

**ANTIBIOTIČNA REZISTENCA *ESCHERICHIE COLI*,  
IZOLIRANE IZ OKOLJA**



# ANTIBIOTIČNA REZISTENCA *ESCHERICHIE COLI*, IZOLIRANE IZ OKOLJA

Biologija

Raziskovalna naloga

Mentor (šolski mentor):  
doc. dr. Miha SLAPNIČAR, prof. kem., biol.

Avtorica:  
Atena IVAČIČ KOLAR

Somentorji (zunanji mentorji):  
Nina ČEŠNOVAR, prof. kem., biol.  
Ines BEJEK, prof. kem., fiz.

2023

Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

## IZJAVA

Atena Ivačič Kolar, dijakinja 3. V. na BIC Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola izjavljam, da sem avtorica tega raziskovalnega dela.

Raziskovalno nalogo sem napisala pod mentorstvom šolskega mentorja doc. dr. Mihe Slapničarja, prof. kem., biol. na BIC Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola ter zunanjih mentoric: Nine Češnovar, prof. kem., biol. in Ines Bejek, prof. kem., fiz.

Atena Ivačič Kolar

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojemu šolskemu mentorju doc. dr. Mihi Slapničarju in mojima somentoricama: Nini Češnovar, prof. kem., biol. in Ines Bejek, prof. kem., fiz.

Zahvala gre Centru KemikUm Univerze v Ljubljani, Pedagoške fakultete.

Raziskavo je podprl ERASMUS+ projekt 'Diversity in Science toward Social Inclusion – Non-formal Education in Science for Students' Diversity (DiSSI)' (612103-EPP-1-2019-1-DE-EPPKA3-IPI-SOC-IN), ki ga financira Evropska Unija.

Najlepša hvala tudi vsem ostalim, ki so mi na kakršen koli način pomagali pri izdelavi raziskovalne naloge.

## POVZETEK

Določene bakterije, kot je *E. coli*, so s pomočjo različnih prilagoditev in načinov razvile rezistenco na nekatere antibiotike. Nepravilna raba protimikrobnih zdravil lahko prispeva k razvoju rezistence. Prekomerna in nepotrebna uporaba antibiotikov namreč spodbuja preživetje na antibiotike rezistentne bakterije, ter jim omogoča, da se nenadzorovano množijo in širijo. Bakterijam rezistenco omogočajo različni mehanizmi, kot je na primer sinteza encimov za razgradnjo antibiotikov, izločanje toksinov za uničevanje antibiotikov, za antibiotike neprehodna stena bakterijske celice, ipd. Bakterije si gene za rezistenco lahko izmenjujejo na tri načine: s transdukcijo, s transformacijo ali s konjugacijo. Posledično se lahko rezistenca *E. coli* na antibiotike hitro širi tudi na ostale vrste nevarnih bakterij. Prav tako lahko k razvoju rezistence prispeva onesnaževanje okolja s fekalnimi odpadki in drugimi viri bakterij, podnebne spremembe, naraščajoča populacija ljudi ipd. V raziskovalni nalogi se poudarja pomembnost nadaljevanja raziskav, ki pripomorejo k boljšemu razumevanju razvoja rezistence na antibiotike ter iskanju načinov za zmanjšanje in preprečevanje te rezistence. Rezultati raziskave potrjujejo hipoteze, da so sevi S. 9. 3, S. 9. 5., S. 9. 6., S. 9. 14. in B1, vsi, razen seva B1, izolirani iz onesnažene vode jeza na reki Sotli, razvili rezistenco na nekatere sulfonamide, betalaktamske antibiotike, tetracikline in fluorokinolone.

Rezultati raziskave odpirajo vprašanja o novih načinih zdravljenja okužb, povezanih z bakterijami, rezistentnimi na antibiotike. Predlogi nadaljnjega raziskovalnega dela segajo v kombinirano zdravljenje z antibiotiki in bakteriofagi. Predvideva se, da bi bilo tovrstno zdravljenje učinkovito tudi pri boleznih, povezanih z rezistentnimi bakterijami.

## ABSTRACT

Some bacteria, such as *E. coli*, have developed resistance to certain antibiotics through different adaptations and modes of action. Improper use of antimicrobial drugs can contribute to the development of resistance. Overuse and unnecessary use of antibiotics promotes the survival of antibiotic-resistant bacteria, allowing them to multiply and spread. Bacteria can acquire resistance through various mechanisms, such as the synthesis of enzymes to break down antibiotics, the secretion of toxins that destroy antibiotics, an antibiotic-impermeable bacterial cell wall, etc.

Bacteria can exchange resistance genes in three ways: transduction, transformation, or conjugation. Therefore, antibiotic resistance in *E. coli* can spread rapidly to other types of dangerous bacteria. Environmental pollution from faecal waste and other sources of bacteria, climate change, and increasing human population are also likely to contribute to the development of resistance. The research thesis must emphasise the importance of continuing research that contributes to a better understanding of the development of antibiotic resistance and finding ways to reduce and prevent it. The results have confirmed the hypotheses that some strains from the environment have developed resistance to sulphonamides, beta lactamase antibiotics, tetracycline, and fluoroquinolones. Some types of *E. coli*, isolated from the environment (S. 9. 3, S. 9. 5, S. 9. 6, S. 9. 14 and B1) have developed resistance to these antibiotics. All these types (except B1) were found in an environment with contaminated water (dam on the Sotla river).

The research findings raise questions about new ways to treat infections associated with antibiotic-resistant bacteria. Suggestions for further research include combined treatment with antibiotics and bacteriophages. It is believed that this type of treatment would also be effective for diseases associated with resistant bacteria.

## KAZALO

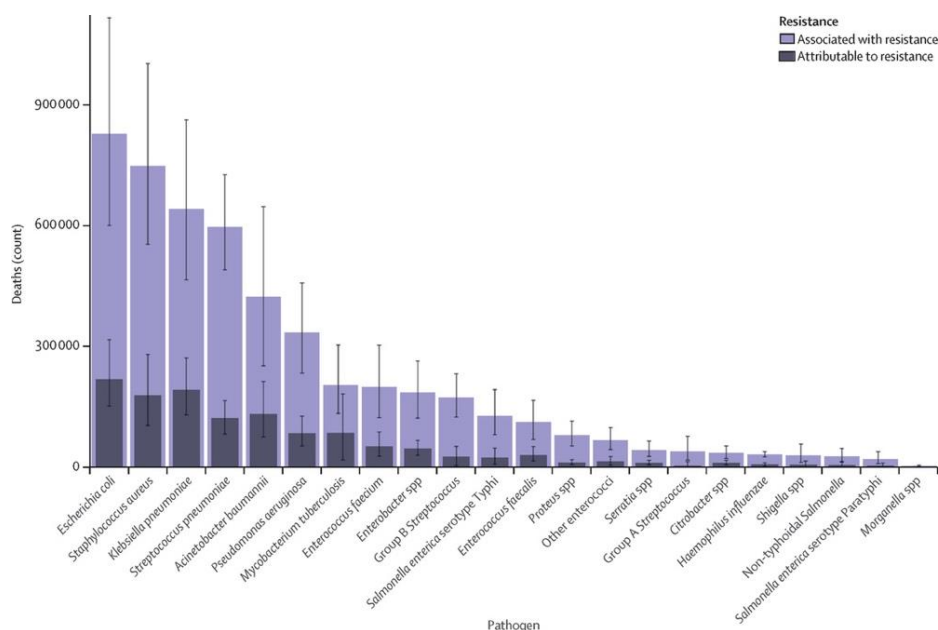
<b>IZJAVA .....</b>	<b>3</b>
<b>ZAHVALA .....</b>	<b>3</b>
<b>POVZETEK .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>NAMEN RAZISKOVALNE NALOGE.....</b>	<b>8</b>
<b>HIPOTEZE.....</b>	<b>8</b>
<b>2. TEORETIČNI DEL .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. ESCHERICHIA COLI.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. RAZMNOŽEVANJE E. COLI .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. MIKROBIOM .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4. ESCHERICHIA COLI KOT DEL MIKROBIOMA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5. BOLEZNI IN PATOGENI SEVI E. COLI.....</b>	<b>14</b>
2.5.1 EPEC .....	14
2.5.2 EHEC.....	14
2.5.3 ETEC .....	14
2.5.4 EAEC.....	14
2.5.5 EIEC .....	14
2.5.6 DAEC .....	14
2.5.7 ExPEC .....	14
<b>2.6. BOLEZNI, KI JIH POVZROČA E. COLI PRI ŽIVALIH.....</b>	<b>15</b>
<b>2.7. ZDRAVLJENJE .....</b>	<b>15</b>
2.7.1. ANTIBIOTIKI .....	15
2.7.2 PROTIMIKROBNA ODPORNOST .....	19
2.7.3. VPLIV PODNEBNIH SPREMEMB IN ONESNAŽEVANJA OKOLJA NA PROTIMIKROBNO ODPORNOST.....	21
2.7.4. ALTERNATIVNE OBLIKE ZDRAVLJENJA .....	21
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEL.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. IZOLIRANJE ESCHERICHIE COLI IZ OKOLJA .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. IZOLIRANJE E. COLI.....</b>	<b>25</b>
3.2.1. POSTOPEK PRECEPLJANJA SEVOV E. COLI .....	29
<b>3.3. IZDELAVA ANTIBIOGRAMA .....</b>	<b>30</b>
3.3.1. POSTOPEK PRIPRAVE HRANILNIH GOJIŠČ .....	30
3.3.2. POSTOPEK IZDELAVE ANTIBIOGRAMOV .....	32
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>35</b>
<b>5. RAZPRAVA.....</b>	<b>37</b>
<b>6. ZAKLJUČEK .....</b>	<b>38</b>
<b>7. VIRI IN LITERATURA .....</b>	<b>39</b>

## 1. UVOD

Po izboru svetovne zdravstvene organizacije (WHO), protimikrobna odpornost predstavlja eno izmed desetih največjih groženj človeštvu (WHO, 2021).

*Escherichia Coli* je bakterija, ki se nahaja v prebavilih ljudi in ostalih živali. Razširjena je tudi povsod, kjer pride do onesnaženja z iztrebki. Nevirulentni sevi te bakterije so pomemben del normalne črevesne flore, medtem ko lahko virulentni sevi povzročajo okužbe v prebavilih in zunaj črevesne okužbe pri ljudeh ter ostalih živalih (NIJZ, 2013). Te lahko zdravimo s pomočjo različnih antibiotikov, vendar so nekateri sevi *E. coli* nanje postali odporni. Ti lahko gene za odpornost prenašajo ne le na ostale seve *E. coli*, temveč tudi na ostale bakterije v prebavilih (Uddin Rasheed, M. idr., 2014).

Analiza inštituta za zdravje univerze v Washingtonu je pokazala, da je v letu 2019 zaradi bolezni, povezanih s protimikrobno odpornostjo, umrlo 4,95 milijonov ljudi po vsem svetu. Od tega je neposredno, zaradi protimikrobne odpornosti, umrlo 1,27 milijonov ljudi (Murray, C. J. L. idr., 2019). Kar pomeni, da je več ljudi umrlo zaradi protimikrobne odpornosti, kot jih je umrlo zaradi virusa HIV (864 000 ljudi) ali malarije (643 000 ljudi) (Thompson, 2022). Največ smrti je povzročila ravno *E. coli* (23,4% vseh smrti, povezanih z antimikrobno odpornostjo) (Murray, C. J. L. idr., 2019).



Slika 1: Število smrti v letu 2019, povezanih z antimikrobno odpornostjo, glede na določeno bakterijo (Murray, C. J. L. idr., 2019)

Predvidevajo, da bi lahko leta 2050, zaradi protimikrobne odpornosti, umrlo 10 milijonov ljudi na leto. V naslednjem desetletju, bi se lahko zaradi tega, še dodatnih 24 milijonov ljudi znašlo v hudi revščini. Na porast pridobivanja in širjenja protimikrobne odpornosti močno vplivajo tudi podnebne spremembe in nepravilno ravnanje z protimikrobnimi zdravili (United Nations Environment Programme, 2023).

