

# Izolacija i karakterizacija bakterija roda *Streptomyces* za primjenu u inhibiciji odabranih patogena

---

Mišković, Ivona

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:159:433917>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Ivona Mišković**  
0058220731

**IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA BAKTERIJA RODA STREPTOMYCES ZA  
PRIMJENU U INHIBICIJI ODABRANIH PATOGENA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Mikrobiologija

**Mentor:** dr. sc. Deni Kostelac

**Zagreb, 2024.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## Izolacija i karakterizacija bakterija roda *Streptomyces* za primjenu u inhibiciji odabranih patogena

Ivona Mišković, 0058220731

**Sažetak:** Rod *Streptomyces* obuhvaća široku skupinu bakterija ključnih za razgradnju organskih tvari, fiksaciju dušika i proizvodnju važnih kemijskih spojeva. Pojedini pripadnici ove skupine imaju značajan genetski i metabolički potencijal za primjenu u farmaceutici. Navedene bakterije proizvode različite antibiotike, što ih čini ključnima u borbi protiv patogena, no prekomjerna upotreba antibiotika dovodi do razvoja otpornosti, naglašavajući potrebu za otkrivanjem novih sojeva ili alternativnih terapija. Bakterije roda *Streptomyces* dio su mikrosfere tla i imaju važnu ulogu u biološkim ciklusima tvari. Cilj rada bio je izolirati divlje sojeve bakterija roda *Streptomyces*, morfološki ih okarakterizirati, ispitati antimikrobna i koagregativna svojstva, te sposobnost inhibicije biofilмова patogena pomoću izvanstaničnih metabolita. Dobiveni rezultati pokazuju kako je najbolje antimikrobno djelovanje imao soj IM2, inhibirajući rast *Escherichia coli* za 31,5%. Također izolati roda *Streptomyces* postigli su najveći postotak inhibicije formacije biofilma kod *E. coli* koji je iznosio 88,5%.

**Ključne riječi:** *Streptomyces*, biofilm, antimikrobna svojstva, koagregacija

**Rad sadrži:** 28 stranica, 9 slika, 2 tablice, 41 literaturni navod

**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 Food Technology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

**Isolation and characterization of *Streptomyces* bacteria for application in the inhibition of selected pathogens**

**Ivona Mišković, 0058220731**

**Abstract:** The genus *Streptomyces* encompasses a wide group of bacteria that are crucial for the decomposition of organic matter, nitrogen fixation, and the production of important chemical compounds. Certain members of this group have significant genetic and metabolic potential for application in pharmaceuticals. These bacteria produce various antibiotics, making them key in the fight against pathogens. However, the excessive use of antibiotics leads to the development of resistance, highlighting the need for the discovery of new strains or alternative therapies. *Streptomyces* bacteria are part of the soil microenvironment and play an important role in the biological cycles of substances. The aim of this study was to isolate wild strains of *Streptomyces* bacteria, morphologically characterize them, examine their antimicrobial and coaggregative properties, and their ability to inhibit pathogenic biofilms using extracellular metabolites. The obtained results show that the strain IM2 had the best antimicrobial activity, inhibiting the growth of *Escherichia coli* by 31.5%. Additionally, *Streptomyces* isolates achieved the highest percentage of biofilm formation inhibition in *E. coli*, amounting to 88.5%.

**Keywords:** *Streptomyces*, biofilm, antimicrobial properties, coaggregation

**Thesis contains:** 28 pages, 9 figures, 2 tables, 41 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 17<sup>th</sup>, 2024.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. BAKTERIJE RODA STREPTOMYCES.....	2
2.2. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA.....	3
2.3. BIOFILMOVI.....	5
2.3.1. STRATEGIJE U SUZBIJANJU BIOFILMOVA.....	7
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>9</b>
3.1. MATERIJALI.....	9
3.1.1. PRIKUPLJANJE UZORAKA TLA S RAZLIČIH LOKACIJA NA ŠIREM ZAGREBAČKOM PODRUČJU.....	9
3.1.2. MIKROORGANIZMI.....	10
3.1.3. HRANJIVE PODLOGE.....	10
3.1.4. APARATURA I PRIBOR.....	10
3.1.5. KEMIKALIJE.....	11
3.2. METODE.....	11
3.2.1. IZOLACIJA BAKTERIJA IZ UZORAKA TLA.....	11
3.2.2. KATALAZA TEST.....	12
3.2.3. KOH TEST.....	12
3.2.4. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST PREMA ODREĐENIM PATOGENIMA.....	12
3.2.5. SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMOVA BAKTERIJSKIH IZOLATA.....	13
3.2.6. ODREĐIVANJE AUTOAGREGACIJSKE SPOSOBNOSTI DOBIVENIH IZOLATA.....	14
3.2.7. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI KOAGREGACIJE IZOLATA.....	14

<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>15</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>22</b>
<b>6. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>23</b>

## 1. UVOD

Rod *Streptomyces* obuhvaća veliku skupinu bakterija koje su ključne za mnoge biološke procese, uključujući razgradnju organskih tvari, fiksaciju dušika i proizvodnju važnih kemijskih spojeva. Ove bakterije su poznate po svojoj izuzetnoj raznolikosti gena i metabolita, što ih čini izuzetno korisnima u medicini, industriji i poljoprivredi (El-Naggar, 2021).

Jedna od najznačajnijih karakteristika *Streptomyces* bakterija je njihov ogroman antimikrobni potencijal. Proizvedeći različite antibiotike poput streptomycina, eritromicina i tetraciklina, ove bakterije su ključne u borbi protiv mnogih bolesti uzrokovanih patogenima. Međutim, zbog prekomjerne upotrebe antibiotika, dolazi do razvoja otpornosti patogena, što postavlja pitanje potrebe za otkrivanjem novih sojeva *Streptomyces* ili razvojem alternativnih terapija.

Njihova prisutnost u zemljištu je izuzetno raširena, budući da su ove bakterije tipični stanovnici tla. Upravo ta prisutnost u tlu doprinosi samom zdravlju tla i ciklusima hranjivih tvari, što ih čini ključnim elementom u održavanju ekosustava. Unatoč njihovoj korisnosti, postoje i problemi povezani s ovim bakterijama. Na primjer, neki sojevi mogu biti patogeni za biljke ili životinje, uzrokujući štete u poljoprivredi. Također, rezistencija na antibiotike postaje sve veći problem s obzirom na prekomjernu upotrebu ovih lijekova (Di Martino, 2022).

Osim toga, *Streptomyces* bakterije često formiraju biofilme, slojeve bakterija koje se mogu razviti na površinama kao što su medicinski uređaji ili oprema u prehrambenoj industriji. Ti biofilmovi mogu biti izuzetno teški za uklanjanje i predstavljaju ozbiljan izazov u medicini i industriji (Wu i sur., 2015).

Obzirom na navedeno cilj ovog rada bio je izolirati divlje sojeve bakterija roda *Streptomyces*, morfološki ih okarakterizirati, ispitati antimikrobna i koagregativna svojstva proizvedenih metabolita, ali i samih stanica bakterija prema čestim patogenima uzročnicima oboljenja. Nadalje, ispitana je sposobnost inhibicije biofilмова patogena pomoću izvanstaničnih metabolita bakterijskih izolata.

## 2. TEORIJSKI DIO

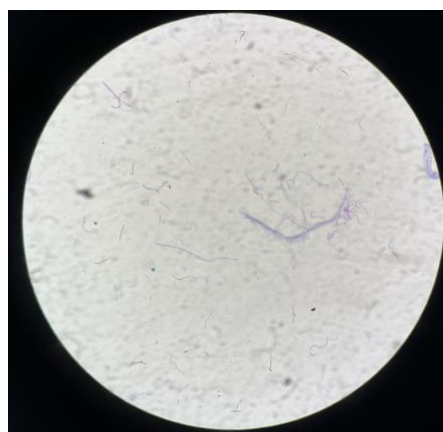
### 2.1. BAKTERIJE RODA STREPTOMYCES

*Streptomyces* je rod nitastih gram pozitivnih bakterija iz obitelji *Streptomycetaceae*, red *Actinomycetota*, koje su se razvile prije otprilike 450 milijuna godina (Chater, 2006). Pojavljuju u vodenim i kopnenim ekosustavima te uključuju više od 500 vrsta bakterija. *Streptomyces* su vrste važne u razgradnji organskih tvari u tlu, djelomično doprinoseći zemljanom mirisu tla te plodnosti tla (Britannica, 2022).

Poznato je da bakterije iz reda Actinomycetota obuhvaćaju različite oblike od kojih su neke jednostanične kuglice i štapići, dok su druge filamentozne. Članovi roda *Streptomyces* imaju najsloženiju strukturu. Njihov oblik podsjeća na nitaste gljive te rastu tvoreći končastu mrežu zvanu micelij s razgranatim hifnim filamentima. Razmnožavaju se na način sličan plijesni tako što šalju specijalizirane zračne grane koje se preoblikuju u lance spora, što je njihov mirujuć oblik s jednim kromosomom (Chater, 2006). Kada se povoljni uvjeti ponovno pojave, spore mogu klijati, formirajući vegetativni ili supstratni micelij, koji dalje razvija koloniju. Nedostatak hranjivih tvari potiče morfološke i fiziološke promjene u koloniji, potičući formiranje zračnog micelija koji koristi vegetativni micelij kao izvor hrane. Zračni micelij prvo ima neseptirane niti s mnogo kromosoma. Nakon uvijanja niti i spiralizacije, dolazi do odvajanja pojedinačnih kromosoma prilikom septiranja vrhova niti. Ovi septirani dijelovi niti stvaraju spore koje se mogu raspršiti. U ponovno povoljnim uvjetima, spore mogu započeti novi životni ciklus (Marić, 2009).



