

Pencerapan dan Analisis Fenomena Pembunuhan Klonal *Escherichia coli* atas Medium Pertumbuhan Minimum Tertakrif Berbanding dengan Medium Kaya (Observation and Analysis of *Escherichia coli* Clonal Killing Phenomenon on Defined Minimal Growth Medium Compared to Rich Medium)

FOO PEI YA¹, NAZALAN NAJIMUDIN², PRAVIN KUMRAN NYANASEGRAN³ & NG CHYAN LEONG^{3,*}

¹Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

²School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, 11700 Gelugor, Penang, Malaysia

³Institute of Systems Biology (INBIOSIS), Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

Diserahkan: 9 September 2024/Diterima: 23 Mei 2025

ABSTRAK

Bakteria menggunakan komunikasi kimia yang rumit yang melibatkan tingkah laku kerjasama dan persaingan demi kelangsungan hidup dalam menghadapi keadaan yang mencabar. Kajian terdahulu telah melaporkan bahawa dalam persekitaran kekurangan nutrien, bakteria menunjukkan tingkah laku radikal, termasuk rembesan sebatian antimikrob. Sebatian ini tidak hanya memberi kesan kepada strain bakteria yang berkaitan tetapi juga koloni klon, membawa kepada fenomena yang dikenali sebagai pembunuhan klon. Namun, fenomena pembunuhan klon pada medium minimum masih kurang dikaji. Penyelidikan ini mengkaji persaingan antara dua koloni klon *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC 25922) pada media kompleks (LB) dan media minimum (M9). Seterusnya, fenomena pembunuhan klon diperhatikan dan dianalisis. Hasil menunjukkan bahawa koloni yang menghadap ke luar (EC-Out) menunjukkan kadar pertumbuhan yang lebih tinggi daripada koloni yang menghadap ke dalam (EC-In). Pada kedua-dua agar media LB dan M9, koloni klon EC 25922 menunjukkan kesan penindasan oleh koloni bersebelahan dan menghasilkan zon perencatan antara dua koloni. Pembentukan zon perencatan berlaku lebih cepat pada agar LB berbanding agar M9 dan mungkin disebabkan oleh faktor yang dirembeskan yang menghalang penggabungan koloni. Pembentukan zon perencatan juga bergantung pada jarak pemisahan awal antara koloni klon. Strain EC 25922 yang sama tidak dapat tumbuh apabila diinokulasikan dalam zon perencatan, menunjukkan kehadiran perencat persaingan. Penemuan ini mencadangkan bahawa sintesis faktor antimikrob serta ketersediaan nutrien mungkin mempengaruhi perkembangan biofilem dan corak pertumbuhan populasi bakteria klon di dalamnya. Pemahaman dalam pembunuhan klon boleh membantu penemuan antibiotik baharu dan meningkatkan pengetahuan mengenai daya tahan bakteria dalam keadaan yang buruk.

Kata kunci: *Escherichia coli* ATCC 25922; pembunuhan klon; perencatan pertumbuhan; sebatian antimikrob; tekanan nutrien

ABSTRACT

Bacteria employ intricate chemical communication involving both cooperative and competitive behaviours for survival when living in harsh conditions. Previous studies have reported that in a nutrient deprivation environment, bacteria exhibit radical behaviours, including antimicrobial compound secretion. These compounds affect not only related bacterial strains but also sibling clonal cells, leading to the phenomenon known as clonal killing. However, the clonal killing phenomenon on minimal medium remains underexplored. This study investigates competition between two *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC 25922) clonal colonies on rich media (LB) and minimal media (M9). Subsequently, the clonal killing phenomenon was observed and analysed. The results indicated that colonies facing outward (EC-Out) exhibited higher growth rates than colonies facing inward (EC-In). On both LB and M9 media, EC 25922 clonal colonies demonstrated suppression exerted by the neighbouring colony and produced a zone of inhibition between the two colonies. This zone of inhibition formed more rapidly on LB agar than M9 agar and is possibly due to secreted factor(s) that prevent colonies from merging. The inhibition zone formation also depended on the initial separation distance between the clonal colonies. The same strain of EC 25922 was unable to grow when inoculated within the zone of inhibition, indicating the presence of a competitive inhibitor. These findings suggest that the synthesis of antimicrobial factors and nutrient availability may affect biofilm development and the growth pattern of clonal bacterial population inside them. Understanding clonal killing could help find new antibiotics and improve our knowledge of bacterial resilience under unfavourable conditions.

Keywords: Antimicrobial compounds; clonal killing; *Escherichia coli* ATCC 25922; growth inhibition; nutrient stress

PENGENALAN

Dalam keadaan semula jadi, mikroorganisma sering berhadapan dengan persekitaran yang mencabar dan keadaan yang ekstrem. Oleh itu, mikroorganisma telah membangunkan sistem kerjasama yang kompleks dan keupayaan komunikasi yang rumit untuk bertindak terhadap tekanan (Corning 2022). Apabila terdedah kepada keadaan persekitaran seperti kelaparan, permukaan keras, haba melampau dan bahan kimia berbahaya, bakteria secara kolektif boleh membangunkan strategi yang unik untuk penyesuaian dan kelangsungan hidup (Be'er & Ariel 2019). Keupayaan sel bakteria untuk berinteraksi dengan sel jirannya memberi peluang kepada mereka untuk bekerjasama atau bersaing sesama sendiri. Salah satu contoh tingkah laku kerjasama ini ialah pembentukan biofilem yang terdiri daripada mikrob spesies yang berbeza (Ng 2019). Kerjasama berasaskan komunikasi bakteria boleh membawa kepada morfogenesis koloni, pengekspressan gen yang diselaraskan, pembezaan sel terkawal dan pembahagian tugas (Niehus et al. 2021). Namun, sel bakteria dalam persekitaran yang padat memudahkan persaingan antara sel jiran (Zhao, Yu & Ding 2020).

Sel mikrob memerlukan medium pertumbuhan untuk mendapatkan gabungan makronutrien dan mikronutrien yang diperlukan bagi pertumbuhan dan perkembangan mereka (Ratiu et al. 2017). Nutrien berfungsi sebagai penentu asas dalam membentuk dinamik komuniti bakteria. Hubungan rumit antara ketersediaan nutrien dan tingkah laku bakteria menambah kekompleksan dalam pemahaman tentang fenomena penolakan antara koloni klon. Kajian lepas mengenai kebolehtumbuhan *E. coli* menggunakan pelbagai media pemilihan, menunjukkan bahawa kehadiran atau ketiadaan sesetengah komponen dalam media pertumbuhan boleh memberikan kesan terhadap pemulihan *E. coli* selepas rawatan gelombang ultralembayung panjang dan ultralembayung pendek (Valero et al. 2017).