## NAMEN RAZISKOVALNE NALOGE

Ker odpornost *E. coli* na antibiotike predstavlja velik zdravstveni problem, sem se odločila, da bom ugotovila, kateri sevi *E. coli*, izolirani iz okolja, so odporni na antibiotike. S tem sem izvedela, ali so nekateri sevi postali odporni tudi na tiste antibiotike, proti katerim nekoč niso bili odporni. Ugotovila sem tudi, kateri antibiotiki bi bili danes učinkoviti pri zdravljenju okužb z *E. coli*.

## HIPOTEZE

Izpostavljenost *E. coli* različnim antibiotikom v okolju poveča stopnjo odpornosti.

Sklepam, da se bo stopnja odpornosti povečala z vedno pogostejšo rabo antibiotikov, kar bi lahko vodilo do resnih posledic v zdravstvu.

### **Hipoteza 1.**

Sevi *E. coli*, izolirani iz okolja so odporni na Tetracycline.

### **Hipoteza 2.**

Sevi *E. coli*, izolirani iz okolja so odporni na Ceftazidime.

### **Hipoteza 3.**

Sevi *E. coli*, izolirani iz okolja so odporni na Ceftazidime/Clavulanic Acid.

### **Hipoteza 4.**

Sevi *E. coli*, izolirani iz okolja so odporni na Chloramphenicol.

### **Hipoteza 5.**

Sevi *E. coli*, izolirani iz okolja so odporni na Ciprofloxacin.

### **Hipoteza 6.**

Sevi *E. coli*, izolirani iz okolja so odporni na Florfenicol.

### **Hipoteza 7.**

Sevi *E. coli*, izolirani iz okolja so odporni na Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

### **Hipoteza 8.**

Sevi *E. coli*, izolirani iz okolja so odporni na Colistin Sulphate.

### **Hipoteza 9.**

Sevi *E. coli*, izolirani iz okolja so odporni na Ampicilin.

### **Hipoteza 10.**

Sevi *E. coli*, izolirani iz okolja so odporni na Ertapenem.

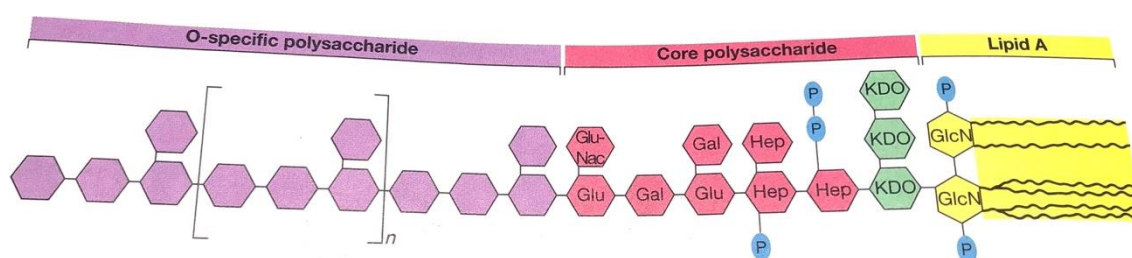


## 2. TEORETIČNI DEL

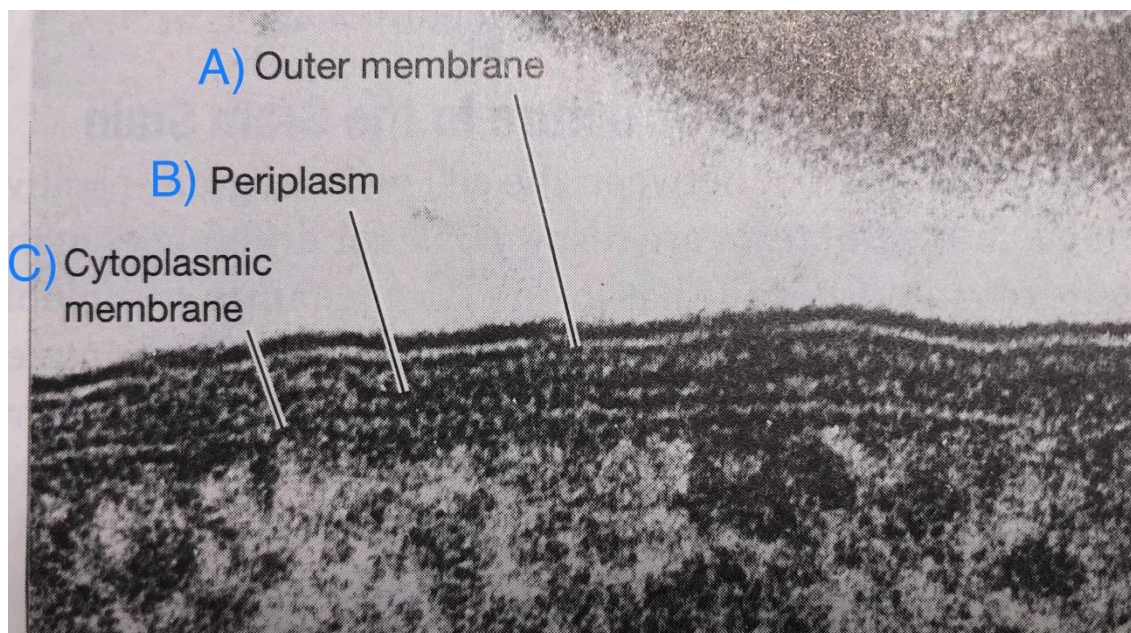
### 2.1. ESCHERICHIA COLI

*Escherichia coli* spada v družino bakterij Enterobacteriaceae. Nahaja se v prebavilih ljudi in ostalih živali. Večina sevov ni škodljivih, vendar poznamo tudi nekaj patogenih sevov, ki povzročajo različne bolezni (npr. kolibacilozo). Odkril jo je nemški zdravnik Theodor Escherich leta 1886. Kasneje je postala zelo popularna v znanosti zaradi svojih lastnosti, kot sta hitra rast in enostavno gojenje v laboratorijih. Kot modelni organizem je imela zelo pomembno vlogo pri odkrivanju temeljnih principov življenja, od genetskega koda, nastanka proteinov in regulacije genov, do življenjskega cikla virusov. Bila je tudi del raziskav, ki so vodile do sinteze biogoriv in mnogih zdravil (npr. za zdravljenje hemofilije, multiple skleroze, sladkorne bolezni in raka) (Allocati idr., 2013; Železnik, 2019).

Velika je 1-2 mm, ima obliko bacila. Spada pod gram negativne bakterije, saj jo poleg citoplazemske membrane in plasti peptidoglikana obdaja tudi zunanja membrana oz. kapsula. Ta je zgrajena iz lipidov in polisaharidov, zato jo včasih imenujemo tudi lipopolisaharidna membrana. Sestavljajo jo tudi A lipidi, ki so za živali toksični. Zato so lahko sevi *E. coli* patogeni, če se ti toksini izločijo v telo živali. Zunanja membrana bakteriji omogoča zaščito pred izsušitvijo, fagocitozo in nekaterimi antibiotiki (Brock biology of microorganisms, 2015).



Slika 2: Struktura lipopolisaharidne membrane (LPS): KDO, ketodeoxyoctonat; Hep, heptoza; Glu, glukoza; Gal, galaktoza; GluNac, N-acetilglukozamin; GlcN, glukozamin; P, fosfat. A lipidi so za živali toksični (endotoksini) (Brock biology of microorganism, 2015)



Slika 3: A) Zunanja membrana/kapsula *E. coli*; B) periplazma, plast peptidoglycana; C) citoplazemska membrana (Brock biology of microorganisms, 2015)

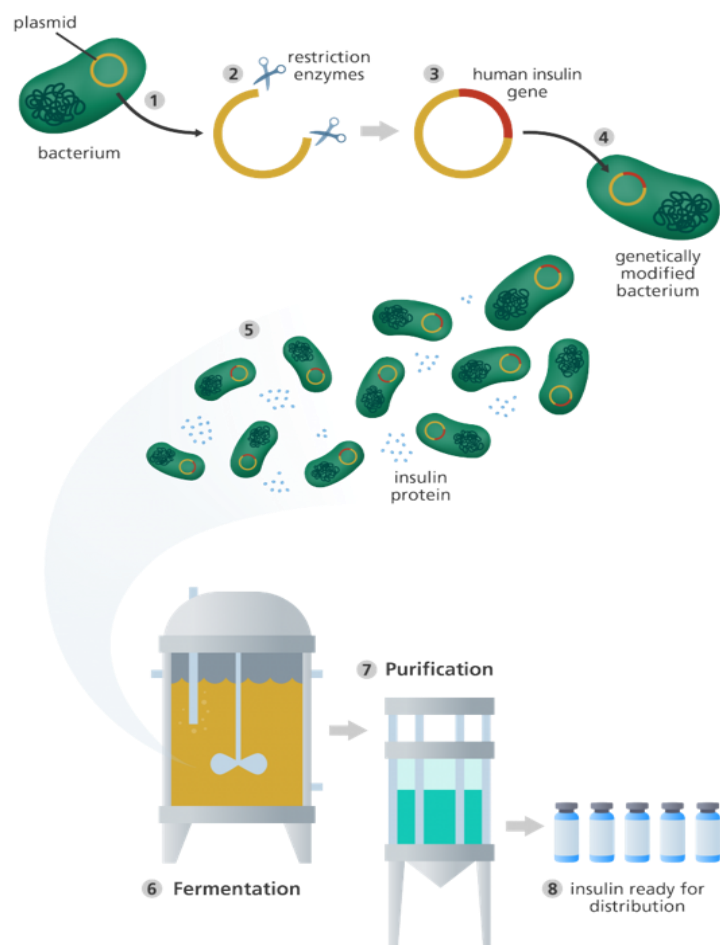
Pod njo se nahaja periplazma. Ta je prepustna za manjše molekule in neprepustna za večje. Preprečuje izgubo pomembnih proteinov, ki se nahajajo v njej oz. izven citoplazemske membrane (hidrolitični encimi, kemoreceptorji ...). Tu se nahajajo tudi proteini porini, ki omogočajo transport snovi skozi zunanjo membrano, periplazmo in citoplazemsko membrano. Nekatere bakterije lahko proizvajajo proteine, ki ubijajo sorodne vrste bakterij ali celo različne seve iste vrste. Imenujejo se bakteriocini. Pri *E. coli* so to kolcini, ki se vežejo na receptorje sumljive bakterije. Tako povzročijo okvaro funkcije njene membrane in bakterijo uničijo. S tem *E. coli* branijo svojo ekološko nišo in uravnavajo mikrobno raznolikost (Brock biology of microorganisms, 2015).

Na celični steni *E. coli* se nahajajo flageli. To so kompleksne strukture, sestavljene iz treh glavnih regij: bazalnega telesca, kaveljčka in filamenta. Flagelni filament je sestavljen iz več tisoč kopij enega samega proteina flagelina. Flageli *E. coli* omogočajo premikanje. Tako se lahko odmika od nevarnih kemikalij ali premika proti hranilnim snovem (glukozi). Flageli in gibljivost sta ena najpomembnejših elementov virulence mnogih patogenih sevov (Budič, M., 2011). *E. coli* je kemoorganotrof. Najhitreje uspeva v prisotnosti glukoze, saj se takrat njeno število podvoji v 50 minutah, v dobro oksegeniranih pogojih, pri 37 °C (Schaechter, 2009).

Procesi metabolizma in rasti potekajo v citoplazmi, ki je sestavljena iz vode, encimov, plinov, hranilnih in odpadnih snovi ... Centralni metabolizem *E. coli* pa predstavljajo številne biokemijske reakcije. (Brock biology of microorganisms, 2015).

V citoplazmi se nahajajo tudi ribosomi. Ti so sestavljeni iz 55 proteinov in treh rRNA molekul. V njih poteka eden izmed ključnih procesov - dekodiranje rRNA v proteine. rRNA pa se tvori v bakterijskih kromosomih in plazmidih (Kaczanowska in Rydén-Aulin, 2007).

V citoplazmi najdemo tudi kromosom iz dolge verige DNA. Za razliko od evkariontskih celic, se ta ne nahaja v jedru obdanem z membrano. Plazmide tudi sestavlja sklenjena veriga DNA, vendar ta ni povezana z reprodukcijo, tako kot kromosom. V njih se lahko razvijejo geni, ki omogočajo rezistenco in višjo virulenco. Zaradi možnosti prenosa različnih genov v plazmide *E. coli*, je ta postala nepogrešljiva na področjih molekularne biologije, genetike in genskega inženiringa. Danes jo na primer uporabljajo za produkcijo inzulina in drugih pomembnih snovi za zdravljenje in raziskovanje (Brock biology of microorganisms, 2015).



