

---

Dunja Pavlović

## Uticaj kateholamina na rast, formiranje biofilma i pokretljivost bakterijskih sojeva gastrointestinalnog trakta

---

Zbog koegzistencije sa sisarima, neke grupe bakterija su razvile mehanizme za komunikaciju sa svojim domaćinom. Jedni od molekulskih signala domaćina sa ovakvom funkcijom jesu kateholamini. Vezivanjem za određene receptore bakterijske ćelije i uticanjem na ekspresiju dotičnih gena, kateholamini mogu uticati na rast bakterijskih kolonija, pokretljivost i formiranje biofilma. U ovom istraživanju je ispitivan efekat adrenalina i dopamina na biofilm, rast i pokretljivost bakterijskih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*. Ovi sojevi su odabrani kao model sisarskih patogena. Korišćene su koncentracije dopamina i adrenalina od 100, 500 i 1000  $\mu\text{mol/L}$ . Na osnovu konstruisanih kriva rasta se može zaključiti da adrenalin i dopamin pri određenim koncentracijama mogu inhibirati rast ovih bakterijskih sojeva. Samo koncentracija od 100  $\mu\text{mol/L}$  dopamina može stimulisati rast bakterijskog soja *E. coli*. Adrenalin je inhibirao razvijanje biofilma kod oba soja, dok ga je kod bakterije *P. aeruginosa* dopamin u višim koncentracijama (500 i 1000  $\mu\text{mol/L}$ ) stimulisao. Kod soja *E. coli* dopamin nije bio efikasan kao adrenalin u inhibiciji formiranja biofilma. Ni adrenalin ni dopamin ne utiču na pokretljivost bakterija.

---

### Uvod

Kateholamini su grupa organskih derivata tirozina izgrađeni od benzenovog prstena sa dve hidroksilne i jednom amino grupom. Sinteza ovih jedinjenja kod sisara započinje jedinjenjem

L-DOPA (L-3,4-dihidroksifenilalanin) koje se pod uticajem enzima konvertuje u dopamin, zatim u noradrenalin i na kraju u adrenalin. Pored toga što imaju endokrinu ulogu, ova jedinjenja su i neurotransmiteri. Zbog značajne uloge u odgovoru organizma na stres, do danas su oni jedna od najistraživanijih grupa jedinjenja u endokrinom mikrobiologiji.

Noradrenalinski i dopaminski neuroni inervišu, između ostalog, i gastrointestinalni (GI) trakt.

Adaptirajući se na uslove sredine, mikroorganizmi koji nastanjuju GI trakt su tokom evolucije razvili mehanizme za registrovanje hemijskih signala koje proizvodi domaćin, među kojima su i kateholamini (Pacheco i Sperandio 2009). Ovi signali omogućavaju bakterijama da prepoznaju unutrašnjost domaćina i da aktiviraju gene odgovorne za kolonijalizaciju domaćina ili ekspresiju faktora virulencije, u slučaju patogenih mikroorganizama (Freestone 2013; Clarke *et al.* 2006).

Bakterije registruju adrenalin histidinskim senzor kinazama (HK) koje se nalaze u membrani. Adrenalin ostvaruje efekte na metabolizam, rast, pokretljivost, formiranje biofilma i ekspresiju gena koji kodiraju za različite faktore virulencije (Hughes i Sperandio 2008; Lyte i Ernst 1992). U odgovoru na dopamin u GI traktu domaćina, gram-negativne bakterije se umnožavaju.

Cilj ovog istraživanja jeste ispitivanje efekta adrenalina i dopamina na rast, formiranje biofilma i pokretljivost bakterija *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Sojevi ove dve bakterijske vrste su izolovani iz reka Kolubare i Ljubostinje (Valjevo), kao predstavnici bakterija koje nastanjuju GI trakt i često se nalaze u vodotocima, usled zagađenja komunalnim otpadnim vodama.