**Slika 1.** Kolonije *Streptomyces*  
(vlastita fotografija)



**Slika 2.** Mikroskopska snimka  
bakterija roda *Streptomyces*  
(vlastita fotografija)



Članovi roda *Streptomyces* od komercijalnog su interesa zbog svoje sposobnosti proizvodnje velikog broja biomolekula i bioaktivnih sekundarnih metabolita kao što su antifungici, antivirusni i antitumorski lijekovi, imunosupresivi, insekticidi, antiparazitski lijekovi te posebice antibiotici koji imaju široku primjenu ne samo u farmaceutske svrhe, nego i primjenu u medicini, poljoprivredi i veterini (El-Naggar, 2021).

Antibiotici su izuzetno važni metaboliti tih bakterija jer osiguravaju bakterijama neku vrstu zaštite tijekom interakcije s različitim mikroorganizmima, što im omogućuje da opstanu. Također, antibiotici igraju ključnu ulogu u simbiozi između *Streptomyces* bakterija i biljaka. Oni djeluju kao zaštita za biljku od različitih patogena, dok istovremeno biljka pruža okruženje pogodno za razvoj same bakterije. Ova simbioza omogućuje obostrano korisnu interakciju između bakterija i biljaka (Procópio i sur., 2012).

Pojedine vrste *Streptomyces* proizvode niz enzima koji su medicinski važni, uključujući L-asparaginazu, urikazu i kolesterol oksidazu, dok pojedine imaju veliku sposobnost proizvodnje aktivnih površinskih biomolekula uključujući bioemulgatore i biosurfaktante (El-Naggar, 2021). Streptomycin, antibiotik kojeg sintetizira organizam iz tla *Streptomyces griseus*, pokazao se izuzetno učinkovitim u liječenju tuberkuloze, jedne od najstrašnijih ljudskih bolesti uzrokovane bacilom tuberkuloze. (Hopwood, 2007). Streptomycin se ne apsorbira u probavnom sustavu te za liječenje gastrointestinalnih infekcija mora se primjenjivati redovitim intramuskularnim injekcijama. Djeluje tako što zaustavlja rast bakterija inhibicijom sinteze proteina. Ototoksičnost je glavni štetni učinak streptomicina koji može dovesti do trajnog gubitka sluha. Mnoge bakterije pokazale su otpornost na streptomycin, a njihova rezistencija može biti rezultat enzimske inaktivacije molekule streptomicina ili strukturne modifikacije same molekule (Grosset i Singer, 2013).

## **2.2. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA**

Antimikrobici su ključne terapijske tvari koje se primjenjuju radi prevencije ili tretiranja infekcija. Ovaj spektar uključuje antiseptike, antibiotike, antivirusne, antifungalne i antiparazitske agense. Dezinficijensi, s druge strane, su antimikrobna sredstva koja se koriste na neživim površinama. Njihov mehanizam djelovanja može uključivati uništavanje mikroorganizama i/ili inhibiciju njihovog rasta, ciljajući ključne procese u staničnom metabolizmu kao što su sinteza bioloških makromolekula, aktivnost enzima ili integritet staničnih struktura poput staničnih stijenki i membrana (Di Martino, 2022).

Otpornost antimikrobnog agensa ovisi o osjetljivosti mikroorganizma, temperaturi, koncentraciji upotrijebljene doze, vremenu izloženosti (djelovanju), broju mikroorganizama i okolišnim uvjetima (Frece, 2021).

Utjecaj antimikrobnih agensa na ekosustave, bilo prirodnim ili umjetnim putem, uvijek ima ekološke posljedice. Svake godine, tisuće tona antimikrobnih tvari i njihovih nusprodukata ispušta se u okoliš, posebice u vodene sustave. Kontinuirana izloženost mikrobnih populacija ne samo visokim, već i malim inhibicijskim koncentracijama antibiotika ključna je za razvoj antibiotske rezistencije u vodenom okolišu i tlu. Ovo dovodi do pojave bakterija otpornih na antibiotike i širenja genetskih čimbenika rezistencije (Di Martino, 2022). Bakterije koje su otporne na više lijekova, među kojima su patogeni (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter*), predstavljaju globalnu prijetnju zdravlju ljudi, mogu uzrokovati teške infekcije koje su izazovne za liječenje, što rezultira produženim razdobljem bolesti i povećanim rizikom od smrtnosti. Neravnoteža između sinteze i nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama i tkivima dokazano dovodi do oksidativnog stresa, što može rezultirati razvojem raka, kardiovaskularnih, bubrežnih i neuroloških bolesti (Rammali i sur., 2022).

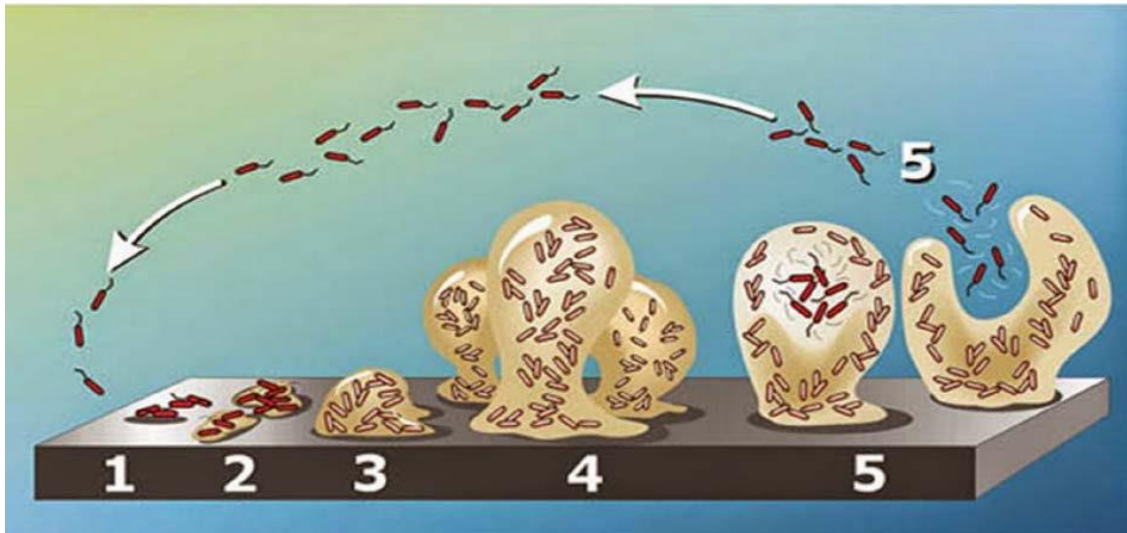
Razvoj nanočestica s antibakterijskim svojstvima predstavlja jedno od rješenja za suzbijanje bakterija koje su postale otporne na više antibiotika. Istraživanje interakcija između različitih mikroorganizama, bilo da su prokariotski ili eukariotski organizmi, predstavlja važan izvor novih otkrića u području antimikrobnih sredstava. Budućnost antimikrobnih lijekova leži u razvoju molekula iz bioloških izvora ili inspiriranih biološkim sustavima (Di Martino, 2022). Prirodne molekule mikrobnog podrijetla postale su glavni izvori za proizvodnju antibiotika koji se kontinuirano koriste. Trenutno se antibiotici smatraju neprocjenjivim alatom u suzbijanju zaraznih bolesti. No, pojava antimikrobne rezistencije, uz nedostatak novih antimikrobnih lijekova, predstavlja značajnu prijetnju za zdravlje ljudi i životinja. Ključni pristupi u borbi protiv antimikrobne rezistencije uključuju racionalnu uporabu antibiotika. Učinkovitost terapije antibioticima ovisi o mnogim faktorima, uključujući sam antibiotik, ciljni patogen i stanje tjelesnog sustava pacijenta. (Li i sur., 2017).

Antibiotici djeluju tako što inhibiraju sintezu stanične stijenke, povećavaju propusnost stanične membrane, inhibiraju aktivnost bakterijskih ribosoma te inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina (Frece, 2021). Procijenjeno je da čak 70% sekundarnih metabolita potječe iz mikrobnih izvora. Tlo, s obiljem ekoloških niša, dom je mnogih mikroba koji proizvode raznolike biomolekule s biološkom aktivnošću protiv različitih patogena. Bakterije iz roda *Streptomyces* su prepoznate kao potencijalni proizvođači sekundarnih metabolita, uključujući antibiotike, lijekove protiv

raka, antioksidanse, antimikrobne i imunosupresivne agense. Antibiotici dobiveni iz roda *Streptomyces* igraju ključnu ulogu u medicinskom sektoru, s obzirom na to da ovaj rod proizvodi oko 50% terapijski korisnih antibiotika (Rammali i sur., 2022).