Slika 4: Postopek pridobivanja inzulina, s pomočjo prvega priznanega gensko spremenjenega organizma - *E. Coli* (Genome Research Limited, 2017)

## 2.2. RAZMNOŽEVANJE *E. COLI*

Tako kot večina ostalih bakterij, se tudi *E. coli* razmnožuje nespolno, z delitvijo. Hitrost razmnoževanja bakterije je odvisna od okolja in drugih dejavnikov. Če so pogoji ugodni, generacijski čas pri *E. coli* traja okoli 20 minut. Tako lahko teoretično iz ene bakterije v 24 urah nastane  $4,722 \cdot 10^{21}$  bakterij oziroma 472,2 ton bakterij *E. coli*.

Delitev celice se začne s pritrditvijo DNK na citoplazemsko membrano. Nato se celica poveča, DNK pa se podvoji. Pri tem lahko nastanejo mutacije, ki pripomorejo k razvoju odpornosti. Potem se oblikuje prečna stena. Celica se deli v dve celici in DNK se porazdeli v vsako nastajajočo hčerinsko celico. Nato se celici ločita in nastaneta dve hčerinski celici (Brock biology of microorganisms, 2015).

## 2.3. MIKROBIOM

V prebavnem sistemu ljudi se nahaja okoli 1800 različnih vrst mikroorganizmov. Izračuni kažejo, da ima povprečen moški, težak 70 kg, 30 trilionov človeških celic in 39 trilijonov bakterijskih celic. Znanstveniki predvidevajo, da naše telo vsebuje več bakterijskih kot lastnih celic (Abbott, 2016). Sestava in delovanje mikrobioma je zelo povezana z zdravjem človeka. Pomemben je za imunski sistem, prebavo, pridobivanje hranilnih snovi ... Ugotavljajo, da lahko vpliva tudi na uravnavanje teže, počutje ljudi ter nastanek raznih bolezni. Od starosti, okolja, prednikov, kondicije in prehrane posameznika je odvisno, katere vrste mikroorganizmov bodo naseljevale njihov prebavni sistem (Hollister idr., 2014).

Pri miših, ki so jih vzgajali v takšnih pogojih, da v ali na sebi niso imele nobenih mikroorganizmov, so ugotovili, kako mikrobiom vpliva na zdravje organizma. Imunski sistem teh miši se je poslabšal, postale so dovzetnejše za bolezni. Tudi njihovi organi so se spremenili, na primer povečal se je volumen slepega črevesja (Kennedy idr., 2018)

	Broad-spectrum antibiotics	References	Germ-Free	References
Whole intestine	Similar length, ↑ transit time	Grasa et al., 2015; Ge et al., 2017		
Small intestine	↓ transit time similar apoptotic cells, fewer proliferating cells ↓ RegIIy and RegIIIβ production ↓ number of PP; ↓ cells in PP ↓ villus width, ↓ T cells/villus ↓ granules/Paneth cell altered expression of TLRs similar tuft cells	Brandl et al., 2008; Vaishnavi et al., 2008; Kinnebrew et al., 2010; Reikvam et al., 2011; Wichmann et al., 2013; Kernbauer et al., 2014; Grasa et al., 2015; Hashiguchi et al., 2015; Park et al., 2016; Ekmekci et al., 2017; Durand et al., 2018; Schneider et al., 2018; Wilen et al., 2018	↓ transit time fewer proliferating cells ↓ RegIIy, RegIIIβ production ↓ villus width, ↓ T cells/villus, ↓ cells in LP ↓ cells in PP ↓ mucus thickness, attachment to epithelium; mucus more attached ↓ granules/Paneth cell, ↓ lysozyme+ cells/crypt similar tuft cells ↑ bile acids	Vaishnavi et al., 2008; Sayin et al., 2013; Wichmann et al., 2013; Kernbauer et al., 2014; Schütte et al., 2014; Johansson et al., 2015; Park et al., 2016; Durand et al., 2018; Schneider et al., 2018
Cecum	↑ size ↑ villus length and width ↓ SCFAs decreased thickness of muscularis propria	Hill et al., 2010; Corbitt et al., 2013; Kelly et al., 2015; Park et al., 2016; Yan et al., 2016	↑ size ↑ villus length and width ↓ SCFAs, bile acids Decreased thickness of muscularis propria	Hill et al., 2010; Corbitt et al., 2013; Sayin et al., 2013; Smith et al., 2013; Yan et al., 2016
Colon	Similar length, ↑ transit time ↓ RegIIy and RegIIIβ, other anti-microbial factors ↓ epithelial regeneration, ↓ proliferating cells Similar mucus penetrability Altered expression of TLRs ↓ tuft cells ↓ SCFAs Formation of goblet-cell antigen passages	Reikvam et al., 2011; Wichmann et al., 2013; Grasa et al., 2015; Johansson et al., 2015; Knoop et al., 2015; Ekmekci et al., 2017; Ge et al., 2017; Wilen et al., 2018	↓ RELMβ, other anti-microbial factors ↓ crypt height Similar mucus thickness, attachment to epithelium; decreased impenetrable mucus Similar tuft cells ↓ SCFAs, bile acids Formation of goblet-cell antigen passages	He et al., 2003; Matsumoto et al., 2012; Sayin et al., 2013; Wichmann et al., 2013; Kernbauer et al., 2014; Johansson et al., 2015; Knoop et al., 2015; Levy et al., 2015; McKinley et al., 2017
Lymph nodes	Similar or ↓ cellularity ↓ size and cellularity after flu infection	Ichinohe et al., 2011; Durand et al., 2018	↓ or similar cellularity Altered structure	Bauer et al., 1963; Manolios et al., 1988; Kernbauer et al., 2014; Zhang et al., 2015; Durand et al., 2018
Spleen	Similar or ↓ weight ↓ cellularity, fewer leukocytes	Ochoa-Repáraz et al., 2009; Reikvam et al., 2011; Yoshiya et al., 2011; Grasa et al., 2015; Suárez-Zamorano et al., 2015; Zhang et al., 2015; Josefsdottir et al., 2017; Thackray et al., 2018	Similar cellularity, similar lymphocytes Altered structure	Bauer et al., 1963; Mazmanian et al., 2005; Zhang et al., 2015
Thymus	↓ weight	Josefsdottir et al., 2017	Similar cellularity	Nakajima et al., 2014
Liver	Similar or ↓ weight Impaired regeneration Altered bile acid production	Corbitt et al., 2013; Sayin et al., 2013; Zhang et al., 2014; Wu et al., 2015; Yan et al., 2016	Similar weight Impaired regeneration Altered bile acid production	Cornell et al., 1990; Corbitt et al., 2013; Sayin et al., 2013; Yan et al., 2016
Fat	↓ weight of abdominal fat pads ↓ inguinal and perigonadal adipose tissue	Suárez-Zamorano et al., 2015; Yan et al., 2016	↓ weight of abdominal fat pads ↓ % body fat	Caesar et al., 2012; Yan et al., 2016
Bone	↑ bone mass	Yan et al., 2016	↑ bone mass vs. short-term SPF colonized, ↓ bone mass/length vs. long-term SPF colonized ↑ bone mass vs. conventional	Sjögren et al., 2012; Yan et al., 2016

PP, Peyer's patch; TLR, Toll-like receptor; LP, lamina propria; SCFA, short-chain fatty acid; SPF, specific-pathogen-free.

Slika 5: Prikaz spremembe organov pri miših brez prisotnosti mikroorganizmov (Kennedy, E. A., King, K. Y., Baldrige, M. T., 2018)

## 2.4. ESCHERICHIA COLI KOT DEL MIKROBIOMA

*E. coli* je tudi pomemben del mikrobioma v črevesju ljudi in živali. Pomaga pri prebavi, ovira gnitje v črevesju in sodeluje pri nastajanju vitaminov K in B kompleksa. Najdemo jo povsod, kjer gre za onesnaženost z iztrebki. (Oražen Adamič in Sernec, 2017)

## 2.5. BOLEZNI IN PATOGENI SEVI *E. COLI*

V črevesju se lahko razvije več različnih kategorij patogenih sevov *E. coli*. To so enteropatogenični (EPEC), enterohemoragični (EHEC), enterotoksinogeni (ETEC), enteroagregativni (EAEC), enteroinvazivni (EIEC) in difuzivno adherentni (DAEC) sevi *E. coli*. Sevi, ki povzročajo patogenezo izven prebavnega sistema pa so t. i. ekstraintestinalni sevi *E. coli* (ExPEC) (Budič, M., 2011). Kategorije patogenih sevov imajo različne značilnosti in povzročajo različne zdravstvene težave:

- 2.5.1 EPEC: enteropatogenični sevi *E. coli* lahko povzročajo hudo drisko, predvsem pri otrocih, mlajših od dveh let. V razvitih državah se občasno pojavljajo v vrtcih in pediatričnih oddelkih. Simptomi so povišana telesna temperatura, vodena in nekrvava driska ter bruhanje. Zaradi driske lahko pride do podhranjenosti. V tem primeru postane infekcija s sevom EPEC za otroka smrtno nevarna (Kliegman, R. M., 2020).
- 2.5.2 EHEC: enterohemoragični sevi *E. coli* predstavljajo podmnžico serotipov, ki sintetizirajo Šigove toksine (Stx), poimenovane kot STEC. Medtem ko sevi STEC niso vsi patogeni, sevi EHEC so. Ti lahko povzročajo hemoragični kolitis, krvavo drisko in hemolitični uremični sindrom z ledvično odpovedjo ter nevrološkimi zapleti (Budič, M., 2011).
- 2.5.3 ETEC: enterotoksinogeni sevi *E. coli* so skupina patogenih sevov, ki kolonizirajo tanko črevo, izločajo enterotoksine in povzročajo hude driske pri otrocih, tudi v razvitih državah. So najpogostejši vzrok za drisko pri ljudeh, ki potujejo po svetu. Zaradi ETC na leto umre 300,000 do 500,000 otrok, mlajših od pet let (Fleckenstein, J. M., Hardwidge, P. R., Munson G. P., Rasko, D. A., Sommerfeld H., Steinsland H., 2010).
- 2.5.4 EAEC: enteroagregativni sevi *E. coli* tudi povzročajo vodeno drisko pri otrocih in odraslih, v razvitem in nerazvitem svetu (Kaur, P., Chakraborti, A., Asea, A., 2010).
- 2.5.5 EIEC: enteroinvazivni sevi *E. coli* povzročajo drisko s sledmi sluzi, krvi in levkocitov. Ti sevi so sposobni vdreti v epitelne celice črevesja ter se v njih razmnožiti. Bolezni, ki jih povzročajo se pojavljajo v razvitem in nerazvitem svetu (Pasqua, M., Michelacci, V., Di Martino, M. L., Tozzoli, R., Grossi, M., Colonna, B., Morabito, S., Prosseda, G., 2017).
- 2.5.6 DAEC: tudi difuzivno adherentni sevi *E. coli* povzročajo vodeno drisko, predvsem pri otrocih (Servin, A. L., 2006).
- 2.5.7 ExPEC sevi *E. coli* so del črevesne mikroflore. Vendar okužb ne povzročajo v črevesju. Povzročajo lahko pnevmonijo, sepso, neonatalni meningitis, okužbe sečil in drugih mest, izven črevesja (Smith idr., 2007).

Virulenca je definirana kot sposobnost organizma, da povzroči bolezen v določenem gostitelju. Pomembni dejavniki, ki vplivajo na virulenco *E. coli* so šigovi toksini (EHEC), intimin, enterohemolizin, flageli ... (Budič, M., 2011).

## 2.6. BOLEZNI, KI JIH POVZROČA *E. COLI* PRI ŽIVALIH

Pogosta bolezen, ki jo povzroča *E. coli* pri živalih je kolibaciloza. Najpogosteje zbolevalo novorojena teleta, žrebeta, jagnjeta in pujski, pa tudi ljudje. Je akutna infekcijska bolezen in poteka kot septikemija, dizenterija, pnevmonija, enterotoksemija ali poliartritis.

Največkrat se živali okužijo peroralno, lahko pa tudi preko popka in nosno-žrelne žleze.