Medium kompleks mengandungi semua bahan yang diperlukan untuk pertumbuhan dan pembiakan bakteria manakala medium minimum mengandungi nutrien penting sahaja untuk pertumbuhan spesies bakteria tertentu (Sperotto et al. 2021). Medium LB merupakan salah satu jenis medium kompleks yang terdiri daripada pencerna pankreas kasein daripada susu lembu dan penghadam automatik *Saccharomyces cerevisiae* (Baev et al. 2006). Semasa proses pertumbuhan *E. coli* dalam medium LB, kultur *E. coli* menggunakan pelbagai nutrien secara beransur-ansur, menyebabkan peralihan diauksik berlaku sepanjang lengkung pertumbuhan (Sezonov, Joseleau-Petit & D'Ari 2007). Sebaliknya, medium M9 merupakan medium minimum yang terdiri daripada sistem penimbal, campuran garam inorganik penting dan sumber karbon yang hanya mencukupi untuk memenuhi keperluan nutrien minimum bagi pertumbuhan *E. coli* (Varik et al. 2016). Dengan itu, medium LB dan M9 telah dipilih sebagai

model medium kompleks dan medium minimum untuk pertumbuhan *E. coli* ATCC 25922 (EC 25922) dalam kajian ini.

Pembentukan zon pemisahan antara dua koloni klon bakteria atas agar medium kompleks telah diperhatikan pertama kali dalam *Paenibacillus dendritiformis*, iaitu sejenis bakteria Gram-positif (Be'er et al. 2009). Kajian interaksi antara dua koloni klon *Bacillus subtilis* pula mendapati pembentukan garisan persempadanan bergantung kepada kepekatan agar dan jarak pemisahan awal dengan faktor biokimia dicadangkan sebagai punca utama (Paul et al. 2019). Di samping itu, kajian tentang koloni klonal EC 25922 (bakteria Gram-negatif) dalam medium kompleks LB juga menunjukkan pembentukan zon perencatan antara koloni yang turut membawa kepada fenomena pembunuhan klonal (Ng 2019).

E. coli boleh bergerak ke arah nutrien yang bertindak sebagai penarik dan menjauhi bahan berbahaya melalui kemotaksis (Adler 1973, 1966; Tso & Adler 1974). *E. coli* juga boleh membentuk biofilem, iaitu komuniti bakteria yang melekat pada permukaan dan terperangkap dalam matriks pelindung (dos Santos et al. 2018). Pembentukan biofilem dipengaruhi oleh ketersediaan nutrien. Sebagai contoh, keadaan keosmolaran yang tinggi disebabkan oleh kepekatan nutrien dapat mencetuskan pengekspressan gen yang terlibat dalam biofilem (Prigent-Combaret et al. 1999).

Kajian lepas telah menunjukkan bahawa komposisi nutrien dapat memberi kesan terhadap mekanisme perencatan pertumbuhan antara koloni bakteria. Namun, pemahaman terhadap impak nutrien dalam mekanisme perencatan pertumbuhan antara koloni klon Gram-negatif bakteria seperti *E. coli* masih lagi terhad. Dengan itu, kajian terhadap fenomena perencatan antara koloni klon EC 25922 dalam medium pertumbuhan minimum tertakrif berbanding dengan medium kompleks telah dikaji dan diperhatikan dengan teliti dalam kajian ini. Pemahaman tentang pembunuhan klon adalah penting untuk menjelaskan kelakuan sel bakteria semasa interaksi koloni klon. Pemahaman ini boleh membuka jalan kepada inisiatif baharu dalam penemuan antibiotik dan menjadi penyelesaian kepada masalah kerintangan mikrob semasa.

KAEDAH

PENGKULTURAN EC 25922 DALAM AGAR DAN KALDU

Bakteria EC 25922 dicalit pada agar Luria-Bertani (LB) dengan kaedah plat calit menggunakan pencungkil gigi yang steril untuk mendapatkan koloni tunggal yang terasing. Plat dieram semalaman selama 14 hingga 18 jam pada suhu 37 °C. Alikuot kaldu LB sebanyak 5 mL dipindahkan ke dalam tiub Falcon steril bertutup secara aseptik. Satu koloni tunggal EC 25922 pada agar LB diambil dengan pipet dan diampai ke dalam kaldu LB. Tiub Falcon dieram dalam pengering bergetar pada

suhu 37 °C selama 14 hingga 18 jam. Selepas pengeraman semalaman, kultur dalam tiub Falcon dilaras dengan kaldu LB segar untuk mencapai bacaan ketumpatan optik pada 600 nm (OD600) sebanyak 0.01. Sel ditumbuhkan pada 37 °C sehingga OD600 adalah sekitar 0.60. Kultur itu kemudiannya dicairkan dengan kaldu LB segar untuk mencapai OD600 sebanyak 0.30. Sebanyak 750 µL aliquot kultur (OD600 sebanyak 0.30) dicampurkan dengan 250 µL gliserol untuk disimpan dalam -80 °C sebagai stok gliserol.

PEMERHATIAN CORAK PERTUMBUHAN KOLONI KLON PADA PERMUKAAN AGAR

Agar LB dan M9 (12.8 g/L natrium hidrogen fosfat, 3.0 g/L kalium dihidrogen fosfat, 0.5 g/L natrium klorida, 1.0 g/L ammonium klorida, 0.1 mM kalsium klorida, 4 g/L glukosa dan 2 mM magnesium sulfat) sebanyak 25 mL disediakan menggunakan pipet serologi dan pam pipet. Empat corak pertumbuhan koloni klon EC 25922 yang direka untuk memerhati corak pertumbuhan dan interaksi adalah seperti berikut: (1) inokulasi satu koloni tunggal dengan pencungkil gigi steril pada titik pusat agar LB dan M9, (2) dua koloni diinokulasi sebagai dua titik sebanyak 10 mm berjauhan, (3) satu koloni diinokulasi sebagai garis tunggal dan (4) dua garis selari diinokulasi 5 mm berjauhan. Semua piring dieram pada suhu 37 °C selama tujuh hari. Imej corak pertumbuhan diambil pada hari kedua, keempat dan ketujuh pengeraman. Setiap uji kaji dilakukan dalam tiga replikasi.

PENENTUAN JARAK MINIMUM UNTUK PEMBENTUKAN GARIS SEMPADAN KOLONI KLON

Bagi menentukan jarak pemisahan awal minimum yang menyebabkan pembentukan garis sempadan antara koloni yang berdepanan dalam, satu siri uji kaji melibatkan dua koloni klon EC 25922 diinokulasikan sebagai dua garis selari telah dijalankan. Koloni diinokulasi pada agar LB dan M9 dengan jarak 5 mm. Piring dieram pada 37 °C selama tujuh hari. Imej gambar corak pertumbuhan koloni klon EC 25922 diambil pada hari kedua, keempat dan ketujuh pengeraman EC 25922. Prosedur ini diulang dengan jarak 4 mm, 3 mm, 2 mm dan 1 mm. Setiap uji kaji dilakukan dalam tiga replikasi.

PEMERHATIAN CORAK PERTUMBUHAN KOLONI KLON DALAM ZON PERENCATAN

Bagi menentukan sama ada koloni klon EC 25922 boleh tumbuh dalam zon perencatan yang terbentuk antara koloni klon, dua garis selari koloni klon yang berjarak 10 mm antara satu sama lain diinokulasi pada permukaan agar LB dan dieram pada suhu 37 °C selama 2 hari. Selepas pengeraman awal ini, strain bakteria yang sama diinokulasi dalam zon perencatan dan di tepi garis selari kedua EC 25922 di sebelah kanan sebagai kawalan (Ng 2019).