### 2.3. BIOFILMOVI

Bakterije se prione na površinu i stvaraju organizirane zajednice unutar vlastitog stvorenog matriksa, koji se sastoji od izvanstaničnih polimernih tvari (EPS), poznatijeg kao biofilm (Carrascosa i sur., 2021). Proces stvaranja biofilma uključuje složenu prostornu i vremensku reorganizaciju bakterijskih stanica. Ovaj proces sastoji se od reverzibilnih i ireverzibilnih faza, koje mogu biti konzervirane ili specifične za određenu vrstu (Kostakioti i sur., 2013). Ciklus razvoja biofilma može se podijeliti u 5 faza (slika 3). U početku planktonske bakterije su pričvršćene na različite površine te se u bilo kojem trenutku mogu vratiti u stanje planktona. Ova faza se naziva reverzno pričvršćivanje. U sljedećoj fazi, ireverzibilno pričvršćivanje, bakterije tvore visoko organiziranu višestaničnu zajednicu putem izvanstaničnih polimernih tvari i ekstracelularnog matriksa. U ovoj fazi bakterije se čvrsto vežu za površinu i nemoguć je povratak u plutajuće stanje. Bakterije se okupljaju, rastu i razmnožavaju što predstavlja sljedeću fazu, odnosno početni razvoj arhitekture biofilma. Mikrobna zajednica nastavlja rasti i stapa se u mikrokolonije s trodimenzionalnim strukturama koje obično izgledaju poput gljive, ali svoj oblik mogu prilagoditi kako bi se bolje stopile s okolnim okolišem. Ovom fazom nastaje potpuno zreli biofilm. U posljednoj fazi, dolazi do povećavanja volumena samog biofilma te zbog nedostatka hranjivih tvari dolazi do rekonturiranja istog kako bi poboljšali životni okoliš. Na kraju, vrh biofilma se otvara i dolazi do disperzije bakterijskih stanica iz zrelog biofilma kako bi slobodne bakterije pokrenule nove biofilmove. U početnoj fazi, bakterije se oslanjaju na dodatke kao što su flagellum, pili i fimbrije kako bi plivale na površinu i smjestile se. Zatim izlučuju egzopolisaharide, izvanstaničnu DNA i proteine da se vežu s okolnim bakterijama (Kang i sur., 2023).



**Slika 3.** Shematski prikaz stvaranja biofilma. 1: Reverzno pričvršćivanje stanica na površinu. 2: Ireverzibilno pričvršćivanje bakterijskih stanica na površinu. 3: Početni razvoj arhitekture biofilma 4: Sazrijevanje arhitekture biofilma. 5: Disperzija bakterijskih stanica iz zrelog biofilma (preuzeto i prilagođeno prema Stoodley i sur. 2002).

Matriks biofilma uključuje polisaharide, proteine, izvanstaničnu DNA i RNA, lipide te druge biomolekule koje zajedno formiraju zaštitni i ljepljivi sloj oko zajednice. Biofilmovi pokazuju određena svojstva koja proizlaze iz interakcija unutar zajednice i s okolinom te se formiraju na različitim površinama, stvarajući stabilne spojeve koji otežavaju uklanjanje i povećavaju preživljavanje. Zreli biofilmovi su 3D strukture koji se prilagođavaju dostupnosti hranjivih tvari, koncentraciji kisika i pH vrijednosti. Unutar matrice biofilma omogućeno je kruženje i recikliranje hranjivih tvari, potičući time rast i opstanak mikroorganizama. Enzimi koje proizvode mikroorganizmi u biofilmu, kao i fizičke i kemijske interakcije, olakšavaju ovaj ciklus hranjivih tvari. Različiti mikrookoliši unutar biofilma mogu dovesti do pojavljivanja različitih podpopulacija mikroorganizama s istim genetskim materijalom, ali različitim ponašanjem i metabolizmom, što omogućuje zajednici da podijeli zadatke za optimalnu učinkovitost. Razmjena genetskog materijala unutar biofilma te kemijska signalizacija mogu dovesti do brzog stjecanja novih svojstava koja omogućuju prilagodbu zajednice promjenjivim uvjetima okoliša (Bamford, 2023).

Biofilmovi u tlu igraju ključnu ulogu u razgradnji organske tvari i oslobađanju hranjivih tvari poput dušika, fosfora i kalija, koji su bitni za biljni rast. Mikroorganizmi poput bakterija i mikoriznih gljiva stvaraju biofilme oko korijena biljaka, poznate kao rizosfera, uspostavljajući

korisne interakcije. Ovi biofilmovi poboljšavaju strukturu tla i zadržavanje vode, što olakšava pristup biljkama vodi i hranjivim tvarima. Biljke, zauzvrat, pružaju ugljikohidrate mikroorganizmima putem fotosinteze. Raznolikost bioloških funkcija biofilмова trenutno se istražuje u kontekstu detoksikacije ljudskih otpadnih proizvoda, uklanjanja pesticida i mikroplastike (Bamford, 2023).

Međutim, unatoč koristima, biofilmovi mogu donijeti i ozbiljne probleme u morskim ekosustavima gdje, posebno putem brodova koji prenose organizme iz jednog u drugo okruženje, uzrokuju rast invazivnih vrsta. To može imati negativne ekološke i ekonomske posljedice. Također, biofilmovi mogu izazvati probleme u oralnom zdravlju stvarajući zubni plak koji je glavni uzrok karijesa i bolesti desni. Osim toga, mogu pridonijeti kroničnim infekcijama povećavajući otpornost na antibiotike. Matriks biofilma pruža fizičku barijeru koja otežava prodor antibiotika do bakterijskih stanica unutar biofilma, dok bakterije unutar biofilma mogu razviti otpornost na antibiotike aktiviranjem gena koji pružaju otpornost na te lijekove (Bamford, 2023).

Primjerice, posljedica velikog širenja *E. coli* u prirodnom okolišu je njezina sposobnost da raste kao biofilm koji bakteriji daje znatno veću otpornost na dezinficijens. Trenutno ne postoji učinkovito sredstvo za sprječavanje stvaranja biofilma niti tretman za njegove infekcije, a liječenje antibioticima često povećava rizik od komplikacija poput zatajenja bubrega.

Također patogeni poput *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella spp.* mogu stvarati biofilme čime predstavljaju ozbiljnu prijetnju zdravlju budući da su bakterije u biofilmu otpornije na antibiotike i imunološki sustav domaćina, što rezultira kroničnim infekcijama i postepenim pogoršanjem zdravstvenog stanja samog domaćina (Carrascosa i sur., 2021).

### **2.3.1. STRATEGIJE U SUZBIJANJU BIOFILMOVA**

S obzirom na karakteristike razvoja biofilma, zreli biofilmovi pokazuju visoku otpornost na antibiotske kemoterapije i ponekad će osloboditi bakterijske stanice u okoliš. Stoga su infekcije uzrokovane biofilmom često kronične. Liječenje antibioticima može pomoći u kontroli, ali je teško potpuno iskorijeniti infekciju. U području medicine često dolazi do infekcija uzrokovanih biofilmovima nakon ugradnje implantata ili određenih medicinskih pomagala i uređaja (Wu i sur., 2015). Takve se infekcije najčešće liječe antibioticima kako bi se spriječio ponovni rast biofilma, međutim ukoliko nije moguće djelovati antibioticima zaraženo strano tijelo se uklanja te zaraženi uređaj zamjenjuje novim.

Inhibicija rasta biofilмова postaje značajan izazov kada bakterije uđu u drugu fazu i uspostave

ireverzibilno pričvršćivanje. Stoga je inhibicija početne bakterijske adhezije ključni način za kontrolu biofilmova i izbjegavanje veće krize. Jedna od široko rasprostranjenih strategija za suzbijanje biofilmova su i površinski premazi koji služe za prevenciju infekcija nastalih na implantatima (Kang i sur., 2023).

Važnu ulogu u životnim ciklusima bakterija i gljivica, koordinirajući ekspresiju gena i regulirajući virulentne čimbenike i infekcije, igra kvorumna signalizacija (QS). QS predstavlja ključni proces interakcije između stanica, omogućujući bakterijama da usklađuju svoje aktivnosti i djeluju kao koherentan tim. Ovaj mehanizam omogućava povećanje preživljavanja ukupne populacije u složenim okruženjima. Blokiranje QS-a kao strategija za sprečavanje formiranja biofilmova pokazuje se kao sigurna i održiva praksa (Kang i sur., 2023).

Također, nukleidna signalizacija, koja uključuje nukleotide kao sekundarne glasnike, kontrolira ključne procese u bakterijskoj prilagodbi i može utjecati na patogenost kao QS (Wu i sur., 2015). Regulatorno načelo koje upravlja c-di-GMP u većini bakterija je da pri niskim koncentracijama c-di-GMP pojačava pokretljivost bakterija i ekspresiju toksina dok visoka koncentracija c-di-GMP potiče ekspresiju faktora prijanjanja i stvaranje biofilma. Štoviše, koncentracija c-di-GMP unutar bakterija igra ključnu ulogu u određivanju hoće li bakterijske stanice započeti stvaranje biofilma ili ostati u planktonskom načinu rada kao pojedinačne stanice (Kang i sur., 2023). Modifikacija cikličkog diguanozim monofosfata (c-di-GMP) ključni je cilj istraživanja uz kontrolu QS-a za razvoj novih lijekova protiv biofilma (Wu i sur., 2015).

