

Inhibicija patogenih biofilmova pomoću metabolita divljih sojeva bakterija roda *Bacillus*

Dinković, Iris

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:253319>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Iris Dinković
0058219188

**INHIBICIJA PATOGENIH BIOFILMOVA POMOĆU METABOLITA DIVLJIH
SOJEVA BAKTERIJA RODA *BACILLUS***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: dr. sc. Deni Kostelac

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Inhibicija patogenih biofilmova pomoću metabolita divljih sojeva bakterija roda *Bacillus* Iris Dinković, 0058219188

Sažetak: Rod *Bacillus* obuhvaća velik broj bakterija različitih fizioloških i morfoloških karakteristika, koje imaju sposobnost sinteze mnogih komercijalnih proizvoda, poput enzima i vitamina, ali i mnoštvo molekula s antimikrobnom aktivnosti. Neistraženi sojevi ovoga roda potencijalni su producenti novih antimikrobnih metabolita, koji bi se mogli koristiti u suzbijanju infekcija i kontaminacija uzrokovanih tvorbom patogenih biofilmova. Poseban problem predstavljaju mikroorganizmi otporni na postojeće antibiotike i dezinfekcijska sredstva. Stoga je cilj ovog rada bio izolirati tri soja bakterija roda *Bacillus* iz uzoraka zemlje, ispitati njihova antimikrobna svojstva te potencijal njihovih metabolita u inhibiciji biofilmova nekih od najčešćih patogenih bakterijskih vrsta. Rezultati su pokazali da je najbolje antimikrobno djelovanje imao soj BCS-01, inhibirajući rast patogena *Staphylococcus aureus* za 43 %. Također, snažan inhibitorski učinak na formaciju biofilmova patogena imali su metaboliti prisutni u 5 %-tnom supernatantu uzgojnog medija soja BCS-03, koji su kod *S. aureus* postigli stupanj inhibicije od čak 82,2 %.

Ključne riječi: *Bacillus*, metaboliti, biofilm, patogeni, antimikrobna svojstva

Rad sadrži: 29 stranica, 12 slika, 3 tablice, 33 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr. sc. Deni Kostelac

Datum obrane: 17. lipnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Inhibition of pathogenic biofilms using metabolites of wild strains *Bacillus* bacteria
Iris Dinković, 0058219188

Abstract: The genus *Bacillus* includes many different species of bacteria with different physiological and morphological characteristics, which can synthesize many commercial products, such as enzymes and vitamins, but also many different molecules with antimicrobial activity. Unknown strains of this genus are potential producers of new antimicrobial metabolites that could be used to suppress infections and contaminations caused by the formation of pathogenic biofilms. However, microorganisms resistant to most of the commonly used antibiotics and disinfectants present a great problem. Therefore, this work aimed to isolate three strains of *Bacillus* bacteria from samples of soil, and examine their antimicrobial properties, as well as the potential of their metabolites to inhibit the formation of biofilms of some of the commonest pathogenic bacterial species. The results showed that strain BCS-01 had the highest antimicrobial activity, inhibiting the growth of the pathogen *Staphylococcus aureus* by 43%. Also, the metabolites present in a 5% cell-free supernatant of the BCS-03 strain achieved an inhibition rate of as much as 82.2% with *S. aureus* biofilm.

Keywords: *Bacillus*, metabolites, biofilm, pathogens, antimicrobial activity

Thesis contains: 29 pages, 12 figures, 3 tables, 33 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Deni Kostelac, PhD

Thesis defended: June 17th, 2024

Zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Deniju Kostelcu na predloženoj temi i nesebičnom vođenju kroz cijeli postupak izrade završnog rada. Također, jedno veliko hvala tehničarkama u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Ines i Vesni, na pomoći prilikom rada i uvijek ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Bakterije roda <i>Bacillus</i>	3
2.2. Funkcionalna svojstva roda <i>Bacillus</i>	4
2.3. Antimikrobni mehanizmi bakterija roda <i>Bacillus</i>	5
2.3.1. Djelovanje na staničnu stijenku	5
2.3.2. Djelovanje na staničnu membranu	5
2.3.3. Djelovanje na vitalne stanične procese	5
2.3.4. Utjecaj na quorum sensing sustav	5
2.4. Bakterijski biofilmovi	6
2.4.1. Biofilmovi – proces nastanka i njihov sastav	6
2.4.2. Dosadašnje strategije inhibicije bakterijskih biofilmova	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. Materijali	9
3.1.1. Prikupljanje uzoraka	9
3.1.2. Mikroorganizmi	9
3.1.3. Hranjive podloge	9
3.1.4. Kemikalije	10
3.1.5. Aparatura i pribor	10
3.2. Metode	11
3.2.1. Izolacija	11
3.2.2. Katalaza test	11
3.2.3. Složeno (diferencijalno) bojanje po Gram-u	11
3.2.4. Priprema radnih otopina bakterija roda <i>Bacillus</i>	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. Aktivnost enzima katalaze kod izolata bakterija roda <i>Bacillus</i>	15
4.2. Morfološke karakteristike izolata bakterija roda <i>Bacillus</i>	15

4.3.	Antimikrobna aktivnost dobivenih izolata bakterija roda <i>Bacillus</i>	16
4.4.	Sposobnost inhibicije formiranja biofilmova patogeno uz pomoć supernatanata uzgojnog medija bakterijskih izolata roda <i>Bacillus</i>	18
4.5.	Klasifikacija biofilmova.....	22
5.	ZAKLJUČCI	26
6.	POPIS LITERATURE	27

1. UVOD

Bakterijske vrste roda *Bacillus* imaju velik značaj za današnje industrijske procese, bilo da se radi o prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji (Schallmey i sur., 2004). Taj rod bakterija uključuje velik broj metabolički i fiziološki različitih mikroorganizama, koje karakterizira otpornost na nepovoljne uvjete, brzi rast, velika gustoća stanica te proizvodnja širokog spektra metabolita (Harirchi i sur., 2022). Kako su bakterije ovog roda većinom izolirane iz zemlje, sinteza različitih antimikrobnih i antifungalnih supstanci jedan je od načina na koji te vrste prirodno osiguravaju svoje mjesto u biološkoj niši te konkuriraju ostatku mikrobne populacije u borbi za resurse. Osim enzima, aminokiselina, vitamina i površinski aktivnih tvari, bakterije toga roda karakterizira proizvodnja bioaktivnih komponenti, poput malih antimikrobnih peptida (AMP) te bakteriocina, a neke vrste mogu proizvoditi antibiotike (Harirchi i sur., 2022). Mali antimikrobni peptidi, osim antibakterijskog, pokazuju još i antitumorno i antifungalno djelovanje. Izolacija novih *Bacillus* sojeva iz različitih okoliša te identificiranje antimikrobnih komponenti koje oni sintetiziraju otvara mnogo mogućnosti za tretiranje patogenih biofilmova, odnosno suzbijanje antibiotičke rezistencije, koja trenutno predstavlja velik problem u zdravstvenim ustanovama diljem svijeta.

Bakterijski biofilmovi kompleksne su tvorbe, koje nastaju povezivanjem bakterijskih stanica i izvanstaničnih polimernih tvari (eng. *EPS – Extracellular Polymeric Substances*) i njihovim vezanjem za neku živu ili neživu površinu (Muhammad i sur., 2020). Kod patogenih bakterijskih vrsta ustanovljeno je da je tvorba biofilma povezana s razvojem bolesti te da može dovesti do kroničnih infekcija (Vestby i sur., 2020). Stvaranje biofilmova velik je problem u zdravstvu, s obzirom na to da su bakterijske stanice unutar biofilma otpornije na nepovoljne uvjete i štite se od djelovanja antibiotika, antimikrobnih agenasa te sredstava za dezinfekciju. Neki od najčešćih ljudskih patogena također tvore biofilme (Muhammad i sur., 2020). Bakterija *Escherichia coli*, inače dio crijevnog mikrobioma u ljudi, dolaskom u urinarni trakt uzrokuje infekcije koje mogu imati ozbiljne posljedice (Meštrović, 2013). Stvaranje biofilma *E. coli* pridonosi nastanku težih infekcija, a površinska kolonizacija na medicinskoj opremi i uređajima otežava liječenje (Sharma i sur., 2016). *Staphylococcus aureus* je bakterija koja je odgovorna za izazivanje različitih oboljenja, od kožnih infekcija i infekcija mekog tkiva pa sve do po život opasne septikemije (Idrees i sur., 2021). Tvorba biofilma tom patogenu omogućava ekspresiju virulencije te otpornost na antibiotike i druge antimikrobne lijekove. Osobito su opasne infekcije izazvane meticilin-rezistentnim sojevima (MRSA). *Listeria monocytogenes* i *Salmonella Typhimurium* patogeni su koji se prenose hranom (Muhammad i sur., 2020).

S. Typhimurium smatra se najčešćim uzročnikom trovanja hranom u zapadnim zemljama (Jørgensen i sur., 2013), dok je *L. monocytogenes* odgovorna za izazivanje listerioze, bolesti koja može uzrokovati upalu moždane ovojnice i druge ozbiljne infekcije ovisno o zahvaćenom području (Meštrović, 2011). Njihova prisutnost u pogonima za proizvodnju prehrambenih proizvoda veliko je opterećenje za prehrambenu industriju i izazov za održavanje sigurnosti hrane. Rast biofilmova u takvim postrojenjima smatra se jednim od glavnih izvora opetovanih bakterijskih kontaminacija hrane (Lee i sur., 2019). Obzirom na navedeno, cilj ovog rada bio je ispitati inhibiciju patogenih biofilmova pomoću metabolita divljih sojeva bakterija roda *Bacillus*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije roda *Bacillus*

Bakterije su poznate još od 17. stoljeća, kada ih je prvi puta promatrao i opisao nizozemski prirodoslovac Antonie van Leeuwenhoek. Tek u 19. stoljeću Ferdinand Cohn započinje s detaljnijim istraživanjima bakterijskih vrsta i klasificira bakterije u nekoliko kategorija: *Sphaerobacteria* (okrugle) s rodom *Micrococcus*, *Microbacteria* (štapićaste) s rodom *Bacterium*, *Desmobacteria* (filamentozne) s rodovima *Bacillus* i *Vibrio* te *Spirobacteria* (uvijene) s rodovima *Spirillum* i *Spirochaeta* (Drews, 2000). Smatra se da je Cohn, predloživši temelje taksonomije bakterija, osnovao i *Bacillus* kao jedan od rodova.