Piring dieram pada suhu 37 °C selama 5 hari tambahan. Imej pertumbuhan koloni diambil pada hari pertama, kedua dan kelima pengeraman lanjutan EC 25922. Prosedur ini diulang dengan menggunakan agar medium pertumbuhan minimum tertakrif M9. Setiap uji kaji dilakukan dalam tiga replikasi.

PEMROSESAN IMEJ DAN UKURAN BENTUK KOLONI KLON

Corak pertumbuhan EC 25922 divisualisasikan dengan mikroskop Stereozoom Trinokular (Olympus SZ6145TR) pada pembesaran $\times 6.7$. Imej diambil menggunakan kamera Olympus TP-XCAM 1080PHB dan dikendalikan melalui perisian Toupview (ToupTek Photonics). Imej diproses dalam ImageJ (Schneider, Rasband & Eliceiri 2012) untuk mendapatkan ukuran saiz koloni bergaris tunggal dan dua garis selari. Kawasan permukaan koloni diukur menggunakan ImageJ berdasarkan bar skala dan pemilihan kawasan melalui 'Threshold' dan 'Wand Tool'. Kadar pertumbuhan EC 25922 bergaris tunggal diukur dengan mengambil kira peningkatan kawasan permukaan sel antara hari kedua, x dan hari keempat pengeraman, y dan dibahagikan dengan 48 jam. Pengiraan tentang kadar pertumbuhan EC 25922 dalam uji kaji adalah seperti berikut:

$$\text{Kadar pertumbuhan EC 25922} = (y - x) \text{ mm}^2 / 48 \text{ jam.}$$

Pada agar yang ditumbuh dengan dua garis selari EC 25922 dengan jarak 5 mm, kadar pertumbuhan koloni klon yang menghadap ke luar (EC-Out) dan menghadap ke dalam (EC-In) diukur dan purata direkodkan. Data dianalisis menggunakan GraphPad Prism (Versi 10). Ujian t bebas dengan andaian varians tidak sama (pembetulan Welch) dijalankan untuk membandingkan purata kadar pertumbuhan EC 25922 pada agar LB dan M9. Keputusan ujian t direkodkan dan ditafsirkan dengan nilai p satu-hala < 0.05 dianggap signifikan.

HASIL DAN PERBINCANGAN

PENCIRIAN MORFOLOGI DAN FISILOGI KOLONI KLON EC 25922 PADA PERMUKAAN AGAR

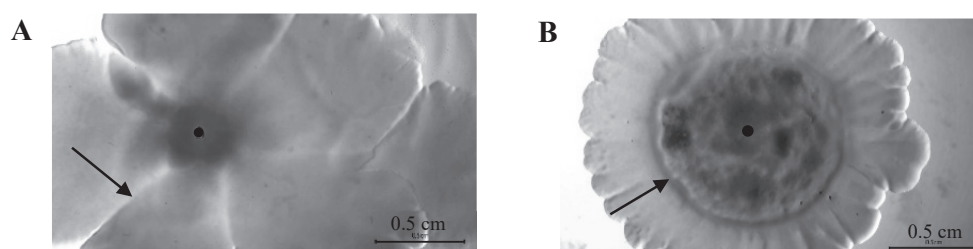
Koloni klon tunggal EC 25922 dapat ditumbuh dalam bulatan pada medium kompleks LB dan medium minimum M9. Koloni pada agar LB merebak lebih cepat dan luas sehingga melebihi bidang pandangan mikroskop selepas 4 hari. Kadar pertumbuhan EC 25922 pada permukaan agar LB lebih tinggi berbanding dengan agar M9. EC 25922 boleh tumbuh pada medium minimum M9 yang mengandungi glukosa sebagai sumber karbon dan sumber tenaga yang membekalkan nitrogen, fosforus dan logam surih (Elbing & Brent 2019). Namun, kajian lepas telah menunjukkan bahawa *E. coli* tumbuh dengan lebih cepat pada medium kompleks LB yang menyediakan faktor pertumbuhan penting (Elbing & Brent 2019).

Koloni klon tunggal EC 25922 pada agar LB dan M9 menunjukkan corak bercabang berkedut, berlapis dan menonjol. EC 25922 pada agar M9 membentuk gelang jejari (Rajah 1(B)) pada hari ketujuh manakala *E. coli* pada agar LB, gelang tidak terbentuk tetapi terdapat permatang (Rajah 1(A)) yang muncul seawal hari keempat dan merebak dari rim luar ke pusat koloni. Kajian lepas melaporkan bahawa kedutan dan permatang *E. coli* dikaitkan dengan sifat fizikal biofilem (Serra, Richter & Hengge 2013). Pembentukan gelang jejari dalam makrokoloni *E. coli* adalah morfologi biofilem pada permukaan agar yang boleh muncul secara jejari, sepusat dan tidak teratur (Hall-Stoodley, Costerton & Stoodley 2004). Corak gelang jejari dan permatang yang diperhatikan mencadangkan bahawa EC 25922 membentuk biofilem pada agar LB dan M9, selepas 4 hari untuk LB dan 7 hari untuk M9.

Corak pertumbuhan dua koloni EC 25922 yang berjarak 10 mm pada agar LB dan agar M9 diperhatikan selama 2, 4 dan 7 hari (Rajah 2). Dua koloni klon EC 25922 pada jarak 10 mm antara satu sama lain dapat tumbuh secara serentak pada permukaan agar medium kompleks LB dan medium pertumbuhan minimum tertakrif M9. Pada awalnya (hari kedua), koloni EC 25922 berkembang dalam bulatan pada permukaan kedua-dua medium. Namun, dua koloni klon EC 25922 pada permukaan kedua-dua medium menjadi rapat selepas pengeraman selama 7 hari. Koloni berganda EC 25922 pada permukaan agar LB tidak menunjukkan penyebaran bulat yang sama seperti koloni tunggal (Rajah 1). Koloni EC 25922 pada permukaan agar LB yang menghadap ke dalam mengalami perencatan oleh sel bersebelahan dan membawa kepada pembentukan zon pemisahan (Rajah 2(A)). Koloni EC 25922 pada permukaan agar M9 yang menghadap ke dalam kurang dipengaruhi oleh perencatan daripada sel bersebelahan berbanding dengan EC 25922 pada permukaan agar LB (Rajah 2(B)).

Kesan perencatan EC 25922 oleh sel bersebelahan pada agar LB dan M9 menunjukkan interaksi antara klonal sel. Tingkah laku 'kerjasama' dikaitkan dengan rembesan bahan guna semua seperti siderofor dan eksoenzim yang dapat meningkatkan kapasiti tampung tempatan dan membawa kepada produktiviti kumpulan yang lebih tinggi dalam komuniti mikrob (Platt & Bever 2009). Kerjasama boleh diutamakan berbanding persaingan apabila keadaan ekologi membolehkan pengembangan kapasiti tampung tempatan, mengurangkan kesan persaingan koloni klon dan menyediakan peluang untuk mengeksport faedah kooperatif (Platt & Bever 2009).

