15 ploščic		Breskov sok 2 x 50 mL 15 ploščic hrapave plastike	
YEPD 2 X 50 mL Hrapava plastika – 15 ploščic		Jabolčni sok 2 x 50 mL 15 ploščic hrapave plastike	
Osnovni gojitveni medij 2 X 50 mL Steklo: 15 ploščic		Sojino mleko 2 X 50 mL 15 ploščic hrapave plastike	
Osnovni gojitveni medij 2 X 50 mL Aluminijasta folija: 15 ploščic		Mleko 3,5% maščobe 2X 50 mL 15 ploščic hrapave plastike	
Osnovni gojitveni medij 2 X 50 mL Tetrapak: 15 ploščic		Kontrola 2X 50 mL 15 ploščic hrapave plastike	
Skupaj: 10 kozarcev 15 ploščic različnih materialov 500 mL YEPD		Skupaj: 10 kozarcev 75 ploščic hrapave plastike 100 mL različnih gojitvenih medijev	

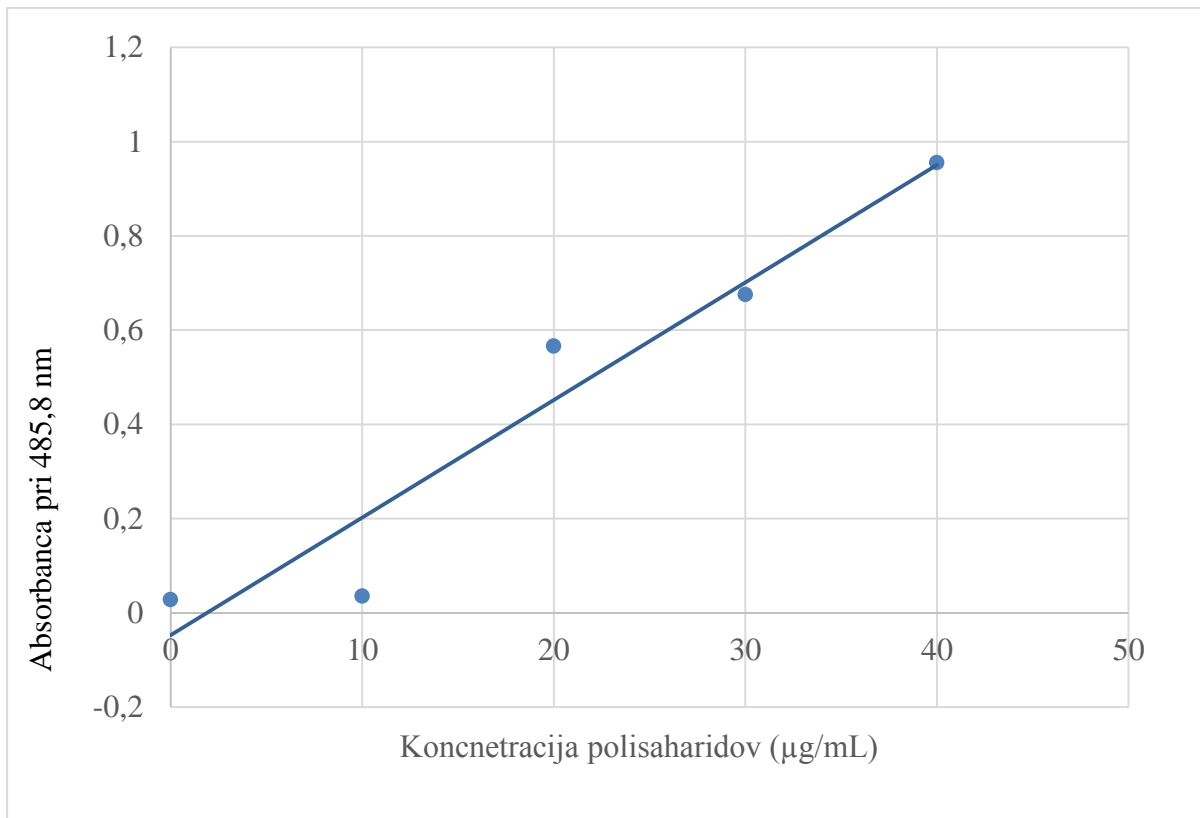
5 REZULTATI

Raziskovalno delo je potekalo od 13.12.2013 do 2.1.2014 v šolskem laboratoriju.

Najprej smo s pomočjo standardnih raztopin in spektrofotometra pripravili umeritveni krivulji iz katerih smo izračunali koncentracije beljakovin in polisaharidov v soniciranem vzorcu. Krivulji sta prikazani v grafih 1 in 2.



Graf 1: Umeritvena krivulja za proteine (meritve absorbance pri 595,2 nm)



Graf 2: Umeritvena krivulja za polisaharide (meritve absorbance pri 485,8 nm)

Koncentracijo beljakovin v vzorcu smo v nadaljevanju izračunali po formuli:

$$\text{Abs} = \mathbf{mx} + \mathbf{b} \quad \text{iz česar sledi} \quad \mathbf{f_{(x)}} = \frac{\mathbf{Abs - b}}{\mathbf{m}}$$

Abs = absorbanca raztopine, merjena pri 595,2 nm

x = koncentracija beljakovin v raztopini

m = naklon premice umeritvene krivulje ki je znašal 0,002125 za beljakovine in 0,02651 za polisaharide

b = odsek premice umeritvene krivulje na osi absorbance ki je znašal 0,004619 za beljakovine in 0,1094 za polisaharide

5.1 Poskus

Velikost vcepka

Plošče so bile številne pri redčitvah 10^{-4} in 10^{-5} . Za izračun smo vzeli število kolonij, prešteti pri redčitvi 10^{-4} , (77). Vrednost smo pomnožili z 10^5 in tako dobili vrednost gostote glivne kulture v vcepku ($7,7 \times 10^7$ CFU/mL). Optična gostota pri 600 nm znašala 0,642.

Pred in po poskusu smo izmerili pH vrednosti gojitvenih medijev, kar je prikazano v tabeli 2.