Izbruh boleznih lahko povzročajo enterotoksinogeni sevi (ETEC) ali prekomerno namnoženi sevi iz debelega črevesja. Poteka v treh oblikah, ki se pojavljajo vsaka zase, lahko pa potekajo tudi hkrati:

1. Kolibacilozna septikemija - povzročitelj vdre v krvni obtok in parenhimatozne organe. Zbolevalo le novorojene živali.
2. Kolibacilozna enterotoksemija – enterotoksemični sevi se prekomerno razmnožijo in preidejo iz debelega črevesja v tanko črevo. Tam se toksini absorbirajo v kri in povzročijo toksemijo. Pri tej obliki zbolevalo tudi odrasle živali.
3. Kolibacilozni enteritis – pri mladih živalih se pojavi huda in zelo smrdeča driska (bela griža), saj se patogeni sevi *E. coli* prekomerno namnožijo (Gros, L., 2021).

## 2.7. ZDRAVLJENJE

Bolezni, ki jih povzročajo patogeni sevi *E. coli* diagnosticiramo na podlagi klinične slike, anamneze in bakterioloških preiskav parenhimatoznih organov, tankega črevesja ali iztrebkov.

Povzročitelje lahko uničimo s parentalnimi in peroralnimi aplikacijami antibiotikov. Proti dehidraciji organizma se borimo s parentalnimi infuzijami elektrolitskih raztopin in glukoze ter s transfuzijami krvi, s čimer organizem dobi tudi protitelesa neposredno v kri. Potrebna je tudi peroralna aplikacija črevesnih adstringentov, absorbentov in antiseptikov ter primerna dietna prehrana (Gros, L., 2021).

### 2.7.1. ANTIBIOTIKI

Luis Pasteur je že leta 1877 opazil, da nekatere klice iz zraka na gojišču preprečujejo rast in razmnoževanje bacila antraksa. Pozneje so pojav imenovali antibioza. Snovi, ki so jih izolirali iz mikroorganizmov, pa antibiotiki (Grah, 2010).

Leta 1928 je Alexander Fleming odkril prvi antibiotik, penicilin. Uporabljati so ga začeli šele desetletje kasneje. To odkritje je popolnoma spremenilo proces odkrivanja novih zdravil, velika proizvodnja penicilina je transformirala farmacevtsko industrijo in omogočila precej učinkovitejše zdravljenje infekcijskih bolezni (Gaynes, 2017).

Antibiotiki so izolirane in kemično definirane spojine oz. produkti metabolizma bakterij, gliv, plesni, lišajev pa tudi nekaterih rastlin. Te spojine lahko pridobivamo na biološki ali biosintetičen način. Antibiotiki, v zelo majhnih koncentracijah, učinkujejo zaviralno na rast ali celo ubijajo na njih občutljive mikroorganizme.

Danes se zelo pogosto uporabljajo za zdravljenje in preprečevanje okužb pri ljudeh in ostalih živalih (medicinska raba). Uporabljali pa so jih tudi za stimulacijo rasti in izkoriščanje krme pri mladih živalih (biostimulacija). Vendar so se z množično uporabo pojavili problemi. Odpornost proti najpogosteje rabljenim antibiotikom je začela rasti. Zato je pravilna raba antibiotikov postala izjemno pomembna (Grah, 2010).

Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je izdala naslednja priporočila glede rabe antibiotikov pri ljudeh in živalih:

1. Za zdravljenje je vedno potrebno izbrati antibiotik, na katerega je povzročitelj okužbe dovolj občutljiv.
2. Antibiotik naj ima čim ožji protimikrobni spekter.
3. Doza antibiotika in način aplikacije morata biti primerna stanju bolnika.
4. Uporaba antibiotika v posameznih primerih naj bo čim krajša.

Antibiotiki se uporabljajo tudi za profilaktične (preventivne) namene. V živalih tovrstna uporaba preprečuje veliko škodo z gospodarskega in zdravstvenega stališča (Grah, 2010).

V humani medicini se antibiotiki preventivno predpisujejo zaradi različnih razlogov, kot so na primer:

#### 1. ZOBNI POSEG

S tem preprečimo, da bi bakterije vdrle v krvni sistem med zobnim posegom pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom.

#### 2. KIRURŠKI POSEG

Med nekaterimi kirurškimi posegi je možnost vdora škodljivih mikroorganizmov zelo velika. Naprimer pri odstranjevanju raka v glavi in vratu, operacijah možganov ter hrbtenjače, histerektomiji (odstranitvi maternice), nekaterih ortopedskih posegih, operacijah srca in transplantaciji organov.

#### 3. POROD

#### 4. OSLABLJEN IMUNSKI SISTEM

Zaradi nekaterih bolezni, kot so naprimer HIV, neutropenija, kemoterapija, lupus, sladkorna bolezen, splenektomija in anemija srpastih celic, imunski sistem obolelega oslabi. Zato morajo redno jemati antibiotike za profilaktične namene (Brennan, 2021)

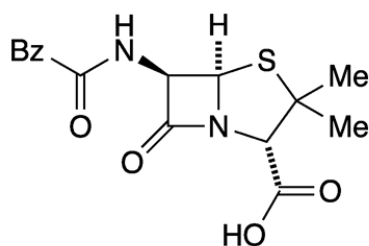


Antibiotike lahko razvrščamo v skupine, glede na njihovo kemijsko pripadnost, saj se dajo na ta način dobro opredeliti tudi njihove antibiotične in farmakološke lastnosti.

Antibiotiki so lahko:

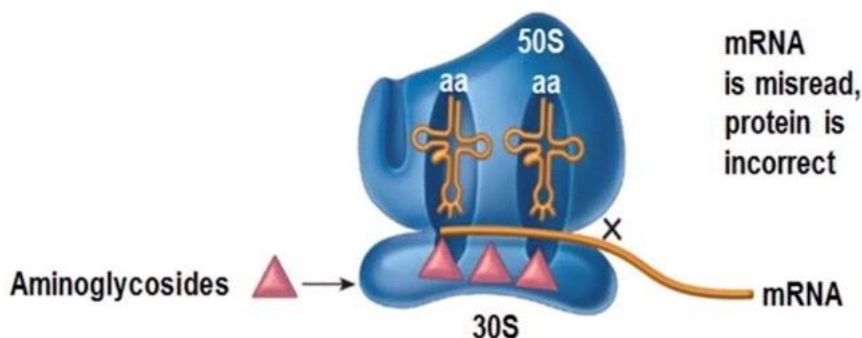
1. BETA LAKTAMINSKI ANTIBIOTIKI (npr. penicilin in cefalosporin). Penicilin zavira sintezo bakterijske celične stene in tako povzroča razpad bakterije. Nekatere bakterije proizvajajo encim, imenovan penicilinaza (beta laktamaza). Ta razgrajuje penicilin in so zato proti njemu odporne. Bolje delujejo proti grampozitivnim bakterijam kot gramnegativnim, ki imajo bolj kopleksno sestavljeno celično steno. Tovrstni antibiotiki lahko povzročajo alergijske reakcije.

Pod peniciline spadajo: penicilin G, penicilin V, penicili odporni na penicilinaze (meticilin, oksacilin, kloksacilin, floksacilin ...) in penicilini širokega spektra (amoksisilin, ampicilin, plivampicilin ...). Pod cefalosporine pa spadajo: cefalosporini 1., 2., 3. in že 4. generacije (Grah, 2010).



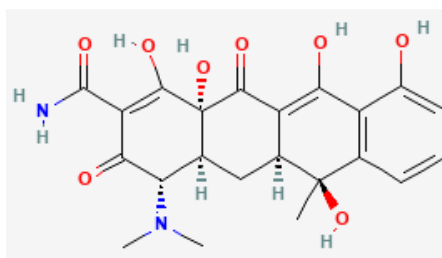
Slika 6: Molekula benzil penicilina (penicilin B) (ACS, 2018)

2. POLIPEPTIDI (polimiksin B, bicitracin). Najpogosteje se uporabljajo za lokalno zdravljenje na koži in v mazilih za oči (Grah, 2010).
3. AMINOGLIKOZIDNI ANTIBIOTIKI (streptomycin, dihidrostreptomycin, neomicin, gentamicin ...). Delujejo tako, da se vežejo z bakterijskimi ribosomi (podenoto S30) in motijo sintezo proteinov. Dobro delujejo na številne aerobne gramnegativne bakterije. Priporočljiva je parenteralna aplikacija, saj se peroralno slabo absorbirajo (Grah, 2010).



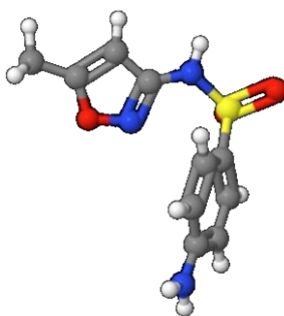
Slika 7: Delovanje aminoglikozidnih antibiotikov (Kumar Mahato, S., 2019)

4. MAKROLIDNI ANTIBIOTIKI (eritromicin, azitromicin). Tudi ti delujejo tako, da se vežejo na ribosome (podenoto S50) in motijo sintezo beljakovin. Protimikrobni spekter makrolidov je podoben penicilinskemu. Zato so makrolidi dobra zamenjava za penicilin pri tistih, ki so nanj alergični (Grah, 2010).
5. POLIENI ali POLIACETILENI (nistatin, amfotericin B). Ti antibiotiki se najbogosteje uporabljajo za zdravljenje glivičnih okužb (Grah, 2010).
6. TETRACIKLINI (tetraciklin, oksitetraciklin, doksiciklin, klortetraciklin). Tetraciklini imajo širok protimikrobni spekter in delujejo tako, da motijo translacijo na bakterijskih ribosomih in s tem sintezo proteinov. Lahko se nalagajo v kosteh in zobeh in tako ovirajo njihovo rast in razvoj, predvsem pri mladih, škodljivi so tudi za plod (Grah, 2010).



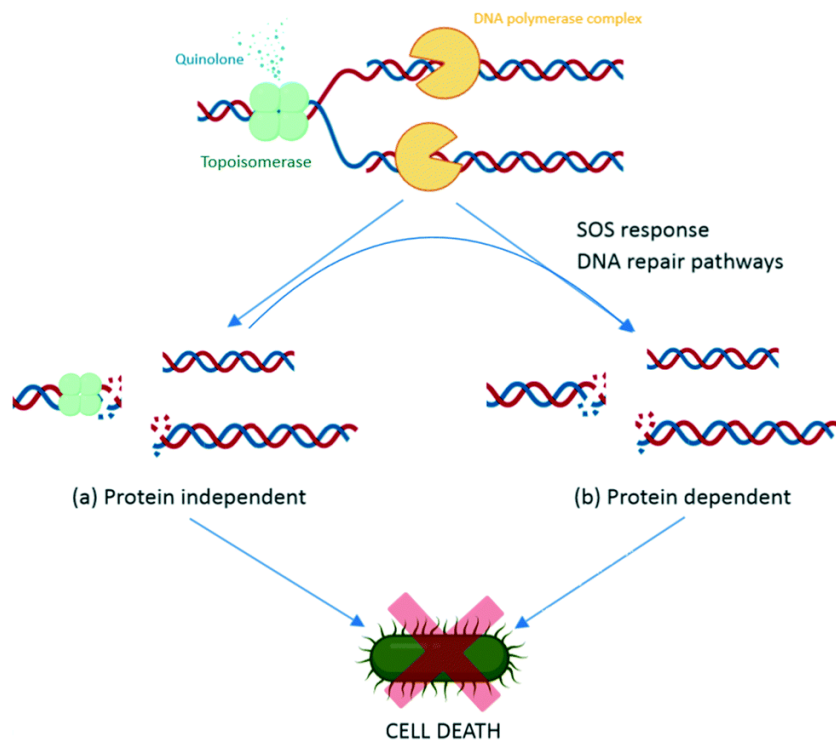
Slika 8: Molekula tetraciklina (PubChem, b. d.)

