

---

Dunja Pavlović

# Izolacija, praćenje dinamike rasta i identifikacija kofein-degradijućih bakterija iz reka Kolubare i Ljubostinje (Valjevo)

---

Neki mikroorganizmi imaju sposobnost da razgrađuju kofein i koriste ga kao jedini izvor ugljenika. Zbog široke upotrebe proizvoda bogatih kofeinom, ovakve organizme je moguće pronaći u vodotocima u koje kofein dospeva putem kanalizacionih odvoda. U ovom istraživanju su bakterije koje imaju sposobnost da koriste kofein kao jedini izvor ugljenika izolovane iz reka Kolubare i Ljubostinje u Valjevu. Uzorkovanje je izvršeno u avgustu 2015. godine. Nakon zasejavanja uzoraka na minimalni medijum sa kofeinom, odabrano je 7 morfološki različitih tipova izraslih kolonija, koje su korišćene u daljem radu. Praćena je njihova dinamika rasta pri izlaganju koncentracijama kofeina u opsegu od 1 g/L do 7 g/L. Analizom sekvence gena za 16S rRNK utvrđeno je da su iz Ljubostinje izolovane bakterije vrsta *Enterobacter aerogenes* i *Klebsiella pneumoniae*, a iz Kolubare bakterije vrste *Escherichia coli*. Krivu rasta bakterija izolovanih iz Kolubare karakteriše prisustvo dve eksponencijalne i dve stacionarne faze, što je moguće objasniti nezavisnom aktivacijom enzima *N*-demetilaze i ksantinskihidrolaze. Vremenski razdvojena aktivacija ova dva enzima direktno utiče na iskoristljivost kofeina kao izvora energije. Bakterije izolovane iz Ljubostinje pokazuju međusobno sličnu dinamiku rasta. Rana stacionarna faza je kod jedne vrste uočljiva nakon 9.5 h, a kod druge nakon 33 h.

---

## Uvod

Kofein (1,3,7-trimetilksantin) je purinski alkaloid koji se nalazi u lišću i plodovima više od 60 rodova biljaka poput *Coffea*, *Cola*, *Paulinia*, *Camellia* i *Theobroma* (Summers 2011). U nekim istraživanjima se kofein navodi kao toksin koji biljkama koje ga sadrže služi kao odbrana od mikroorganizama (Dash et Gummadi 2010; Nayak et al. 2012). Kofein potencijalno može da inhibira *quorum sensing* kod bakterija (Norizan et al. 2013).

Mikroorganizmi, poput bakterija i gljiva roda *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Rhodococcus*, *Alcalignes*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stemphidium*, mogu imati sposobnost da razgrađuju kofein (Summers 2011;

---

Dunja Pavlović  
(1998), Valjevo,  
Naselje Milorada  
Pavlovića 4/3,  
učenica 2. razreda  
Valjevske gimnazije

MENTOR: Lea  
Mascarell Maričić,  
doktorand,  
Medicinski fakultet  
Univerziteta u  
Beogradu

Nayak *et al.* 2012). Kao često stanište tih mikroorganizama se pominju polja kafe i čaja, zbog visokih koncentracija kofeina (Summers 2011). Usled široke upotrebe proizvoda bogatih kofeinom, pretpostavlja se da bi ovakvi organizmi mogli biti nađeni u rekama u koje kofein dospeva putem kanalizacionih odvoda.

Rezultat biodegradacije kofeina je urinska kiselina, a glavni metaboliti ovog procesa kod bakterija jesu teobromin (3,7-dimetilksantin) i paraksantin (1,7-dimetilksantin). Biodegradacija se kod bakterija dešava u dve faze: demetilacija i oksidacija. Demetilaciju kofeina do ksantina vrše enzimi N-demetilaze (Ndm). Postoje tri izoforme ovog enzima: N1-demetilaza (NdmA), N3-demetilaza (NdmB) i N7-demetilaza (NdmC), u zavisnosti na koju od metil grupa deluju. Pored ovih enzima, u proces su uključene i reduktaza (NdmD), čija je uloga oksidacija NAD(P)H i prenos elektrona potrebnih za demetilaciju, na Ndm i pomoćni enzim za N7-demetilaciju (NdmE). Oksidaciju vrše enzimi ksantin-oksidade, koji oksidacijom C8 atoma u molekulu ksantina, grade urinsku kiselinu (Summers 2012).