---

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

MENTOR: Iva Atanasković, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

## Materijal i metode

U eksperimentu su korišćene bakterije *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, izolovane iz Kolubare i Ljubostinje. Bakterije su tretirane adrenalinom i dopaminom, u koncentraciji od 100, 500 i 1000  $\mu\text{mol/L}$ . Praćena je promena brzine pokretljivosti bakterija u toku izlaganja kateholaminima. Takođe, konstruisana je kriva rasta merenjem optičke gustine medijuma sa bakterijama na 620 nm. Ispitivan je i efekat kateholamina na formiranje biofilma.

**Izolacija bakterija iz vodotokova.** Za izolaciju *Pseudomonas aeruginosa*, uzorkovanje vode je izvršeno na Ljubostinji (44°16'38.90'' SGŠ 19°55'38.40'' IGD, 169 m n.v.). Zatim je na Cetrimid Agar podlogu je zasejano po 100  $\mu\text{L}$  uzorka vode sa lokaliteta. Nakon inkubacije od 24 h na 37°C, na podlogama su se formirale kolonije bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Kultura je prečišćena metodom iscrpljivanja na Plate Count Agar podlozi (Knežević-Vukčević i Simić 1997). Kultura *E. coli* korišćena u eksperimentu je izolovana po sličnoj proceduri iz Kolubare 2015. godine (Pavlović 2015).

**Konstruisanje krive rasta.** Po 15  $\mu\text{L}$  preko-noćne kulture bakterija za svaku od 7 eksperimentalnih grupa, uz 100  $\mu\text{L}$  sterilnog LB medijuma, je centrifugirano na 5000 rpm, 10 minuta. Supernatant je potom odliven i ćelije su isprane u čistom serum-SAPI medijumu (6.25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1.84 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.35 mmol/L KCl, 1.01 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 2.77 mmol/L glukoza, 30% v/v fetalni goveđi serum; glukoza i goveđi serum dodati su nakon sterilizacije medijuma) na 5000 rpm, 10 minuta. Višak medijuma je odliven i u svaku grupu je dodato po 1.5 mL serum-SAPI medijuma, kao i ista zapremina medijuma sa odgovarajućim koncentracijama adrenalina i dopamina. Po 200  $\mu\text{L}$  svake suspenzije je prebaćeno u mikrotitar ploče (za svaku eksperimentalnu grupu u triplikatu) radi praćenja rasta i konstruisanja krive rasta. Rast je praćen tokom 24 h.

**Test pokretljivosti bakterija.** U polučvrstu LA podlogu sa 0.3% agra inokulisano je po 2  $\mu\text{L}$  suspenzije bakterija tretiranih adrenalinom i dopaminom na početku tretmana i 6 h nakon početka tretmana. Nakon inkubacije od 12 h, na 37°C, mereni su poluprečnici migracije bakterija

kroz podlogu. Zasejavanja su vršena u duplikatu, a poluprečnici svake formirane kolonije mereni su 4 puta.