7. ANTIBIOTIKI Z NEOBIČAJNO KEMIJSKO ZGRADBO (kloramfenikol, grizeofulvin, linkomicin, klindamicin, spektinomycin). Sem spadajo antibiotiki, ki imajo zelo različno kemično zgradbo in zato tudi nimajo skupnih značilnosti (Grah, 2010).
8. SULFONAMIDI (sulfadiazin, sulfometoksazol, sulfadimetoksin). Poizkusi, ki so jih delali s sulfonamidi *in vitro*, so pokazali, da le-ti delujejo na mikroorganizme bakteriostatično, saj zaviralno delujejo na sintezo folne kisline, ki je potrebna za nadaljnjo sintezo nukleinskih kislin in razmnoževanje bakterij. Imajo precej širok spekter delovanja. Mikroorganizmi, ki za svoj razvoj ne rabijo folne kisline ali jo jemljejo iz okolice, niso občutljivi na sulfonamide. Različni sulfonamidi imajo isti protimikrobni spekter, vendar se razlikujejo v svojih fizikalno-kemijskih in farmakokinetičnih lastnostih (Grah, 2010).



Slika 9: 3D formula sulfometoksazola (ChemSpider, b. d.)

9. KINOLONI (enrofloksacin, marbofloksacin). Za zdravljenje je pomembna njihova podskupina fluorkinoloni (ciprofloksacin), ki so relativno nova protibakterijska zdravila širokega spektra proti grampozitivnim in gramnegativnim bakterijam in delujejo tako, da inhibirajo encim DNA- girazo, potreben za podvajanje DNK bakterij in jih s tem aktivno ubijajo (Grah, 2010).

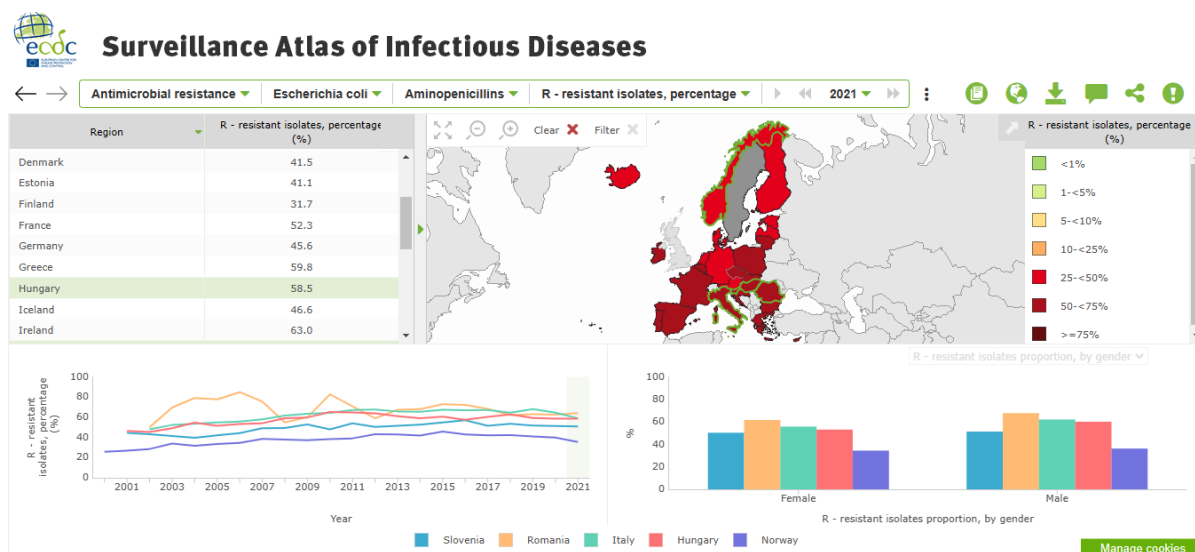


Slika 10: Delovanje antibiotikov kinolonov (Pham, D. M., Ziora, Z. M., Blaskovich, M. A. T., 2019)

## 2.7.2 PROTIMIKROBNA ODPORNOST

Rezistenca ali odpornost je sposobnost organizma, tkiva ali celice, da se upre škodljivemu dejavniku ali stanju, kot so kemična spojina, povzročitelj bolezni ali okoljski stresor. Na primer nekatere vrste kaktusov so se prilagodile na okolja z zelo visokimi temperaturami in postale rezistentne na vročino. Valjasti črvi iz rodu *Cooperia*, ki zajedajo pri govedu, so razvili rezistenco oz. odpornost proti antihelminnikom. Rezistenca se lahko pojavi tudi pri ostalih patogenih mikroorganizmih, kot so na primer glivice, bakterije in virusi, ki povzročajo bolezni tudi pri ljudeh (Oražem Adamič, A., Serneč, K., 2017)

Po ocenah Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni v Evropski uniji vsako leto umre več kot 35.000 ljudi zaradi protimikrobno odpornih okužb, primerjalno po letih pa je prisoten trend naraščanja. Vpliv protimikrobne odpornosti na zdravje je primerljiv z učinki gripe, tuberkuloze in HIV/aidsa skupaj (Ministrstvo za zdravje, 2022).



Slika 11: Rezistenco največkrat povzroča prepogosta in nepotrebna uporaba antimikrobnih zdravil  
(Surveillance Atlas of Infectious Diseases, 2021)

Charles Darwin je odkril, da se organizmi ves čas spreminjajo in razvijajo v procesu evolucije, tudi patogeni mikroorganizmi. Tisti, ki razvijejo mutacije, ki jim omogočajo odpornost proti antimikrobnim zdravilom, preživijo, medtem ko ostali propadejo. Tako preživijo le najodpornejši mikroorganizmi, ki se prilagodijo na spremenljive razmere okolja. Mutacije lahko organizmu škodijo, so nevtralne ali pa organizmu pomagajo preživeti. Nastanejo takrat, ko pri natančnem podvojevanju DNK pride do napak, ki jih popravljalni mehanizmi v celici ne popravijo. Najpogosteje pride do zamenjave ene dušikove baze z drugo (substitucija), izgube nukleotida (delecija) ali pa dodajanja nukleotida (insercije). Ponavadi največje posledice povzroča dodajanje ali izguba nukleotida, saj se pri tem spremeni bralni okvir zaporedja, kar privede do napačnega poročanja vseh aminokislin (Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L., 2010).

Primer »koristnih« mutacij najdemo pri bakterijah, ki so postale odporne na antibiotike. Pri njih, se je naključno zgodila mutacija gena v plazmidih, s katero so dobile sposobnost, da sprožijo sintezo encima, ki razgradi strupen antibiotik (npr. penicilin). Na antibiotike so postale odporne tudi na druge načine. Nekatere bakterije so razvile odprtine (efflux pumps), ki jim omogočajo izločanje toksinov antibiotika tetracycline. Pri nekaterih so se proteini v steni bakterije tako spremenili, da antibiotik nanje ne more več vplivati (Resistance mechanisms, b. d.). To se je pojavilo pri bakteriji *Staphylococcus aureus*, ki je postala odporna na antibiotik meticilin. Zaradi seva te bakterije v bolnišnicah vsako leto umre okoli 1000 bolnikov, ki so bili v bolnišnico sprejeti zaradi drugih bolezni. Poznamo gram negativne in gram pozitivne bakterije. Lipidna membrana pri gram negativnih bakterijah tudi omogoča odpornost proti nekaterim antibiotikom (Madigan, M. T., 2017).

Ameriški raziskovalec Joshua Lederberg je dobil Nobelovo nagrado za odkritje izmenjave genov med bakterijami. Njegovo odkritje predstavlja dokaz, da si lahko bakterije izmenjujejo gene za odpornost proti zdravilom. Izmenjujejo jih lahko s konjugacijo, transdukcijo ali transformacijo. Pri konjugaciji se geni iz plazmid prenašajo po pilosu, ki dve bakteriji poveže skupaj. Transdukcija se pojavlja pri bakterijah, ki jih napadajo bakteriofagni virusi. Ti se v bakterijah razmnožujejo in spet napadajo nove bakterije. Pri tem, lahko poleg svojih genov pomotoma prenašajo tudi rezistentne gene odpornih bakterij. O transformaciji pa govorimo takrat, ko bakterija propade in se v okolico sprostijo rezistentni geni. Ti nato pridejo do ostalih bakterij in nanje prenesejo informacije za odpornost (Hasudungan, A., 2014).

### 2.7.3. VPLIV PODNEBNIH SPREMENB IN ONESNAŽEVANJA OKOLJA NA PROTIMIKROBNO ODPORNOST

Antibiotiki se ne uporabljajo le za zdravljenje okužb, temveč tudi v živinoreji, ribogojstvu, poljedelstvu in kot krmna dopolnila rejnim živalim. Zaradi množične uporabe se pogosto z vsemi ostalimi odpadki znajdejo v našem okolju. Onesnaževanje (npr. površinskih voda) predstavlja resen problem, saj se tako lahko rezistenca razvije v okolju veliko hitreje, kot bi se sicer.

Jaz sem seve *E. coli* našla tudi pri jezu na reki sotli. Tam je voda onesnažena s fekalnimi odpadki, kar pomeni, da je tudi možnost razvoja rezistence mikroorganizmov na antibiotike veliko večja. Naraščajoča populacija ljudi predstavlja tudi vedno večjo potrebo po antibiotikih in še več onesnaževanja.

Klimatske spremembe zelo negativno vplivajo na ekosistem, zdravje ljudi, zdravje živali, proizvodnjo hrane, med drugim pa tudi na razvoj protimikrobne odpornosti. Naraščajoče temperature povzročajo večjo verjetnost horizontalnega prenosa rezistentnih genov med bakterijami (predvsem konjugacije). Vplivajo pa tudi na porast okužb in bolezni, povezanih s patogenimi mikroorganizmi. S podnebnimi spremembami in onesnaževanjem, se zmanjšuje biodiverziteteta, kar tudi vpliva na porast rezistentnih mikroorganizmov (United Nations Environment Programme, 2023).

### 2.7.4. ALTERNATIVNE OBLIKE ZDRAVLJENJA

#### 2.7.4.1. BAKTERIOFAGI

Bakteriofage sta neodvisno odkrila Frederick W. Twort (leta 1915 v Veliki Britaniji) in Félix d'Hérelle (leta 1917 v Franciji). Kmalu po odkritju, sta jih začela uporabljati za zdravljenje raznih bolezni, ki jih povzročajo bakterije (bubonsko kugo oz. črno smrt in kolero). Terapija z bakteriofagi na začetku ni bila uspešna. Zato je bila, po odkritju antibiotikov, v štiridesetih letih prejšnjega stoletja praktično opuščena (Bacteriophage, 2023).

Vendar je porast na antibiotike odpornih bakterij, ki povzročajo okužbe, pripomogel k raziskovanju alternativnih oblik zdravljenja okužb. Zato se je zanimanje za terapijo z uporabo bakteriofagov povečalo. Večina vrst bakteriofagov lahko uniči le specifične vrste bakterij. Pogosto se za terapijo uporabljajo bakteriofagni koktejli, ki vsebujejo več različnih vrst virusov (Janežič, 2019). Ti virusi bakterijo uničijo tako, da jo okužijo in se v njej razmnožujejo. Nekatere bakterije so razvile odpornost tudi proti bakteriofagom. Vendar so za tem bakteriofagi spremenili infektivnost in tako uspešno uničili nekoč odporno bakterijo. Ta proces, ki mu pravimo koevolucija, se izkorišča tudi pri bakteriofagni terapiji (Filipič, 2018).

»Tretma kombinacije bakteriofagov in antibiotikov se je izkazal za učinkovitejšo kot samostojna terapija z omenjenima sredstvoma. Na bakteriofag konjugirani antibiotiki so se izkazali za zelo uspešno obliko zdravljenja okužb, saj se tako na mestu okužbe zaradi specifičnosti bakteriofagov do gostitelja koncentracija antibiotikov poviša.» (Janežič, 2019, izvleček). Bakteriofagna terapija še ni dovolj dobro raziskana. Zato se v Sloveniji še ne uporablja v praksi.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1. IZOLIRANJE ESCHERICHIE COLI IZ OKOLJA

Z namenom iskanja različnih sevov *E. coli* v okolju, sem nabrala 11 vzorcev iz različnih lokacij, na območju občine Podčetrtek in občine Kozje. Vzorčila sem na dva načina:

##### 1. VZORČENJE POVRŠIN - BRIS Z VATIRANO PALČKO

Na tak način sem vzorčila vzorec št. 1, št. 3, št. 6, št. 7, št. 8 in vzorec št. 11.

Najprej sem vzela sterilno vatirano palčko in z njo naredila bris po površini. Nato sem to nanese na že pripravljeno gojišče (sterilno petrijevko s primerno ohlajenim agarjem). Vzorec sem označila in natančno opisala način ter kraj vzorčenja (opis površine, ura, datum, točna lokacija,...).