Geni koji kodiraju enzime potrebne za demetilaciju (NdmABCDE) se nalaze na jednom operonu (Quandt *et al.* 2013), što znači da se N-demetilaze aktiviraju istovremeno, a oksidaze nezavisno od njih.

Značaj bioremedijacije kofeina se ogleda u tome što bi se mezokarp kafe ili ostaci biljaka koji u sebi, pored kofeina, sadrže ugljene hidrate, proteine i druge nutrijente nakon procesa degradacije mogli koristiti kao hrana za životinje ili kao đubriva (Mazzafera 2002). Metilksantini takođe imaju primenu u medicini, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, pa bi se kao metaboliti procesa degradacije kofeina mogli izolovati i koristiti (Summers 2011). U pojedinim vodenim ekosistemima kofein se sreće u koncentracijama daleko višim od praga toksičnosti za neke grupe organizama. Iako za sada nije prepoznat kao velika pretnja po živi svet, ispitivanje akutne i hronične toksičnosti ove supstance tek dolazi u istraživački fokus (Bruton *et al.* 2010).

**Cilj** ovog istraživanja su izolacija i identifikacija bakterija iz reka Kolubare i Ljubostinje koje imaju sposobnost da koriste kofein kao izvor ugljenika i upoznavanje dinamike rasta izolovanih sojeva u medijumima sa različitim koncentracijama kofeina. Izolovani sojevi potencijalno mogu da budu iskorišćeni za prečišćavanje otpadnih voda od kofeina i bioremedijaciju.

## Materijal i metode

Uzorci su prikupljeni u delovima tokova reka Kolubare i Ljubostinje neposredno ispred njihovog ušća. Uzorci su zasejani na minimalni medijum sa kofeinom, pomoću kog su izolovane bakterije sposobne da koriste kofein kao jedini izvor ugljenika. Izabrano je 7 morfološki različitih tipova kolonija, koje su korišćene za konstruisanje krivâ rasta u minimalnom medijumu sa koncentracijama kofeina od 1 do 7 g/L. Krive rasta su konstruisane

na osnovu vrednosti optičke gustine medijuma, u koji su inokulisane bakterijske suspenzije, izmerene na 600 nm. Izolovana je DNK iz 7 pretpostavljenih bakterijskih sojeva, koji su formirali morfološki različite kolonije, i poslata je na analizu sekvence gena za 16S rRNK.