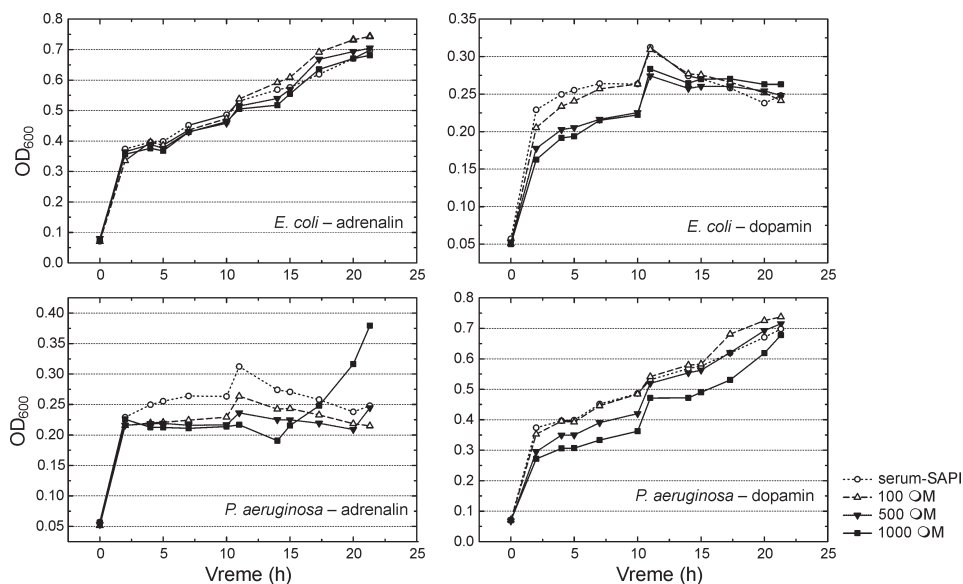
**Degradacija biofilma.** Po 200  $\mu\text{L}$  svake bakterijske kulture, stare 24 h i gajene u LB medijumu, je inokulisano u mikrotitar ploču i inkubirano dodatnih 24 h na 37°C. Potom je medijum odliven i ploča je isprana fiziološkim rastvorom. Ubaćeno je po 200  $\mu\text{L}$  svežeg medijuma sa odgovarajućim koncentracijama adrenalina i dopamina, a u kontrolnu grupu je ubaćen čist serum-SAPI medijum. Nakon 24 h odliven je medijum, bunarići su isprani fiziološkim rastvorom, a formirani biofilmovi su fiksirani sa po 125  $\mu\text{L}$  metanola. Supernatant je odliven i u svaki bunarić je dodato po 125  $\mu\text{L}$  0.1% rastvora kristal violet boje u 4% etanolu. Ploča je inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je isprana vodom radi uklanjanja viška boje. Po 125  $\mu\text{L}$  30% sirćetne kiseline je dodato u svaki bunarić i nakon 10 minuta je merena apsorbancija na 620 nanometara.

## Rezultati i diskusija

**Uticaj na rast bakterija.** Uticaj dopamina i adrenalina na rast bakterija *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* predstavljen je na slici 1. Nakon 24 h tretmana, primećeno je da *E. coli* ne ulazi u stacionarnu fazu. Kultura *P. aeruginosa* dostiže stacionarnu fazu u prvim satima merenja. Adrenalin i dopamin u koncentracijama od 500 i 1000  $\mu\text{mol/L}$  inhibiraju rast bakterija. Izuzetak predstavlja *E. coli* pod uticajem dopamina u koncentracijama od 100 i 500  $\mu\text{mol/L}$  gde je rast blago stimulisan.

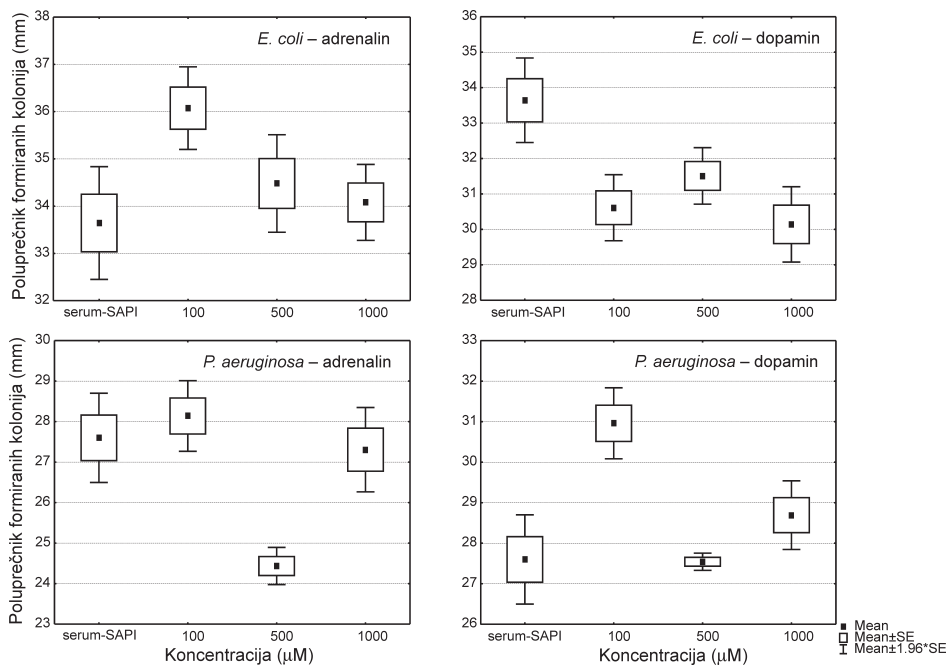
**Test pokretljivosti bakterija.** Bakterije nakon 6 h tretmana ispoljavaju najveću pokretljivost. Ta pokretljivost tokom daljeg izlaganja adrenalinu i dopaminu opada. Značajne razlike u efektima različitih koncentracija ovih supstanci nisu primećene (slika 2).