Tabela 2: Sprememba pH medijev med poskusom

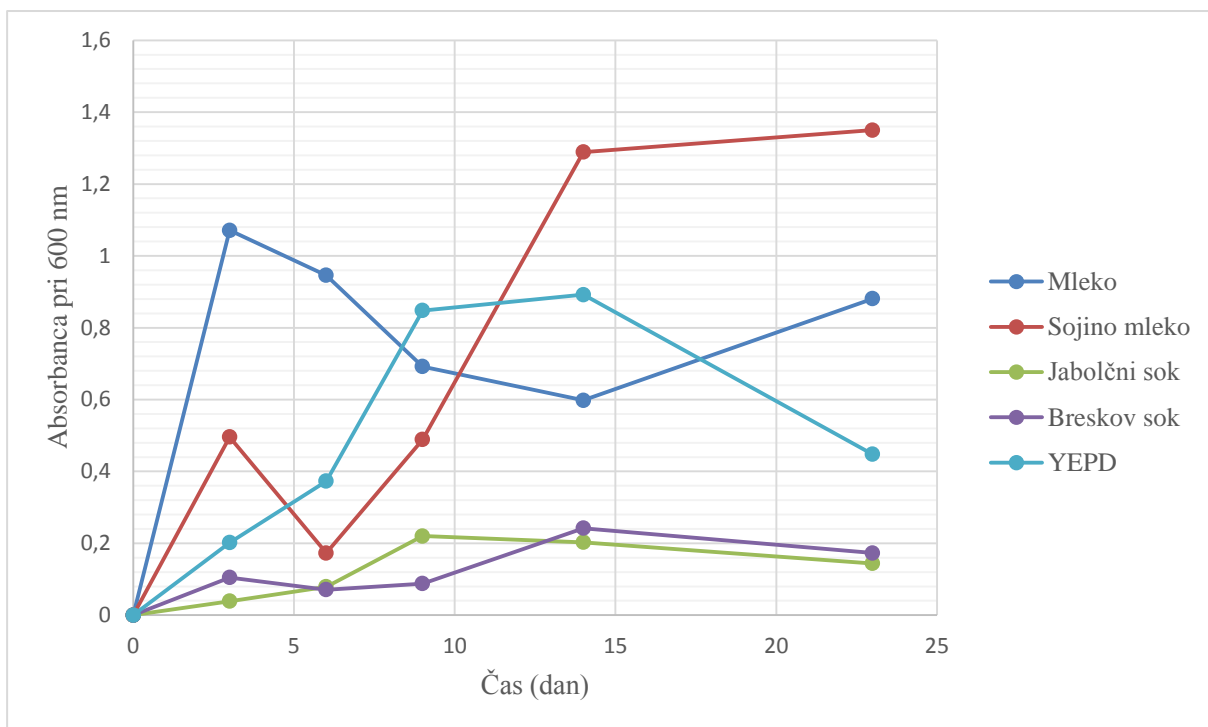
Medij	pH pred poskusom	pH po poskusu	pH odprte tekočine izpostavljene zraku (23 dni)
Breskov sok	2,25	2,47	
Sojino mleko	7,74	4,85	6,68
Mleko (3,5%)	6,45	4,95	6,94
Jabolčni sok	2,84	2,90	
YEPD	4,79	4,21	



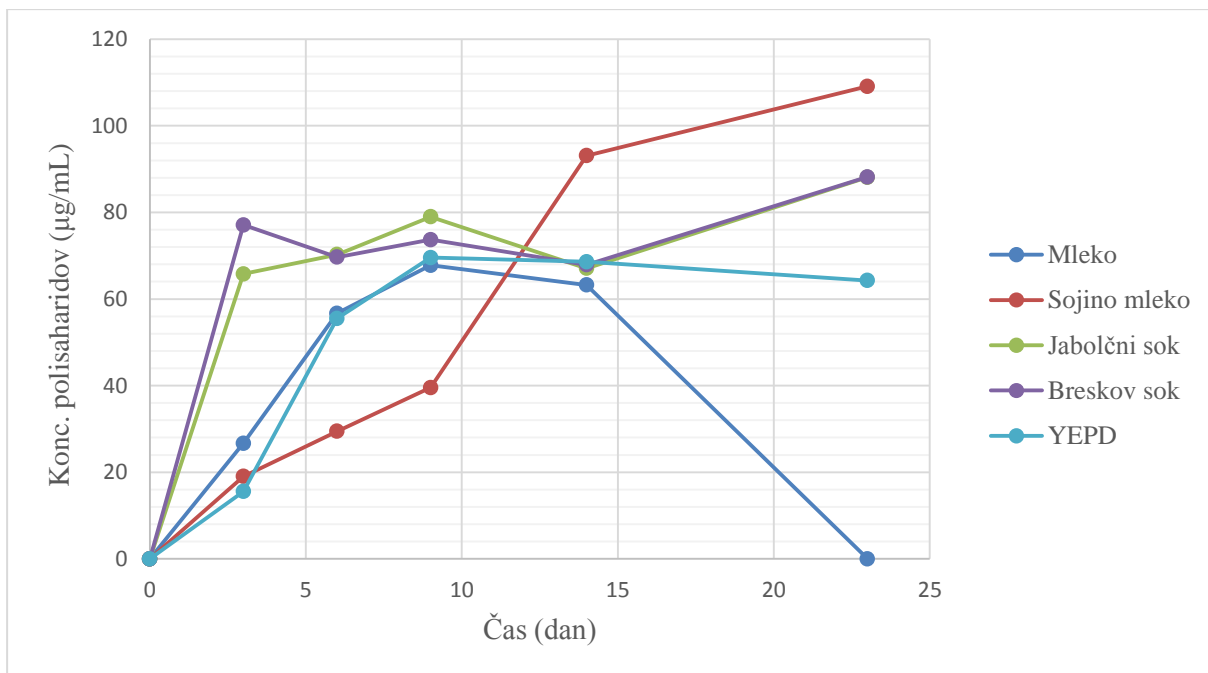
Slika 6: Tvorba biofilma na hrapavi plastiki v sojinem mleku

Po nastavitvi poskusa smo v časovnih razmakih tri, šest, devet, štirinajst in triindvajset dni iz gojitvenih medijev analizirali po tri ploščice za vsak medij in za vsako podlago, Rezultati

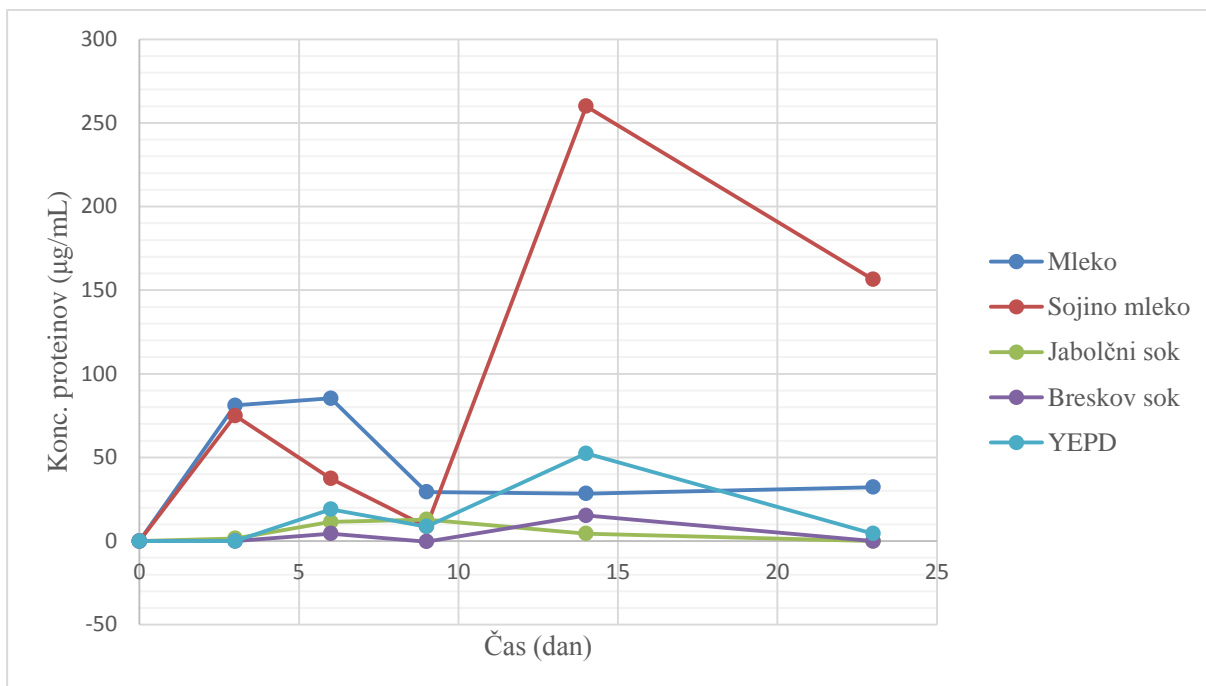
meritev so prikazani v grafih 2-8, v katerih so podane le povprečne vrednosti meritev. Surovi podatki meritev absorbance so v prilogi 2, tabele s povprečnimi vrednostmi pa v prilogi 3.