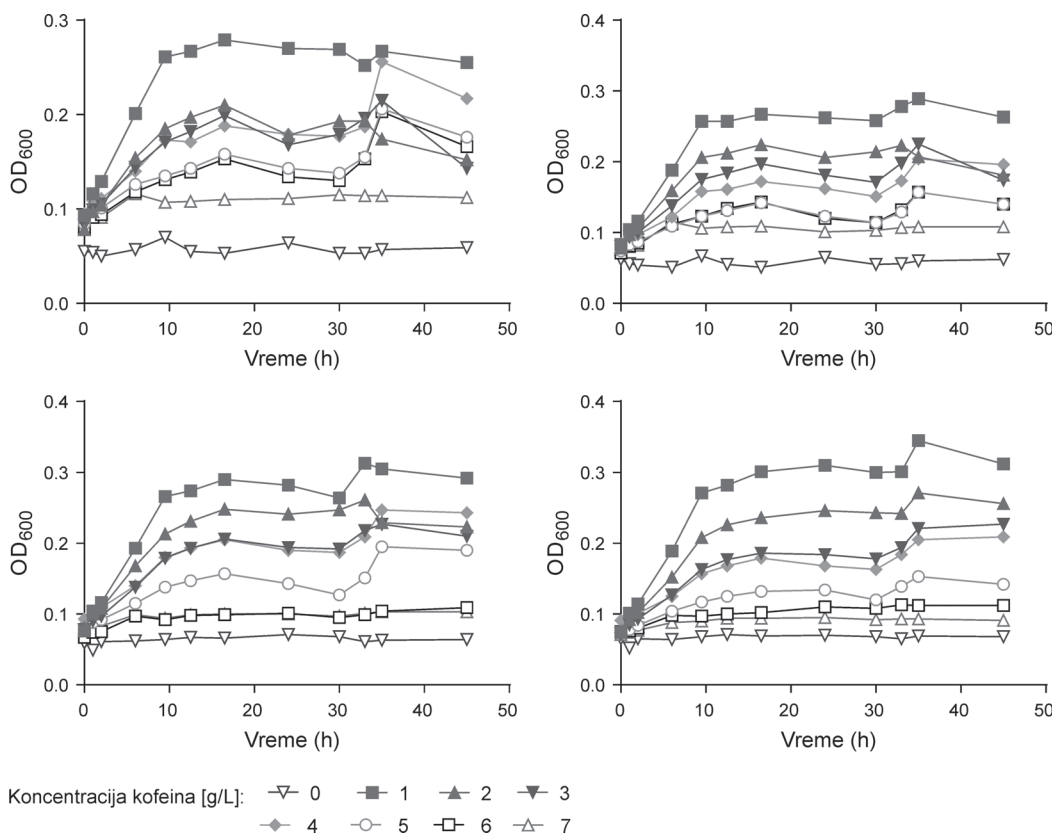
**Izolacija kofein-degradijućih bakterija.** Uzorkovanje vode izvršeno je na rekama Kolubari (44°16'12.40" SGŠ 19°55'17.10" IGD, 170 m n. v.) i Ljubostinji (44°16'38.90" SGŠ 19°55'38.40" IGD, 169 m n. v.). U sterilnim uslovima su filtracijom razdvojeni mulj i voda. Pripremljena je Caffeine agar (CA) podloga (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g/L; NaCl, 0.5 g/L; NH<sub>4</sub>Cl, 1 g/L; 2.5 g/L kofein; 1.5% agra) (Sumitha i Sivakumar 2013). Na podloge je zasejano 100 µL uzoraka vode sa svakog lokaliteta i njihovih razređenja od 10<sup>-1</sup> i 10<sup>-2</sup>. Uzorci su inkubirani 24 h na 37°C, nakon čega je nastavljena inkubacija na sobnoj temperaturi tokom dodatna 72 h. Izabrano je 7 morfološki različitih kolonija, koje su presejane u LB medijum. Nakon inkubacije u trajanju od 12 h, metodom iscrpljivanja na Plate Count Agar podlozi (PCA, HIMEDIA) dobijene su pojedinačne kolonije. Ovaj postupak je ponovljen još jednom u cilju izolovanja čiste kulture.

**Praćenje krive rasta u medijumima sa različitim koncentracijama kofeina.** Bakterijska kriva rasta predstavlja grafički prikazanu dinamiku rasta bakterijske kolonije u toku vremena, određenu na osnovu optičke gustine medijuma u kom se kolonija nalazi. Kriva rasta izolovanih bakterija je konstruisana na osnovu vrednosti apsorbanci izmerenih na Thermo Multiscan EX čitaču na talasnoj dužini 600 nm. Merenje je tokom 6 h vršeno na svakih 30 min, a nakon toga na svakih 60 min tokom ukupne inkubacije u trajanju od 45 h. Bakterije su gajene u medijumu (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g/L; NaCl, 0.5 g/L; NH<sub>4</sub>Cl, 1 g/L) koji je sadržao kofein kao jedini izvor ugljenika u rasponu koncentracija od 1 g/L do 7 g/L. Inkubacija je vršena na sobnoj temperaturi, a tokom noći je rast zaustavljan čuvanjem kultura na 4°C. Eksperiment je postavljen u mikrotitar pločama u triplikatu.