Osim QS i c-di-GMP-a, bakterijski amiloidi postaju zanimljiva tema istraživanja. Amiloidi su identificirani u bakterijama i gljivicama te omogućuju lijepljenje jedan na drugoga ili na površine domaćina, što potiče formiranje biofilma. Oštećenje amiloidnih struktura moglo bi pružiti novi pristup kontroli bakterijskih biofilmova (Wu i sur., 2015).

Uz amiloide, lektin također igra ključnu ulogu u stvaranju biofilma. On omogućava ugljikohidratima da se vežu na više mjesta što olakšava proces prepoznavanja među bakterijama i samu adheziju bakterija. Stoga, poremećaj funkcije ovog proteina može potencijalno spriječiti razvoj bakterija otpornih na lijekove i spriječiti proces sazrijevanja biofilma (Kang i sur., 2023).

S obzirom na rastuću otpornost na antibiotike, istraživanje bakteriofaga koji mogu ubiti antibiotik rezistentne bakterije dobiva sve veću pažnju kao potencijalna metoda prevencije samog biofilma (Wu i sur., 2015).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Prikupljanje uzoraka tla s razliĉih lokacija na Ńirem zagrebaĉkom podruĉju

Uzorci zemlje s dubine od 10-20 cm prikupljeni su tijekom 11. mjeseca 2023. godine. Za izuzimanje su odabrane tri nasumiĉne lokacije sa otvorenog nenaseljenog podruĉja. Uzorci mase 20 g prikupljeni su u sterilne kivete volumena 50 mL te su dopremljeni u Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Odmah po dolasku uzoraka provredena je izolacija.



**Slika 4.** Prikupljanje uzoraka zemlje  
(Vlastita fotografija)

### 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 koji su korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti, autoagregacije, koagregacije i inhibiciju biofilmova:

- *Candida albicans* ATCC®10231™
- *Escherichia coli* ATCC®25922™
- *Listera monocytogenes* ATCC®23074™
- *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™
- *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™

### 3.1.3. Hranjive podloge

- HB (hranjivi bujon) (Biolife, Italija) - istog sastava kao i hranjivi agar, ali bez dodanog agara.
- Sladni bujon sastava: sladni ekstrakt (praškasti) 20 g L<sup>-1</sup>; pepton 6 g L<sup>-1</sup>; glukoza 20 g L<sup>-1</sup>; pH 5,5; sterilizacija pri 121 °C tijekom 15 min.
- TCA sastava: pepton 10,0 g L<sup>-1</sup>; goveđi ekstrakt 10,0 g L<sup>-1</sup>; ekstrakt kvasca 5,0 g L<sup>-1</sup>; glukoza 20,0 g L<sup>-1</sup>; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 g L<sup>-1</sup>; natrijev acetat 5,0 g L<sup>-1</sup>; amonijev citrat 2,0 g L<sup>-1</sup>; magnezijev sulfat 0,2 g L<sup>-1</sup>; manganov sulfat 0,05 g L<sup>-1</sup>; agar 15,0 g L<sup>-1</sup>; Tween 80 1,0 g L<sup>-1</sup>; pH vrijednost podloge je 6.5; sterilizacija pri 121 °C, 15 min. Navedeni sadržaj je otopljen u destiliranoj vodi dobro promješšan i nakon sterilizacije razliven u petrijeve zdjelice.
- HA (hranjivi agar) (Biolife, Italija) sastava: pepton 15,0 g L<sup>-1</sup>; mesni ekstrakt 3,0 g L<sup>-1</sup>; NaCl 5,0 g L<sup>-1</sup>; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 g L<sup>-1</sup>; agar 18,0 g L<sup>-1</sup>; u destiliranoj vodi; pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/ 15min.

### 3.1.4. Aparatura i pribor

- analitička vaga, Entris (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- centrifuga, Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- Eppendorf tubice (2mL)
- filteri za šprice „Minisart“, PTFE, 0,22 μm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Kirchdorf, Njemačka)



- kivete (50 mL)
- laboratorijske čaše
- laboratorijski stalci
- mikrobiološka ušica
- mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- mikrotitarske pločice s 96 i 12 jažica (Falcon, SAD)
- Olympus BX-41 (Tokyo, Japan)
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala
- spektrofotometar, Helios β UV-Vis (Unicam, Cambridge, UK)
- sušionik (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- štapići po Drigalskom
- tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- termostat (Mettler GmbH+Co.KG, Büchenbach, Njemačka)
- vibracijska miješalica, V-1 plus (Biosan, Riga, Latvija)

### **3.1.5. Kemikalije**

- 3 %-tna otopina KOH
- 3 %-tni H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- deionizirana sterilizirana voda
- fosfatna puferska otopina pH 7,2
- kristal-violet 1% otopina (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- metanol (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- octena kiselina 33% (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. Izolacija bakterija iz uzoraka tla**

Nakon prikupljanja uzorka tla, provedena je izolacija bakterija. Odvagan je 1 g zemlje te prebačen u epruvetu broj 1 koja je napunjena vodom do oznake. Neposredno poslije homogeniziranja epruvete, napravljena su 4 razrjeđenja. Prvo razrjeđenje pripremljeno je dodavanjem 1 mL iz epruvete broj 1 sterilnom pipetom u epruvetu broj 2 koja je dopunjena vodom do oznake. Preostala su 3 razrjeđenja dobivena su istim postupkom. Sterilnom pipetom nacepljen je 0,1 mL iz 3 i 4 razrjeđenja na TCA.

### 3.2.2. Katalaza test

Katalaza test proveden je na predmetnici tako što su dodane dvije kapi 3 % vodikovog peroksida na prekonocnu kulturu bakterija *Streptomyces* poraslih na HR agaru. Katalaza test se smatra pozitivnim ukoliko dođe po pojave mjehurića kisika koji su rezultat enzimskog cijepanja peroksida.

### 3.2.3. KOH test

Na predmetnicu su stavljene 2 kapi 3%-tne otopine KOH. Koristeći sterilnu i ohlađenu mikrobiološku ušicu, uzet je mali uzorak čistih izolata bakterijske kulture *Streptomyces* s čvrste podloge te dodan u nanesenu kap KOH i miješan ušicom 30-60 sekundi. Za vrijeme miješanja, lagano se podiže mikrobiološka ušica 1 do 2 cm iznad površine mikrobne kulture kako bi se mogla vidjeti pojava vlakana u materijalu koji visi na ušici. Ako je bakterija gram-negativna, formirat će se vlakna, dok do pojave vlakana neće doći ako je bakterija gram-pozitivna.

### 3.2.4. Antimikrobna aktivnost prema određenim patogenima

Stanice bakterijskih izolata bakterija *Streptomyces*, nakon prekonocnog uzgoja na TCA, odvojene su od medija centrifugiranjem na 6000 okretaja u minuti tijekom 15 minuta. Supernatanti su zatim odvojeni i filtrirani kroz 0,22 µm filtere radi sterilizacije. Određena je antimikrobna aktivnost na polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 96 jažica prilagođenim postupkom prema Frece i sur. (2011) i Ratsep (2014). Testirana je antimikrobna aktivnost prema sljedećim test-mikroorganizmima: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™ i *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™. U svaku pojedinu jažicu mikrotitarske pločice dodano je 100 µL supernatanta izolata bakterija roda *Streptomyces*, zatim 170 µL medija za patogene (hranjivi bujon) te su inokulirane s 10 µL ranije uzgojenog test-mikroorganizma. Inkubacija je provedena na 37 °C tijekom 24 sata, pri čemu je apsorbancija mjerena na 620 nm u redovitim intervalima pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Pratio se rast u navedenom razdoblju te je inhibicija izračunata korištenjem sljedećeg 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

Uzorci bez dodatka patogenih mikroorganizama su bile slijepe probe, a kontrolni uzorci su,

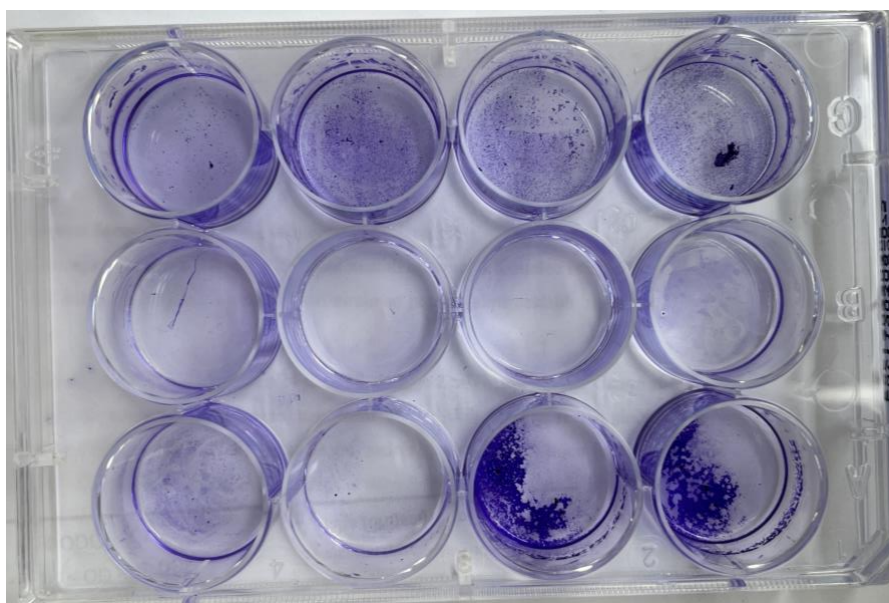
umjesto supernatanta, sadržavali neinokulirani TCA tretiran isto kao i ostali uzorci.