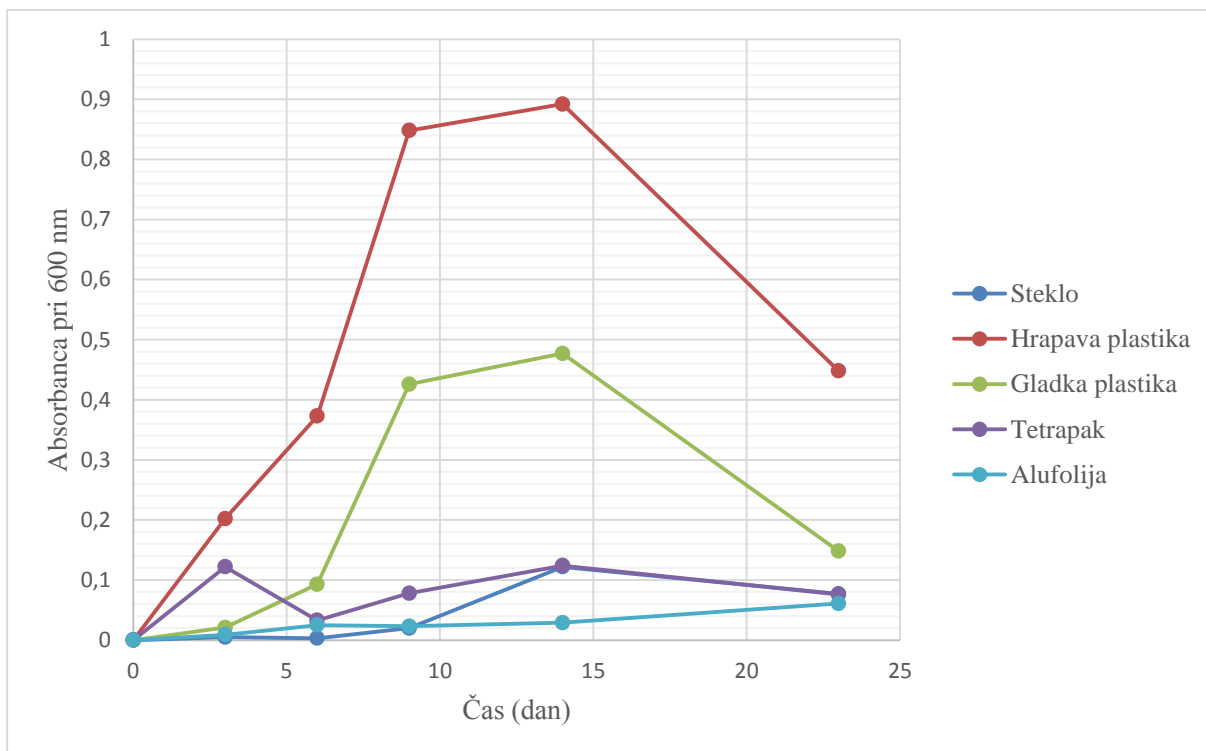
Graf 3: Časovno spreminjanje optične gostote vzorcev iz različnih medijev na hrapavi plastiki



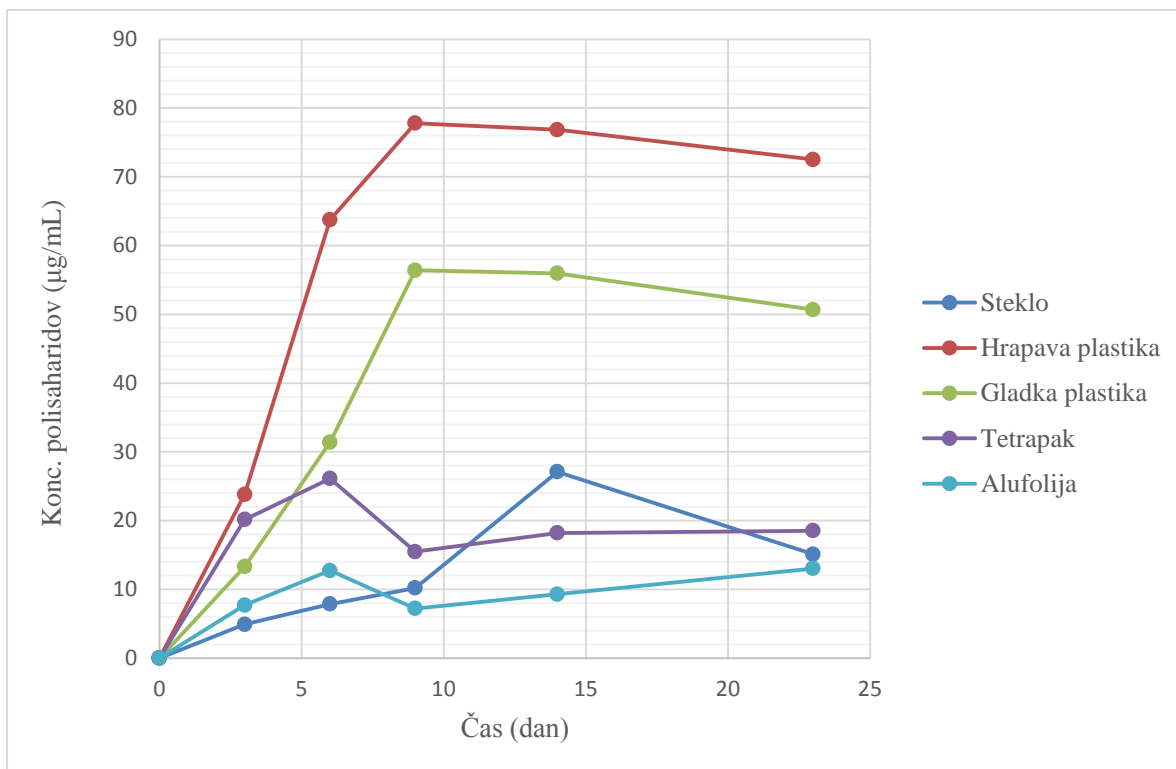
Graf 4: Časovno spreminjanje količine polisaharidov v različnih medijih na hrapavi plastiki



