

# Anti - Legionella učinak metabolita *Bacillus amyloliquefaciens*

---

Sadiku, Dalila

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:163602>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dalila Sadiku

ANTI – *LEGIONELLA* UČINAK METABOLITA *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dalila Sadiku

ANTI – *LEGIONELLA* UČINAK METABOLITA *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

Diplomski rad obranjen je dana u/na, 29. rujna 2021., na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Mateja Ožanič, dipl. sanit. ing.
2. doc. dr. sc. Dijana Tomić Linšak, dipl. sanit. ing.
3. izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. sanit. ing.

Rad sadrži 53 stranica, 29 slika, 8 tablica,  
17 literaturnih navoda.

## ***Zahvala***

*Želim se zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Gobin, dipl. sanit. ing. koja mi je svojim znanstvenim savjetima i stručnošću pomogla u izradi ovog diplomskog rada. Također joj se zahvaljujem na pristupačnosti, razumijevanju, brizi, podršci, vodstvu i vjeri u moj uspjeh kroz sve godine studiranja.*

*Također se zahvaljujem Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na suradnji u provedbi eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.*

*Zahvalu želim uputiti i svim djelatnicima Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci koji su doprinijeli stjecanju moga znanja i iskustva kao sanitarnog inženjera, ali i života općenito.*

*I na kraju posebno se želim zahvaliti svima koji su bili uz mene, poticali me i podupirali u svim trenucima ma koliko bili mali, sretni ili tužni, znate koji ste!*

*Hvala Vam!*

## Sažetak

Bakterije iz roda *Bacillus* široko su rasprostranjene u okolišu, u tlu i vodi te su dio mikrobne flore ljudi i životinja. Razlog tome je njihova prilagodljivost preživljavanju u različitim pa i onim ekstremnim uvjetima. Bacilusi imaju sposobnost stvaranja endospora, različiti su u fiziološkim svojstvima i imaju sposobnost stvaranja mnogobrojnih metabolita, od kojih nekolicina pokazuje antimikrobna svojstva. Potencijal sojeva skupine *B. subtilis* u proizvodnji brojnih sekundarnih metabolita koji posreduju antimikrobni učinak prepoznat je desetljećima. Mnogi enzimi, antibiotici i ostali metaboliti različitih vrsta bacilusa imaju medicinsku, poljoprivrednu, farmaceutsku i ostalu raznovrsnu industrijsku primjenu. O potencijalu antimikrobnog učinka metabolita bacilusa na legionele nema podataka u literaturi te je cilj ovog istraživanja bio utvrditi antimikrobni učinak metabolita *Bacillus amyloliquefaciens* na odabrane sojeve *Legionella* spp.

Istraživanje je provedeno na *L. pneumophila* i *L. longbeachae*. Antimikrobni učinak je testiran difuzijskom metodom i metodom dvostruke mikrodilucije. Istovremeno je ispitan i anti – adhezijski učinak ekstrakta i supernatanta *B. amyloliquefaciens*. Dobiveni rezultati ukazuju na izraziti antimikrobni potencijal *B. amyloliquefaciens* supernatanata, kao i njegovog ekstrakta. Metaboliti bacilusa imaju anti – *Legionella* učinak te postoji potencijal primjene kao biokontrola u vodenim sustavima.

**Ključne riječi:** *Bacillus amyloliquefaciens*, antimikrobno sredstvo, *Legionella*, biokontrola

## Summary

Bacteria of the genus *Bacillus* are widespread in the environment, in soil and water and are part of the microbial flora of humans and animals. The reason for this is their adaptability to survival in different and even extreme conditions. Bacilli have the ability to form endospores, show their difference in physiological properties and have the ability to form numerous metabolites, several of which exhibit antimicrobial properties. The potential of *B. subtilis* strains in the production of secondary metabolites that mediate the antimicrobial effect has been recognized for decades. Many enzymes, antibiotics and other metabolites of different types of bacilli have medical, agricultural, pharmaceutical and other various industrial applications. There is no data in the literature on the potential of the antimicrobial effect of the *Bacillus* spp. metabolite on *Legionella* spp. and the aim of this study was to determine the antimicrobial effect of the metabolite *Bacillus amyloliquefaciens* on selected strains of *Legionella* spp.