##### 2. VZORČENJE VODE

Vzorci vode (št. 2, št. 4, št. 5, št. 9 in št. 10) sem pridobila tako, da sem vzela čiste plastenke. Te sem najprej splahnila z vodo na lokaciji in nato to vodo zajela. Vsako plastenko sem označila ter natančno opisala kraj in način vzorčenja, tako kot sem to storila pri ostalih vzorcih.

Tabela 1: Vzorčila sem na prikazanih lokacijah.

LOKACIJA	ŠTEVILO VZORCA	MESTO VZORČENJA	PRISOTNOST <i>E. COLI</i>
Sedlarjevo	1.	iztrebek konja	da
	2.	vodni jarek ob njivi	da
	3.	lupina kokošnjega jajca	da
	4.	tekočina, ki izteka iz kravjega gnoja	da
Kozje	5.	ribnik	ne
Podčetrtek	6.	smetnjak pri kopališču in restavraciji	ne
	7.	ob bazenu v Aqualuni	ne
Vonarje	8.	ob jezua na reki Sotli	da
	9.	voda ob jezua na reki Sotli	da
Imeno	10.	mlaka	ne
	11.	odpadki iz klavnice	da

SLIKE LOKACIJ IN MEST VZORČENJA:



Vzorec št. 1



Vzorec št. 2



Vzorec št. 3



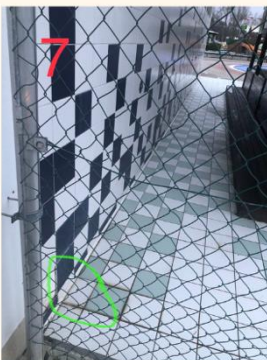
Vzorec št. 4



Vzorec št. 5



Vzorec št. 6



Vzorec št. 7



Vzorec št. 8



Vzorec št. 9



Vzorec št. 10



Vzorec št. 11

Slika 12: Prikaz lokacije in mesta vzorčenja posameznih vzorcev



### 3.2. IZOLIRANJE *E. COLI*

Vzorci v petrijevkah sem inkubirala 18 ur pri 37 °C. Vzorce vode pa sem nanela na posebne petrijevke, imenovane Compact Dry EC. Njihov premer meri 55 mm. Vsebujejo hranilno blazinico, ki je specifična za detekcijo kaliformnih bakterij. Gre za skupino enterobakterij, ki imajo značilni biokemični lastnosti; pozitivna reakcija na laktozo in negativna oksidativna reakcija.

Opis postopka izolacije *E. coli* iz vzorcev vode:

1. Na pipeto sem nadela nastavek.



Slika 4: Pipetiranje

2. Platenko z vzorcem vode sem odprla ob gorilniku in s tem poskrbela za sterilno okolje.



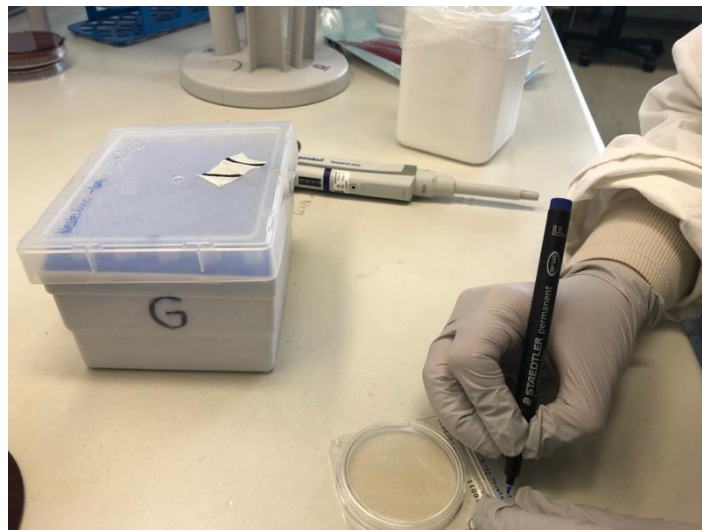
Slika 5: Pipetiranje 1 ml vzorca vode št. 9

3. S pipeto sem vzela 1 ml vode iz plastenke in vsebino nanesla na petrijevko Compact Dry EC (tudi to sem storila ob prižganem gorilniku).



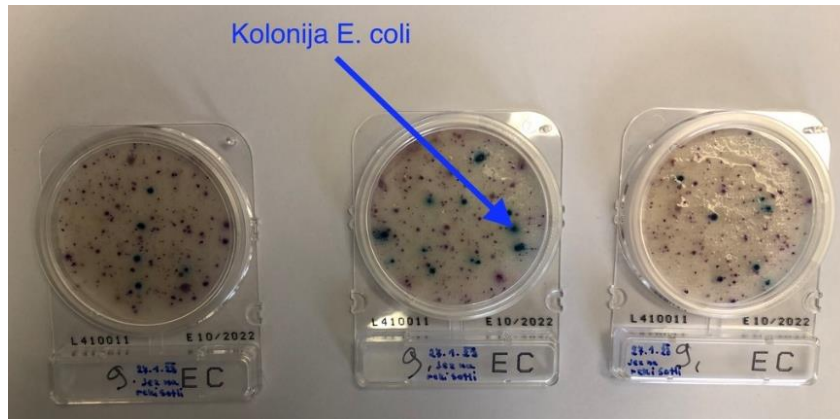
*Slika 6: Nanos vzorca na gojišče Compact Dry EC.*

4. Petrijevko sem označila ter dala v inkubator za 12 ur pri 37 °C.



*Slika 7: Označevanje gojišča z nanešenim vzorcem Compact Dry EC.*

5. Če so na njej zrasle modre kolonije (*E. coli*), sem te z zanko precepila na novo gojišče (petrijevko z agarjem). Na gojiščih z agarjem so kolonije *E. coli* roza barve. Postopek precepljanja sem ponovljala dokler nisem dobila gojišč z le eno vrsto bakterije (*E. coli*).



Slika 8: kolonija *E. coli* na Compact Dry EC.



Slika 98: Bakterije na gojiščih sem inkubirala 18 ur pri 37 °C.



Slika 10 Vhod v sobo za inkubiranje vzorcev.

Tudi vzorce, ki sem jih nanescila z vatirano palčko na gojišče z agarjem, sem morala večkrat precepiti, da sem dobila čiste kolonije *E. coli*.

Ker se ta bakterija nahaja tudi v črevesju živali, sem jo lahko zasledila na iztrebku konja in na lupini kokošnjega jajca. Zanimivo je, da sem *E. coli* zasledila tudi ob jezcu na reki Sotli, v Vonarju.

Na tem območju je leta 1980 nastalo umetno akumulacijsko Vonarsko jezero, za namen regulacije Sotle in zaščite območja pred visokimi vodami, pa tudi pridobivanje pitne vode, namakanje in turizem. Leta 1988 je bil zadrževalnik jezera izpraznjen in izpuščen, zaradi preslabe kakovosti vode. Kasneje so želeli jezero zopet obuditi (za turistične namene). Vendar strokovnjaki menijo, da je ojezeritev s kakovostno vodo neizvedljiva (agencija STA, 2021). Vzorcji, namenjeni moji raziskovalni nalogi potrjujejo, da je kakovost vode na tem območju res slaba. Saj vsebuje bakterije *E. coli*, ki dokazujejo prisotnost fekalnih snovi oz. odpadkov.

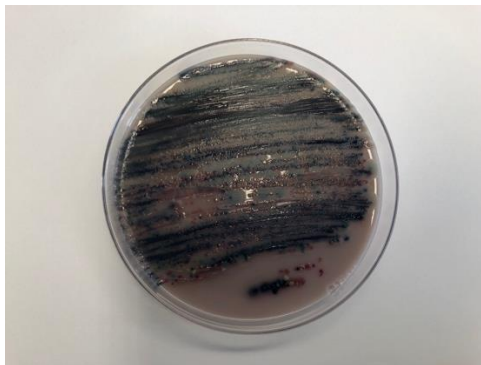
### 3.2.1. POSTOPEK PRECEPLJANJA SEVOV *E. COLI*

Kolonije *E. coli* sem morala večkrat preceptiti, da sem dobila čiste seve *E. coli*.

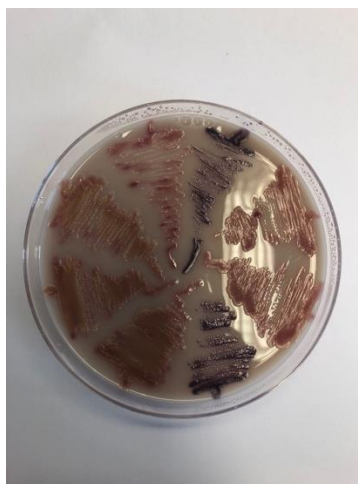


Slika 11: Precepljanje kolonij *E. coli*

1. Prižgala sem gorilnik in pripravila nova gojišča in gojišča polna bakterijskih kolonij.
2. Vzela sem sterilno ezo in z njo zajela le bakterije *E. coli*, ki so bile roza (gojišče Uriselect) ali modro obarvane (gojišče Compact Dry EC).
3. Z ezo sem *E. coli* nanesla na novo gojišče in to inkubirala čez noč, pri 37°C.



Slika 12: Kolonije so z vsakim precepljanjem postajale vedno čistejše (po prvem precepljanju).



Slika 13: Kolonije so z vsakim precepljanjem postajale čistejše (po več precepljanjih).

### 3.3. IZDELAVA ANTIBIOGRAMA

#### 3.3.1. POSTOPEK PRIPRAVE HRANILNIH GOJIŠČ

1. Najprej sem si pripravila ves potreben material: erlenmajerice, stekleno palčko, sterilne PVC petrijevke, merilni valj, destilirano vodo, čašo, žličko, gorilnik, krpo, alufolijo, terilnik, agar, Mueller – Hinton Groth agar, beležko in pisalo ...



*Slika 14: material za pripravo gojišč*

2. Nato sem izračunala in stehtala potrebno količino agarja ter hranil. V 1,5 L destilirane vode sem zmešala 22,5 g navadnega agarja in 33 g Mueller – Hinton Groth agarja. Vse skupaj sem dobro zmešala z litrom in pol destilirane vode.



*Slika 15: mešanje raztopine agarja*

3. Raztopino sem segrela nad gorilnikom, tako da so se snovi dobro raztopile. Nato sem zmes enakomerno porazdelila in prelila v štiri manjše erlenmajerice. Pokrila sem jih z alufolijo ter nanje nalepila indikatorske trakove. Nato sem jih avtoklavirala 15 min. Zatem sem jih dala v kopel, da so ostale na primerni temperaturi.



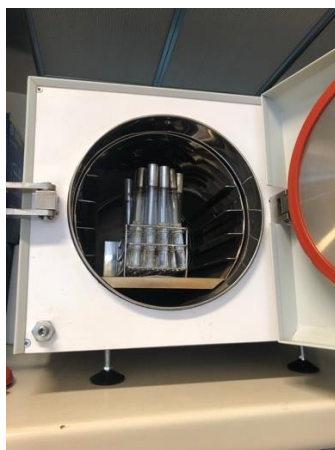
Slika 16: pripravljene erlenmajerice



Slika 17: avtoklaviranje

4. Preden sem začela prelivati v petrijevke, sem erlenmajerico zavila v krpo, pripravila petrijevke in prižgala gorilnik. Pred in po vlitju v petrijevke sem vrh erlenmajerice dala nad ogenj. Vlivala sem zelo previdno in ves čas ohranjala sterilnost.
5. Gojišča sem pustila nekaj časa, da so se ohladila. Nato sem jih označila in dala v hladilnik.

Poleg gojišč sem pripravila tudi fiziološko raztopino za izdelavo antibiogramov. Najprej sem v dvolitrski erlenmajerici zmešala 0,9 % NaCl in destilirano vodo, ter naredila 1 L fiziološke raztopine. Vsako epruveto, s kovinskim pokrovčkom, sem s pipeto napolnila z 10 mL fiziološke raztopine. Nato sem jih avtoklavirala 15 min in počakala da so se ohladile.