Bakterije roda *Bacillus* morfološki se može opisati kao štapićaste, ravne ili blago zakrivljene, koje se u okolišu nalaze kao samostalne stanice ili združene u parove, tvoreći lance ili duže filamente (Logan i De Vos, 2009). Taj rod bakterija obuhvaća Gram-pozitivne i Gram-negativne vrste. Karakteristično je za rod *Bacillus* to da u neodgovarajućim uvjetima – bilo da se radi o nestašici hranjivih tvari u okolišu, nepovoljnom pH ili temperaturi – imaju sposobnost stvaranja spora (endospora). Spore su metabolički neaktivna tjelešca koja u svojoj srži sadrže DNA i RNA molekule, enzime, dipikolinsku kiselinu i kalcijeve katione, a okružene su s nekoliko zaštitnih slojeva (Harirchi i sur., 2022). Spora bakterijske stanice ostaje zaštićena od vanjskih uvjeta, poput degradacije enzimima, zračenja (UV), kemijskih agenasa, isušivanja, termičkih šokova i sl. Kada uvjeti u okolišu postanu povoljni, dolazi do germinacije spore i razvoja nove vegetativne bakterijske stanice. Svaka vegetativna stanica može formirati jednu sporu te ona može biti smještena u središnjem, paracentralnom, subterminalnom ili terminalnom dijelu stanice, a prema tome gdje se nalazi moguće je odrediti vrstu bakterije (Harirchi i sur., 2022).

Iako većinom izolirane iz zemlje, bakterije roda *Bacillus* zbog velike raznolikosti fizioloških svojstava moguće je pronaći i u zraku, vrućim izvorima (termofili), morskoj vodi (halofili), slatkovodnim jezerima, močvarnim područjima, na kamenim površinama, u pustinjama i probavnim sustavima životinja te su izolirani i neki klinički primjerci (Logan i De Vos, 2009; Harirchi i sur., 2022). Mogu rasti na neutralnim, alkalnim i kiselim područjima, a većina vrsta mezofili su koji preferiraju temperature od približno 30 °C. Međutim, zabilježeno je da podnose širok raspon temperatura, od -2 °C do 20 °C (psihrofili), pa sve do temperatura preko 50 °C (termofili) (Harirchi i sur., 2022). U prirodi većinom vrše ulogu saprofita i rijetko su povezane s izazivanjem bolesti u ljudi i životinja (Harirchi i sur., 2022). Nekoliko iznimaka uključuje vrste kao što su *Bacillus anthracis*, uzročnik antraksa, zatim *Bacillus cereus*, koji se smatra

odgovornim za bolesti povezane s trovanjem hranom, te *Bacillus thuringiensis*, patogen insekata koji se koristi kao biološki pesticid (Harirchi i sur., 2022). Međutim, danas se mnogo vrsta bakterija roda *Bacillus* koristi u raznim industrijskim procesima te su određeni sojevi dobili GRAS status (eng. *GRAS – generally regarded as safe*).

2.2. Funkcionalna svojstva roda *Bacillus*

Bacillus subtilis i srodni *Bacillus* sojevi smatraju se dominantnim mikroorganizmima za proizvodnju različitih enzima (Schallmey i sur., 2004). Varijabilnost vrsta, odnosno njihova sposobnost da rastu i provode reakcije u širokom rasponu pH vrijednosti, u kombinaciji s prisutnošću termofilnih bakterija u rodu, omogućava raznovrsnu primjenu i niz specifičnih aplikacija. Enzimi porijeklom iz tih mikroorganizama zauzimaju otprilike 50 % svjetskog tržišta komercijalnih enzima (Hirachi i sur., 2022), a većinom se radi o ekstracelularnim enzimima poput proteaza i amilaza za industrijsku upotrebu (Schallmey i sur., 2004). Alkalne proteaze, specifično serinske proteaze (suptilizin), našle su svoju primjenu u deterdžentima koji se koriste u kućanstvu, dok se neutralne proteaze koriste u industriji mlijeka i mliječnih proizvoda, pivskoj industriji te u pripremi stočne hrane (Schallmey i sur., 2004). Amilaze proizvedene pomoću *Bacillus* vrsta imaju najveću primjenu u prehrambenoj industriji za likvefakciju škroba te saharifikaciju, ali koriste se i u industriji papira te tekstilnoj industriji.

Budući da su bakterije roda *Bacillus* sporogene, povoljni su kandidati za istraživanje probiotičke aktivnosti jer dobro podnose procese prerade i skladištenja, ali i prolazak kroz gastrointestinalni trakt (Lu i sur., 2024). Probiotici koji sadrže određene *Bacillus* sojeve potencijalno bi se mogli koristiti za suzbijanje crijevne i nazalne infekcije kod ljudi, uzrokovane patogenom *S. aureus*, a takav probiotički pristup u liječenju infekcija imao bi značajne prednosti nad trenutnim terapijskim merodama koje su bazirane na upotrebi antibiotika (Lu i sur., 2024).

Već je od ranije poznat i potencijal roda *Bacillus* u proizvodnji antimikrobnih spojeva, a procjenjuje se da sojevima unutar vrste *B. subtilis* najmanje 4-5 % od ukupnog genoma zauzimaju geni koji kodiraju njihovu sintezu (Saxena i sur., 2019). Među antimikrobnim spojevima pronalazimo uglavnom peptidne molekule, koje mogu biti sintetizirane na ribosomima (ribosomski peptidi) ili na enzimskom kompleksu neribosomske peptid sintetaze (neribosomski peptidi), a tu spadaju i poliketidni spojevi, hlapljive komponente, surfaktanti itd. (Caulier i sur., 2019).

2.3. Antimikrobni mehanizmi bakterija roda *Bacillus*

2.3.1. Djelovanje na staničnu stijenk

Budući da stanice ljudi i životinja nemaju staničnu stijenk, stanična stijenk patogena potencijalno je ciljno mjesto djelovanja antimikrobnih metabolita. Pokazalo se da nekoliko *Bacillus* sojeva cilja upravo na tu strukturu otpuštanjem raznih enzima poput amilaza, glukanaza, proteaza itd. (Tran i sur., 2022). Glukozamin-6-fosfat sintetaza (G6PS) je enzim koji je odgovoran za sintezu prekursora peptidoglikana bakterijske stijenke. Metaboliti poput bacilizina i njegovih kloriranih derivata, izolirani iz određenih sojeva *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens*, pokazali su se uspješnima u suzbijanju širokog spektra bakterija, ulaskom u stanicu putem transmembranskih proteina te inhibirajući enzim G6PS i sintezu peptidoglikana (Tran i sur., 2022). Sličan mehanizam djelovanja ima i kanozamin, metabolit izoliran iz *B. cereus*, koji inhibira rast gljivice *Candida albicans* (Tran i sur., 2022).

2.3.2. Djelovanje na staničnu membranu

Stanična membrana je struktura građena od fosfolipidnog dvosloja i proteina. Fosfolipidni dvosloj kontrolira propusnost i strukturu membrane. Membrana je polarizirana, tako da s unutarnje strane prevladava negativni, a vanjske strane pozitivni naboj te ukoliko dođe do promjena u njezinom lipidnom sastavu ili narušavanja električnog potencijala, doći će do oslobađanja esencijalnih iona iz stanice te povećanja permeabilnosti, što na kraju može rezultirati smrću stanice (Casares i sur., 2019). Mehanizam djelovanja metabolita poput homopolimera ϵ -poli-L-lizina (*B. cereus*) uključuje elektrostatsko vezanje na fosfolipidni dvosloj i ometanje permeabilnosti, dovodeći tako do stanične smrti (Tran i sur., 2022). Metaboliti kao što su to neki aurantinini, produkti određenih sojeva *B. subtilis*, pokazali su se učinkovitima u suzbijanju rasta metiliclin-rezistentnog *Staphylococcus aureus*, uzrokujući lizu stanične membrane i istjecanje staničnog sadržaja (Tran i sur., 2022).

2.3.3. Djelovanje na vitalne stanične procese

Neki metaboliti mogu biti uneseni u bakterijsku stanicu, gdje se zatim vežu za ciljno mjesto koje je esencijalno stanici za njezino preživljavanje. Proces na koje djeluju takve molekule uključuju transkripciju DNA, translaciju te metabolizam proteina. Primjer takve molekule je zwittermicin A, pronađen u jednom soju *B. cereus*, koji djeluje kao inhibitor enzima giraze i topoizomeraze, koji su nužni za pravilno odvijanje transkripcije (Tran i sur., 2022).