The study was conducted on *L. pneumophila* and *L. longbeachae*. The antimicrobial effect was tested by the agar well diffusion method and the double microdilution method. At the same time, the anti - adhesive effect of *B. amyloliquefaciens* extract and supernatant was examined. The obtained results indicate a pronounced antimicrobial potential of *B. amyloliquefaciens* in the supernatant, as well as its extract. *Bacillus* metabolites have an anti - *Legionella* effect and there is potential for use as biocontrol in aquatic systems.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*, antimicrobial agent, *Legionella*, biocontrol

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Biokontrola.....	1
1.1.1. Biokontrola bolesti koje se prenose tlom .....	2
1.1.2. Interakcija s mikrobnom zajednicom.....	3
1.1.3. Rizici i benefiti biokontrole .....	3
1.2. <i>Bacillus</i> spp. ....	4
1.2.1. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	4
1.2.2. Antimikrobne komponente <i>Bacillus</i> spp.....	5
1.2.3. Mehanizam djelovanja .....	8
1.2.3.1. Surfaktanti .....	8
1.2.3.2. Fizikalno – kemijska svojstva .....	9
1.2.3.3. Mehanizam biosinteze surfaktina.....	10
1.2.3.4. Surfaktin i biofilm.....	11
1.3. <i>Legionella</i> spp.....	12
1.3.1. <i>Legionella pneumophila</i> .....	13
1.3.2. <i>Legionella longbeachae</i> .....	13
1.3.3. Interakcija <i>Legionella</i> spp. i protozoa .....	15
1.3.4. Povezanost rasta <i>Legionella</i> spp. i ostalih bakterija.....	16
1.3.5. <i>Legionella</i> spp. u biofilmu .....	17
1.3.6. Morfologija i virulencija .....	18
1.3.7. Izvori legioneloze u okolišu .....	19
1.3.8. Dezinfekcijski tretmani na <i>Legionella</i> spp.....	20
1.4. Stvaranje biofilma u distribucijskom sustavu pitke vode .....	21
1.4.1. Kemijski sastav, hranjive tvari, dezinfekcijska sredstva, temperatura vode i njihov utjecaj na razvoj biofilma .....	23



1.4.2. Quorum sensing.....	24
2. Materijali i postupci .....	25
2.1. Materijali .....	25
2.1.1. Laboratorijski pribor .....	25
2.1.2. Kemikalije .....	25
2.2. Mikroorganizmi .....	26
2.2.1. Bakterijski izolati i ekstrakcija lipopeptida .....	27
2.3. Testiranje antimikrobnog potencijala <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	28
2.3.1. Priprema bakterijske suspenzije.....	28
2.3.2. Metoda difuzije agarnih jažica – orijentacijska metoda osjetljivosti .....	28
2.3.3. Metoda dvostruke mikrodilucije.....	29
2.3.5. Formacija biofilma na polistirenskim mikrotitarskim pločicama i na nehrđajućem čeliku – "metoda anti – adhezije" .....	31
3. Rezultati.....	33
3.1. Antibakterijsko djelovanje <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> na različite sojeve <i>Legionella</i> spp. 33	
3.2. Formacija biofilma – "metoda anti – adhezije" .....	36
3.2.1. Antiadhezivni učinak ekstrakta <i>B. amyloliquefaciens</i> na polistirenu .....	37
3.2.2. Antiadhezivni učinak ekstrakta <i>B. amyloliquefaciens</i> na nehrđajući čelik .....	40
3.2.3. Utjecaj supernatanta <i>B. amyloliquefaciens</i> na legionele .....	42
4. Rasprava .....	46
5. Zaključak .....	49
6. Literatura .....	50
7. Popis skraćenica i akronima .....	52
8. Životopis .....	53

## 1. Uvod

Pojam biokontrole danas se većinski veže za poljoprivredu i glavni zadatak joj je smanjiti, ali u budućnosti možda i iskorijeniti upotrebu pesticida. No, obzirom na sve veću upotrebu kemijskih sredstava u svim aspektima života, potreba za smanjenjem onečišćenja okoliša i u konačnici upotrebom "zdravijih" inačica, sve je veći interes za pronalaskom istih.