Slika 18: Avtoklaviranje epruвет s fiziološko raztopino

### 3.3.2. POSTOPEK IZDELAVE ANTIBIOGRAMOV

1. Najprej sem prižgala ogenj.



*Slika 19: prižiganje gorilnika*

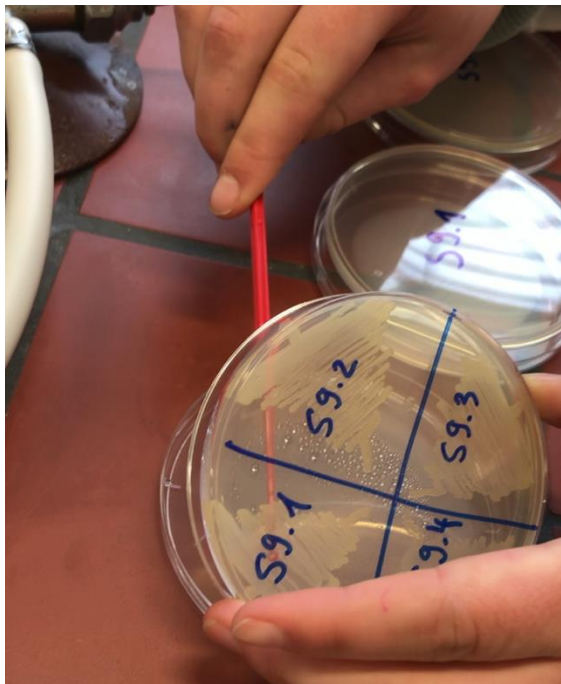
2. Nato sem označila petrijevko namenjeno antibiogramu. Napisala sem ime seva in datum. Za 1 sev sem uporabila 2 petrijevki. Na vsako sem dala 4 – 5 različnih antibiotikov.



*Slika 20: Označevanje petrijevke*



3. Z ezo sem vzela kolonijo *E. coli* ter jo raztopila v 10 ml pripravljene fiziološke raztopine.



Slika 21: Jemanje kolonije *E. coli* seva S9.1



Slika 22: Mešanje *E. coli* z fiziološko raztopino

4. Motnost raztopine sem preverila z Mc Farland standardom. Nato sem vsebino zajela z vatirano palčko in naredila razmaz po novi petrijevki.



Slika 23: Primerjava motnosti raztopine z motnostjo Mc Farland standarda.



Slika 24: Nanašanje *E. coli* raztopljene v fiziološki raztopini.

5. Nato sem na petrijevko nanesa diske petih ali štirih različnih antibiotikov. Razporedila sem jih čimbolj enakomerno okoli sredine gojišča.



Slika 25: Nanos diska antibiotika

6. Gojišča s kolonijami različnih sevov *E. coli* in antibiotiki sem inkubirala čez noč na 37°C.

Naslednji dan sem izmerila inhibicijsko cono in s pomočjo tabele standardov za antibiogram zapisala rezultate. Ocenila sem, ali je sev bakterije na določen antibiotik občutljiv (susceptible), odporen (resistant) ali pa nekaj vmes (intermediate).

## 4. REZULTATI

Tabela 2 prikazuje inhibicijsko cono pri posameznem sevu *E. coli* in antibiotiku. Merjena je v mm.

Tabela 2: Inhibicijska cono posameznega seva *E. coli* in antibiotiku.

SEVI <i>E. coli</i>	TE. 30	CAZ. 30	CAZ./CLA.	C. 30	CIP. 1	FFC. 30	SXT. 25	CT. 10	AMP. 10	ETP. 10
S.C.1	/	33 - S	35 - S	25 - S	36 - S	21 - S	34 - S	17 - S	18 - S	40 - S
S.C.2	27 - S	32 - S	33 - S	26 - S	32 - S	25 - S	31 - S	17 - S	18 - S	32 - S
S.C.3	23 - S	29 - S	32 - S	26 - S	33 - S	23 - S	32 - S	11 - S	19 - S	36 - S
S.C.4	26 - S	31 - S	33 - S	23 - S	30 - S	15 - I	32 - S	11 - S	16 - I	32 - S
S.C.5	30 - S	35 - S	34 - S	29 - S	33 - S	26 - S	31 - S	11 - S	18 - S	37 - S
S.C.6	29 - S	34 - S	36 - S	26 - S	35 - S	23 - S	32 - S	18 - S	17 - S	35 - S
S.C.7	21 - S	31 - S	33 - S	26 - S	33 - S	23 - S	31 - S	17 - S	16 - I	41 - S
S. 9.1	27 - S	34 - S	34 - S	26 - S	32 - S	28 - S	32 - S	17 - S	19 - S	31 - S
S. 9.1	28 - S	31 - S	32 - S	29 - S	33 - S	28 - S	34 - S	17 - S	16 - I	33 - S
S. 9.2	27 - S	33 - S	36 - S	35 - S	35 - S	33 - S	34 - S	17 - S	19 - S	35 - S
S. 9.3	/	31 - S	32 - S	25 - S	35 - S	22 - S	0 - R	16 - S	0 - R	31 - S
S. 9.4	24 - S	30 - S	30 - S	23 - S	34 - S	23 - S	30 - S	16 - S	16 - I	31 - S
S. 9.5	25 - S	27 - S	30 - S	24 - S	31 - S	22 - S	30 - S	11 - S	11 - R	34 - S
S. 9.6	16 - S	34 - S	35 - S	22 - S	35 - S	22 - S	33 - S	19 - S	13 - R	37 - S
S. 9.7	26 - S	32 - S	33 - S	24 - S	33 - S	24 - S	29 - S	17 - S	16 - I	39 - S
S. 9.8	/	33	35 - S	25 - S	36 - S	22 - S	31 - S	17 - S	16 - I	36 - S
S. 9.9	/	29 - S	30 - S	21 - S	35 - S	21 - S	31 - S	16 - S	16 - I	33 - S
S.9.11	/	25 - S	22 - S	20 - S	29 - S	22 - S	31 - S	19 - S	19 - S	32 - S
S.9.12	/	27 - S	29 - S	21 - S	35 - S	23 - S	30 - S	16 - S	17 - S	35 - S
S.9.13	22 - S	29 - S	30 - S	24 - S	29 - S	21 - S	30 - S	15 - S	14 - I	32 - S
S.9.14	0 - R	26 - S	25 - S	17 - I	0 - R	21 - S	0 - R	15 - S	0 - R	33 - S
S.9.15	23 - S	29 - S	29 - S	21 - S	34 - S	22 - S	29 - S	15 - S	17 - S	36 - S
B1	/	24 - S	27 - S	19 - S	29 - S	19 - S	28 - S	14 - S	11 - R	33 - S
A3	/	29 - S	30 - S	26 - S	33 - S	23 - S	30 - S	17 - S	16 - I	33 - S

S – Susceptible

I – Intermediate

R - Resistant

### ANTIBIOTIKI:

1. TE. 30 – Tetracycline
2. CAZ. 30 – Ceftazidime
3. CAZ./CLA. – Ceftazidime/Clavulanic Acid
4. C. 30 – Chloramphenicol
5. CIP. 1 – Ciprofloxacin
6. FFC. 30 – Florfenicol
7. SXT. 25 – Trimethoprim/Sulfamethoxazole
8. CT. 10 – Colistin Sulphate
9. AMP. 10 – Ampicilin
10. ETP. 10 – Ertapenem

Tabela 3: Prikaz lokacije in načina vzorčenja vzorcev, ki so vsebovali seve, uporabljene za izdelavo antibiogramov.

SEVI <i>E. coli</i>	Lokacija vzorčenja	Način vzorčenja
S.C.1	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli	Bris z vatirano palčko
S.C.2	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli	Bris z vatirano palčko
S.C.3	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli	Bris z vatirano palčko
S.C.4	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli	Bris z vatirano palčko
S.C.5	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli	Bris z vatirano palčko
S.C.6	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli	Bris z vatirano palčko
S.C.7	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli	Bris z vatirano palčko
S. 9.1	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S. 9.1	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S. 9.2	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S. 9.3	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S. 9.4	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S. 9.5	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S. 9.6	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S. 9.7	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S. 9.8	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S. 9.9	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S.9.11	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S.9.12	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S.9.13	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S.9.14	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
S.9.15	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje	Zajemanje vzorca vode
B1	Iztrebek konja	Bris z vatirano palčko
A3	Površina kokošnjega jajca	Bris z vatirano palčko

Antibiogrami so pokazali, da je sev S. 9. 3 odporen na Trimethoprim/Sulfamethoxazole in Ampicilin, sev S. 9. 5. na Ampicilin, S. 9. 6. na Ampicilin, S. 9. 14. na Tetracycline, Ciprofloxacin, Trimethoprim/Sulfamethoxazole in Ampicilin, sev B1 pa tudi na Ampicilin. Najmanj učinkovit antibiotik, ki sem ga uporabila, je bil Ampicilin. Nanj so bili manj občutljivi tudi nekateri drugi sevi (S. C. 4., S. C. 6., S. 9. 1., S. 9. 4., S. 9. 7., S. 9. 8., S. 9. 9., S. 9. 13. in A3). Najbolj odporen sev *E. coli* pa je bil sev S. 9. 14., ki je razvil odpornost na kar štiri uporabljene antibiotike.

## 5. RAZPRAVA

Rezultati so pokazali, da so *E. coli* razvile odpornost na Trimethoprim/Sulfamethoxazole, Ampicilin, Tetracycline in Ciprofloxacin. Potrdila sem 1., 5., 7. in 9. hipotezo. 2., 3., 4., 6., 8. in 10. hipotezo pa sem uvrгла.

Ampicilin spada pod beta lakteminske antibiotike. Deluje tako, da zavira sintezo bakterijske celične stene in tako povzroča razpad bakterije (Grah, 2010). Pri nanj odpornih sevih *E. coli*, se je najverjetneje zgodila mutacija gena v plazmidih, s katero so dobili sposobnost, da sprožijo sintezo encima, ki razgradi ampicilin (Madigan, M. T., 2017).

Trimethoprim/Sulfamethoxazole spada pod sulfonamide. Tovrstni antibiotiki zaviralno delujejo na sintezo folne kisline, ki je potrebna za nadaljnjo sintezo nukleinskih kislin in razmnoževanje bakterij (Grah, 2010).

Tetracycline spada v skupino tertaciklinov. Deluje tako, da s toksini moti translacijo na bakterijskih ribosomih in s tem sintezo proteinov (Grah, 2010). Nekateri sevi *E. coli* so razvili odprtine (efflux pumps), ki so jim omogočile izločanje toksinov antibiotika tetracycline (Madigan, M. T., 2017).

Ciprofloxacin pa spada v skupino kinolonov in v podskupino fluorkinolonov. Deluje tako, da inhibira encim DNA - girazo, ki je potreben za podvajanje DNK bakterij in jih s tem aktivno ubija (Grah, 2010). Tudi pri tem antibiotiku je sev S. 9. 14. razvil mehanizme, ki so mu omogočili odpornost in preživetje (Madigan, M. T., 2017). Ta sev sem našla v onesnaženi vodi, ob jezu na reki Sotli. Sklepam, da je na razvoj te odpornosti vplivalo s fekalnimi odpadki onesnaženo okolje.

## 6. ZAKLJUČEK

V raziskovalni nalogi sem ugotovila, da so nekateri sevi *E. coli*, izolirani iz okolja odporni na določene antibiotike. Na porast protimikrobne odpornosti vplivajo tudi podnebne spremembe in onesnaževanje okolja. Zato sem nekatere seve izolirala iz onesnaženih voda, ki vsebujejo fekalne odpadke. Mednje spadajo tudi sevi S. 9. 3, S. 9. 5., S. 9. 6. in S. 9. 14, ki so razvili odpornost na nekatere sulfonamide, beta lakteminske antibiotike, tertacikline in fluorkinolone. Rezistenco je razvil tudi sev B1, ki sem ga izolirala iz iztrebka konja.

Ugotovila sem, da onesnaženost okolja, predvsem voda, res vpliva na porast in širjenje protimikrobne odpornosti. Razlog za to je lahko vedno večje število odpornih bakterij, ki se s pomočjo vode širijo dalje in tako hitro pristanejo v hrani in vodi ljudi ter ostalih živali. Tudi antibiotiki se lahko kot odpadne snovi znajdejo v okolju (v manjših količinah s slabšo učinkovitostjo) in pripomorejo k še hitrejšem razvoju protimikrobne odpornosti. Vedno večja populacija ljudi pa pomeni tudi vedno večje število zbolelih z različnimi okužbami, ki jih povzročajo rezistentne bakterije. Menim, da bi morali več pozornosti posvetiti reševanju problemov, povezanih z protimikrobno odpornostjo.