**Izolacija DNK.** U cilju odabira optimalnog protokola za izolaciju DNK iz izolovanih bakterijskih kultura, izvršena je njihova karakterizacija bojenjem po Gramu (Knežević-Vukčević i Simić 1997). Kao referentni sojevi korišćene su prekoćne kulture *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. DNK je izolovana iz 7 sojeva pomoću Peqlab kita za izolaciju bakterijske DNK prema uputstvu proizvođača. Izolovana DNK je poslata na analizu sekvence gena za 16S rRNK (Macrogen Inc. Netherlands) radi identifikacije.

## Rezultati i diskusija

**Izolacija kofein-degradijućih bakterija.** Nakon 48 h od zasejavanja primećeno je formiranje brojnih kolonija na CA na kome su zasejani uzorci vode iz Ljubostinje, dok je na podlogama sa uzorcima iz Kolubare formiran manji broj kolonija. To ukazuje na potencijalno manji broj bakterija koje



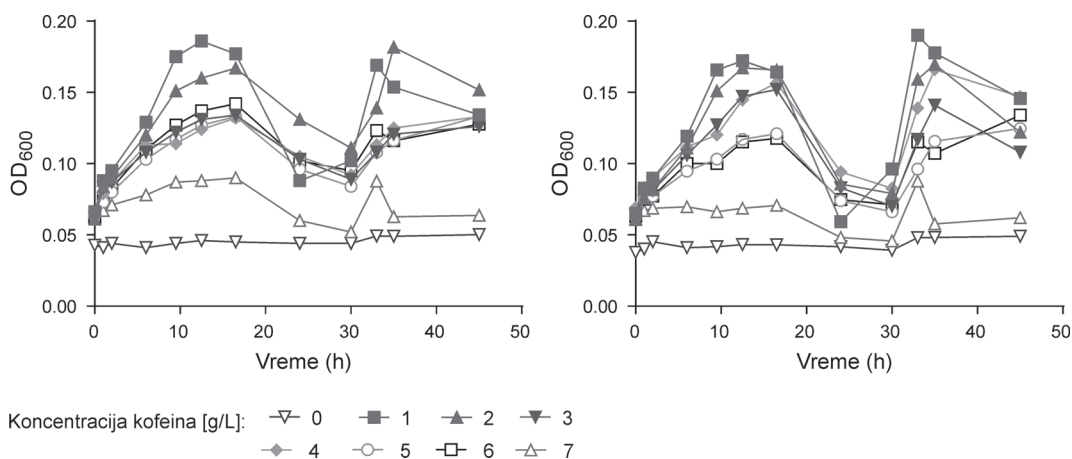
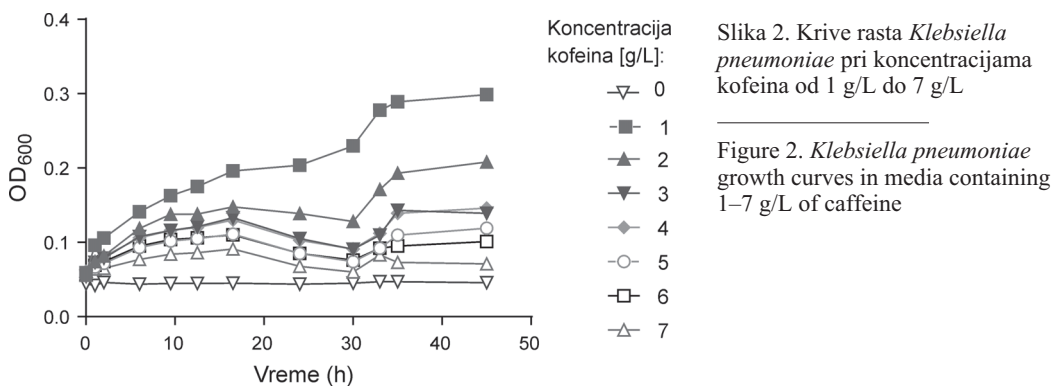
Slika 1. Krive rasta *Enterobacter aerogenes* pri koncentracijama kofeina od 1 g/L do 7 g/L