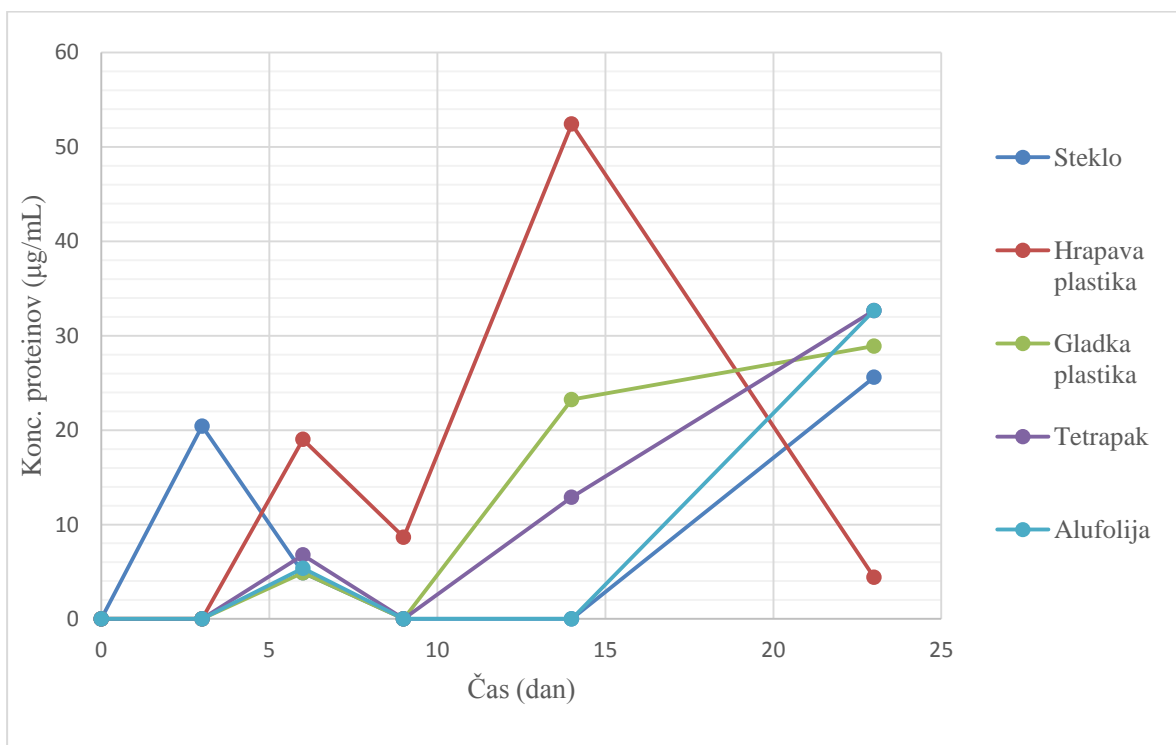
Graf 5: Časovno spreminjanje količine beljakovin v različnih medijih na hrupavi plastiki



Graf 6: Časovno spreminjanje optične gostote vzorcev iz različnih podlag v gojišču YEPD



Graf 7: Časovno spreminjanje količine polisaharidov na različnih podlagah v gojišču YEPD



Graf 8: Časovno spreminjanje količine beljakovin na različnih podlagah v gojišču YEPD

6 RAZPRAVA

V raziskovalni nalogi smo želeli ugotoviti, katera podlaga (gladka in hrapava plastika, aluminijasta folija, steklo, tetrapak) in kateri medij (sojino in kravje mleko, jabolčni in breskov sok, YEPD tekoče gojišče) v odvisnosti od časa je najugodnejše za razvoj biofilma rdeče kvasovke *Rhodotorula mucilaginosa*. V ta namen smo v obdobju 23 dni spremljali razvoj biofilma s tremi različnimi pristopi: merjenje optične gostote, količine polisaharidov in proteinov.

Ugotovili smo, da *R. mucilaginosa* tvori biofilm na vseh gojitvenih podlagah in v vseh gojitvenih medijih. Biofilm se je na hrapavi plastiki najhitreje (največje spremembe v vseh parametrih v krajšem časovnem obdobju) razvijal. Razlog je hrapavost podlage, kar mnogi omenjajo kot zelo ugoden dejavnik v razvoju biofilma (Gattlen, 2011). Na koncu meritev opazimo, da so se vse tri izmerjene spremenljivke zmanjšle. Možen vzrok za to bi lahko bil delni razkroj biofilma in sprostitve glivnih celic, da kolonizirajo nove površine (Madigan, 2012).

Na gladki plastiki se je v primerjavi s hrapavo biofilm sicer počasneje razvijal, vendar veliko hitreje rasel kot na ostalih podlagah. Možna vzroka sta lahko nesposobnost pritrjevanja kvasovk na teh površinah ali pa toksičnost površine.

Na tetrapaku se optična gostota ni povečevala, se je pa povečevala koncentracija beljakovin in polisaharidov. Kot smo predvidevali, so bile vrednosti veliko manjše kot pri plastiki. Alufolija in steklo sta se kot pričakovano izkazala za najmanj ugodni površini za nastanek in razvoj biofilma. Vrednosti pri steklu in alufoliji skoraj enake kot pri tetrapaku, za katerega smo predvidevali, da bo boljša podlaga za rast. Iz rezultatov lahko sklepamo, da se podlage tetrapak, steklo in alufolija ne razlikujejo po primernosti za razvoj biofilma, vendar pa je pomemben čas kontaminacije z kvasovko, saj se biofilm hitreje pojavi na tetrapaku, steklo in alufolija pa na koncu dosežeta enake vrednosti. Vpliv snovi, ki jih izloča *R. mucilaginosa* nismo dokazovali, nam pa zadnja meritev kaže, na potencialni vpliv teh snovi na steklo in alufolijo, kar bi bilo v prihodnosti tudi dobro preveriti z daljšim poskusom.

Primerjava gladke in hrapave plastike z istimi lastnostmi, nam v celoti potrjuje ugodni vpliv hrapavosti podlage na rast biofilma. Naša prva hipoteza je bila potrjena, saj se je biofilm v primerjavi z ostalimi podlagami občutno boljše razvijal na hrapavi plastiki. Vzrok za to, je hrapavost površine (Quirynen, 1991; Muller, 2007; Gattlen, 2011), ki omogoča biofilmu boljše zaščito in boljši oprijem, ter ga varuje pred drugimi zunanji silami, kar so dokazali že mnogi znanstveniki (Zottola, 1994; Palmer, 2007; Gattlen, 2011), steklo (Armon, 1996), alufolija in tetrapak pa so za razvoj biofilma najmanj primerni.

Predpostavili smo, da bo najbolj ugoden medij YEPD, saj je še posebej pripravljen za glive, sledilo bi mu sojino mleko, zaradi najbolj ugodnega pH, kravje mleko in oba sokova.

Glede na podatke iz literature, ki omenjajo, da na rast biofilma vplivajo zunanje sile, smo predpostavili, da se bo biofilm boljše razvijal v breskovem soku, kot v jabolčnem, saj je gostejši in zunanji dejavniki (prestavljanje kozarcev), manj vplivajo nanj. Razen tega omenjamo vpliv pH, kar je v tem primeru nadzorovana spremenljivka, saj je pH breskovega soka 2,25 in pH jabolčnega soka 2,84, torej gre le za manjšo razliko, ki, predpostavljamo, na naše rezultate ne more drastično vplivati. Na podlagi rezultatov težko sklepamo o vplivu gostote tekočine na rast biofilma, saj so rezultati zelo podobni. Gostote obeh sokov nismo izmerili.

Najboljše se je biofilm razvijal v sojinem mleku, ki je po 6. dnevu postalo je zelo gosto, Možen vzrok za hitro povečanje vseh vrednosti pri bi torej lahko bila ravno zgostitev medija, ki je bila že na videz zelo spremenjena, saj mleko ni bilo več enako tekoče. Možen vzrok uspešnosti pa bi bil tudi ugodna vrednost pH te tekočine, saj se je izmed vseh medijev, najbolj približala 7,0 (Aksu, 2005).

Biofilm v mleku se je slabše razvijal, kot v sojinem mleku, ampak boljše, kot v ostalih. Po uspešnosti je sledilo gojišče YEPD in oba sokova.