### 3.2.5. Sposobnost formiranja biofilмова bakterijskih izolata

Prema metodi opisanoj u Kostelac i sur. (2021) određena je sposobnost formiranja biofilмова. Prema jačini biofilмова formiranih nakon inkubacije klasificirani su ispitivani izolati bakterija *Streptomyces*.

Dodano je 2 mL TCA u polistirenske mikrotitarske pločice s 12 jažica. Sa 100  $\mu$ L suspenzije prethodno uzgojenih bakterijskih kultura uzorci su nacjepljeni te su pločice inkubirane na 37 °C tijekom 48 h. Nakon inkubacije, sadržaj jažica je pažljivo ispražnjen pipetiranjem kako bi se izbjeglo oštećenje dna jažica. S 2 mL sterilne vode ispran je nastali talog bakterijskih stanica uz lagano miješanje. Preostale stanice koje su adhezirane u biofilm, fiksirane su dodatkom 2 mL metanola i inkubacijom tijekom 15 min. Nakon fiksiranja, pločice su osušene na zraku te je metanol pažljivo uklonjen. Adhezirane stanice su obojane dodatkom 1%-tne otopine kristal violeta tijekom 5 minuta, nakon čega je višak boje temeljito uklonjen ispiranjem deioniziranom vodom (slika 5.). Vezana boja otpuštena je dodatkom 2 mL 33 % octene kiseline poslije čega je mjerena optička gustoća (OD) pri 620 nm pomoću spektrofotometra. Kao negativna kontrola korišteni su neinokulirani uzorci.

Dobivene vrijednosti optičke gustoće su uspoređene s optičkom gustoćom negativne kontrole (ODC).



**Slika 5.** Mikrotitarska pločica nakon tretiranja kristal violetom i ispiranja  
(vlastita fotografija)

### 3.2.6. Određivanje autoagregacijske sposobnosti dobivenih izolata

Izolati bakterijskih stanica *Streptomyces* su nakon prekonoćnog uzgoja na TCA izdvojeni centrifugiranjem i pripremljena je suspenzija stanica u fosfatnom puferu pH 7,2 volumena 5 mL. Stupanj autoagregacije određen je prilagođenom metodom prema Kostelac (2022). U mirujućem uzorku tijekom 24 h u odabranim intervalima oprezno se uklanjao gornji sloj suspenzije te se mjerila apsorbancija pri 600 nm pomoću spektrofotometra. Apsorbancija uzoraka mjerila se intervalima od 30 minuta unutar 60 minuta. Stopa autoagregacije je izračunata prema izrazu:

$$\text{Autoagregacija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \times 100 \quad [2]$$

gdje je:

$A_t$  – apsorbancija u vremenu  $t$

$A_0$  – apsorbancija u vremenu 0

### 3.2.7. Određivanje sposobnosti koagregacije izolata

Za određivanje stupnja koagregacije pomiješani su jednaki volumeni suspenzija test-mikroorganizama i suspenzija izolata bakterija *Streptomyces*. Test-mikroorganizmi su isti kao i u poglavlju 3.2.4. Uzorkovanje i određivanje stupnja koagregacije navedenih suspenzija provedeno je jednako autoagregacijskom postupku opisanom u poglavlju 3.2.6.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu uspješno je provedena izolacija bakterija roda *Streptomyces* iz uzoraka zemlje sa šireg nenaseljenog Zagrebačkog područja. Provedenom izolacijom izdvojene su čiste kulture dva soja bakterija roda *Streptomyces*, pridodane su im oznake IM1 i IM2 te su pohranjene u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Kao dio izolacije i karakterizacije izolati su podvrgnuti katalaza testu i KOH testu. Rezultati su prikazani u tablici 1.

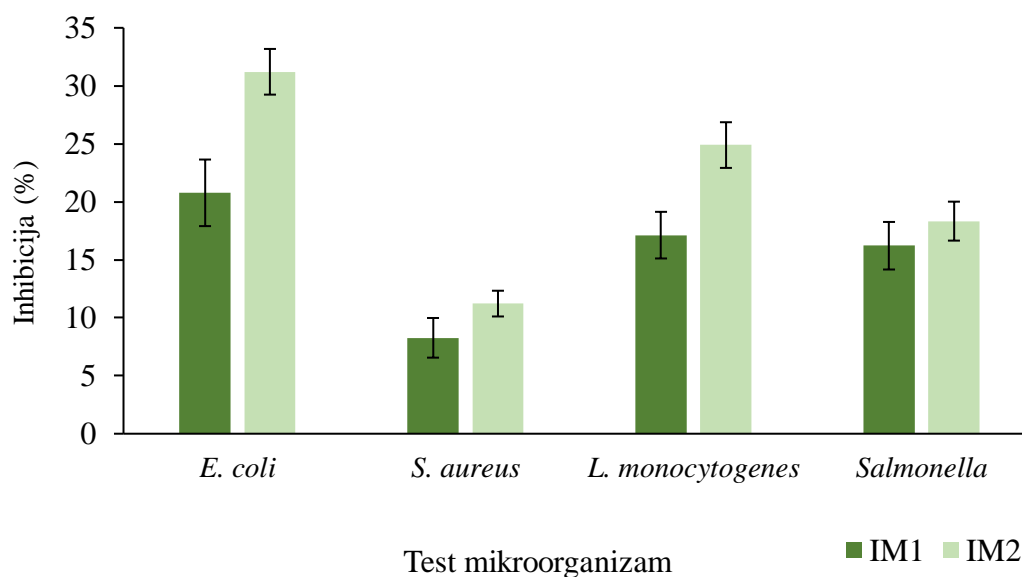
**Tablica 1.** Rezultati KOH i katalaza testa za dva odabrana izolata bakterija roda *Streptomyces*

Oznaka izolata	KOH test	Katalaza test
IM1	-	+
IM2	-	+

Iz rezultata je vidljivo da su oba izolata, IM1 i IM2, KOH negativni i katalaza pozitivni. Navedeni rezultati su očekivani jer su pripadnici navedenog roda pokazali ista svojstva u navedenim testovima (Hasani i sur., 2014; Ismail i sur., 2020). Iz navedenog se potvrđuje kako su bakterije ovog roda gram-pozitivne. Naime KOH test se temelji na razlikama u kemijskom sastavu bakterijske stanične stijenke. Stanična stijenka gram-negativnih bakterija lako se poremeti kada je izložena razrijeđenoj lužini. Kada se stanična stijenka gram negativnih bakterija lizira u prisutnosti lužine, dolazi do otpuštanja relativno nefragmentiranih niti deoksiribonukleinske kiseline koji smjesu čine viskoznom, dok stanične stijenke gram pozitivnih bakterija nisu narušene (Halebian i sur., 1981). Također iz navedenih pozitivnih rezultata možemo zaključiti da bakterije roda *Streptomyces* posjeduju enzim katalazu. Katalaza je enzim koji katalizira reakciju kojom se vodikov peroksid razgrađuje na vodu i kisik. Katalaza sprječava nakupljanje i štiti stanične organele i tkiva od oštećenja peroksidom, koji kontinuirano nastaje brojnim metaboličkim reakcijama (Britannica, 2024).

*Streptomyces* je jedan od najučinkovitijih rodova mikroorganizama koji proizvode biološki aktivne spojeve. Ranije je potvrđeno da su pojedini pripadnici ovoga roda učinkoviti protiv brojnih multi rezistentnih patogena (Alahadeb, 2022). Kako je antimikrobna aktivnost bakterija roda *Streptomyces* jedno od najvažnijih svojstava te kako bi se odredio potencijal dobivenih izolata, u ovom radu određena je inhibitorna aktivnost bakterija roda *Streptomyces* prema čestim patogenima uzročnicima bolesti: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Listeria*

*monocytogenes* ATCC®23074™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™ i *Salmonella* Typhimurium ATCC®29631™. Rezultati antimikrobne aktivnosti prikazani su na slici 6.



**Slika 6.** Inhibicija rasta patogenih test mikroorganizama u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija izolata bakterija roda *Streptomyces* prikazano kao postotak inhibicije  $\pm$  SD

Iz rezultata možemo vidjeti kako sojevi bakterija roda *Streptomyces* imaju antimikrobni utjecaj na određene patogene. Iz prikazanih rezultata (slika 6) soj IM2 pokazao je snažniju inhibicijsku aktivnost na ispitane patogene stoga je navedeni soj IM2 odabran za daljnja ispitivanja.