Dalam biofilem, sel melekat pada permukaan dan merembeskan bahan polimer ekstrasel (EPS) yang merupakan sumber perkongsian yang boleh digunakan oleh sel lain (Xavier & Foster 2007). Kajian lepas telah melaporkan bahawa pembentukan biofilem adalah lebih diperkenankan dalam medium minimum M9ZB berbanding dengan medium LB, menunjukkan bahawa M9ZB menyediakan keadaan yang meningkatkan pembangunan struktur biofilem (Flemming et al. 2016; Soares et al. 2021). Kajian juga menunjukkan bahawa peralihan diauksik berlaku dalam *E. coli* apabila tumbuh dalam media kaya seperti LB (Wang & Koch 1978). Perubahan dalam ketersediaan nutrien dan kekurangan nutrien tempatan dalam kultur bakteria menghasilkan kecerunan yang mendorong persaingan populasi dalam media kaya (Portell et al. 2018). Dalam kajian ini, koloni pada medium M9 kurang dipengaruhi oleh sel jiran berbanding dengan medium LB. Ini mencadangkan bahawa koloni bakteria mungkin bekerjasama dan memberi keutamaan kepada kemandirian dan pertumbuhan mereka sendiri dalam ketersediaan nutrien yang sangat terhad melalui penghasilan EPS berbanding dengan penghasilan sebatian antimikrob yang merencat pertumbuhan sel jiran.



Bar skala mewakili 0.5 cm

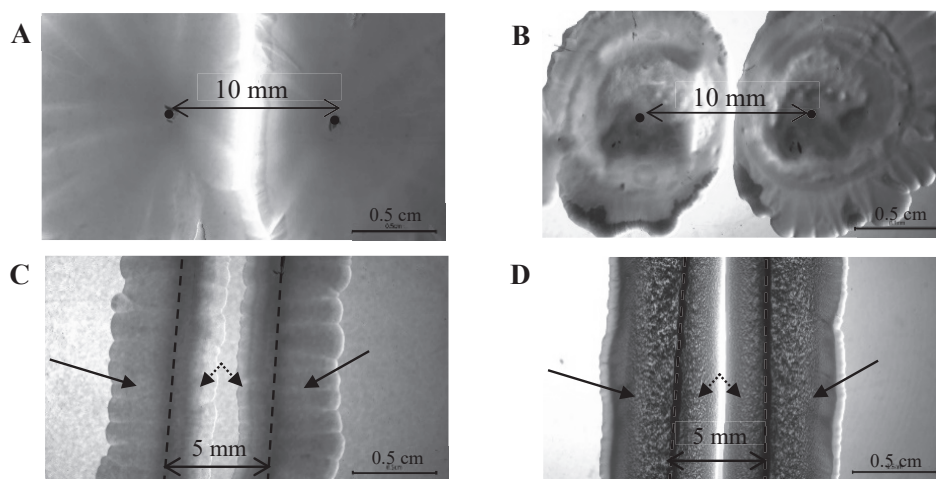
RAJAH 1. Corak pertumbuhan klon tunggal EC 25922 pada titik pusat permukaan agar LB dan M9. (A) Pembentukan permatang koloni klon tunggal EC 25922 yang ditunjukkan oleh anak panah pada permukaan agar LB pada hari keempat. Pembentukan permatang *E. coli* pada permukaan agar LB diperhatikan pada rim luar merambat ke arah pusat EC 25922 dan (B) Pembentukan gelang jejari koloni klon tunggal EC 25922 yang ditunjukkan oleh anak panah pada permukaan agar M9 pada hari ketujuh. Titik hitam mewakili titik inoculasi EC 25922

Seterusnya, walaupun pengenalan diri dan bukan-diri boleh menggalakkan kerjasama dalam kalangan bakteria yang berkait rapat, struktur kumpulan saudara bakteria yang sama juga boleh membawa kepada persaingan apabila sumber terhad dan berpotensi membatalkan kelebihan kooperasi (Grafen 1986; Wade 1985; Williams 2007). Pemerhatian ke atas koloni yang tumbuh pada medium LB yang agak dipengaruhi oleh sel jiran mencadangkan bahawa koloni bakteria mungkin bersaing untuk mendapatkan sumber terhad dan merencat pertumbuhan sel jiran.

Corak pertumbuhan garis tunggal koloni EC 25922 pada permukaan agar LB dan agar M9 diperhatikan sepanjang 2, 4 dan 7 hari. Sel EC 25922 garis tunggal berkembang secara mendatar. Bagi membandingkan kadar pertumbuhan EC 25922 pada permukaan agar medium LB dan medium M9, peningkatan kawasan permukaan sel diukur pada hari kedua dan hari keempat pengeraman. Peningkatan kawasan permukaan sel EC 25922 pada permukaan kedua-dua medium LB dan M9 di kiri dan kanan garis inokulasi adalah sama rata. Secara purata, kadar peningkatan kawasan permukaan sel EC 25922 pada permukaan agar LB ialah 0.68 mm^2 per jam manakala pada permukaan agar M9 ialah 0.22 mm^2 per jam. Kadar pertumbuhan *E. coli* pada agar LB dan M9 dibandingkan menggunakan ujian *t* bebas dan analisis menunjukkan perbezaan yang signifikan secara statistik antara kedua-dua

kumpulan ($p = 0.0323$), di mana EC 25922 menunjukkan kadar pertumbuhan yang lebih tinggi pada agar LB berbanding dengan agar M9 (Figure S1(A)).

Corak pertumbuhan dua baris selari koloni EC 25922 yang berjarak 5 mm pada permukaan agar LB dan agar M9 diperhatikan sepanjang 2, 4, dan 7 hari. Dua baris selari koloni klon EC 25922 pada jarak 5 mm antara satu sama lain dapat ditumbuhkan secara serentak pada kedua-dua agar medium LB dan M9 (Rajah 2). Koloni EC 25922 berkembang secara mendatar pada permukaan kedua-dua agar medium. Untuk membandingkan kadar pertumbuhan koloni klon *EC-In* dan *EC-Out* pada permukaan agar medium LB dan M9, peningkatan kawasan permukaan sel telah diukur pada hari kedua dan hari keempat pengeraman. Secara purata, kadar peningkatan kawasan permukaan sel *EC-Out* pada permukaan agar LB ialah $0.20 \text{ mm}^2/\text{jam}$ manakala *EC-In* ialah $0.04 \text{ mm}^2/\text{jam}$. Kadar peningkatan kawasan permukaan sel *EC-Out* dan *EC-In* pada permukaan agar M9 masing-masing pula ialah $0.15 \text{ mm}^2/\text{jam}$ dan $0.06 \text{ mm}^2/\text{jam}$ secara purata. *EC-Out* merebak 5 kali lebih jauh berbanding *EC-In* pada agar LB dan 2.5 kali lebih jauh pada agar M9. Kadar pertumbuhan *EC-out* dan *EC-in* dibandingkan dalam media LB dan M9 menggunakan ujian *t* bebas dengan andaian varians tidak sama (Figure S1(B)-S1(C)). Pada kedua-dua permukaan agar LB dan M9, *EC-out* menunjukkan kadar pertumbuhan yang lebih tinggi secara signifikan berbanding *EC-in* ($p < 0.05$).