2.3.4. Utjecaj na *quorum sensing* sustav

Pokazano je i da određeni metaboliti roda *Bacillus* djeluju na *quorum sensing* sustave (QS) komunikacije među stanicama, odnosno regulaciju ekspresije gena ovisno o gustoći kulture

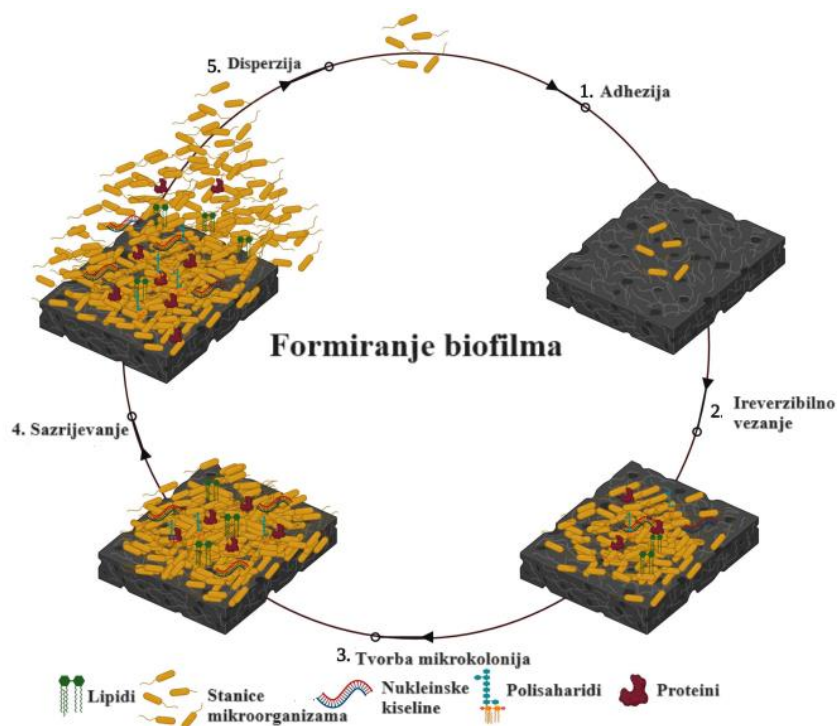
stanica i uvjetima u okolišu (Tran i sur., 2022). Za takav sustav komunikacije među stanicama potrebne su male signalne molekule, a utvrđeno je da taj sustav ima značajnu ulogu u virulenciji kod patogenih vrsta bakterija te u stvaranju biofilmova (Rutherford i Bassler, 2012). Metaboliti koje proizvode neke vrste *Bacillus* bakterija ometaju lučenje signalnih molekula te tako djelujući na *quorum sensing* sustav inhibiraju stvaranje biofilmova i ekspresiju virulencije (Tran i sur., 2022).

2.4. Bakterijski biofilmovi

2.4.1. Biofilmovi – proces nastanka i njihov sastav

Stvaranje bakterijskih biofilmova proces je koji se odvija u nekoliko faza (slika 1.). Početna faza obuhvaća prihvaćanje i reverzibilno vezanje bakterijskih stanica na površinu. Nakon toga slijedi ireverzibilno vezanje i tvorba mikrokolonija (više slojeva bakterijskih stanica), koje počinju sintetizirati komponente izvanstaničnog matriksa. Zatim slijedi sazrijevanje u kojem biofilm poprima tipičnu 3D strukturu (zreli biofilm). Zadnji korak obuhvaća disperziju, tj. dezintegraciju biofilma (Srinivasan i sur., 2021).

Ovisno o vrsti mikroorganizama koji tvore biofilm, ali i o uvjetima u okolišu (temperatura, pH, razina kisika) razlikuje se i sastav izvanstaničnog matriksa. Generalno, sastav matriksa obuhvaća proteine (<1 – 2 %), polisaharide (1 – 2 %), DNA (<1 %) i RNA (<1 %) te vodu (do 97 %), koja čini većinu matriksa jer djeluje kao medij za prijenos nutrijenata, signalnih molekula i sl. unutar biofilma. Bakterijske stanice unutar biofilma također mogu reagirati na promjene u okolišu tako da modificiraju sastav i kompoziciju izvanstaničnog matriksa kako bi se bolje prilagodile (Srinivasan i sur., 2021).



Slika 1. Proces formiranja bakterijskog biofilma (preuzeto i prilagođeno prema Srinivasan i sur., 2021)

2.4.2. Dosadašnje strategije inhibicije bakterijskih biofilmova

Degradacija biofilmova elektrokemijskim metodama pokazala se obećavajućom metodom za inhibiciju bakterijskih biofilmova. Takav pristup obuhvaća kombinaciju niže doze antibiotika i slabog električnog polja, koji djelujući sinergijski postižu veću permeabilnost bakterijskog biofilma i ulazak biocidnih iona u stanice (Srinivasan i sur., 2021).

Nadalje, kako izvanstanični matriks sadrži polisaharide kao jednu od osnovnih komponenti, učinkovitom se pokazala i metoda disperzije bakterijskog biofilma tretmanom enzimima. Postoje određeni enzimi poput polisaharid-liaza i DNAza, koji su u mogućnosti narušiti strukturu biofilmova. DNAza I i disperzin B funkcioniraju kao dobri anti-biofilm agensi. DNAza I ima sposobnost razgradnje ekstracelularne DNA (eDNA), koja je prisutna u strukturi izvanstaničnog matriksa, dok disperzin B djeluje tako da cijepa gradivne polimere ekstracelularnih polisaharida, koji imaju ulogu u povezivanju bakterija unutar biofilma. Jače djelovanje protiv biofilmova postiže se kombiniranjem antimikrobnih sredstava i enzima (Roy i sur., 2017).

Velik su problem u zdravstvu biofilmovi koji se mogu razviti na medicinskim alatima i uređajima. U prehrambenoj industriji problem su biofilmovi nastali na dijelovima postrojenja (cjevovodi). Iako postoje baktericidna sredstva kojima je moguće obložiti površine kako bi se spriječila formacija biofilmova, većina ih je toksična i nepogodna za takvu upotrebu. Međutim,

u slučaju prehrambene industrije, učinkovitim se pokazalo prekrivanje izloženih površina komponentama poput silikona ili derivata fluoropolimera, koji omogućavaju glatke, neporozne, hidrofobne površine za koje je dokazana smanjena adhezija bakterijskih stanica. Također, komponente koje u svome sastavu sadržavaju srebro pokazale su se uspješnima prilikom inhibicije adhezije bakterijskih stanica na površinu te disrupcije zrelih biofilmova, zbog čega se takvi spojevi mogu potencijalno koristiti za dezinfekciju medicinskih uređaja, implantata, katetera i sl. (Roy i sur., 2017).

Obećavajući pristup u kontroli rasta biofilmova nude prirodni metaboliti određenih vrsta bakterija koji imaju antagonistički učinak. Stoga je cilj ovog rada bio izolirati bakterije roda *Bacillus* iz zemlje prikupljene na različitim lokacijama u Zagrebu te ispitati hoće li njihovi supernatanti prekonocnih kultura imati utjecaj na formaciju biofilmova nekih od najčešćih ljudskih patogena: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. Typhimurium* i *L. monocytogenes*. Osim utjecaja na tvorbu biofilmova, određivana je i antimikrobna aktivnost izoliranih sojeva *Bacillus* vrsta prema patogenima.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Prikupljanje uzoraka

Prikupljanje uzoraka provedeno je na različitim lokacijama u gradu Zagrebu. Za izuzimanje su odabrane tri nasumične lokacije: Čučerje, park Ribnjak te park Travno (Novi Zagreb). Uzorci zemlje uzeti su s dubine od otprilike 10 cm i prikupljeni su tijekom veljače 2024. godine. Uzorci mase 20 g prikupljeni su u kivete volumena 50 mL te dopremljeni u Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Odmah po dopremanju uzoraka u Laboratorij provedena je izolacija.

3.1.2. Mikroorganizmi

Iz komercijalnih zbirki mikroorganizama (The Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH i American Type Culture Collection) pribavljeni su standardni sojevi test-mikroorganizama korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti i inhibiciju biofilmova:

- *Escherichia coli* ATCC®25922™
- *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™
- *Salmonella Typhimurium* ATCC®29631™
- *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™

3.1.3. Hranjive podloge

Za održavanje i uzgoj bakterija roda *Bacillus* i test-mikroorganizama korištene su sljedeće hranjive podloge:

- HA (hranjivi agar) (Biolife, Milano, Italija) sastava:

pepton	15,0 g L ⁻¹
mesni ekstrakt	3,0 g L ⁻¹
NaCl	5,0 g L ⁻¹
K ₃ PO ₄	0,3 g L ⁻¹
agar	18,0 g L ⁻¹
destilirana voda	

pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/ 15 min
- HB (hranjivi bujon) (Biolife, Milano, Italija) – istog sastava kao i hranjivi agar, ali bez dodanog agara

3.1.4. Kemikalije

- etanol, 96 %-tni (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- glicerol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- kristal-violet 1 %-tna otopina (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- metanol (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- octena kiselina (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- deionizirana voda
- lugolova otopina (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- safranin (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- vodikov peroksid, 3 %-tna otopina (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- imerzno sredstvo (Roth, Karlsruhe, Njemačka)

3.1.5. Aparatura i pribor

- automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- centrifuga Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- spektrofotometar, Helios β UV-Vis (Unicam, Cambridge, UK)
- čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- Eppendorf tubice (2mL)
- Erlenmeyerove tikvice
- filteri za šprice „Minisart“, PTFE, 0,22 μ m (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- laboratorijske čaše
- menzura (100 mL)
- Petrijeve zdjelice (\varnothing 10 cm)
- štapići po Drigalskom
- tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- vibromješač EV-102 (Tehtnica, Slovenija)
- hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Kirchdorf, Njemačka)
- kivete (15 mL i 50 mL)
- mikrobiološka ušica
- mikrobiološke epruvete (16 \times 160 mm, 18 \times 180 mm)
- mikrotitarske pločice s 96, 24 i 12 jažica (Falcon, SAD)
- predmetna stakalca (Isolab, Wertheim, Njemačka)
- kapaljka

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija

Odvagan je po 1 gram zemlje iz svakog uzorka i stavljen u epruvetu s 9 mL deionizirane vode. Zatim su tako pripremljene originalne suspenzije razrijeđene 10 i 100 puta. Epruvete su stavljene u vodenu kupelj na 80 °C/ 15 min. Svi uzorci su zatim nacijepljeni na krute hranjive podloge i stavljeni u inkubator na 37 °C. Nakon 48 sati, odabrane pojedinačne kolonije precijepljene su na svježije krute hranjive podloge i stavljene u inkubator na 37 °C. Nakon 24 sata, porasle izolirane kolonije precijepljene su u tekuću hranjivu podlogu (slika 2.).