Figure 1. *Enterobacter aerogenes* growth curves in media containing 1–7 g/L of caffeine

moгу da koriste kofein kao jedini izvor ugljenika u Kolubari. Kolonije su bile okrugle, sitne, žuto-smeđe ili belo-žute boje.

**Praćenje krive rasta izolovanih bakterija pri različitim koncentracijama kofeina.** Sekvenciranjem gena 16S rRNK pokazano je da kolonije iz Ljubostinje pripadaju vrstama *Enterobacter aerogenes* i *Klebsiella pneumoniae*, dok je iz Kolubare izolovana bakterija *Escherichia coli*. Identifikacija izolovanih bakterija je izvršena do nivoa vrste, pa se zabeležene razlike u obrascu rasta kod predstavnika iste vrste mogu objasniti pretpostavkom da su u pitanju različiti sojevi.

Rana stacionarna faza kod bakterije *Enterobacter aerogenes* počinje nakon 9.5 h inkubacije, a faza odumiranja nakon 35 h (slika 1). Na krivi rasta bakterije *Klebsiella pneumoniae* (slika 2) nakon 33 h uočava se rana stacionarna faza. Kolonije *E. coli*, izolovane iz reke Kolubare, takođe pokazuju međusobno slične obrasce rasta (slika 3). Ove krive su specifične po tome što imaju dve eksponencijalne i dve stacionarne faze. Ta pojava bi mogla biti objašnjena aktivacijom N-demetilaza i ksantin-oksidaza u razli-



Slika 3. Krive rasta *Escherichia coli* pri koncentracijama kofeina od 1 g/L do 7 g/L

Figure 3. *Escherichia coli* growth curves in media containing 1–7 g/L of caffeine

čitom stadijumu degradacije kofeina, što direktno utiče na iskoristljivost kofeina kao izvora ugljenika tokom vremena. Geni koji kodiraju Ndm nalaze se na istom operonu, stoga se sve Ndm aktiviraju istovremeno, dok njihova aktivacija ne indukuje aktivaciju ksantin-oksidade (Quandt *et al.* 2013). Ovu pretpostavku bi trebalo dodatno eksperimentalno ispitati, jer nije poznato da su ovakvi slučajevi zabeleženi u literaturi. Kolonije izolovane iz reke Kolubare rastu sporije od ostalih.

## Zaključak

Prisustvo kofein-degradujućih bakterija potvrđeno je u obe reke obuhvaćene ovim istraživanjem. Uočena su dva obrasca rasta. Krive rasta sojeva izolovanih iz Ljubostinje (slike 1 i 2) međusobno su slične i na njima se uočavaju po jedna eksponencijalna i jedna stacionarna faza. Sojevi izo-

lovani iz Kolubare pokazuju specifičan obrazac rasta (slika 3) sa po dve eksponencijalne i stacionarne faze, što je potrebno dodatno ispitati. Izolovane bakterije pripadaju vrstama *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* i *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae* je u prethodnim istraživanjima opisana kao bakterijski soj sposoban da degraduje kofein (Summers 2011). U ovom istraživanju je *Enterobacter aerogenes* tolerisala koncentracije do 5 g/L kofeina u medijumu, dok ranija istraživanja navode koncentraciju od 1.2 g/L kofeina kao inhibitornu za ovu bakteriju (Dash i Gummadi 2008). Nije od ranije poznato da *Escherichia coli* može da koristi kofein kao jedini izvor ugljenika, ali se koristi kao organizam za transformaciju pomoću plazmida iz kofein-degradijućih bakterija (Dash i Gummadi 2008). Kod ove vrste se pojavljuju dve eksponencijalne i dve stacionarne faze na krivi rasta. Pretpostavka je da je razlog tome nezavisna aktivacija enzima N-demetilaze i ksantin-oksidade u različitom trenutku, što direktno utiče na iskoristljivost kofeina kao izvora ugljenika u toku vremena. Izolovani bakterijski sojevi mogu naći primenu u bioremedijaciji vodotoka kontaminiranih kofeinom.