**Degradacija biofilma.** Adrenalin u svim testiranim koncentracijama dovodi do degradacije biofilma i kod *E. coli* i kod *P. aeruginosa* (slika 3). Dopamin u koncentraciji od 100  $\mu\text{mol/L}$  je takođe doveo do degradacije biofilma, za razliku od viših koncentracija koje su imale stimulatorni efekat na produkciju biofilma kod *P. aeruginosa*.



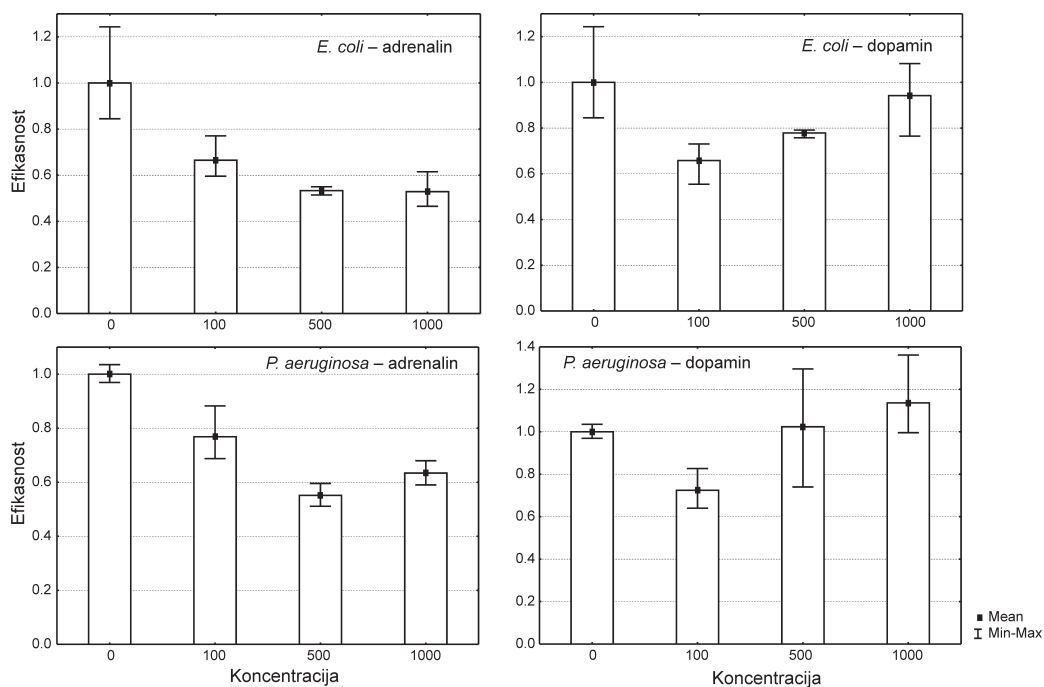
Slika 1. Uticaj adrenalina i dopamina na rast bakterija *E. coli* i *P. aeruginosa*

Figure 1. Adrenaline and dopamine effect on *E. coli* and *P. seruginosa* growth



Slika 2. Pluprečnik formiranih kolonija bakterija *E. coli* i *P. aeruginosa* nakon 6 h tretmana adrenalinom i dopaminom u koncentracijama od 100, 500 i 1000  $\mu\text{mol/L}$