Zaradi podnebnih sprememb, se temperatura viša, kar pomeni, da bodo imele bakterije v prihodnosti vedno bolj ugodne razmere za razmnoževanje. Za raziskovalno nalogo bi lahko dobila precej boljše rezultate, če bi vzorce nabirala poleti in ne pozimi (januarja). Pomembno je poudariti tudi to, da si lahko bakterije med seboj izmenjujejo gene za odpornost (s transdukcijo, transformacijo ali konjugacijo). Odpornost se tako hitreje širi, tudi med zelo nevarnimi patogenimi bakterijami. Ker se *E. coli* nahaja v našem črevesju, lahko odpornost prenese tudi na ostale bakterije v našem črevesju, ali pa v onesnaženem okolju gene za odpornost prenese na ostale patogene bakterije.

Zanimivo je, da ima *E. coli*, če se nahaja v debelem črevesju v primernem številu, zelo pomembno vlogo pri zdravem delovanju telesa. Pomaga pri prebavi ter sodeluje pri nastajanju vitaminov K in B kompleksa.

Med nastajanjem raziskovalne naloge so se mi odprla tudi mnoga vprašanja o novih načinih zdravljenja okužb, povezanih z bakterijami, odpornimi na antibiotike. V prihodnosti bi lahko še več raziskav namenili kombinirani terapiji z antibiotiki in bakteriofagi, saj menim, da bi bile tovrstne terapije najučinkovitejše, tudi pri boleznih povezanih z rezistentnimi bakterijami (npr. *E. coli*).

Upam, da bomo v prihodnje vedno boljše razumeli mehanizme nastanka in zatiranja odpornosti *E. coli* ter ostalih bakterij na antibiotike, se tudi mi prilagajali s pravilno izbiro in uporabo antibiotikov, ter s tem reševali mnoga življenja ljudi in ostalih živali.

## 7. VIRI IN LITERATURA

- Abbot, A. (2016). *Scientists bust myth that our bodies have more bacteria than human cells*. Natue. <https://www.nature.com/articles/nature.2016.19136>
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli in Europe: An Overview*. Int. J. Environ. Res. Public Health, 10(12), 6235-6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Andreson, S. (2023). *Antimicrobial Resistance Death Toll Could Catch Up to Cancer by 2050, and Pollution is Fuelling its Spread*. Health Policy Watch. <https://healthpolicy-watch.news/antimicrobial-resistance-deaths-cancer/>
- Bacteriophage (2023). *Enciklopedija Britannica*. <https://www.britannica.com/science/bacteriophage>
- Baddeley, A. (1991). *Human memory: theory and practice*. Lawrence Erlbaum Associates. [https://books.google.si/books?hl=sl&lr=&id=fMgm-2NXAXYC&oi=fnd&pg=PP7&dq=Baddeley,+A.+\(1991\).+Human+memory:+theory+and+practice&ots=jP0i5EgIMk&sig=2FerFAKY1ySWT6mztHOEefpJuE0&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.si/books?hl=sl&lr=&id=fMgm-2NXAXYC&oi=fnd&pg=PP7&dq=Baddeley,+A.+(1991).+Human+memory:+theory+and+practice&ots=jP0i5EgIMk&sig=2FerFAKY1ySWT6mztHOEefpJuE0&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Budič, M. (2011). *Virulentni dejavniki sevov bakterije Escherichia coli izoliranih iz blata goveda*. [Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta]. Repozitorij UL. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=118402&lang=slv>
- Compact Dry EC. Product info*. (b. d.). R-Biopharm. <https://food.r-biopharm.com/products/compact-dry-ec/>
- Dermastia, M., Komel, R., Turk, T. (2011). *Kjer se življenje začne*. Rokus Klett.
- Filipič, M. (2018). *Koevolucija bakterij in bakteriofagov v bioreaktorju* [Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta]. Repozitorij UL. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=102939&lang=slv&prip=rul:11217167:r1>
- Fleckenstein, J. M., Hardwidge, P. R., Munson G. P., Rasko, D. A., Sommerfeld H., Steinsland H. (2010). *Molecular mechanisms of enterotoxigenic Escherichia coli infection*. Science direct. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1286457909002354>
- Gaynes, R. (2017). *The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use*. PubMed Central. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5403050/>
- Grah, E. (2010). *Osnove farmakologije*. Biotehniški izobraževalni center Ljubljana.
- Hollister, E. B., Chunxu, G., Versalovic, J. (2014). *Gastroenterology: Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health*. Elsevier.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016508514001437#preview-section-cited-by>

Hasudungan, A. (10. 6. 2014). Microbiology - Bacteria Antibiotic Resistance [video]. Youtube. <https://youtu.be/057phDG4mKU>

Hasudungan, A. (17. 12. 2013). Microbiology - Antibiotics Mechanisms of Action [video]. <https://youtu.be/IVBCrzjOl40>

Janežič, T (2019). *Protibakterijska terapija z bakteriofagi*. [Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta]. Repozitorij UL. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=109582>

Jaruszewicz-Błońska, J., Lipniacki, T. (2017). *Genetic toggle switch controlled by bacterial growth rate*. PubMed Central. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5712128/>

Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. T. (2004). *Pathogenic Escherichia coli*. Nature reviews microbiology. <https://www.nature.com/articles/nrmicro818>

Kaur, P., Chakraborti, A., Asea, A. (2010). *Enteroaggregative Escherichia coli: An Emerging Enteric Food Borne Pathogen*. PubMed Central. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2837894/>

Kennedy, E. A., King, K. Y., Baldrige, M. T. (2018). *Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria*. Front. Physiol. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01534/full>

Kliegman, R. M. (2020). *Enteropathogenic Escherichia coli*. *Nelson Textbook of pediatrics*. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/enteropathogenic-escherichia-coli>

Krebs, J. E., Goldstein, E. S., Kilpatrick, S. T. (2011). *Genes*. Jones & Bartlett Learning.

Kumar, D., Kumar Singh, A., Rashid Ali, M., Chander, Y. (2014). *Antimicrobial Susceptibility Profile of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Producing Escherichia coli from Various Clinical Samples*. PubMed Central. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4024053/>

Kümmerer, K. (2004). *Resistance in the environment*. *Chemotherapy*, 54(2), 311–320. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh325>

lpc/mg (28. 11. 2021). Po oceni direktije za vode ponovna ojezeritev Vonarskega jezera ni možna. Slovenska tiskovna agencija. <https://www.sta.si/2971333/po-oceni-direkcije-za-vode-ponovna-ojezeritev-vonarskega-jezera-ni-mozna>

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley D. H. In Stahl, D. A. (2015). *Brock biology of microorganisms*.



Ministrstvo za zdravje (18. 11. 2022). *Na antibiotike odporne bakterije so velika globalna nevarnost za zdravje*. <https://www.gov.si/novice/2022-11-18-na-antibiotike-odporne-bakterije-so-velika-globalna-nevarnost-za-zdravje/>

Murray, C. J. L., Shunji Ikuta, K., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., ... Naghavi, M. (2022). *Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis*. Lancet.

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0140673621027240?token=426A364BD0E6514ED3D4A28E61C6948BE0E70F07C48398687AA393876157A23ECFDB8401D3C793399432510D54AA856E&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230219160209>

Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J., Foster, J. A. (2010). *Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice*. Blackwell Publishing Ltd, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x>

NIJZ (2013). *Escherichia Coli (E. coli) v živilih*. NIJZ.

[https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/ecoli\\_05082015.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/ecoli_05082015.pdf)

Orožen Adamič, A. in Sernec, K. (2017). *Mikrobiologija. Učbenik za farmacevtske in kozmetične tehnike*. DZS.

Pasqua, M., Michelacci, V., Di Martino, M. L., Tozzoli, R., Grossi, M., Colonna, B., Morabito, S., Prosseda, G. (2017). *The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive E. coli (EIEC) toward Pathogenicity*. *Frontiers in Microbiology*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02390/full>

*Resistance mechanisms*. (b. d.). ReAct.

<https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/resistance-mechanisms-in-bacteria/>

Rydén-Aulin, M., Kaczanowska, M. (2007). *Ribosome Biogenesis and the Translation Process in Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168646/>

Schaechter, M. (2009). *Encyklopedia of microbiology*. Academic press.

<https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/chemoheterotroph>

Servin, A. L. (2006). *Diffusely adherent Escherichia coli strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens*. *FEMS Microbiology Letters*, <https://academic.oup.com/femsle/article/256/2/185/631132>

Smith, J. L., Fratamico, P. M., Gunther, N. W (2007). *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*. Mary Ann Liebert, <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2007.0087>

Snyder, E. R., Savitske, B. J., Credille, B. C. (2020). *Concordance of disk diffusion, broth microdilution, and whole-genome sequencing for determination of in vitro antimicrobial susceptibility of Mannheimia haemolytica*. *Pub Med*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7517867/>

Špik, L. (2011). *Osnove kliničnih postopkov in bolezenskih procesov. Učbenik za modul veterinarska tehnologija v programu veterinarski tehnik*. Tehniška založba Slovenije.

Thompson, T. (2022). *The staggering death toll of drug-resistant bacteria*. Nature. <https://www.nature.com/articles/d41586-022-00228-x#ref-CR1>

Tomažič, I., Zidar, P., Dolenc Koce, J., Ambrožič Avguštin, J. (2017). *Biologija 1. O biologiji, celicah in genetiki*. Mladinska knjiga.

Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2010). *Microbiology*. Pearson.

Uddin Rasheed, M., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., Jamil, K. (2014). *Antimicrobial drug resistance in strains of Escherichia coli isolated from food sources*. PubMed Central. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4131821/>

United Nations Environment Programme (2023). *Bracing for Superbugs: Strengthening environmental action in the One Health response to antimicrobial resistance*. Geneva. <https://www.unep.org/resources/superbugs/environmental-action>

WHO (2021). Antimicrobial resistance. WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Železnik, R. T. (2019). *Bakterija Escherichia coli: od povzročiteljice bolezni do pomembnega orodja v znanosti*. Kvarkadabra. <https://kvarkadabra.net/2019/06/escherichia-coli/>

## VIRI SLIK

Slika 1: Graf prikazuje število smrti v letu 2019, povezanih z antimikrobno odpornostjo, glede na določeno bakterijo.

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673621027240>, 23. 2. 2023

Slika 2: Struktura lipopolisaharidne membrane (LPS): KDO, ketodeoxyoctonat; Hep, heptoza; Glu, glukoza; Gal, galaktoza; GluNac, N-acetilglukozamin; GlcN, glukozamin; P, fosfat. A lipidi so za živali toksični (endotoksini)

- Brock biology of microorganisms, str. 46, 23. 2. 2023

Slika 3: A) Zunanja membrana/kapsula *E. coli*; B) periplazma, plast peptidoglycana; C) citoplazemska membrana.

- Brock biology of microorganisms, str. 46, 23. 2. 2023

Slika 4: prikaz sprememb organov pri miših brez prisotnosti mikroorganizmov.

- <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01534/full>, 23. 2. 2023

Slika 5: Molekula benzil penicilina (penicilin B)

- <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/b/benzylpenicillin.html>, 23. 2. 2023

Slika 6: Delovanje aminoglikozidnih antibiotikov.

- <https://www.slideshare.net/sumit2apr/aminoglycoside-by-sumit>, 23. 2. 2023

Slika 7: Molekula tetraciklina

- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetracycline#section=2D-Structure>, 23. 2. 2023

Slika 8: 3D formula sulfometoksazola

- <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5138.html>, 23. 2. 2023

Slika 9: Delovanje antibiotikov kinolonov.

- <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/md/c9md00120d>, 23. 2. 2023

Slika 10: Rezistenco največkrat povzroča prepogosta in nepotrebna uporaba antimikrobnih zdravil.

- <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>, 23. 2. 2023

Slika 11: postopek pridobivanja inzulina, s pomočjo prvega priznanega gensko spremenjenega organizma - *E. Coli*

- <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-genetic-engineering/> , 23. 2. 2023

Avtor preostalih slik: Atena Ivačič Kolar