Slika 2. Izolirana kolonija iz uzorka zemlje (vlastita fotografija).

3.2.2. Katalaza test

Katalaza test provodi se na predmetnici tako što se dodaje jedna kap 3 %-tne otopine vodikova peroksida, a zatim se pomoću sterilne mikrobiološke ušice uzorak prekončne bakterijske kulture prenese s krute hranjive podloge na predmetnicu. Pojava šuma i mjehurića plina uslijed enzimskog cijepanja vodikova peroksida (pjenjenje) potvrđuje pozitivan test.

3.2.3. Složeno (diferencijalno) bojanje po Gram-u

Predmetnicu je prvo potrebno odmastiti provlačeći ju par puta sa svake strane kroz plamen. Zatim se na predmetnicu dodaje kap deionizirane vode te se na to sterilnom mikrobiološkom ušicom nanese malo prekončne bakterijske kulture porasle na hranjivom agaru. Ušicom je potrebno razvući kapljicu po predmetnici u što tanjem sloju te ostaviti na zraku da se osuši. Pripravak je potrebno fiksirati držeći predmetnicu par sekundi iznad plamena. Na ohlađeni pripravak je onda potrebno nanijeti prvo bojilo – 1 %-tnu otopinu kristal violeta i pustiti da

odstoji 1 minutu. Na preparat se zatim nanosi lugolova otopina te ostavlja da stoji 1 minutu. Predmetnica se potom ispire 96 %-tnim etanolom te se preparat još jednom ispire pod mlazom vodovodne vode. Na tako vlažni pripravak dodaje se kontrastno bojilo – safranin i ostavlja da reagira 3-5 minuta. Pripravak se opet ispire pod mlazom vodovodne vode, a višak vode se ukloni staničevinom. Na tako pripremljeni preparat stavlja se kap imerzijskog ulja, a mikroskopiranje se provodi na imerzijskom objektivu pri povećanju 1000×.

3.2.4. Priprema radnih otopina bakterija roda *Bacillus*

Nakon prekonoćnog uzgoja u hranjivom bujonu, bakterijske stanice odvojene su od hranjive podloge centrifugiranjem pri 6000 okretaja min⁻¹ u trajanju od 15 min. Nakon centrifugiranja, supernatant je odvojen od taloga (bakterijskih stanica) i steriliziran preko filtera pomoću šprice.

3.2.5. Antimikrobna aktivnost dobivenih izolata bakterija roda *Bacillus* prema test-mikroorganizmima

Antimikrobna aktivnost supernatanta određena je na polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 96 jažica prilagođenim postupkom prema Frece i sur. (2011) i Ratsep (2014). Određena je antimikrobna aktivnost prema test-mikroorganizmima: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella* Typhimurium ATCC®29631™ i *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™.

U jažice mikrotitarske pločice dodano je 190 µL ispitivanog supernatanta bakterija roda *Bacillus*, 80 µL medija za patogene (hranjivi bujon) te su inokulirane s 10 µL prethodno uzgojenog ispitivanog test-mikroorganizma. Provedena je inkubacija na 37 °C tijekom 24 sata te je u intervalima mjerena apsorbancija na 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Praćen je rast u navedenom razdoblju te je izračunata inhibicija pomoću izraza:

$$\text{Inhibicija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \times 100 \quad [1]$$

gdje je:

A_t = apsorbancija u vremenu t

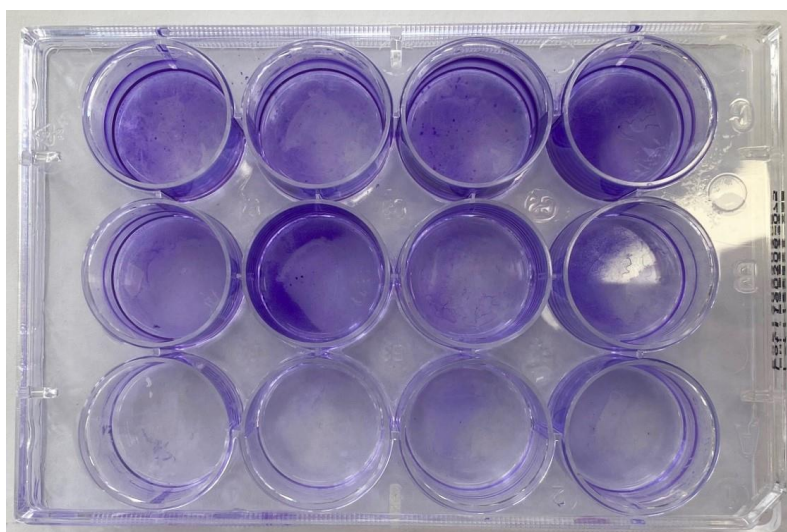
A_0 = apsorbancija u vremenu 0

Kontrolni uzorci sadržavali su 270 µL hranjivog bujona i 10 µL kulture test-mikroorganizama.

3.2.6. Inhibicija formiranja biofilmova patogena

Sposobnost inhibicije formiranja biofilmova patogena određena je prema metodi opisanoj u Kostelac i sur. (2021). Ispitivani supernatanti bakterija roda *Bacillus* klasificirani su prema jačini inhibicije biofilmova patogena formiranih nakon inkubacije 24 sata.

Sposobnost inhibicije ispitivana je u polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 12 jažica dodano je 1900 μL hranjvog bujona i 100 μL supernatanta za 5 %-tnu koncentraciju te 1600 μL hranjvog bujona i 400 μL supernatanta za 20 %-tnu koncentraciju. Uzorci su naciepljeni sa 100 μL suspenzije prethodno uzgojenih test-mikroorganizama. Pločice su inkubirane na 37 $^{\circ}\text{C}$ tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, sadržaj jažica je ispražnjen pažljivim pipetiranjem kako bi se izbjeglo grebanje dna jažica. Nastali talog bakterijskih stanica ispran je s 2 mL sterilne vode uz lagano miješanje. Preostale stanice (adhezirane u biofilm) fiksirane su dodatkom 2 mL metanola te inkubacijom tijekom 15 min. Nakon fiksiranja, metanol je uklonjen i pločice su osušene na zraku. Adhezirane stanice obojane su dodatkom 1 %-tnog kristal violeta tijekom 5 min, te je višak boje uklonjen temeljitim ispiranjem deioniziranom vodom (slika 3). Dodatkom 2 mL 33 % octene kiseline otpuštena je vezana boja te je mjerena optička gustoća (OD) pri 620 nm pomoću spektrofotometra. Uzorci bez dodanog supernatanta uzgojnog medija korišteni su kao negativna kontrola.



Slika 3. Mikrotitarska pločica prilikom kvantifikacije biofilma test-mikroorganizama u prisutnosti supernatanta kulture odabranih izolata bakterija roda *Bacillus*, nakon tretiranja kristal violetom i ispiranja (vlastita fotografija).

Dobivene vrijednosti optičke gustoće (OD) uspoređene su s optičkom gustoćom negativne kontrole (ODC). Korišteni sojevi potom su klasificirani prema Borges i sur. (2012), a klasifikacije su prikazane u tablici 1.

Tablica 1. Klasifikacija formacije biofilмова usporedbom optičke gustoće uzorka i negativne kontrole (prema Borges i sur. 2012)

Usporedba OD i ODC vrijednosti	Klasifikacija proizvodnje biofilma
OD < ODC	nema formacije biofilma
ODC < OD < 2×ODC	slaba formacija biofilma
2×ODC < OD ≤ 4×ODC	umjerena formacija biofilma
4×ODC < OD	jaka formacija biofilma

3.2.7. Statistička obrada podataka

Rezultati eksperimenata izraženi su kao srednje vrijednosti ponovljenih eksperimenata ± standardna devijacija. Statističke razlike među ponavljanjima te usporedbe među uzorcima određene su t-testom, a statistička značajnost postavljena je na $p < 0,05$. Za statističku obradu podataka korišten je program Excel i MedCalc statistički kalkulator (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija).

4. REZULTATI I RASPRAVA

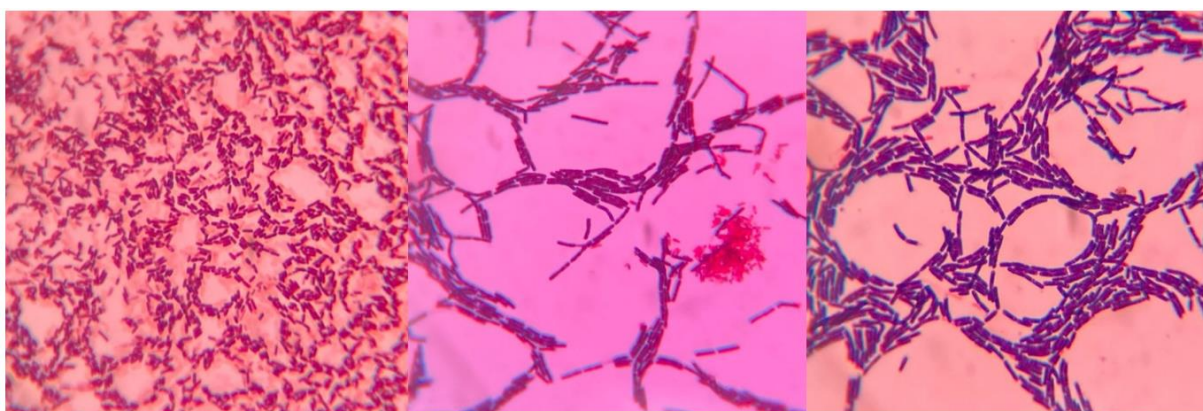
U ovom radu određen je potencijal izolata bakterija roda *Bacillus* u inhibiciji patogenih test-mikroorganizama te je kvalitativno i kvantitativno određeno koliko su metaboliti izolata proizvedeni tijekom rasta uspješni u inhibiciji formacije patogenih biofilmova. Otkriće i primjena novih sojeva te njihovih metabolita uvelike bi pomogla u suzbijanju kontaminacije u prehrambenoj industriji i sprječavanju formacije biofilmova patogena na medicinskim uređajima i površinama u zdravstvenim ustanovama.