---

## Literatura

- Bruton T., Alboloushi A., De La Garza B., Kim B. O., Halden R. U. 2010. Fate of caffeine in the environment and ecotoxicological considerations. *ACS Symposium Series*, **1048**: 257.
- Dash S. S., Gummadi S. N. 2008. Inhibitory effect of caffeine on growth of various bacterial strains. *Research Journal of Microbiology*, **3** (6): 457.
- Dash S. S., Gummadi S. N. 2010. Biodegradation of caffeine by *Pseudomonas* sp. NCIM 5235. *Research Journal of Microbiology*, **5** (8): 745.
- Knežević-Vukčević J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji I: praktikum i laboratorijski dnevnik*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu
- Mazzafera P. 2002. Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. *Scientia Agricola*, **59** (4): 815.
- Nayak S., Harshita M. J., Sampath C., Anikumar H. S., Rao C. V. 2012. Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from coffee pulp. *Indian Journal of Biotechnology*, **11**: 86.
- Norizan S. N. M., Yin W. F., Chan K. G. 2013. Caffeine as a potential Quorum Sensing Inhibitor. *Sen Sors*, **13** (4): 5117.
- Quandt M. E., Hammerling J. M., Summers M. R., Otoupal B. P., Slater B., Alnahhas N. R., Dasgupta A., Bachman L. J., Subramanian V. M., Barrick E. J. 2013. Decaffeination and measurement of caffeine content by addicted *Escherichia coli* with a

refracted N-demethylation operon from *Pseudomonas putida* CBB5. *ACS Synthetic Biology*, **2** (6): 301.

Sumitha J., Sivakumar T. 2013. Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from West Karnataka, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **2** (8): 338.

Summers M. R. 2011. Metabolism, enzymology, and genetic characterization of caffeine degradation by *Pseudomonas putida* CBB5. PhD thesis. University of Iowa, Iowa City, IA 52242, United States

Summers M. R., Louie T. M., Yu C. L., Gakhar L., Louie C. K., Subramanian M. 2012. Novel, highly specific N-demethylases enable bacteria to live on caffeine and related purine alkaloids. *Journal of Bacteriology*, **194** (8): 2041.

---

*Dunja Pavlović*

## Isolation, Monitoring of Growth Dynamics and Identification of Caffeine Degrading Bacteria from Rivers Kolubara and Ljubostinja (Valjevo, Serbia)

Certain microorganisms are able to metabolize caffeine and use it as their only source of carbon. Due to the wide use of caffeine rich products, it is possible to find these organisms in aquatic ecosystems, polluted by caffeine from waste waters. In this research, bacteria that have the ability to use caffeine as the sole source of carbon were isolated from rivers Kolubara and Ljubostinja in Valjevo. Sampling was performed in August 2015. Seven morphologically different types of bacterial colonies isolated from water samples and grown on minimal medium with caffeine were used in further research. Dynamics of growth of selected bacterial strains was monitored at various concentrations of caffeine in minimal medium, from 1 g/L to 7 g/L. Analysis of gene sequence for 16S rRNA showed that bacteria isolated from Ljubostinja river are *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae*, and bacteria isolated from Kolubara is *Escherichia coli*. Growth curve of *E. coli* is characterized by two exponential and stationary phases, which can be explained by independent activation of N-demethylase and xanthine-oxidase. Independent activation of those two enzymes directly affects utilization of caffeine over time. All bacteria isolated from Ljubostinja show similar patterns of growth dynamics. The early exponential phase is noticeable after 9.5 h for one group and after 33 h for the other.