Figure 2. Radius of formed *E. coli* and *P. aeruginosa* colonies after 6h of adrenaline and dopamine treatment in concentrations of 100, 500 and 1000  $\mu\text{mol/L}$



Slika 3. Efikasnost formiranja biofilma bakterija *E. coli* i *P. aeruginosa* pod uticajem adrenalina i dopamina u koncentracijama od 100, 500 i 1000 µM

Figure 3. *E. coli* and *P. aeruginosa* biofilm formation efficiency under effect of adrenaline and dopamine in concentrations of 100, 500 and 1000 µmol/L

## Zaključak

Adrenalin i dopamin u većim koncentracijama inhibiraju rast bakterija *E. coli* i *P. aeruginosa*, osim u slučaju dopamina koji kod *E. coli* nema efekta na rast. Adrenalin inhibira razvijanje biofilma kod oba soja, dok ga kod bakterije *P. aeruginosa* dopamin u višim koncentracijama (500 i 1000 µmol/L) stimuliše. Sa povećanjem koncentracije dopamina dolazi do intenzivnije produkcije biofilma *E. coli*. Na osnovu dobijenih rezultata pokretljivosti bakterija se može zaključiti da ni adrenalin ni dopamin ne stimulišu pokretljivost i nije moguće uočiti nikakav trend među različitim tretmanima. U nekim slučajevima se bakterije i slabije kreću, što nije u skladu sa očekivanim rezultatima. Razlog tome može biti upotreba metode za merenje pokretljivosti koja nije standardna.

## Literatura

- Clarke M. B., Hughes D. T., Zhu C., Boedecker E. C., Sperandio V. 2006. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **103**: 10420.
- Freestone P. 2013. Communication between Bacteria and Their Hosts. *Scientifica*, vol. 2013, Article ID 361073. <https://doi.org/10.1155/2013/361073>.
- Hughes D. T., Sperandio V. 2008. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nature Reviews*, **6**: 111.
- Lyte M., Ernst S. 1992. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Science*, **50**: 203.
- Knežević-Vukčević J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji I: praktikum i laboratorijski dnevnik*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu
- Pavlović D. 2015. Izolacija, praćenje dinamike rasta i identifikacija kofein-degradirajućih bakterija iz reka

Kolubare i Ljubostinje (Valjevo). *Petničke sveske*, 74: 203.

Pacheco A. R., Sperandio V. 2009. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host. *Current Opinion in Microbiology*, 12: 192.

---

Dunja Pavlović

## Effect of Catecholamines on Growth, Biofilm Formation and Motility of Gastrointestinal Bacterial Strains

Due to the coexistence with mammals, some groups of bacteria have developed mechanisms for communication with their host. This cross-kingdom communication involves molecular signals such as catecholamines, produced by hosts. Bacteria sense and respond to catecholamines to regulate a great number phenotypes, from metabolism to virulence gene expression. In this research, the effect of adrenaline and dopamine on growth, biofilm formation and bacte-

rial motility was investigated. The *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains, isolated from rivers Kolubara and Ljubostinja, were used as models of mammal pathogens. Concentrations of 100, 500 and 1000  $\mu\text{mol/L}$  of adrenaline and dopamine were used. Based on the growth curves of these bacteria, it is concluded that both adrenaline and dopamine can inhibit the growth of these bacterial strains. However, the concentration of 100  $\mu\text{mol/L}$  can stimulate the growth of *E. coli*. Adrenaline decreased the percentage of both bacteria biofilm formation. Higher concentrations of dopamine (500 and 1000  $\mu\text{mol/L}$ ) stimulated the production of *P. aeruginosa* biofilm. In the case of *E. coli*, dopamine did not stimulate biofilm, but it inhibited the formation of biofilm less than the adrenaline treatment. Based on the obtained results of bacterial motility, it can be concluded that neither adrenaline nor dopamine can stimulate the motility of these bacteria. There is no trend that can be detected among different treatments. In some cases, bacteria move slower, which was not expected. The reason for this may be the use of a nonstandard method for bacterial motility measuring. 