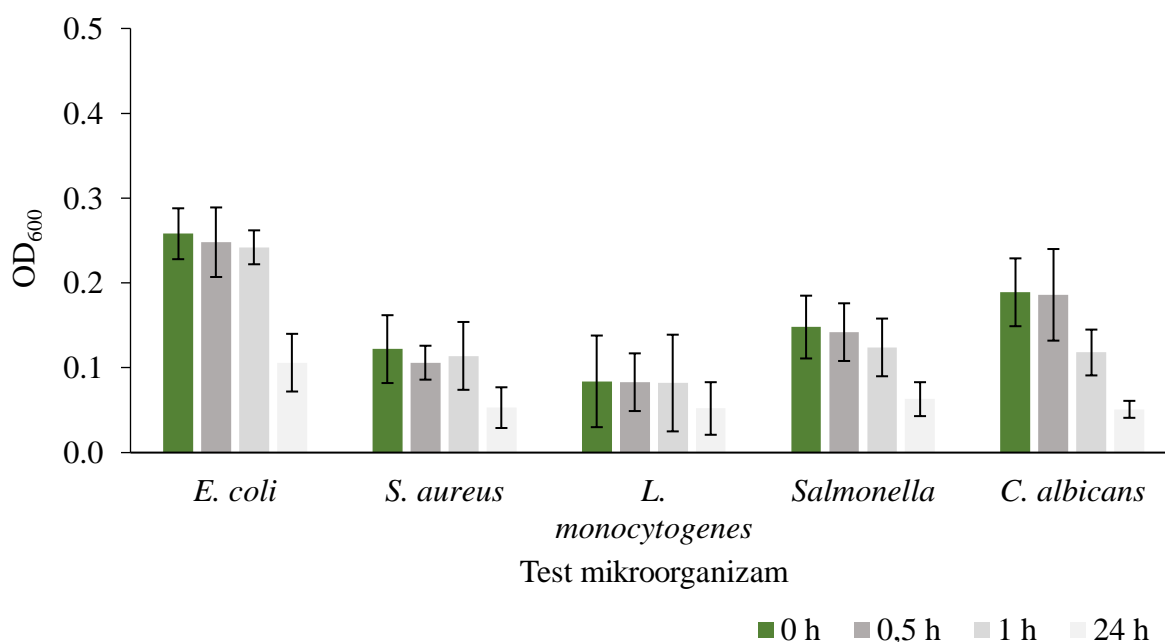
Iz rezultata je također vidljivo da je najveći stupanj inhibicije odabranog soja ostvaren prema *Escherichia coli* (31,5%).

U slučaju patogena *S. aureus*, postignuta je inhibicija od 11,2%. Shodno rezultatima, ispitujući antimikrobnu aktivnost izolata bakterija roda *Streptomyces* disk difuzijskom metodom u istraživanju koje su proveli Ilić i sur. (2005), ustanovljeno je antimikrobno djelovanje metabolita bakterija roda *Streptomyces* prema patogenim bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*.

Iz rezultata antimikrobne aktivnosti prema *L. monocytogenes* postignuta je inhibicija od 24,8%. Prema istraživanju Evangelista-Martínez i sur. (2022) također je dokazano disk difuzijskom metodom antimikrobno djelovanje metabolita bakterija roda *Streptomyces* prema *L. monocytogenes*. Osim toga u ovom istraživanju potvrđeno je kako različit sastav hranjive podloge utječe na proizvodnju antimikrobnih metabolita. Naime dodatkom organskih dušikovih spojeva uočena je smanjena proizvodnja antimikrobnih metabolita, što je u konačnici rezultiralo smanjenim brojem inhibiranih bakterija.

Vidljivo je iz rezultata da je u slučaju patogena *Salmonella*, postignut inhibicijski učinak od 18,3%. Prema Turpin i sur. (1992), preživljavanje *Salmonella* u tlu može se povećati ili smanjiti ovisno o prisutnosti bakterija roda *Streptomyces* i dostupnosti hranjivih tvari.

Autoagregacija, prijanjanje između identičnih bakterijskih stanica, ključna je za kolonizaciju, prepoznavanje i preživljavanje bakterija (Nwoko i Okeke, 2021). Budući da autoagregacija općenito štiti od vanjskog stresa, može biti korisna i za okolišne i za patogene bakterije, osobito u uvjetima kao što su nedostatak hranjivih tvari ili oksidativni stres. Autoagregacija i stvaranje mikrokolonija također mogu igrati ulogu u zaštiti od imunološkog sustava domaćina (Trunk i sur., 2018). S obzirom na to u ovom radu određena je i sposobnost autoagregacije odabranih patogena te su rezultati prikazani kao optička gustoća autoagregiranih stanica u rasponu od 1 do 24 sata inkubacije (slika 7).



**Slika 7.** Sposobnost autoagregacije patogenih test mikroorganizama u vremenskim intervalima tijekom 24 h inkubacije prikazana kao optička gustoća (OD) pri 600 nm  $\pm$  SD

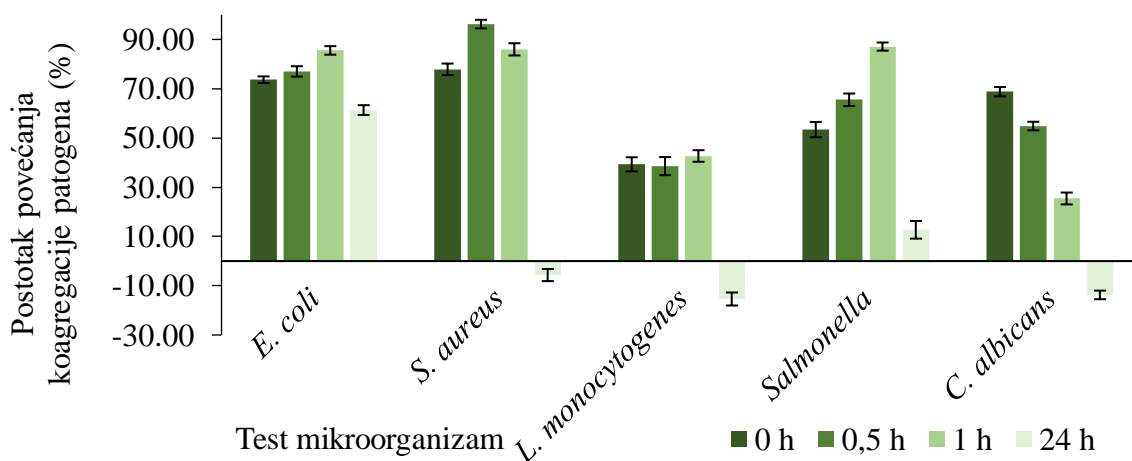
Iz rezultata je vidljivo da je autoagregacija ovisna o vremenu. Najviše vrijednosti autoagregacije (najniže vrijednosti optičke gustoće) detektirane su 24. satu inkubacije. Najviši stupnjevi autoagregacije zabilježeni su kod svih ispitanih patogena u 24. satu inkubacije. Autoagregacijska sposobnost ispitivanih patogena primjećena je i u ranijim studijama.

Primjerice, usporedivi rezultati dobiveni su i u studiji Sherlock i sur. (2004) gdje su zapaženi najviši stupnjevi autoagregacije u početnom vremenu za izolate bakterije *E. coli*.

Iz rezultata možemo također vidjeti da i *S. aureus* i *Salmonella* imaju najviši stupanj autoagregacije u početnom vremenu. Trunk i sur. (2018) su u svom istraživanju objavili tablicu autoagregirajućih bakterija i njihovih autoaglutinina među kojima se također nalaze *S. aureus*, *E. coli* te *Salmonella*. U skladu s rezultatima, prema istraživanju Chantanawilas i sur. (2024), *Candida albicans* ima visoku sposobnost autoagregacije.

Iznimno je važno napomenuti kako su autoagregacijska svojstva specifična za pojedini soj što je potvrđeno u istraživanju koje su proveli Nyenje i sur. (2012) gdje su izolati iste vrste pokazali varijacije u svojim sposobnostima autoagregacije.

Koagregacija je vrlo specifično prepoznavanje i prijanjanje genetski različitih bakterija. Specifičnost je posredovana komplementarnim proteinskim adhezivima i polisaharidnim receptorima na staničnoj površini koagregirajućih stanica. Kao i autoagregacija, koagregacija može potaknuti razvoj biofilma, promjene u arhitekturi biofilma i promijeniti sastav samog biofilma (Vornhagen i sur., 2013). Zbog navedenog u ovom radu određena je i sposobnost koagregacije patogena s odabranim izolatom IM2 te su rezultati prikazani kao postotak povećanja ili smanjenja koagregacije patogena (slika 8).



**Slika 8.** Sposobnost koagregacije patogenih test mikroorganizama u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija izolata IM2 u vremenskim intervalima tijekom 24 h inkubacije prikazana kao postotak povećanja koagregacije patogena (%)  $\pm$  SD



Iz rezultata je vidljivo da je sposobnost koagregacije varijabilna među sojevima. Prema našim saznanjima ovo je prvo istraživanje koagregacije bakterija roda *Streptomyces* i korištenih patogena.

Kod bakterija *E. coli* i *Salmonella* najveći postotak povećanja koagregacije zamijećen je tijekom 1. sata te za *E. coli* iznosi 85,5%, a za *Salmonella* 87,1%.

Dobivena razina koagregacije usporediva je s rezultatom istraživanja koje su proveli Ekmekci i sur. (2009) gdje su pojedini sojevi probiotičkih bakterija roda *Lactobacillus spp.* pokazali stupanj koagregacije od 71% u vremenu od 4 sata inkubacije.