Našo drugo hipotezo smo delno potrdili. Najuspešnejšo rast smo zaznali pri sojinem mleku, ki je ob začetku poskusa imelo pH vrednost 7,74, sledilo mu je navadno kravje mleko, z pH 6,45, YEPD medij z pH 4,79, jabolčni sok in breskov sok pa sta bila precej podobna, saj se tudi njuni pH le malo razlikujejo (pH 2,84 in 2,25). Naša predpostavka, da se bo biofilm najboljše razvijal v gojišču YEPD, saj je posebej pripravljeno za glive, je bila napačna. S tem

poskusom smo dokazali, potencialni močan vpliv pH medija na razvoj biofilma, ki bi ga lahko v prihodnosti še preverili. O vplivu gostote tekočine ne moremo biti prepričani, čeprav so vrednosti po zgostitvi sojinega mleka močno narasle, saj tega dejavnika nismo popolnoma nadzorovali, zato predlagamo, da bi se vpliv gostote na hitrost rasti eksperimentalno preveril.

V času med predzadnjo in zadnjo meritvijo je temperatura prostora padla, saj je bilo gretje izključeno. Na podlagi prejšnjih raziskav smo predpostavili, da nižja kot bo temperatura v prostoru, slabše in počasneje se bo biofilm razvil, saj je najoptimalnejša temperatura za rast kvasovke (*Rhodotorula mucilaginosa*) 30 °C (Aksu, 2005). Ker temperature nismo konstantno nadzorovali, zadnja meritev pa ni močno odstopala od predzadnje, vpliva temperature ne moremo potrditi. Bil bi možen razlog za stagnacijo oziroma manjši padec vrednosti, vendar pa je možen vzrok tudi, da je biofilm dozorel in je prišlo do delnega razkroja (Madigan, 2012).

6.2 Ocena metode in možni viri napak

Uporabili smo ročno izrezane ploščice plastike, tetrapaka in alufolije, za steklene ploščice smo uporabili kar krovna stekelca. Vse podlage smo rezali z istim nožkom. Hrapavo plastiko smo pripravili kot smo opisali v podpoglavju »Priprava podlag«. Možen vir napake je, da smo ročno razili plastiko z brusnim papirjem. Tako seveda nismo mogli natančno prilagoditi silo s katero smo pritiskali na ploščice.

Pri pripravljanju umeritveni krivulj dobili bolj linearne rezultate pri količini proteinov, kot pri umeritveni krivulji za polisaharide. Umeritvene krivulje smo pripravili z standardnimi raztopinami od 0 do 40 µg/mL, potem pa smo jo linearno podaljšali, na podlagi Beer-Lambertovega zakona, ki pravi, da pri manjših koncentracijah, vrednosti naraščajo premo sorazmerno z absorbanco. Količine proteinov v večini niso dosegale višjih vrednosti, količine polisaharidov pa so, vendar bi bilo zelo zamudno in nevarno vzorce redčiti, saj bi to počeli z 98% H₂SO₄.

Kalibracije spektrofotometra smo za določanje količine proteinov opravili s čistim Bradfordovim reagentom, za določanje količine polisaharidov pa z 0,9% raztopino NaCl in ne z dodatkom fenola in H₂SO₄.

Ko smo aseptično odvzemali ploščice iz medijev, je lahko prišlo do kontaminacije ostalega medija z mikroorganizmi iz zraka. V medije tudi nisva dodali nobenih antibiotikov, ki bi

preprečili kontaminacijo z mikroorganizmi, katerih rast nisva preučevali, saj se nam je zdelo dovolj natančno za srednješolski poskus. Ob spiranju ploščic, sva vsako 3-krat pomočile v fiziološko raztopino, zagotovo pa nisva odstranili vsega medija, kar je posledično tudi možen vir napake.

Opravili smo le tri ponovitve, da bi bili podatki bolj zanesljivi pa lahko analizirali več ponovitev, da bi lahko osamelce zanemarili. Zaradi dolgotrajnosti poskusa in zelo zamudnih metod v tako kratkem času, to ni bilo možno.

Metoda določevanja proteinov izkazala za precej nezanesljivo, saj so vrednosti nihale. Na količino beljakovin vplivajo mnoge spremenljivke, ki pa jih nismo analizirali.

Metoda določevanja polisaharidov se je izkazala za precej zanesljivo. Rezultati so bili glede na pričakovanja in ugotovitve raziskovalcev primerljive, poleg tega pa je količina polisaharidov večja kot količina proteinov.

Na optično gostoto je mogoče vplival medij, saj ga nismo mogli povsem sprati (sojino mleko, ki se je zgostilo).

6.3 Izboljšave, smernice za delo

Veliko manjše tveganje izpostavljenosti okoliškim bakterijam bi bilo delo v mikrobiološki komori, ki je žal nismo imeli na razpolago.

Vzorci so bili izpostavljeni šolski kurjavi, česar pa nismo mogli nadzorovati. Vzorci bili čez vikend izpostavljeni nižji temperaturi, kot čez teden. Rezultati bi lahko bili idealnejši z zagotovitvijo stalne temperature in rabo inkubatorja, vendar bi se s tem oddaljili od realnega stanja v naših domovih.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Tema naše raziskovalne naloge in pridobljeni rezultati se navezujejo na osnovna načela družbene odgovornosti.

Družbeno odgovorno sva se lotili naloge, saj se zavedava velikega vpliva nastanka biofilma v vsakdanjiku. Upava, da bova z najino raziskovalno nalogo dodali majhen prispevek, k prepoznavanju in proučevanju ugodnih pogojev za razvoj biofilma, ki nam zelo otežuje delo na vseh področjih.

Želeli bi tudi opozoriti na neodgovornost živilskih tovarn, saj v želji po večjem dobičku, večino produktov zapakirajo v plastične embalaže (proizvodnja plastenke stane 0,05 centa, steklenice pa 0,38 centa), kar je kot smo dokazali, zelo ugodna podlaga za razvoj biofilma in posledično manj ugodna za uporabo za embalažo.

8 ZAKLJUČEK

Kvasovka *Rhodotorula mucilaginosa* je zelo dober kolonizator vseh vrst površin, ki smo jih proučevali, prav tako uspeva v vseh proučevanih medijih. Steklo, tetrapak in alufolija so veliko bolj odporni na korozivne produkte kvasovke kot plastika, kar je eden izmed možnih vzrokov, za slabši razvoj biofilma v primerjavi s plastiko. Najbolj dinamični razvoj smo zaznali pri hrapavi (če izvzamemo zadnjo meritev proteinov) in gladki plastiki, pri ostali podlagah je prišlo do večjih nihanj med posameznimi metodami.

Na podlagi rezultatov sklepamo, da je plastična podlaga najbolj primerna za razvoj biofilma, zaradi česa bi odsvetovali uporabo le te v živilski tehnologiji, hrapavost površine še samo poveča ugoden vpliv za razvoj.

Tetrapak, v katerem večinoma shranjujejo mleko in sokove, ni najboljša izbira, saj se kljub povešanosti na notranji strani tetrapaka, čez čas na odprtem mleku uspešno razvije biofilm, predvsem na robovih na mestu, kjer odlivamo tekočino iz embalaže, kjer se tetrapak sreča tudi z plastično površino.

Gojitveni mediji imajo zelo veliko vlogo pri razvoju biofilma, saj so se pokazale precejšnje razlike. Najbolj verjetna razlaga je vpliv pH medija, saj je biofilm najuspešnejše rasel v mediju, ki je bil blizu nevtralnega pH, z nižanjem pH pa se je tudi rast zmanjšala.