4.1. Aktivnost enzima katalaze kod izolata bakterija roda *Bacillus*

Katalaza testom određeno je prisustvo enzima katalaze procjenom aktivnosti na vodikovom peroksidu kao primarnom supstratu. Od tri izolata, samo je soj BCS-01 pokazao katalitičku aktivnost, odnosno posjeduje enzim katalazu, dok izolati BCS-02 i BCS-03 nisu pokazali pozitivni katalaza test. Katalaza test svrstava se među najčešće korištene biokemijske testove koji se provode pri identifikaciji bakterijskih vrsta, s obzirom na jednostavnost izvedbe i nisku cijenu (Aslanzadeh, 2006). Iako većina *Bacillus* bakterija sintetizira katalazu, neki sojevi ipak ne posjeduju tu sposobnost (Logan i De Vos, 2009).

4.2. Morfološke karakteristike izolata bakterija roda *Bacillus*

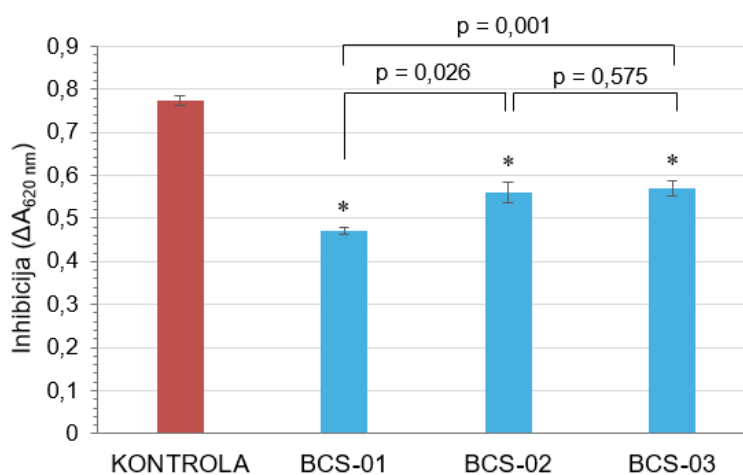
Bojanjem po Gram-u utvrđeno je da su svi izolirani sojevi Gram-pozitivni (G⁺). Stanice gram-pozitivnih bakterijskih vrsta, gledane pod mikroskopskim uvećanjem (1000 \times), poprimaju ljubičasto-plavo obojenje (slika 4). Rezultati upućuju na staničnu stijenku građenu od višeslojnog peptidoglikana, na koji su u bakterija roda *Bacillus* često kovalentno vezani anionski polimeri kao što je teihoična kiselina (Angeles i Scheffer, 2021).



Slika 4. S lijeva na desno pod mikroskopskim uvećanjem od 1000 \times , rezultati bojanja po Gram-u pokazuju da sojevi BCS-01, BCS-02 i BCS-03 pripadaju Gram-pozitivnim *Bacillus* vrstama (vlastita fotografija).

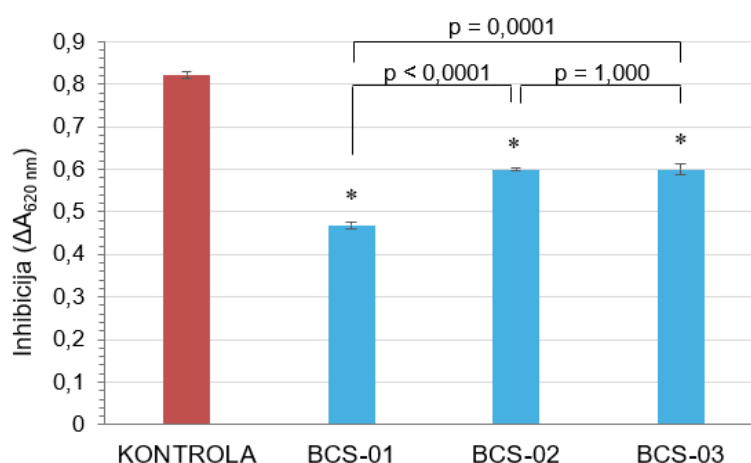
4.3. Antimikrobna aktivnost dobivenih izolata bakterija roda *Bacillus*

Kako bi se odredio potencijal dobivenih izolata i ispitala mogućnost primjene istih u inhibiciji patogenih bakterija, određena je antimikrobna aktivnost supernatanta uzgojnog medija na *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* te *L. monocytogenes*. Rezultati antimikrobne aktivnosti prikazani su na slikama 5 – 8. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancija kontrolnog i ispitivanog uzorka pri 620 nm ± standardna devijacija.



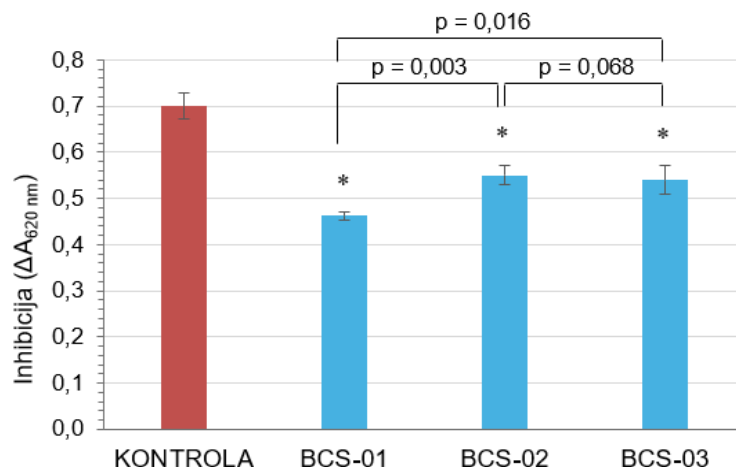
Slika 5. Antimikrobna aktivnost izoliranih sojeva bakterija roda *Bacillus* prema *E. coli* ATCC®25922™ tijekom 24 sata uzgoja na 37 °C.

*statistički značajno različito od kontrolnog uzorka ($p < 0,05$).



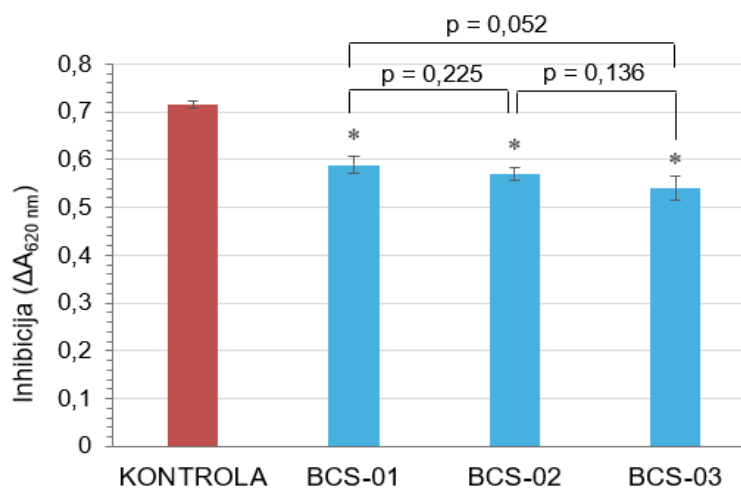
Slika 6. Antimikrobna aktivnost izoliranih sojeva bakterija roda *Bacillus* prema *S. aureus* ATCC®25923™ tijekom 24 sata uzgoja na 37 °C.

*statistički značajno različito od kontrolnog uzorka ($p < 0,05$).



Slika 7. Antimikrobna aktivnost izoliranih sojeva bakterija roda *Bacillus* prema *S. Typhimurium* ATCC®29631™ tijekom 24 sata uzgoja na 37 °C.

*statistički značajno različito od kontrolnog uzorka ($p < 0,05$).



Slika 8. Antimikrobna aktivnost izoliranih sojeva bakterija roda *Bacillus* prema *L. monocytogenes* ATCC®23074™ tijekom 24 sata uzgoja na 37 °C.

*statistički značajno različito od kontrolnog uzorka ($p < 0,05$).

Iz rezultata je vidljivo da je u slučaju *E. coli* postignuta statistički značajna inhibicija rasta u odnosu na kontrolu za sva tri ispitivana izolata (slika 5). Također, postoji statistički značajna razlika među sojevima BCS-01 i BCS-02 te sojevima BCS-01 i BCS-03 ($p < 0,05$). Ipak, najveću razinu inhibicije rasta od čak 39,1 % kod *E. coli* uzrokuje soj BCS-01.

U slučaju patogena *S. aureus*, rezultati pokazuju da je statistički značajna inhibicija primijećena za sva tri ispitivana uzorka *Bacillus* sojeva u odnosu na kontrolu (slika 6), dok je statistički značajna razlika primijećena između sojeva BCS-01 i BCS-02 te sojeva BCS-01 i

BCS-03 ($p < 0,05$). Kod *S. aureus* primijećen je i najveći stupanj inhibicije u odnosu na ostale ispitivane test- mikroorganizme, a iznosi čak 43 % te je postignut u prisutnosti BCS-01.