*L. monocytogenes* ima najmanji postotak povećanja koagregacije u odnosu na ostale patogene te taj postotak iznosi 42,6%. Sličan rezultat svom istraživanju dobili su Gómez i sur. (2016) između bakterija *Weisella viridescens* i *L. monocytogenes* gdje je postotak koagregacije iznosio 53,4% u vremenskom intervalu od 48 sati.

S obzirom na ostale patogene *S. aureus* ima najveći postotak povećanja koagregacije tijekom 0.5 h te iznosi 96,2%. Nadalje rezultate možemo usporediti s istraživanjem koje su proveli Amenu i Bacha (2023) gdje je visok postotak koagregacije među bakterijama mliječne kiseline i *S. aureus*.

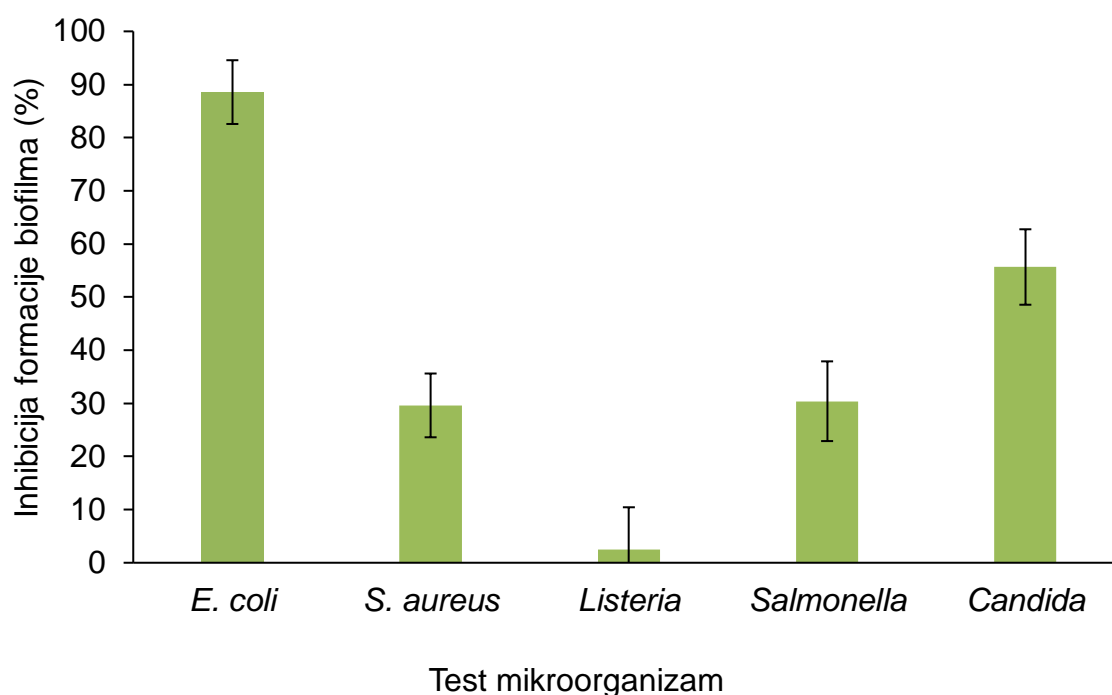
Kod *C. albicans* tijekom vremena primjećujemo pad postotka koagregacije dok je najveći bio u 0 h i iznosio je 68,7%. Bunetel i sur. (2019) proveli su istraživanje i dokazali koagregaciju *C. albicans* s više različitih bakterija i gljivica što ukazuje na njenu blisku povezanost s drugim mikrobima u njenom okruženju.

U ovom radu određena je i sposobnost inhibicije formiranja biofilмова patogenih bakterija i kvasca. Biofilmovi se mogu definirati kao zajednice mikroorganizama koji su pričvršćeni na površinu. Bakterije pokreću razvoj biofilma kao odgovor na specifične okolišne znakove, kao što je dostupnost hranjivih tvari. Prelazak iz planktonskog oblika u kompleksnu zajednicu rezultira ispoljavanjem novih fenotipskih svojstava. (Toole i sur., 2000). Test mikroorganizmi inkubirani su u prisutnosti supernatanta kulture izolata *Streptomyces* te su rezultati prikazani kao postotak inhibicije formacije biofilma (slika 9).

U tablici 2. prikazani su postotci inhibicije optimalnog soja IM2 bakterija roda *Streptomyces* na određene patogene.

**Tablica 2.** Inhibitorna aktivnost izolata IM2 prema patogenim test mikroorganizmima

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i>	<i>C. albicans</i>
<b>Kontrola</b>	1,203±0,08	0,1655±0,06	0,451±0,07	0,7751±0,05	0,46±0,04
<b>IM2</b>	0,14±0,06	0,12±0,06	0,53±0,08	0,54±0,075	0,2±0,071
<b>Inhibicija (%)</b>	88,57	29,61	2,44	30,40	55,65



**Slika 9.** Prikaz postotka inhibicije formacije biofilma patogenih mikroorganizama u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija izolata IM2. Rezultati su prikazani kao postotak inhibicije ± SD

Iz rezultata je vidljivo da je ispitani soj bakterije roda *Streptomyces* postigao najveći postotak inhibicije formacije biofilma kod *E. coli* te je iznosio 88,5%, a najmanji kod *L. monocytogenes*

i to samo 2,4%. Oko 55% inhibicije formacije biofilma postignuto je za *C. albicans*, dok približnu inhibiciju od 30% kod bakterijskih patogena *S. aureus* i *Salmonella*.

Također, izolati roda *Salmonella* su u istraživanju Dai i sur. (2021) pokazali visok stupanj otpornosti na streptomycin, antibiotik koji je inhibirao njihov rast te formaciju biofilma, a produkt je bakterijskog roda *Streptomyces*. U usporedbi sa sličnim istraživanjima koje su proveli Neamah i sur. (2019), dobiveni rezultati ukazuju kako bakterije roda *Streptomyces* imaju jaku aktivnost uništavanja patogena *E. coli*.

Shodno rezultatima, Suzuki i sur. (2015) izolirali su streptorubin B koji je imao inhibirajući učinak formacije biofilma patogene bakterije *S. aureus*.

Slične rezultate u svom istraživanju dobili su Srivastava i Dubey (2016) gdje je ekstrakt metabolita bakterijskog soja roda *Streptomyces* imao snažan inhibitorni učinak na adheziju stanica *Candida* i njihovu pretvorbu u stanje hifa. Također, učinkovito je ubijao stanice u dobro oblikovanom zrelom biofilmu.

Wang i sur. (2023) su u svom istraživanju došli do otkrića kako setomimicin može smanjiti stvaranje biofilma *L. monocytogenes* kada se kombinira s kanamicinom ili amikacinom. Setomicin su izolirali iz *Streptomyces cyaneochromogenes*. Setomimicin ima potencijal da se razvije kao antibakterijski kandidat za inhibiciju stvaranja biofilma *L. monocytogenes*, proizvodnju faktora virulencije i drugih infekcija.

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Uspješno su izolirani izolati bakterija iz uzoraka zemlje te su izolati nakon osnovne karakterizacije identificirani kao pripadnici roda *Streptomyces*.
2. Ustanovljeno je da soj bakterije roda *Streptomyces* pokazuje određeni stupanj antimikrobne aktivnosti prema svim testiranim mikroorganizmima. Najveća inhibicija rasta, od 31,5%, postignuta je za soj IM2 prema *Escherichia coli* ATCC®25922™.
3. Određena je sposobnost autoagregacije i koagregacije patogena u prisutnosti metabolita izolata IM2. Najveći postotak povećanja koagregacije zapažen je kod bakterija *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™ u iznosu od 87,1% i *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™ u iznosu od 96,2%.
4. Kvantificirna je sposobnost inhibicije formacije patogenih biofilмова u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija izolata IM2. IM2 najuspješnije je inhibirao biofilm bakterije *Escherichia coli* ATCC®25922™ (88,5 %), dok je biofilm *Listera monocytogenes* ATCC®23074™ inhibiran za 2,44%.

## 6. POPIS LITERATURE

Alahadeb J. I. (2022). Inhibitory potentials of *Streptomyces exfoliatus* strain 'MUJA10' against bacterial pathogens isolated from rural areas in Riyadh, Saudi Arabia. *PLOS ONE*, **17**(4), p.e0266297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266297> (pristupljeno 15. travnja 2024.)

Augustyn, A. (2024). Catalase. In: *Encyclopædia Britannica*. Britannica. <https://www.britannica.com/science/catalase> (pristupljeno 15. travnja 2024.)

Bamford, N.C., MacPhee, C.E. and Stanley-Wall, N.R. (2023). Microbial Primer: An introduction to biofilms – what they are, why they form and their impact on built and natural environments. *Microbiology*, **169**(8). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001338> (pristupljeno 5. travnja 2024.)

Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "*Streptomyces*". *Encyclopedia Britannica*, (2022), <https://www.britannica.com/science/Streptomyces> (pristupljeno 20. ožujka 2024.)

Bunetel, L., Tamanai-Shacoori, Z., Martin, B., Autier, B., Guiller, A. and Bonnaure-Mallet, M. (2019). Interactions between oral commensal *Candida* and oral bacterial communities in immunocompromised and healthy children. *Journal de Mycologie Médicale*, **29**(3), pp.223–232. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.06.004> (pristupljeno 15. svibnja 2024.)

Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A. and Raposo, A. (2021). Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **18**(4), p.2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014> (pristupljeno 5. travnja 2024.)

Chater, K.F. (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **361**(1469), pp.761–768. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1758> (pristupljeno 18. ožujka 2024.)

Dai, W., Zhang, Y., Zhang, J., Xue, C., Yan, J., Li, X., i sur. (2021). Analysis of antibiotic-induced drug resistance of *Salmonella enteritidis* and its biofilm formation mechanism. *Bioengineered*, **12**(2), pp.10254–10263. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1988251> (pristupljeno 25. travnja 2024.)

Lima Procópio, R.E., da Silva, I.R., Martins, M.K., de Azevedo, J.L. and de Araújo, J.M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **16**(5), pp.466–471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014> (pristupljeno 18. ožujka 2024.)

Desalegn Amenu and Bacha, K. (2023). Probiotic potential and safety analysis of lactic acid bacteria isolated from Ethiopian traditional fermented foods and beverages. *Annals of Microbiology*, **73**(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-023-01740-9> (pristupljeno 10. svibnja 2024.)

Di Martino, P. (2022). Antimicrobial agents and microbial ecology. *AIMS Microbiology*, **8**(1), pp.1–4. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2022001> (pristupljeno 28. ožujka 2024.)

Ekmekci, H., Aslim, B. and Ozturk, S. (2009). Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. *Microbiology and Immunology*, **53**(2), pp.59–65. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00115.x> (pristupljeno 10. svibnja 2024.)

Evangelista-Martínez, Z., Ríos-Muñiz, D.E., Gómez-Cano, J., Montoya-Hidalgo, A.C. and Ochoa-Solórzano, R.E. (2022). Actividad antimicrobiana de *Streptomyces* sp. Y15 contra bacterias patógenas y evaluación de medios de cultivo para la producción de antibióticos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **25** <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.415> (pristupljeno 19. travnja 2024.)

Gómez, N.C. *et al.* (2016) 'Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation', *Frontiers in Microbiology*, **7**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00863> (pristupljeno 15. svibnja 2024.)

Grosset, J.H. and Singer, T. (2013) 'Streptomycin', *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, pp. 568–569. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374984-0.01484-4> (pristupljeno 15. svibnja 2024.)

Halebian, S., Harris, B., Finegold, S.M. and Rolfe, R.D. (1981). Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **13**(3), pp.444–448. <https://doi.org/10.1128/jcm.13.3.444-448.1981> (pristupljeno 15. travnja 2024.)

Hasani, A., Kariminik, A. and Issazadeh, K. (2014). Corresponding Author Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, **2**(1), pp.63–75.

[https://www.ijabbr.com/article\\_7033\\_7733c8235876d7ba635f6c831a916648.pdf](https://www.ijabbr.com/article_7033_7733c8235876d7ba635f6c831a916648.pdf)

(pristupljeno 9. travnja 2024.)

Hopwood, D.A. (2007), *Streptomyces in nature and medicine: The antibiotic makers*. Oxford: Oxford University Press. (pristupljeno 28. ožujka 2024.)

Ismail, S., Jiang, B., Nasimi, Z., Inam-ul-Haq, M., Yamamoto, N., Danso Ofori, i sur. (2020). Investigation of *Streptomyces scabies* Causing Potato Scab by Various Detection Techniques, Its Pathogenicity and Determination of Host-Disease Resistance in Potato Germplasm. *Pathogens*, **9**(9), p.760. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090760> (pristupljeno 19. travnja 2024.)

Kang, X., Yang, X., He, Y., Guo, C., Li, Y., Ji, H., Qin, Y. and Wu, L. (2023). Strategies and materials for the prevention and treatment of biofilms. *Materials Today Bio*, **23**, p.100827. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100827> (pristupljeno 9. travnja 2024.)

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. and Hultgren, S.J. (2013). Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **3**(4), pp.a010306–a010306. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306> (pristupljeno 9. travnja 2024.)

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. *International dairy journal*, **112**, pp.104828–104828. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104828> (pristupljeno 15. travnja 2024.)

Li, J., Xie, S., Ahmed, S., Wang, F., Gu, Y., Zhang, C. i sur. (2017). Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors. *Frontiers in Pharmacology*, **8** (364). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00364> (pristupljeno 9. travnja 2024.)

Marić M. (2009) Kloniranje i ekspresija gena za SGNH-hidrolazu iz bakterije *Streptomyces coelicolor* u heterolognom sustavu (diplomski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, (pristupljeno 20. ožujka 2024.) <https://zir.nsk.hr/islandora/object/pmf%3A3769/datastream/PDF/view>

Neamah, A.J. *et al.* (2020) 'Inhibition of Escherichia coli biofilm formation by Streptomyces sdLi crude extract', *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, **34**(2), pp. 305–310. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2019.125965.1202> (pristupljeno 25. travnja 2024.)

Noura El-Ahmady El-Naggar (2021), Microbial Cell Factories Engineering for Production of Biomolecules. *Streptomyces*-based cell factories for production of biomolecules and bioactive metabolites **11**, 183-234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821477-0.00011-8> (pristupljeno 24. ožujka 2024.)

Nwoko, E.Q.A. and Okeke, I.N. (2021). Bacteria autoaggregation: how and why bacteria stick together. *Biochemical Society Transactions*. <https://doi.org/10.1042/bst20200718> (pristupljeno 17. travnja 2024.)

Nyenje, M.E., Green, E. and Ndip, R.N. (2012). Biofilm Formation and Adherence Characteristics of *Listeria ivanovii* Strains Isolated from Ready-to-Eat Foods in Alice, South Africa. *The Scientific World Journal*, 2012, pp.1–7. <https://doi.org/10.1100/2012/873909> (pristupljeno 25. travnja 2024.)

Panita Chantanawilas, Nuntiya Pahumunto, Rawee Teanpaisan (2024), Aggregation and adhesion ability of various probiotic strains and *Candida* species: An in vitro study, *Journal of Dental Sciences*, ISSN 1991-7902, <https://doi.org/10.1016/j.jds.2024.03.016> (pristupljeno 25. travnja 2024.)

Prof.dr. sc. Jadranka Frece (2021), Suzbijanje rasta mikroorganizama (predavanje, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb) (pristupljeno 5. travnja 2024.)

Rammali, S., Hilali, L., Dari, K., Bencharki, B., Rahim, A., Timinouni, M. i sur. (2022). Antimicrobial and antioxidant activities of *Streptomyces* species from soils of three different cold sites in the Fez-Meknes region Morocco. *Scientific Reports*, **12**(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21644-z> (pristupljeno 5. travnja 2024.)

Sherlock, O., Schembri, M.A., Reisner, A. and Klemm, P. (2004). Novel Roles for the AIDA Adhesin from Diarrheagenic *Escherichia coli*: Cell Aggregation and Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, **186**(23), pp.8058–8065. <https://doi.org/10.1128/jb.186.23.8058-8065.2004> (pristupljeno 19. travnja 2024.)



Srivastava, V. and Dubey, A.K. (2016) 'Anti-biofilm activity of the metabolites of *Streptomyces chrestomyceticus* strain ADP4 against *Candida albicans*', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **122**(4), pp. 434–440. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.03.013> (pristupljeno 25. travnja 2024.)

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. and Costerton, J.W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, **56**(1), pp.187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705> (pristupljeno 25. travnja 2024.)

Suzuki, N., Ohtaguro, N., Yoshida, Y., Hirai, M., Matsuo, H., Yamada, Y. i sur. (2015). A Compound Inhibits Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* from *Streptomyces*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **38**(6), pp.889–892. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00053> (pristupljeno 25. travnja 2024.)

Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. (2000). Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology*, **54**(1), pp.49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49> (pristupljeno 19. travnja 2024.)

Trunk, T., S. Khalil, H. and C. Leo, J. (2018). Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiology*, **4**(1), pp.140–164. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.1.140> (pristupljeno 17. travnja 2024.)

Turpin, P.E., Dhir, V.K., Maycroft, K.A., Rowlands, C. and Wellington, E.M.H. (1992). The effect of *Streptomyces* species on the survival of *Salmonella* in soil. *FEMS Microbiology Letters*, **101**(4), pp.271–280. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90824-8](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90824-8) (pristupljeno 19. travnja 2024.)

Vornhagen, J., Stevens, M., McCormick, D.W., Dowd, S.E., Joseph N.S. Eisenberg, Boles, B.R. and Rickard, A.H. (2012). Coaggregation occurs amongst bacteria within and between biofilms in domestic showerheads. *Biofouling*, **29**(1), pp.53–68. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.744395> (pristupljeno 17. travnja 2024.)

Wang, W. *et al.* (2023) 'Synergistic effect of kanamycin and amikacin with setomimycin on biofilm formation inhibition of *Listeria monocytogenes*', *Microbial pathogenesis*, **185**, pp. 106447–106447. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106447> (pristupljeno 25. travnja 2024.)

Wu, H., Moser, C., Wang, H.-Z., Høiby, N. and Song, Z.-J. (2014). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*, **7**(1), pp.1–7. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.65> (pristupljeno 5. travnja 2024.)

## Izjava o izvornosti

Ja Ivona Mišković izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ivona Mišković

Vlastoručni potpis