*Bacillus* spp. poznat je kao proizvođač širokog spektra antimikrobnih spojeva od kojih se posebice izdvajaju lipopeptidi i neribosomski sintetizirani peptidi. Snažno antimikrobno djelovanje potvrđeno je i brojnim istraživanjima u kojima je dokazana snažna antibioza prema biljnim patogenima. (1)

Oboljenja uzrokovana bakterijama iz roda *Legionella* nazivaju se legioneloze. Legionarska bolest je jedna od vrlo važnih bolesti koje se javljaju i epidemijski i sporadično. Bolest se manifestira u dva oblika – atipična upala pluća i pontijačka groznica. Uz to, dokazane su i vanplućne infekcije. Legionarska bolest je tipična bolest nastala zbog ljudske aktivnosti. Naime, zbog želje za što ugodnijim životom, čovjek je doskočio izumima kao što su primjerice klimatski uređaji koji koriste vodu iz sustava i omogućuju nastanak aerosola koji, nakon što biva udahnut, dospijeva u pluća i tako u većini slučajeva izaziva bolest. (2)

### 1.1. Biokontrola

Posljednjih godina interes za biološkom kontrolom biljnih patogena značajno se povećao. Razlog tome je potreba uvođenja ekološki prihvatljivijih alternativa zbog masovne upotrebe kemijskih pesticida. Osim učinka zaštite, mnogi sojevi mikroorganizama imaju svojstva poticanja rasta biljaka. Među bakterijama, sojevi iz rodova *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Agrobacterium* imaju važnu ulogu u biološkoj kontroli kao mikroorganizmi povezani s tlom i biljkama. Ako su definirani kao proizvodi koji se sastoje od živih mikroorganizama, a koji se koriste u borbi protiv biljnih patogena, do posljednjeg desetljeća, proizvodi biokontrole činili su samo 1% prodaje svih poljoprivrednih kemikalija na globalnom tržištu. (9)

Biokontrola se definira kao metoda suzbijanja koja je, uz svoju efikasnost, praktična, sigurna i ekološki prihvatljiva, a uz to ne ostavlja štetne posljedice na zdravlje čovjeka. (3)

Biokontrola uključuje iskorištavanje mikroorganizama koji suzbijaju bolesti radi poboljšanja zdravlja biljaka. Suzbijanje bolesti sredstvima biokontrole trajna je manifestacija interakcija između biljke, patogena, agensa za biokontrolu, mikrobne zajednice na i oko biljke, te fizičkog okoliša. Čak i u modelnim laboratorijskim sustavima, proučavanje biokontrole uključuje interakcije između najmanje tri organizma. Stoga je, unatoč svom potencijalu u poljoprivrednoj primjeni, biokontrola jedno od najnerazumljivijih područja interakcije biljaka i mikroba. (4)

Postoji nekoliko načina upotrebe biokontrole:

**Klasična biološka kontrola** – radi na principu unošena specifičnog i učinkovitog prirodnog neprijatelja u problematično područje. Nakon spomenute inokulacije, očekuje se da prirodni neprijatelj uspostavi stalnu populaciju i ravnotežu sa štetnom vrstom. Metoda sama po sebi nije skupa, ali ponekad može biti neuspješna. Potrebno je obratiti pažnju na uspješnost, odnosno ako je prirodni neprijatelj zaista štetan samo za ciljani problem, dok ne dira ostale prisutne biološke vrste.

**Konzervacijska biološka kontrola** – zasniva se na mjeri očuvanja ili poboljšanja uvjeta za rast i razvoj autohtonih prirodnih neprijatelje vrste koja se želi suzbiti.

**Augmentativna biološka kontrola** – implicira periodično ispuštanje autohtonih ili egzotičnih prirodnih neprijatelja te očekivanje njihovog brzog djelovanja. U ovom slučaju se ne očekuje uspostava populacije, nego njihovo sezonsko uzdržavanje. (3)

### **1.1.1. Biokontrola bolesti koje se prenose tlom**

Biokontrola bolesti koje se prenose tlom osobito je složena jer se te bolesti javljaju u dinamičkom okruženju na sučelju korijena i tla poznatog kao rizosfera, koja je definirana kao regija koja okružuje korijen koji je zahvaćen. Rizosferu karakteriziraju brze promjene, intenzivna mikrobna aktivnost i velika populacija bakterija u usporedbi s tlom bez rizosfere. Biljke oslobađaju metabolički aktivne stanice iz korijena i talože čak 20% ugljika koji se u korijenu nalazi u rizosferi, što ukazuje na visoko razvijen odnos između biljnih i rizosfernih mikroorganizama. Tijekom duljih vremenskih razmjera, rizosfera se može promijeniti zbog rasta korijena, interakcije s drugom biotom u tlu i vremenskih uvjeta. Dinamička priroda rizosfere čini je zanimljivim okruženjem za interakcije koje dovode do bolesti i biokontrolu bolesti. (4)