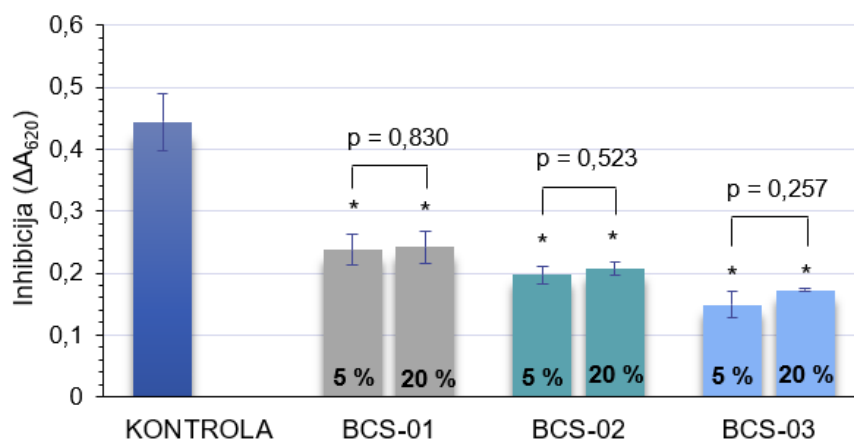
U skladu s tim rezultatima, u istraživanju koje su proveli Avcı i sur. (2017) ispitujući antimikrobnu aktivnost izolata bakterija roda *Bacillus* disk difuzijskom metodom, dokazano je antimikrobno djelovanje metabolita bakterija roda *Bacillus* prema patogenoj bakterijskoj vrsti *S. aureus*, a poznato je i da metaboliti nekih *Bacillus* sojeva imaju izrazito antimikrobno djelovanje prema metilicin-rezistentnim sojevima (Baharudin i sur., 2021).

Rezultati inhibicije rasta *S. Typhimurium* pokazuju da se sva tri ispitivana *Bacillus* soja statistički značajno razlikuju od kontrolnog uzorka (slika 7) te postoji statistički značajna razlika među sojevima BCS-01 i BCS-02 te BCS-01 i BCS-03 ($p < 0,05$). Soj koji je pokazao najveće antimikrobno djelovanje je BCS-01, inhibirajući rast stanica patogena za 34 %. Usporedno tomu, u istraživanju koje su proveli Gao i sur. (2011) također je dokazano antimikrobno djelovanje određenog soja *B. subtilis* prema nekoliko patogena, među kojima je najveća razina inhibicije rasta postignuta u slučaju *S. Typhimurium*.

Iz rezultata antimikrobne aktivnosti izolata prema *L. monocytogenes* uočeno je da se sva tri uzorka statistički značajno razlikuju od kontrole (slika 8). Međutim nema statistički značajne razlike među sojevima međusobno ($p < 0,05$). Najveća inhibicija rasta bakterijskih stanica *L. monocytogenes* postignuta je u prisutnosti soja BCS-03, a iznosi 24, 5 %. Sličan stupanj inhibicije imaju i ostala dva soja. Usporedivi rezultati dobiveni su u istraživanju koje su proveli Avcı i sur. (2017), gdje je ispitano 13 sojeva bakterija roda *Bacillus* izoliranih iz zemlje (Turska) i krumpira te je utvrđeno da njihovi metaboliti imaju antimikrobni učinak na Gram – pozitivne i Gram – negativne patogene vrste, među kojima se posebno ističu *L. monocytogenes* te *E. coli* kod kojih je zabilježena najveća inhibicija rasta. U istom istraživanju došlo se do zaključka da sastav hranjive podloge (smanjena koncentracija glukoze) te temperatura i pH podloge uvelike utječu na produkciju antimikrobnih metabolita.

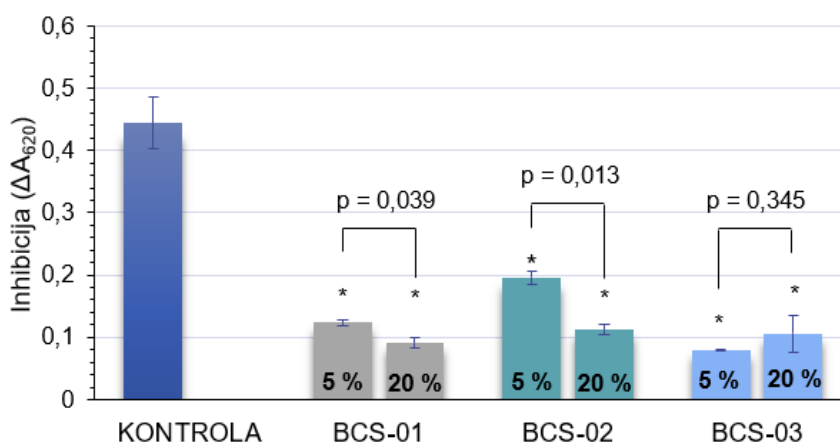
4.4. Sposobnost inhibicije formiranja biofilmova patogena uz pomoć supernatanta uzgojnog medija bakterijskih izolata roda *Bacillus*

Rezultati inhibicije biofilmova patogena uz pomoć supernatanta uzgojnog medija izolata bakterija roda *Bacillus* prikazani su na slikama 9. – 12. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancija uzoraka pri 620 nm \pm standardna devijacija.



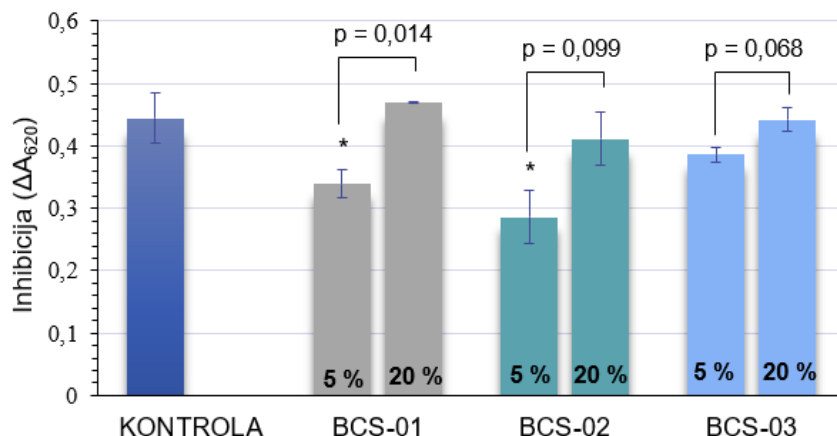
Slika 9. Djelovanje 5 %-tnog i 20 %-tnog supernatanta uzgojnog medija na tvorbu biofilma *E. coli* ATCC®25922™ tijekom 24 sata.

*statistički značajno različito od kontrolnog uzorka ($p < 0,05$).



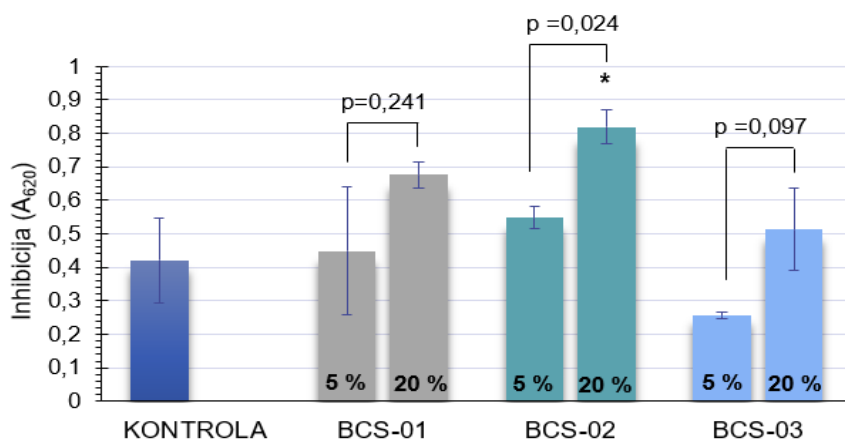
Slika 10. Djelovanje 5 %-tnog i 20 %-tnog supernatanta uzgojnog medija na tvorbu biofilma *S. aureus* ATCC®25923™ tijekom 24 sata.

*statistički značajno različito od kontrolnog uzorka ($p < 0,05$).



Slika 11. Djelovanje 5 %-tnog i 20 %-tnog supernatanta uzgojnog medija na tvorbu biofilma *S. Typhimurium* ATCC®29631™ tijekom 24 sata.

*statistički značajno različito od kontrolnog uzorka ($p < 0,05$).



Slika 12. Djelovanje 5 %-tnog i 20 %-tnog supernatanta uzgojnog medija na tvorbu biofilma *L. monocytogenes* ATCC®23074™ tijekom 24 sata.

*statistički značajno različito od kontrolnog uzorka ($p < 0,05$).

Rezultati za *E. coli* pokazuju da sva tri uzorka značajno inhibiraju formaciju biofilma i to u obje ispitane koncentracije (slika 9). Rezultati također ukazuju da nema statistički značajne razlike između ispitanih koncentracija unutar istog uzorka ($p < 0,05$). Najviši stupanj inhibicije postignut je u prisutnosti soja BCS-03, točnije korištenjem 5 %-tnog supernatanta uzgojnog medija tog soja, a inhibicija formacije biofilma patogena iznosila je čak 66,6 %. Međutim, u slučaju uzoraka BCS-02 i BCS-02 postignut je otprilike jednak stupanj inhibicije neovisno o koncentraciji korištenog supernatanta uzgojnog medija. U skladu s dobivenim rezultatima

inhibicije biofilma za *E. coli*, u istraživanju koje su proveli Cordisco i sur. (2023) također se pokazalo kako određeni metaboliti divljih sojeva bakterija roda *Bacillus*, izoliranih iz zemlje, inhibiraju formaciju biofilma. Spomenuti metaboliti interferiraju s mehanizmom sinteze amiloidnih vlakana, najbitnije komponente ekstracelularnog matriksa biofilma *E. coli*, uzrokujući tako gubitak kompleksne morfološke strukture i „zaštitnog sloja“ oko svake stanice unutar biofilma. Na taj način stanice postaju izložene djelovanju dezinfekcijskih agenasa ili lijekova.