Bar skala mewakili 0.5 cm

RAJAH 2. Corak pertumbuhan dua koloni dan pembentukan garis sempadan di *EC-In* bagi EC 25922 pada permukaan agar LB dan M9. (A) Koloni EC 25922 pada permukaan agar LB yang menghadap ke dalam mengalami perencatan oleh sel bersebelahan dan membawa kepada pembentukan zon pemisahan, (B) Koloni EC 25922 pada permukaan agar M9 yang menghadap dalam kurang dipengaruhi oleh perencatan daripada sel bersebelahan, (C) Pembentukan garis sempadan di *EC-In* yang berjarak 5 mm pada permukaan agar LB dan (D) M9 pada hari keempat. Anak panah padat menunjukkan *EC-Out* dan anak panah garis putus-putus menunjukkan *EC-In*. Garisan putus-putus mewakili garis inokulasi EC 25922

Jarak pemisahan awal antara koloni sebanyak 5 mm menyebabkan pembentukan garis sempadan di koloni yang menghadap ke dalam pada permukaan agar medium LB (Rajah 2(C)) dan medium M9 (Rajah 2(D)) sepanjang 7 hari pertumbuhan. Pemerhatian uji kaji persaingan antara koloni klon *P. dendritiformis* menunjukkan bahawa koloni berjiran saling menghalang pertumbuhan melalui rembesan yang menyebabkan maut jika tahap melebihi ambang yang tertentu (Be'er et al. 2009). Zon perencatan yang terbentuk antara dua koloni klon EC 25922 dalam kajian ini mencadangkan bahawa sebatian perencat mungkin dirembes dan menghalang pertumbuhan. Fenomena tolakan ini mungkin kurang dipengaruhi oleh kekurangan nutrien kerana zon perencatan antara dua baris selari koloni *E. coli* dibentuk dalam kedua-dua medium pertumbuhan minimum tertakrif M9 mahupun medium kompleks LB yang kaya dengan nutrien. Kajian lepas telah melaporkan bahawa perencatan pertumbuhan sel bakteria EC 25922 pada permukaan agar medium kompleks LB menunjukkan kematian sel bakteria ditemui dalam kalangan sel dalam *EC-In* manakala sel hidup aktif dikesan dalam kalangan sel *EC-Out* (Ng 2019). Kadar pertumbuhan *EC-Out* yang lebih tinggi daripada *EC-In* pada permukaan kedua-dua medium LB dan M9 dalam kajian ini mencadangkan bahawa *EC-Out* mungkin terdiri daripada sel aktif yang masih tumbuh manakala *EC-In* terdiri daripada sel hidup dan sel mati.

JARAK MINIMUM UNTUK PEMBENTUKAN GARIS SEMPADAN KOLONI KLON

Corak pertumbuhan dua baris selari koloni klon EC 25922 yang berjarak 5 mm, 4 mm, 3 mm, 2 mm dan 1 mm pada permukaan agar LB dan M9 diperhatikan sepanjang 2, 4 dan 7 hari. Dua koloni klon EC 25922 pada permukaan agar LB menjadi rapat selepas pengeraman selama 7 hari. Terdapat pembentukan garis sempadan antara koloni yang menghadap ke dalam dengan pemisahan awal koloni berjarak 5 mm, 4 mm dan 3 mm (Rajah 3(A)) pada permukaan agar LB. Pada jarak pemisahan awal antara garis koloni EC 25922 yang dikurangkan kepada 2 mm pada permukaan agar LB (Rajah 3(B)), diperhatikan bahawa garis koloni EC 25922 telah bergabung. Sempadan antara dua koloni klon EC 25922 agak kabur, menjadikan koloni klon sukar untuk dibezakan antara satu sama lain. Situasi yang serupa apabila koloni klon menjadi rapat dan menyatu berlaku dalam koloni klon yang berjarak 1 mm. Dengan itu, hasil ini menunjukkan bahawa jarak minimum pemisahan awal antara koloni yang menyebabkan pembentukan garis sempadan antara koloni yang berhadapan ke dalam pada permukaan agar LB ialah 3 mm.

Pada permukaan agar M9, dua koloni klon EC 25922 menjadi rapat selepas pengeraman selama 7 hari. Terdapat pembentukan garis sempadan antara koloni yang menghadap ke dalam yang berjarak 5 mm pada permukaan agar M9 sepanjang pengeraman selama 7 hari (Rajah 3(C)).

Namun, semasa jarak pemisahan awal antara garis koloni EC 25922 yang dikurangkan kepada 4 mm, diperhatikan bahawa dua koloni klon bergabung tanpa ada celahan yang dapat dikenal pasti antara koloni pada hari kedua, keempat sehingga hari ketujuh (Rajah 3(D)). Situasi yang sama diperhatikan dengan koloni klon menjadi rapat dan menyatu dalam koloni klon yang berjarak 3 mm, 2 mm dan 1 mm. Dengan itu, jarak minimum pemisahan awal antara koloni yang menyebabkan pembentukan garis sempadan antara koloni yang menghadap ke dalam pada permukaan agar M9 ialah 5 mm.

Pada permukaan agar LB dan M9, koloni klon EC 25922 mengalami perencatan daripada sel bersebelahan yang mungkin disebabkan oleh faktor perencatan yang dihasilkan yang menghalang penggabungan koloni klon. Terdapat garis masa yang berbeza untuk faktor perencatan menunjukkan keberkesanannya. Faktor perencatan pada agar LB mengambil masa yang lebih singkat untuk menunjukkan keberkesanannya berbanding dengan agar M9. Kajian lepas melaporkan bahawa mutasi dalam lokus pengenalan diri boleh menyebabkan pembentukan sempadan antara koloni strain yang sama dalam bakteria *Proteus mirabilis* kerana mutan didapati kehilangan keupayaan untuk mengenali strain induk mereka sebagai diri sendiri (Gibbs, Urbanowski & Greenberg 2008). Telah dihipotesiskan bahawa faktor perencatan pada medium LB mengambil masa yang lebih singkat untuk menunjukkan keberkesanan, menyebabkan EC 25922 pada medium LB mengembangkan identiti diri dan membentuk sempadan dengan koloni bersebelahan pada jarak 5 mm, 4 mm dan 3 mm. Reka bentuk uji kaji yang melibatkan jarak awal tertentu antara dua garis selari koloni EC 25922 (5 mm, 4 mm, 3 mm, 2 mm dan 1 mm) telah direka dengan teliti untuk mengkaji ambang ruang secara sistematik dan koloni bakteria boleh membezakan diri mereka sebagai entiti yang berasingan, mengembangkan identiti sendiri dan menghalang integrasi antara satu sama lain. Dengan memperkenalkan julat jarak, pendekatan ini membolehkan penerokaan titik kritikal apabila koloni bakteria beralih daripada mengekalkan sempadan yang berbeza kepada potensi integrasi, sekali gus dapat memberikan pemahaman tentang mekanisme pengenalan diri dan interaksi kompetitif mereka.