9 UPORABLJENI VIRI IN LITERATURA

1. Aksu, Z., Tugba Eren, A. (2005). *Carotenoids production by the yeast Rhodotorula mucilaginosa: Use of agricultural wastes as a carbon source*. Prevezeto 14. 1 2014 iz Sciencedirect: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511305001157>
2. AquaFit4Use. (2010). *Summary report on scaling, fouling and corrosion parameters*. Prevezeto 15. 1 2014 iz <http://www.aquafit4use.eu/userdata/file/Public%20results/AquaFit4Use%20-%20Fouling%20and%20corrosion%20parameters.pdf>
3. Armon R., Starosvetzky J., Arbel T., Green M. (1996). *Survival of Legionella pneumophila and Salmonella typhimurium in biofilm systems*. Prevezeto 23. januar 2014 iz ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273122397002758>
4. *Biofilm*. (10. junij 2007). Prevezeto 14. december 2013 iz Wikipedia: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Biofilm>
5. Bloss, R., Kampf, G. . (2004). Test models to determine cleaning efficacy with different types of bioburden and its clinical correlation. *J Hosp infect*, 44-48.
6. Bradford, M. M. (7. maj 1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Prevezeto 28. januar 2014 iz ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>
7. Brugnoli L. I., Lozano, J. E., Cubitto M. A. . (2007). Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Res Int* , 40.
8. Brugnoli, L. (23. september 2009). *BIOFILM FORMATION*. Prevezeto 14. december 2014 iz Wiley Online Library: [gy > General & Introductory Food Science & Technology > Journal of Food Process Engineering > Vol 34 Issue 1 > Abstract](http://www.wiley.com)
9. Calzone L. et al. (13. april 2005). *WILD TYPE in glucose Cell Cycle*. Prevezeto 26. januar 2014 iz Modeling the Budding Yeast: http://mpf.biol.vt.edu/research/budding_yeast_model/pp/wt_glucose.php
10. Chambers, L. D. et al. (2006). Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surf Coat Technol*, 3642-3652.
11. Chmielewski R., Frank R. (20. november 2006). *Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities*. Prevezeto 25. januar 2014 iz Wiley Online Library: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x/abstract>
12. Christensen B., P. R. (1997). *Molecular tools for study of biofilm physiology*. Prevezeto 15. december 2014 iz ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687999100041>
13. Danevčič T., M.-M. I. (2007). *Praktikum iz fiziologije mikroorganizmov za študente mikrobiologije*. Ljubljana: UL, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

14. Davies D. et al. (10. april 1998). *The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm*. Prevezeto 29. januar 2014 iz Science:
<http://www.sciencemag.org/content/280/5361/295.short>
15. Deak, T. (16. november 2007). *Handbook of Food Spoilage Yeasts, Second Edition*. Prevezeto 25. januar 2014 iz
http://www.google.si/books?hl=sl&lr=&id=RR21g8_2OXIC&oi=fnd&pg=PP12&dq=way+of+spoiling+food+rhodotorula&ots=fXhXWum71G&sig=Z-vGAIEV_jK4s23o_YQcspnssys&redir_esc=y#v=onepage&q=rhodotorula&f=false
16. Dermastia, M. K. (2011). *Kjer se življenje začne*. Ljubljana: Založba Rokus Klett.
17. Donlan R., C. J. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 167-193.
18. Donlan, R. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8.
19. Douglas, L. (2002). Medical importance of biofilms in Candida infections. *Rev Iberoam Micol*, 19.
20. Douglas, L. (2003). Candida biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*, 11.
21. Dubois M. et al . (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 8, 359-356.
22. Dworecka-Kaszak, B., Kizerwetter-Šwida. (2011). Pseudomycelium forming Rhodotorula - unusual picture of biofilm.
23. Elvers K. T. et al. (1998). Bacterial-fungal biofilms in flowing water photo-processing tanks. *J Appl Microbiol*, 607-618.
24. Ganesh Kumar C., Anand S. (30. junij 1998). *Significance of microbial biofilms in food industry: a review*. Prevezeto 27. januar 2014 iz ScienceDirect:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160598000609>
25. Gattlen J., A. C. (30. avgust 2010). *Biofilms isolated from washing machines from three continents and their tolerance to a standard detergent*. Prevezeto 14. december 2013 iz Taylor & Francis online:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927014.2010.524297#.UvfiomJ5Mvk>
26. Gattlen J., Zinn M., Amberg C. (30. avgust 2011). *Biofilm formation by the yeast Rhodotorula mucilaginosa: process, repeatability and cell attachment in a continuous biofilm reactor*. Prevezeto 14. december 2013 iz Taylor & Francis Online:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927014.2011.619657#.UvfjHWJ5Mvk>
27. Gavin L., Harding J., Gilian L. (junij 2009). *Biofilm Bacterial Community Structure in Streams Affected by Acid Mine Drainage*. Prevezeto 15. december 2013 iz American society for microbiology.

28. Glass for Europe. (brez datuma). *Industry Facts and Figures*. Prevezeto 26. januar 2014 iz Glass for Europe: <http://www.glassforeurope.com/en/industry/index.php>
29. Goeres D. M. et al. (2005). Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology* , 757-762.
30. Hadi, R. et al. (2010). Biofilm removal by medical device cleaners: comparison of two bioreactor detection assays. *J Hosp Infect*, 160-167.
31. Hamilton, M. A. . (2002). Testing antimicrobials against biofilm bacteria. *J AOAC* , 479-485.
32. Harding, M. W. et al. (2009). Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol*, 475-480.
33. Hung Lee, R. J. (december 1987). *Some Properties of Extracellular Acetylxylan Esterase Produced by the Yeast Rhodotorula mucilaginosa*†. Prevezeto 25. januar 2014 iz Applied and Environmental Microbiology: <http://aem.asm.org/content/53/12/2831.short>
34. Jabra-Rizk, M. A., Falker, W. A., Meiller, T. F. . (2004). Fungal Biofilms and Drug Resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 14-19.
35. Jenkinson, H. F., Douglas, L. J. . (2007). Interactions between Candida species and bacteria in mixed infections. *Polymicrobial diseases*, 357-373.
36. Kronlof, J., Haikara, A. . (1991). Contamination of immobilized yeast bioreactors. *J Inst Brew*, 375-380.
37. *Kvasovka*. (2000). Prevezeto 28. januar 2014 iz Inštitut za slovenski jezik Frana Ramovša ZRC SAZU: http://bos.zrc-sazu.si/cgi/a03.exe?name=sskj_testa&expression=kvasovka&hs=1
38. Ljubljana, Z. z. (marec 2007). *Elektronski časopis "Moje zdravje"* . (S. B. Pučnik, Ured.) Prevezeto 25. januar 2014 iz <http://www.zzv-lj.si/izobrazevanje-in-strokovna-srecanja/e-novice-marec-07-legionele.pdf>
39. Loureiro V., Malfeito-Ferreira, M. (14. maj 2003). *Spoilage yeasts in the wine industry*. Prevezeto 26. januar 2014 iz ScienceDirect: http://awe.mol.uj.edu.pl/~allel/s6/pliki/mbPrz_seminaria/spoilage%20yeasts.pdf
40. Lyon, D. Y. et al. (2008). Assessing the antibiofouling potential of a fullerene-coated surface. *Int Biodeterior*, 475-478.
41. Madigan , M. T. (2012). *Brock biology of microorganisms*. Boston: Pearson.
42. Matlock, B. C. (2011). *Differences in Bacterial Optical Density Measurements between Spectrophotometers*. Prevezeto 8. 2 2014 iz http://www.thermoscientific.de/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF_58468.PDF
43. *Methods in Microbial Ecology*. (brez datuma). Prevezeto 8. 2 2014 iz <http://202.204.115.67/jpkch/jpkch/2008/wswx/chapter%2018.htm>