Iz rezultata vezanih uz inhibiciju tvorbe biofilma bakterijske vrste *S. aureus* vidljivo je da se svi uzorci statistički značajno razlikuju u odnosu na kontrolu (slika 10), a u slučajevima uzoraka BCS-01 te BCS-02 postoji i statistički značajna razlika između korištenih koncentracija supernatanta uzgojnog medija ($p < 0,05$). Najviša inhibicija iznosi 82,2 %, a postignuta je s 5 %-tnim supernatantom uzgojnog medija soja BCS-03. U slučajevima gdje su korišteni metaboliti uzgojnog medija sojeva BCS-01 i BCS-02, uspješnijim se pokazala viša, tj. 20 %-tna koncentracija. Slični rezultati dobiveni su i u istraživanju koje su proveli Ray i sur. (2023) koristeći supernatante uzgojnog medija bakterija roda *Bacillus* na biofilmovima patogene vrsta *S. aureus*. Najučinkovitijima su se pokazali metaboliti vrste *B. thuringiensis*, kod kojih je zabilježena inhibicija biofilma *S. aureus* za čak 90 %, bez utjecaja na planktonski rast stanica. U jednakoj mjeri, metaboliti uzgojnog medija vrste *B. thuringiensis* utjecali su i na dispergiranje biofilma patogena. U istom istraživanju, ispitivana je i korelacija između stupnja inhibicije formacije biofilma i koncentracije supernatanta uzgojnog medija te je ustanovljeno da je pri višim koncentracijama razina inhibicija viša, dok je pri nižim koncentracijama slabija ili je gotovo nema.

Kod ispitivanja inhibicije patogenih biofilma u vrste *S. Typhimurium* (slika 11), kod samo dva uzorka zabilježena je statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, a radi se o 5 %-tnim supernatantima uzgojnog medija sojeva BCS-01 i BCS-02. Kod soja BCS-01 zabilježena je također značajna statistička razlika među različitim koncentracijama ($p < 0,05$). Najuspješnija inhibicija postignuta je s 5 %-tnim supernatantom uzgojnog medija soja BCS-02 i ona iznosi 35,6 %. U slučajevima kada je korištena viša koncentracija uzgojnog medija, kod sojeva BCS-02 i BCS-03 zabilježena je jako niska razina inhibicije, a kod soja BCS-01 nema inhibicije. Usporedivi rezultati dobiveni su u istraživanju koje su proveli Podnar i sur. (2022) gdje je određeni soj vrste *B. subtilis* uspješno inhibirao biofilm *S. Typhimurium* te je zaključeno da do najveće inhibicije rasta bakterijskih stanica kao i do najveće inhibicije tvorbe biofilma dolazi u uvjetima kada medij obiluje hranjivim tvarima. Takvi rezultati sugeriraju da *B. subtilis* antagonistički djeluje na druge bakterijske vrste u okolišu, sintetizirajući antimikrobne metabolite u natjecanju za resurse. Međutim, u uvjetima kada medij nije bogat hranjivim

tvarima ili postoji limitacija istim, *B. subtilis* nije inhibirao tvorbu biofilma i rast *S. Typhimurium*. Dakle, može se zaključiti da stupanj inhibicije ovisi i o uvjetima u okolišu, odnosno o dostupnosti hranjivih tvari.

Najmanje uspješan učinak inhibicije zabilježen je prema *L. monocytogenes* (slika 12), gdje rezultati pokazuju da je do inhibicije došlo samo u slučaju kada je korištena niža koncentracija uzgojnog medija soja BCS-03 i ona iznosi 39 %. Prilikom ispitivanja supernatanta uzgojnih medija sojeva BCS-02 i BCS-03 u obje koncentracije, nije zabilježena inhibicija nego značajni porast u formaciji biofilma. U istraživanju koje su proveli Lee i sur. (2021) ispitivan je inhibitorni učinak koji metabolit ϵ -polilizina ima na formaciju biofilma patogenih bakterijskih vrsta koje se prenose hranom, uključujući i *L. monocytogenes*. U radu je istaknuto kako je u tekućem TSB mediju (TSB – *triptozna sojin bujon*) inhibicija formacije biofilma *L. monocytogenes* pri $\frac{1}{2}$ MIK (MIK – *minimalna inhibicijska koncentracija*) ϵ -polilizina, iznosila 65 %. Pri višim koncentracijama također nije zabilježena inhibicija. Za taj metabolit, otkriveno je da ga osim plijesni, proizvodi i bakterijska vrsta *Bacillus cereus*, a svoju primjenu kao prirodni konzervans u prehrambenoj industriji već je pronašao u SAD-u, Južnoj Koreji i Japanu (Chheda i sur., 2014). Međutim, bitno je istaknuti kako *L. monocytogenes* i danas ostaje velik problem u postrojenjima prehrambene industrije zbog mehanizama rezistencije na postojeće antimikrobne agense i metode dezinfekcije. Zabilježeno je da bakterijske stanice *L. monocytogenes* imaju sposobnost izmjene genetskog materijala horizontalnim transferom gena međusobno i s drugim bakterijskim vrstama, što uvelike pridonosi rezistenciji na često korištene antimikrobne agense. Također, još jedan mehanizam uključuje postojanje efluks pumpi unutar bakterijskih stanica, posebnih membranskih proteina, uz pomoć kojih se antimikrobne molekule unesene u stanicu izbacuju natrag u okoliš i na taj način ne dolaze do ciljnog mjesta djelovanja (Chheda i sur., 2014).

4.5. Klasifikacija biofilmova

Sposobnost ispitivanih sojeva izoliranih iz zemlje da inhibiraju formaciju patogenih biofilmova obrađena je i klasificirana prema Borges i sur. (2012). Rezultati su prikazani u tablici 3, gdje je kvantifikacija i klasifikacija biofilmova određena za svaki ispitani test – mikroorganizam, korištenjem 5 %-tnog i 20 %-tnog koncentriranog supernatanta uzgojnog medija svakog soja, tijekom 24 sata na temperaturi od 37 °C. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti apsorbancije pri 620 nm za svaki uzorak \pm standardna devijacija.

Tablica 2. Rezultati mjerenja negativne kontrole, odnosno hranjive podloge. Klasifikacija biofilмова određena je uspoređivanjem rezultata mjerenja optičke gustoće uzorka i negativne kontrole.

ODC ^a :	0,089 ± 0,04
2×ODC:	0,178 ± 0,04
4×ODC:	0,356 ± 0,04

^a vrijednost negativne kontrole (samo podloga)

Tablica 3. Klasifikacija biofilмова test – mikroorganizama poraslih u prisutnosti pri 5 %-tnog i 20 %-tnog supernatanta uzgojnog medija izoliranih *Bacillus* sojeva.

Patogen	Ispitivani bakterijski soj	Koncentracija uzgojnog medija (%)	Rezultat (OD ^b)	Klasifikacija ^c
<i>E.coli</i>	BCS-01	5	0,238 ± 0,003	umjerena formacija biofilma
	BCS-02	5	0,197 ± 0,014	umjerena formacija biofilma
	BCS-03	5	0,149 ± 0,022	slaba formacija biofilma
	BCS-01	20	0,242 ± 0,026	umjerena formacija biofilma
	BCS-02	20	0,207 ± 0,011	umjerena formacija biofilma
	BCS-03	20	0,173 ± 0,003	slaba formacija biofilma
ODK^d:	0,4447 ± 0,045		jaka formacija biofilma	
<i>S. aureus</i>	BCS-01	5	0,124 ± 0,005	slaba formacija biofilma
	BCS-02	5	0,197 ± 0,011	umjerena formacija biofilma

	BCS-03	5	0,079 ± 0,002	nema formacije biofilma
	BCS-01	20	0,091 ± 0,08	slaba formacija biofilma
	BCS-02	20	0,113 ± 0,009	slaba formacija biofilma
	BCS-03	20	0,106 ± 0,031	slaba formacija biofilma
ODK^d:	0,444 ± 0,041		jaka formacija biofilma	
<i>S. Typhimurium</i>	BCS-01	5	0,339 ± 0,022	umjerena formacija biofilma
	BCS-02	5	0,286 ± 0,042	umjerena formacija biofilma
	BCS-03	5	0,387 ± 0,012	jaka formacija biofilma
	BCS-01	20	0,470 ± 0,002	jaka formacija biofilma
	BCS-02	20	0,412 ± 0,044	jaka formacija biofilma
	BCS-03	20	0,443 ± 0,019	jaka formacija biofilma
ODK^d:	0,444 ± 0,040		jaka formacija biofilma	
<i>L. monocytogenes</i>	BCS-01	5	0,449 ± 0,192	jaka formacija biofilma
	BCS-02	5	0,549 ± 0,034	jaka formacija biofilma
	BCS-03	5	0,257 ± 0,010	umjerena formacija biofilma
	BCS-01	20	0,677 ± 0,040	jaka formacija

				biofilma
	BCS-02	20	0,820 ± 0,050	jaka formacija biofilma
	BCS-03	20	0,513 ± 0,122	jaka formacija biofilma
ODK^d:	0,421 ± 0,128		jaka formacija biofilma	

^b vrijednost OD₆₂₀ za svaki uzorak; ^c klasifikacija biofilmova prema Borges i sur. (2012); ^d vrijednost pozitivne kontrole (samo kultura patogena)

Rezultati iz tablice 2 ukazuju da je svaki ispitivani test-mikroorganizam klasificiran kao jaki producent biofilmova. Međutim, u prisutnosti supernatanta uzgojnih medija izoliranih *Bacillus* sojeva, primijećeno je slabije formiranje biofilmova kod nekih patogena. U bakterije *E. coli*, klasifikacija biofilma bila je klasificirana kao slaba formacija biofilma u prisutnosti 5 %-tnog supernatanta uzgojnog medija soja BCS-03. Komplikacije vezane uz infekcije uzrokovane s *E. coli* povezane su sa sposobnošću tog patogena da tvori biofilme. Metaboliti koji ometaju njihovu formaciju, odnosno djeluju na procese kojima se bakterijske stanice vežu na površinu u inicijalnoj fazi pričvršćivanja za podlogu, moguće je spriječiti formaciju jakih biofilmova i olakšati liječenje (Sharma i sur., 2016). Kod bakterijske vrste *S. aureus* u prisutnosti 5 %-tnog supernatanta uzgojnog medija soja BCS-01 potpuno se izgubila formacija biofilma, što znači da je potrebno provesti daljnja ispitivanja u svrhu identifikacije metabolita s takvim djelovanjem. Lijekovi koji se danas koriste za tretiranje infekcija izazvanih patogenom *S. aureus* postaju djelomično ili čak potpuno neučinkoviti, s obzirom na to da ne mogu prodrijeti do ciljnog mjesta djelovanja zbog strukture biofilma unutar kojeg se nalaze stanice (Idrees i sur., 2021). Za formaciju biofilma *S. aureus* kodira 12 gena i njihova ekspresija ovisi o zrelosti biofilma, gustoći stanica i uvjetima u okolišu (Idrees i sur., 2021), zbog čega je svakako potrebno ispitivati kombinacije novih anti-biofilm metabolita različitih mehanizama djelovanja te njihove sinergijske učinke s postojećim lijekovima u svrhu otkrivanja novih metoda liječenja. Slabiji rezultati vidljivi su kod bakterijskih vrsta *S. Typhimurium* i *L. monocytogenes*, gdje gotovo da i nije bilo razlike u klasifikaciji biofilmova u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija i bez korištenja istih.