Adalah dicadangkan bahawa pembentukan sempadan antara koloni klon EC 25922 dikaitkan dengan kehilangan pengenalan diri dan bukan diri serta perkembangan suatu identiti yang baharu. Kadar pertumbuhan EC 25922 yang lebih tinggi pada medium LB juga mungkin menyumbang kepada pembentukan sempadan, kerana masa replikasi generasi yang baharu dengan masa yang lebih singkat membawa kepada pembangunan identiti yang berbeza dengan lebih pantas dan seterusnya merembeskan faktor perencatan. Pada medium M9, faktor perencatan mengambil masa yang lebih panjang untuk menunjukkan keberkesanan menyebabkan pertumbuhan sel tanpa kesan faktor perencatan yang membawa kepada penggabungan

koloni klon pada jarak 4 mm atau kurang. Namun, pada jarak kritikal iaitu 5 mm pada medium M9, faktor perencatan dapat bertindak dan membolehkan koloni EC 25922 mengembangkan identiti diri dan dihalang daripada bergabung walaupun tumbuh selama 7 hari.

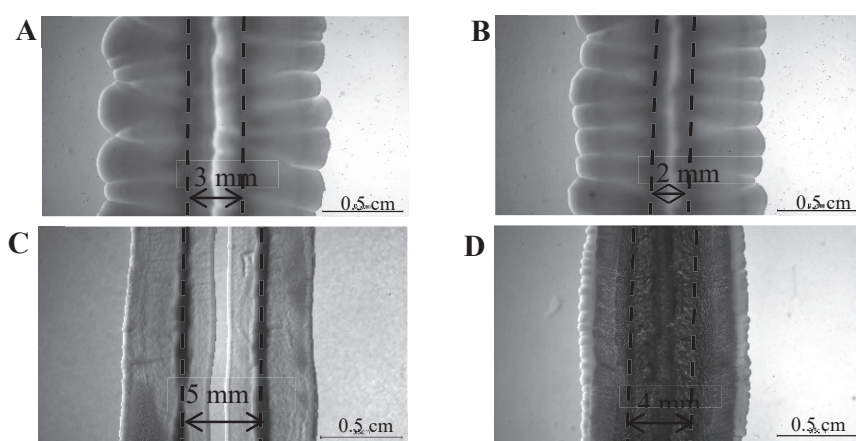
Jarak minimum pemisahan awal antara koloni yang menyebabkan pembentukan garis sempadan antara koloni yang menghadap ke dalam pada permukaan agar LB ialah 3 mm manakala pada permukaan agar M9 ialah 5 mm. Oleh itu, terdapat jarak minimum kritikal yang diperlukan untuk pembentukan garisan sempadan. Pemisahan yang terbentuk antara koloni klon EC 25922 pada permulaan didapati berterusan tanpa penutupan walaupun selepas tempoh 7 hari. Pembentukan garis sempadan telah diperhatikan dalam bakteria Gram positif *B. subtilis* yang tumbuh pada kepekatan agar 1% atau lebih tinggi apabila pemisahan awal mereka adalah 20 mm atau lebih tinggi (Paul et al. 2019). Fenomena pembentukan garis sempadan yang sama dicerap dalam kajian ini yang melibatkan bakteria Gram-negatif mencadangkan bahawa fenomena pembentukan sempadan antara koloni klon atas faktor perubahan jarak pemisahan awal boleh menjadi universal dalam dunia bakteria.

CORAK PERTUMBUHAN KOLONI KOLON BAKTERIA DALAM ZON PERENCATAN

Corak pertumbuhan koloni klon tambahan EC 25922 dalam zon perencatan dan kawasan *EC-Out* pada agar LB dan agar M9 diperhatikan sepanjang 1, 2 dan 5 hari. Dua baris selari EC 25922 pada jarak 10 mm yang diinokulasikan terlebih dahulu dapat tumbuh serentak pada agar LB dan

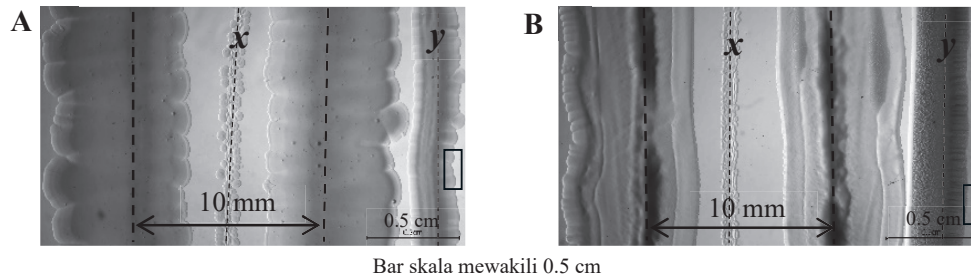
M9. Koloni EC 25922 berkembang secara mendatar pada permukaan kedua-dua agar LB dan M9. Seperti yang telah dijangkakan dan dilaporkan oleh Ng (2019), koloni *E. coli* tidak berkembang rapat antara satu sama lain dan satu garis sempadan terbentuk. Koloni tambahan tidak tumbuh di kawasan sempadan selama 5 hari di kedua-dua medium. Secara kontrasnya, koloni klon EC 25922 tambahan dapat tumbuh di kawasan *EC-Out* malah dapat mengembangkan corak berkedut pada hari kelima pengeraman (Rajah 4).

Kajian serupa mendapati bakteria lain boleh tumbuh dalam zon perencatan antara dua koloni klon EC 25922 (Ng 2019). Yang menariknya, kemasukan nutrien dalam zon perencatan tidak menghasilkan pertumbuhan EC 25922 selanjutnya, menunjukkan bahawa pembentukan zon perencatan mungkin bukan disebabkan oleh kekurangan nutrien (Ng 2019). Kajian terdahulu melaporkan bahawa apabila kaca nipis diletakkan antara dua koloni klon *P. dendritiformis*, kedua-duanya terus berkembang hingga menyentuh kaca (Be'er et al. 2009). Fenomena yang serupa juga dilaporkan untuk koloni *B. subtilis* yang berhadapan dengan halangan fizikal apabila bakteria dapat tumbuh di sepanjang tepi halangan tersebut tanpa membentuk garis sempadan, menunjukkan bahawa kehadiran halangan fizikal bukanlah faktor utama dalam pembentukan garisan sempadan (Paul et al. 2019). Seterusnya, pemerhatian pewarnaan fluoresen dan pengukuran unit pembentuk koloni (CFU) menunjukkan bahawa dua koloni klon EC 25922 yang menghadap ke dalam mengalami kematian sel (Ng 2019). Dalam kajian ini, fenomena penolakan antara dua koloni klon EC 25922 mungkin kurang dipengaruhi oleh kekurangan nutrien atau faktor fizikal, tetapi lebih berkaitan dengan rembesan bahan kimia atau toksin yang berfungsi sebagai isyarat yang membawa kepada kematian sel.