44. Muller, R. et al. (2007). Fluorescence-based bacterial overlay method for simultaneous in situ quantification of surface-attached bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2653-2660.
45. Munk, S. et al. (2001). Microbial survival and odor in laundry. *J Surf Deterg*, 385-394.
46. Navodila. (brez datuma). Prevezeto 26. december 2013 iz Zpm: http://www.zpm-mb.si/attachments/sl/316/Navodila_za_pripravo_RN_IP_nova.pdf
47. Novak Štagoj M., Podobnik M. (2006). *Kvasovke - tovarne rekombinantnih proteinov*. Prevezeto 25. januar 2014 iz Digitalna knjižnica Slovenije: <http://www.dlib.si/preview/URN:NBN:SI:doc-4ZE093SV/706e4c8c-b6ec-4458-9fc8-88a6b51987c5>
48. Olson M., Ceri H., Morck D., Read R. (april 2002). *Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics*. Prevezeto 28. januar 2014 iz PMC: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC226988/>
49. Palmer, R. J. (1999). Microscopy flowcells: perfusion chambers for real-time study of biofilms. *Methods Enzymol*, 160-166.
50. Pathol, J. (1980). *Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae*. Prevezeto 20. januar 2014 iz Journal of Clinical Pathology: <http://jcp.bmj.com/content/33/12/1179.short>
51. Pitts, B. et al. (2001). A repeatable laboratory method for testing the efficacy of biocides against toilet bowl biofilms. *J Appl Microbiol*, 110-117.
52. Pitts, B. et al. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Methods*, 269-276.
53. PlasticsEurope. (2012). *Plastics - the Facts 2012*. Prevezeto 25. januar 2014 iz http://www.plasticseurope.org/documents/document/20121120170458-final_plasticsthefacts_nov2012_en_web_resolution.pdf
54. Quirynen, M. et al. (1991). The bacterial colonization of intra-oral hard surfaces in vivo: influence of surface free energy and surface roughness. *Biofouling*, 187-198.
55. Ramage G., Vande Walle, K., Wickes BL. (2001). Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*, 39.
56. Ramage, G. et al. (2002). Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 49.
57. Raspor, P. (1996). *Biotehnologija*. Ljubljana.
58. Raspor, P. (Ljubljana, 1996). Kvasovke. *Biotehnologija. Osnovna znanja*, 69-89.
59. Rayner, J., Veeh, R., Flood, J. . (2004). Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. *Int J Food Microbiol*, 29-39.

60. Roberfroid, M. B. (1. julij 1999). *Caloric Value of Inulin and Oligofructose*. Prevezeto 28. januar 2014 iz In the journal of nutrition: <http://jn.nutrition.org/content/129/7/1436S.full>
61. Rose A. H., Wilkinson J. F. (1. januar 1966). *ADV IN MICROBIAL PHYSIOLOGY VOL 2 APL*. Prevezeto 27. januar 2014 iz http://www.google.si/books?id=D1r6u9UcnuUC&dq=budding+of+yeast+cells&lr=&hl=sl&source=gbs_navlinks_s
62. Saithong, P., Nakamura, T., Shima, J. . (2009). Prevention of bacterial contamination using acetate-tolerant *Schizosaccharomyces pombe* during bioethanol production from molasses. *J Biosci Bioeng*, 216-219.
63. Shi, X., Zhu, X. . (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci Technol*, 407-413.
64. Shih C. T., Hang Y. D. (1996). *Production of Carotenoids by Rhodotorula rubra from Sauerkraut Brine*. Prevezeto 26. januar 2014 iz ScienceDirect: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643896900870
65. Slovenska farmacija. (26. januar 2014). *Farmacevtski vestnik (2006, letnik 57, številka 4)*. Pridobljeno iz Digitalna knjižnica Slovenije: <http://www.dlib.si/preview/URN:NBN:SI:DOC-9A7O18VL/>
66. Sponholz, W. F. (1992). Wine spoilage by microorganisms. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 395-419.
67. Venturini, M. E., Oria, R., Blanco, D. (2002). *Microflora of two varieties of sweet cherries: Burlat and Sweetheart*. Prevezeto 12. 1 2014 iz Elsevier: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002001904435>
68. Vičar P., H. D. (2011). *Kjer se življenje začne - biologija celice in genetika za gimnazije*. Ljubljana: Rokus Klett.
69. Visser, M. (27. julij 2010). *Life Cycle Analysis for Glass bottle versus plastic bottle*. Prevezeto 24. januar 27 iz Design-4-Sustainability: http://www.design-4-sustainability.com/life_cycle_analyses/5-glass-bottle-versus-plastic-bottle
70. Vopalenska, I. et al. (2010). Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environ Microbiol*, 264-277.
71. Webb, J. (2003). *Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity*. Prevezeto 15. december 2014 iz ScienceDirect.
72. Webb, J. S. et al. (2002). *Journal of Bacteriology*. Prevezeto 14. 1 2014 iz Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: <http://jb.asm.org/content/185/15/4585.short>
73. Zottola, E. A., Sasahara, K. C. . (1994). Microbial biofilms in the food-processing industry - should they be a concern. *Int J Food Microbiol*, 125-148.

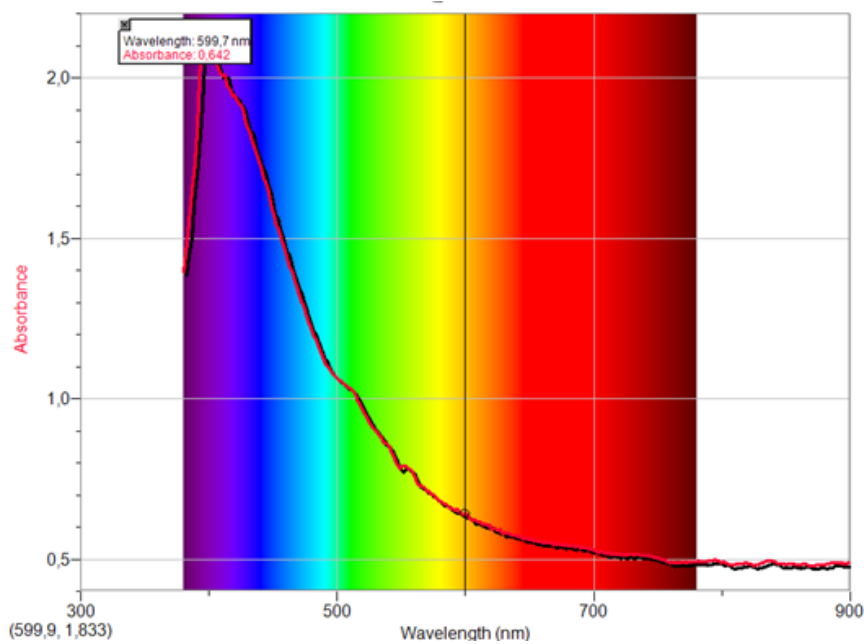
10 VIRI SLIK

Slika 1: Sesavljanje puzzlov (avtorica, decemder 2013).....	7
Slika 2: Faze razvoja rasti biofilma pod elektronskim mikroskopom (Medscape) Dostopno na URL naslovu: http://www.medscape.com/viewarticle/774267_4 (15.4.2014).....	11
Slika 3: A: Rhodotorula mucilaginosa (redčitvena vrsta) (lastni vir); B: Rhodotorula mucilaginosa pod mikroskopom pri 400× povečavi (avtorica, december 2013).....	14
Slika 4: Shema poteka dela (avtorica, december 2013).....	15
Slika 5: Priprava redčitvene vrste Dostopno na URL naslovu: http://202.204.115.67/jpkch/jpkch/2008/wswx/chapter%2018.htm (15.2.2014).....	20
Slika 6: Tvorba biofilma na hrapavi plastiki v sojinem mleku (avtorica, december 2013).....	25
Slika 7: Primer meritve s programom Logger Pro (avtorica, januar 2014).....	41