5. ZAKLJUČCI

1. Utvrđeno je da sva tri izolirana soja bakterija roda *Bacillus* pokazuju određeni stupanj antimikrobne aktivnosti prema svim test-mikroorganizmima. Najveća inhibicija rasta postignuta je korištenjem soja BCS-01 na *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™ i ona iznosi 43 %. Najmanji stupanj inhibicije rasta iznosio je 24,5 % i postignut je korištenjem soja BCS-03 na patogenu *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™.
2. Određena je sposobnost inhibicije formacije patogenih biofilmova s pomoću supernatanata uzgojnih medija izoliranih *Bacillus* sojeva, u 5 %-tnoj i 20 %-tnoj koncentraciji. Uspješnijima su se pokazali supernatanti uzgojnih medija u nižoj koncentraciji, specifično 5 %-tni supernatant uzgojnog medija kulture soja BCS-03 prema *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, inhibirajući formaciju biofilma za 82,2 %. Supernatanti uzgojnih medija sojeva BCS-02 i BCS-03 u koncentraciji od 20 % potaknuli su formaciju biofilma u slučaju patogena *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™.
3. Uspješno je kvantificirana i klasificirana formacija biofilmova za svaki test-mikroorganizam, u prisutnosti 5 % i 20 % koncentriranog supernatanta uzgojnog medija sva tri izolirana soja bakterija roda *Bacillus*. Svi test-mikroorganizmi klasificirani su kao jaki producenti biofilmova. Međutim, u prisutnosti 5 %-tnog supernatanta uzgojnog medija soja BCS-03, biofilm bakterije *Escherichia coli* ATCC®25922™ klasificiran je kao slabi biofilm. Također, najbolji rezultat postignut je u prisutnosti 5 %-tnog supernatanta uzgojnog medija soja BCS-01 na patogenu *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, gdje se potpuno izgubila formacija biofilma. U slučaju patogena *Salmonella* Typhimurium ATCC®29631™ i *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™ nije zamijećena promjena u formaciji biofilmova u prisutnosti supernatanata *Bacillus* sojeva.

6. POPIS LITERATURE

- Angeles DM, Scheffers DJ (2021) The Cell Wall of *Bacillus subtilis*. *Curr Issues Mol Biol* **41**, 539-596. <https://doi.org/10.21775/cimb.041.539>
- Aslanzadeh J (2006) Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. U: Tang YW i Stratton CW (ured.). *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, 1. izd., Springer, Boston, MA, str. 84–116.
- Avcı A, Çağrı-Mehmetoğlu A, Arslan D (2017) Production of antimicrobial substances by a novel *Bacillus* strain inhibiting *Salmonella* Typhimurium. *LWT* **80**, 265-270. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.030>.
- Baharudin MMA-a, Ngalimat MS, Mohd Shariff F, Balia Yusof ZN, Karim M, Baharum SN i sur. (2021) Antimicrobial activities of *Bacillus velezensis* strains isolated from stingless bee products against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* **16**, e0251514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251514>
- Borges S, Silva J, Teixeira P (2012) Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. *Antonie van Leeuwenhoek*, **101**(3), 677–682. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9666-y>
- Casares D, Escribá PV, Rosselló CA (2019) Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci* **20**(9), 2167. <https://doi.org/10.3390/ijms20092167>
- Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J (2019) Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Front Microbiol* **10**, 302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Chheda AH, Vernekar MR (2014) Improved production of natural food preservative ϵ -poly-L-lysine using a novel producer *Bacillus cereus*. *Food Biosci* **7**, 56–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2014.05.005>
- Cordisco E, Zanor MI, Moreno DM, Serra DO (2023) Selective Inhibition of the Amyloid Matrix of *Escherichia coli* Biofilms by a Bifunctional Microbial Metabolite. *npj Biofilms Microbiomes* **9**, 81. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00449-6>
- Drews G (2000) The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. *FEMS microbiology reviews* **24**, 225–249. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00540.x>
- Frece J, Markov K, Kovačević D (2011) Određivanje Autohtone Mikrobne Populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso : prvi hrvatski časopis o mesu*. **12**(2), 92–98.

- Gao X, Ma Q, Zhao L, Lei Y, Shan Y, Ji C (2011) Isolation of *Bacillus subtilis*: screening for aflatoxins B₁, M₁, and G₁ detoxification. *Eur Food Res Technol* **232**, 957–962. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1463-3>
- Harirchi S, Sar T, Ramezani M, Aliyu H, Etemadifar Z, Nojoumi SA, i sur. (2022) *Bacillales*: From Taxonomy to Biotechnological and Industrial Perspectives. *Microorganisms* **10**, 2355. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122355>
- Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A (2021) *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *Int J Environ Res Public Health* **18**, 7602. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147602>
- Kostelac D, Gerić M, Gajski G, Markov K, Domijan AM, Čanak I i sur. (2021) Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. *Int J Dairy Sci*, **112**, 104828. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104828>.
- Lee BH, Cole S, Badel-Berchoux S, Guillier L, Felix B, Krezdorn N, Hébraud M, Bernardi T i sur. (2019) Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* Strains Under Food Processing Environments and Pan-Genome-Wide Association Study. *Front Microbiol* **10**, 2698. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02698>
- Lee DU, Park YJ, Yu HH, Jung SC, Park JH, Lee DH i sur. (2021) Antimicrobial and Antibiofilm Effect of ϵ -Polylysine against *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* in Tryptic Soy Broth and Chicken Juice. *Foods* **10**, 2211. <https://doi.org/10.3390/foods10092211>
- Logan NA, De Vos P (2015) *Bacillus* ^t. U: Trujillo ME, Dedysh S, De Vos P, Hedlund B, Kämpfer P, Rainey FA Whitman WB (ured.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1. izd., John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's ManualTrust, str. 1 – 163.
- Lu S, Na K, Li Y, Zhang L, Fang Y, Guo X (2024) *Bacillus*-derived probiotics: metabolites and mechanisms involved in bacteria-host interactions. *Crit Rev Food Sci Nutr* **64**, 1701-1714. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2118659>
- MedCalc Software Ltd Comparison of means calculator (Verzija 22.023). https://www.medcalc.org/calc/comparison_of_means.php Pristupljeno 5. svibnja 2024.
- Meštrović T (2011) Listerioza – infekcija koja vreba iz hrane - Pliva zdravlje. <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/20966/Listerioza-infekcija-koja-vreba-iz-hrane.html> Pristupljeno 24. travnja 2024.

- Meštrović T (2015) *Escherichia coli* - Pliva zdravlje. <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/26315/Escherichia-coli.html> Pristupljeno 7. svibnja 2024.
- Muhammad MH, Idris AL, Fan X, Guo Y, Yu Y, Jin X i sur. (2020) Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Front Microbiol* **11**, 928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928>
- Podnar E, Erega A, Danevčič T, Kovačec E, Lories B, Steenackers H, i sur. (2022) Nutrient Availability and Biofilm Polysaccharide Shape the Bacillaene-Dependent Antagonism of *Bacillus subtilis* against *Salmonella* Typhimurium. *Microbiol Spectr* **10**, e0183622. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01836-22>
- Ray S, Jin JO, Choi I, Kim M. (2023) Cell-Free Supernatant of *Bacillus thuringiensis* Displays Anti-Biofilm Activity Against *Staphylococcus aureus*. *Appl Biochem Biotechnol* **195**, 5379-5393. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03971-z>
- Roy R, Tiwari M, Donelli, G, Tiwari V (2018) Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* **9**, 522–554. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
- Rutherford ST, Bassler BL (2012) Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a012427. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>
- Saxena AK, Kumar M, Chakdar H, Anuroopa N, Bagyaraj DJ (2020) *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *J Appl Microbiol* **128**, 1583-1594. <https://doi.org/10.1111/jam.14506>
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* **50**, 1–17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S i sur. (2016) *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol* **121**, 309–319. <https://doi.org/10.1111/jam.13078>
- Srinivasan R, Santhakumari S, Poonguzhali P, Geetha M, Dyavaiah M, Xiangmin L (2021) Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Front Microbiol* **12**, 676458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.676458>
- Tran C, Cock IE, Chen X, Feng Y (2022) Antimicrobial *Bacillus*: Metabolites and Their Mode of Action. *Antibiotics* **11**, 88. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010088>
- Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL (2020) Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics* **9**, 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>

Izjava o izvornosti

Ja _____ Iris Dinković _____ izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Iris Dinković
Vlastoručni potpis