Bar skala mewakili 0.5 cm

RAJAH 3. Corak pertumbuhan dua baris selari koloni EC 25922 pada agar LB dan M9 dengan jarak awal berbeza pada hari ke-empat. (A) LB, jarak 3 mm: pembentukan garis sempadan. (B) LB, jarak 2 mm: gabungan koloni. (C) M9, jarak 5 mm: pembentukan garis sempadan. (D) M9, jarak 4 mm: gabungan koloni. Garisan putus-putus menunjukkan garis inokulasi



Bar skala mewakili 0.5 cm

RAJAH 4. Koloni klon tambahan EC 25922 dalam zon perencatan pada agar LB dan M9 pada hari kelima. Koloni klon tambahan EC 25922 dicoret di zon perencatan (x) dan di kawasan *EC-Out* (y) pada permukaan agar LB dan M9. Koloni klon EC 25922 tambahan tidak dapat tumbuh pada zon perencatan selama 5 hari pada permukaan (A) agar LB dan (B) agar M9. Koloni klon EC 25922 tambahan dapat tumbuh di kawasan *EC-Out* malah dapat mengembangkan corak berkedut yang ditunjukkan dalam petak. Garisan putus-putus mewakili garis inokulasi EC 25922

Sel *E. coli* boleh bertindak balas secara bersyarat terhadap toksin yang dilepaskan klon melalui auto-induksi atau genotip lain melalui penderiaan persaingan, membolehkan tindak balas yang diselaraskan terhadap pesaing (Mavridou et al. 2018). *E. coli* menghasilkan pelbagai sebatian perencatan, termasuk kolisin, mikrosin, peptida antimikrob dan toksin lain yang memainkan peranan penting dalam persaingan antara bakteria serta mempunyai implikasi dalam penyelidikan antimikrob (Baquero et al. 2019). Kolisin dan mikrosin ialah bakteriosin dengan pelbagai mekanisme tindakan seperti pembentukan liang pada membran, aktiviti nuklease dan perencatan sintesis dinding sel, menjadikannya calon yang berpotensi untuk pembangunan antibiotik baharu (Cascales et al. 2007). Peptida antimikrob yang dihasilkan oleh *E. coli* mengganggu membran bakteria dan menunjukkan potensi terhadap strain yang rintang (Alves et al. 2010). Sebatian semula jadi *E. coli* yang stabil dalam pelbagai keadaan berpotensi menangani kerintangan antibiotik dan menjadi agen antimikrob generasi baharu (Budić et al. 2011). Namun, jenis toksin atau sebatian kimia khusus yang dirembeskan oleh koloni klon EC 25922 masih belum dikenali. Mekanisme molekul yang terlibat dalam jenis interaksi antara koloni klon EC 25922 juga masih belum diketahui. Pemahaman yang lebih mendalam tentang mekanisme yang terlibat dalam fenomena perencatan atau pembunuhan klon EC 25922 yang diinduksi adalah penting untuk memahami fenomena ini dengan sepenuhnya.

KESIMPULAN

Interaksi antara koloni klon EC 25922 yang tumbuh pada agar medium kompleks LB dan medium minimum M9 membawa kepada fenomena perencatan pertumbuhan koloni klon. Kadar pertumbuhan EC 25922 lebih tinggi

pada agar LB berbanding dengan M9. Pengaruh perencatan oleh koloni klon bersebelahan EC 25922 menunjukkan interaksi yang berbeza antara koloni klon dalam kedua-dua jenis medium yang dikaji. Dalam medium minimum, EC 25922 lebih mengutamakan kerjasama dengan koloni klon manakala dalam medium kompleks, keutamaan diberikan kepada persaingan dengan koloni klon. EC 25922 tidak dapat tumbuh dalam zon perencatan antara dua koloni klon mencadangkan terdapatnya rembesan sebatian perencat yang menghalang pertumbuhan *E. coli*. Faktor perencat pada agar LB menunjukkan keberkesannya dengan lebih cepat berbanding daripada pada agar M9, bergantung kepada jarak pemisahan awal antara dua koloni klon EC 25922. *EC-Out* menunjukkan kadar pertumbuhan lebih tinggi berbanding dengan *EC-In* pada kedua-dua agar medium LB dan M9 mencadangkan bahawa *EC-Out* terdiri daripada sel aktif manakala *EC-In* berkemungkinan besar terdiri daripada sel yang kurang aktif atau mati. Dalam gabungan dengan semua pemerhatian corak pertumbuhan koloni klon EC 25922, fenomena penolakan antara dua koloni klon EC 25922 dihipotesiskan adalah berkaitan dengan rembesan bahan antimikrob sebagai isyarat kematian sel serta ketersediaan nutrien yang mungkin mempengaruhi biofilm. Namun, data analisis molekul yang mendalam diperlukan untuk membuktikan hipotesis ini. Salah satu soalan yang penting ialah sama ada terdapat faktor khusus yang menyumbang kepada penghasilan zon perencatan semasa koloni klon EC 25922 tumbuh berdekatan masih belum dikenal pasti. Oleh itu, kajian masa hadapan perlu memberi tumpuan kepada pengenalpastian makromolekul dan mikromolekul seperti metabolit dalam zon perencatan, serta melibatkan analisis molekul seperti kajian pengekspressan gen atau metabolomik. Pendekatan ini diharapkan dapat memberikan pemahaman lebih mendalam terhadap mekanisme pembunuhan klonal bakteria.

PENGHARGAAN

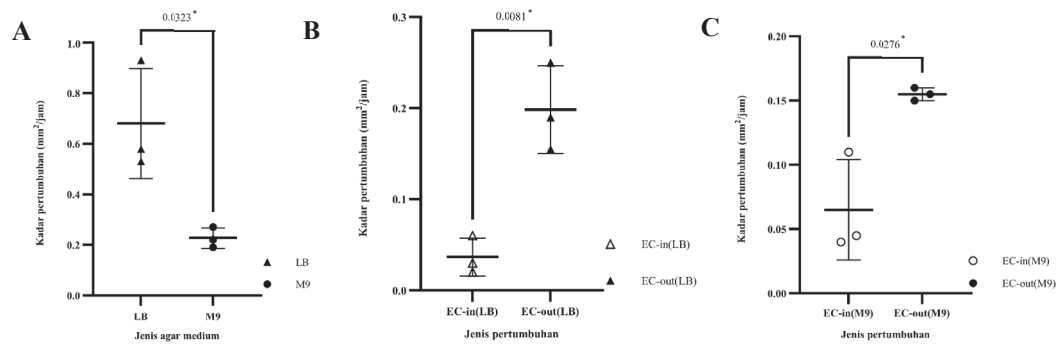
Kami mengucapkan terima kasih kepada Dr. Liew Yun Khoon daripada International Medical University (IMU) kerana membekalkan strain *E. coli* ATCC 25922 untuk kajian ini. Kami turut berterima kasih kepada Dr. Ng Fui Ling dan Dr. Sylvia Chieng atas panduan berharga mereka.