11 PRILOGE

Priloga 1: Primer meritve s programom Logger Pro

V prikazanem primeru smo merili absorbanco in s tem optično gosoto prekonočne kulture pri 600 nm (OD_{600}). Na enak način smo z ustrezno obdelanimi vzorci merili tudi absorbanco pri valovni dolžini 485,8 nm za določanje količine polisaharidov in pri 595,2 nm, za določanje količine beljakovin.



Slika 7: Primer meritve s programom Logger Pro

Priloga 2: Primer grobih rezultatov meritev

Rezultate za OD600 smo lahko uporabili kar takšne, kot smo jih izmerili, rezultate, ki smo jih dobili na podlagi določanja absorbance za polisaharide in proteine, smo morali preračunati v koncentracijo polisaharidov oz. proteinov. Tabela prikazuje vse grobe rezultate meritev, ki smo jih opravili v enem dnevu (tabela 3).

Tabela 3: Grobi podatki o opravljenih meritvah (6. dan)

Medij in podlaga	Št. paralele	6. dan 16. 12. 2013		
		Absorbanca pri 600 nm	Polisaharidi (absorbanca pri 485,8 nm)	Proteini (absorbanca pri 595,2 nm)
YEPD + steklo	1	0,005	0,113	0,021
	2	0,002	0,089	0,004
	3	0,003	0,096	0,020
YEPD + alufolija	1	0,049	0,192	0,018
	2	0,019	0,327	0,015
	3	0,006	0,165	0,016
YEPD + tetrapak	1	0,048	0,576	0,022
	2	0,033	0,654	0,008
	3	0,018	0,518	0,027
YEPD + gladka plastika	1	0,108	0,638	0,012
	2	0,082	0,898	0,020
	3	0,089	0,634	0,014
YEPD + hrapava plastika	1	0,323	1,572	0,023
	2	0,592	2,250	0,072
	3	0,204	0,920	0,039
Jabolčni sok + hrapava plastika	1	0,074	1,766	0,042
	2	0,008	2,357	0,020
	3	0,156	1,792	0,024
Breskov sok + hrapava plastika	1	0,052	1,926	0,012
	2	0,099	2,098	0,011
	3	0,061	1,845	0,018
Sojino mleko + hrapava plastika	1	0,312	0,909	0,095
	2	0,154	1,093	0,093
	3	0,054	0,667	0,063
Mleko + hrapava plastika	1	1,172	1,409	0,226
	2	1,096	2,163	0,214
	3	0,569	1,265	0,118

Tabela 4: Spreminjanje vrednosti pri kontrolah (grobi podatki)

	Št. paralele	Po 14. Dnevih			Po 23. Dnevih		
		Optična gostota (absorbanca pri 600 nm)	Polisaharidi (absorbanc a pri 485,8 nm)	Proteini (absorbanc a pri 595,2 nm)	Optična gostota (absorbanca pri 600 nm)	Polisaharidi (absorbanca pri 485,8 nm)	Proteini (absorbanca pri 595,2 nm)
YEPD brez kvasovk	1	0,459	0,156	0,039	0,004	0,073	-0,017
	2	0,309	0,697	0,059	0,004	0,116	-0,024
	3	0,049	0,883	0,017	0,000	0,167	-0,018
Voda + kvasovke	1	0,075	1,070	0,005	0,008	2,015	-0,021
	2	0,034	0,101	0,031	0,002	1,909	-0,033
	3	0,023	0,181	0,011	0,002	2,030	-0,020

Priloga 3: Povprečne vrednosti meritev

V tabelah (4-7) so podane povprečne vrednosti meritev za optično gostoto, proteine in polisaharide, grafično pa so prikazane v grafih 3-8 (str. 26-28).

Tabela 5: Časovno spreminjanje optične gostote vzorcev iz različnih medijev na hrapavi plastiki

	Absorbanca pri valovni dolžini 600 nm				
Čas (dnevi)	Mleko	Sojino mleko	Jabolčni sok	Breskov sok	YEPD
3	1,071	0,496	0,039	0,105	0,202
6	0,946	0,173	0,079	0,071	0,373
9	0,692	0,489	0,220	0,088	0,848
14	0,598	1,289	0,203	0,242	0,892
23	0,881	1,350	0,144	0,173	0,448

Tabela 6: Spreminjanje količine polisaharidov in beljakovin v različnih medijih, na hrapavi plastiki

čas (dnevi)	Količina polisaharidov ($\mu\text{g/mL}$)					Količina proteinov ($\mu\text{g/mL}$)				
	Mleko	Sojino mleko	Jabolčni sok	Breskov sok	YEPD	Mleko	Sojino mleko	Jabolčni sok	Breskov sok	YEPD
3	34,945	27,288	74,025	85,341	23,817	85,468	79,35	5,938	0,000	0,000
6	64,934	37,699	78,514	77,910	63,765	89,703	41,703	15,821	8,762	23,35
9	76,024	47,808	87,227	81,946	77,797	33,703	12,997	17,232	4,056	12,997
14	71,498	101,373	75,345	76,137	76,854	32,762	264,291	8,762	19,585	56,762
23	6,880	117,367	96,356	96,432	72,516	36,527	160,762	0,000	0,000	8,762

Tabela 7: Optična gostota vzorcev iz različnih medijev

Čas (dnevi)	Absorbanca pri 600 nm				
	Steklo	Hrapava plastika	Gladka plastika	Tetrapak	Alufolija
3	0,005	0,202	0,021	0,122	0,009
6	0,003	0,373	0,093	0,033	0,025
9	0,020	0,848	0,426	0,078	0,023
14	0,122	0,892	0,477	0,124	0,029
23	0,077	0,448	0,148	0,076	0,061

Tabela 8: Spreminjanje količine polisaharidov in beljakovin na različnih podlagah, v mediju YEPD

čas (dnevi)	Količina polisaharidov ($\mu\text{g/mL}$)					Količina proteinov ($\mu\text{g/mL}$)				
	Steklo	Hrapava plastika	Gladka plastika	Tetra pak	Alu folija	Steklo	Hrapava plastika	Gladka plastika	Tetra pak	Alu Folija
3	4,919	23,817	13,331	20,158	7,710	24,762	0,000	0,000	0,000	0,000
6	7,861	63,765	31,399	26,118	12,727	9,232	23,350	9,232	11,115	9,703
9	10,200	77,797	56,409	15,481	7,220	0,000	12,997	0,000	0,000	0,000
14	27,099	76,854	55,956	18,197	9,295	0,000	56,762	27,585	17,232	0,000
23	15,104	72,516	50,675	18,536	13,029	29,938	8,762	33,232	36,997	36,997