RUJUKAN

- Adler, J. 1973. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 74(1): 77-91.
- Adler, J. 1966. Chemotaxis in bacteria. *Science* 153(3737): 708-716.
- Alves, C.S., Melo, M.N., Franquelim, H.G., Ferre, R., Planas, M., Feliu, L., Bardají, E., Kowalczyk, W., Andreu, D., Santos, N.C., Fernandes, M.X. & Castanho, M.A.R.B. 2010. *Escherichia coli* cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides BP100 and pepR. *Journal of Biological Chemistry* 285(36): 27536-27544.
- Baev, M.V., Baev, D., Radek, A.J. & Campbell, J.W. 2006. Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: Monitoring utilization of sugars, alcohols, and organic acids with transcriptional microarrays. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71(3): 310-316.
- Baquero, F., Lanza, V.F., Baquero, M.R., del Campo, R. & Bravo-Vázquez, D.A. 2019. Microcins in Enterobacteriaceae: Peptide antimicrobials in the eco-active intestinal chemosphere. *Frontiers in Microbiology* 10: 2261.
- Be'er, A. & Ariel, G. 2019. A statistical physics view of swarming bacteria. *Movement Ecology* 7(1): 9.
- Be'er, A., Zhang, H.P., Florin, E.L., Payne, S.M., Ben-Jacob, E. & Swinney, H.L. 2009. Deadly competition between sibling bacterial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(2): 428-433.
- Budič, M., Rijavec, M., Petkovšek, Ž. & Žgur-Bertok, D. 2011. *Escherichia coli* bacteriocins: Antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. *PLoS ONE* 6(12): e28769.
- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S. & Cavard, D. 2007. Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71(1): 158-229.
- Corning, P.A. 2022. A systems theory of biological evolution. *Biosystems* 214: 104630.
- dos Santos, A.L.S., Galdino, A.C.M., de Mello, T.P., de Souza Ramos, L., Branquinha, M.H., Bolognese, A.M., Columbano Neto, J. & Roudbary, M. 2018. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 113(9): e180212.
- Elbing, K.L. & Brent, R. 2019. Recipes and tools for culture of *Escherichia coli*. *Current Protocols in Molecular Biology* 125(1): e83.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A. & Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* 14(9): 563-575.
- Gibbs, K.A., Urbanowski, M.L. & Greenberg, E.P. 2008. Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. *Science* 321(5886): 256-259.
- Grafen, A. 1986. Natural selection, kin selection and group selection. *Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach*.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2(2): 95-108.
- Mavridou, D.A.I., Gonzalez, D., Kim, W., West, S.A. & Foster, K.R. 2018. Bacteria use collective behavior to generate diverse combat strategies. *Current Biology* 28(3): 345-355.e4.
- Ng, F.L. 2019. Clonal interaction between *Escherichia coli* ATCC 25922 colonies. PhD Thesis, Universiti Sains Malaysia.
- Niehus, R., Oliveira, N.M., Li, A., Fletcher, A.G. & Foster, K.R. 2021. The evolution of strategy in bacterial warfare via the regulation of bacteriocins and antibiotics. *eLife* 10: e69756.
- Paul, R., Ghosh, T., Tang, T. & Kumar, A. 2019. Rivalry in *Bacillus subtilis* colonies: Enemy or family? *Soft Matter* 15(27): 5400-5411.
- Platt, T.G. & Bever, J.D. 2009. Kin competition and the evolution of cooperation. *Trends in Ecology & Evolution* 24(7): 370-377.
- Portell, X., Pot, V., Garnier, P., Otten, W. & Baveye, P.C. 2018. Microscale heterogeneity of the spatial distribution of organic matter can promote bacterial biodiversity in soils: Insights from computer simulations. *Frontiers in Microbiology* 9: 1583.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. & Lejeune, P. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 181(19): 5993-6002.
- Ratiu, I.A., Ligor, T., Bocos-Bintintan, V., Al-Suod, H., Kowalkowski, T., Rafińska, K. & Buszewski, B. 2017. The effect of growth medium on an *Escherichia coli* pathway mirrored into GC/MS profiles. *Journal of Breath Research* 11(3): 036012.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9(7): 671-675.
- Serra, D.O., Richter, A.M. & Hengge, R. 2013. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *Journal of Bacteriology* 195(24): 5540-5554.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D'Ari, R. 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology* 189(23): 8746-8749.

- Soares, A., Gomes, L.C., Monteiro, G.A. & Mergulhão, F.J. 2021. The influence of nutrient medium composition on *Escherichia coli* biofilm development and heterologous protein expression. *Applied Sciences* 11(18): 8667.
- Sperotto, G., Stasiak, L.G., Godoi, J.P.M.G., Gabiatti, N.C. & De Souza, S.S. 2021. A review of culture media for bacterial cellulose production: Complex, chemically defined and minimal media modulations. *Cellulose* 28(5): 2649-2673.
- Tso, W.W. & Adler, J. 1974. Negative chemotaxis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 118(2): 560-576.
- Valero, P., Giannakis, S., Mosteo, R., Ormad, M.P. & Pulgarin, C. 2017. Comparative effect of growth media on the monitoring of *E. coli* inactivation and regrowth after solar and photo-Fenton treatment. *Chemical Engineering Journal* 313: 109-120.
- Varik, V., Oliveira, S.R.A., Hauryliuk, V. & Tenson, T. 2016. Composition of the outgrowth medium modulates wake-up kinetics and ampicillin sensitivity of stringent and relaxed *Escherichia coli*. *Scientific Reports* 6(1): 22308.
- Wade, M.J. 1985. Soft selection, hard selection, kin selection, and group selection. *The American Naturalist* 125(1): 61-73.
- Wang, C.H. & Koch, A.L. 1978. Constancy of growth on simple and complex media. *Journal of Bacteriology* 136(3): 969-975.
- Williams, P. 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153(12): 3923-3938.
- Xavier, J.B. & Foster, K.R. 2007. Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(3): 876-881.
- Zhao, X., Yu, Z. & Ding, T. 2020. Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria. *Microorganisms* 8(3): 425.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: clng@ukm.edu.my



RAJAH S1. Perbandingan kadar pertumbuhan purata EC 25922 pada agar medium LB dan M9, *EC-In* dan *EC-Out* pada agar medium LB dan M9 masing-masing. Purata dan sisihan piawai kadar pertumbuhan EC 25922 pada agar medium LB dan M9 ditunjukkan dalam graf. (A) Perbezaan yang signifikan antara kadar pertumbuhan *E. coli* pada agar LB dan M9 dengan nilai $p = 0.0323$, (B) perbezaan yang signifikan antara kadar pertumbuhan purata *EC-In* dan *EC-Out* pada agar medium LB dengan nilai $p = 0.0081$ dan (C) perbezaan yang signifikan antara kadar pertumbuhan purata *EC-In* dan *EC-Out* pada agar medium M9 dengan nilai $p = 0.0276$. Perbandingan kadar pertumbuhan purata EC 25922 telah menggunakan ujian t bebas tanpa pasangan dengan pembetulan Welch