### **1.1.2. Interakcija s mikrobnom zajednicom**

Interakcija biokontrolnog sredstva s mikrobnom zajednicom može dati naznake objašnjenja zašto mnogi organizmi učinkovito suzbijaju bolest u laboratoriju, ali to ne čine na terenu. Mikrobnе zajednice mogu utjecati na biokontrolne organizme, a mogu utjecati i na zajednice u koje ulaze. U nekim slučajevima mogu poboljšati komponente zajednice koje rade na suzbijanju bolesti. Nedavni dokazi ukazuju na to da namjerna manipulacija mikrobnim zajednicama može biti vrlo izdržljiv i učinkovit oblik biokontrole. (4)

Tri su izazova povezana s proučavanjem mikrobnih promjena koje proizlaze iz uvođenja sredstava za biološku kontrolu. Prvo, teško je utvrditi igra li promjena zajednice ulogu u suzbijanju bolesti ili je to jednostavno nepovezan ishod promjene mikroflore rizosfere. Drugo, podaci prikupljeni analizom zajednice zahtijevaju nove matematičke alate za rješavanje složenih zajednica i njihovih više razina interakcije. Mora se biti oprezan pri tumačenju rezultata deskriptivnih studija. Snaga takvih studija može se povećati primjenom multivarijantnog statističkog modeliranja. Konačno, sav rad koji se bavi učincima biokontrolnih organizama na mikrobnе zajednice oslanjao se na uzgoj kako bi opisao zajednice. Budući da se <1% (i daleko manje od toga) bakterija u tlu može uzgojiti, studije temeljene na uzgoju zanemaruju neke ključne organizme i interakcije. (4)

### **1.1.3. Rizici i benefiti biokontrole**

Naravno, ništa nije bez rizika pa s tako i kod biokontrole javlja nekoliko problema. Jedan je problem što je vrlo teško predvidjeti učinke bioloških agenasa prije njihovog oslobađanja. To se odražava stopom uspješnosti biokontrole, koja pokazuje da <40% unošenja sredstava protiv korova i insekata zapravo rezultira značajnom kontrolom. No, kako je utjecaj na ciljnu vrstu tako teško predvidjeti, kakve su šanse za niz neciljanih organizama i ekosustav u cjelini? Trenutno je dostupno nekoliko predviđajućih metodologija za procjenu relativnih rizika različitih strategija kontrole, ali još uvijek relativno malo razumijevanja po tom pitanju. (5)

Za kemijsku kontrolu tvrdilo se da je, budući da aplikacije nisu trajne, bilo koje nuspojave lakše ukloniti nego one koju potencijalno može uzrokovati upotreba biokontrole. To predlaže da se kemijske nuspojave otkrivaju na vrijeme, kao i da su dostupne održive alternative kemijskoj

kontroli kako bi se prskanje moglo zaustaviti ako se uoče štetni učinci. Stoga je važno istaknuti da bi biokontrolu doista trebalo bolje ocijeniti, a ne samo pretpostaviti da je sigurna, isto vrijedi i za ostale mogućnosti kontrole ako se želi uravnotežiti, odnosno smanjiti relativni rizik. (5)

Kako bi se doskočilo spomenutom problemu, kao prvi korak potrebno je provoditi evaluacijske studije te provoditi dugoročne studije nakon ispuštanja biokontrolnih organizama.

Konačno, kako bi se olakšalo sve gore navedeno, biokontrolu treba promatrati zajedno s ostalim alternativnim strategijama kontrole, a ne kao posljednje (ili prvo) sredstvo. Usvajanje ovog pristupa dati će vremena za što temeljitiju procjenu rizika. To također zahtijeva da se ekološka evaluacija smatra sastavnim dijelom biokontrole i da se biokontrola ne smatra samo "brzim rješenjem" ili jedinim popravkom. Nadalje, kako bi se donijela uravnotežena odluka, utjecaj alternativnih opcija kontrole treba procijeniti na istoj razini kao i ona koja se zahtijeva za biokontrolu. (5)

## **1.2. *Bacillus* spp.**

Rod *Bacillus* predstavlja veliku skupinu gram-pozitivnih bakterija koja pripada vrsti *Firmicutesphylum*. To su bakterije štapićastog oblika, koje stvaraju endospore, katalaza su pozitivne, a metabolizam im je aeroban ili fakultativno anaeroban. Dosad su identificirane 142 vrste iz roda *Bacillus*, a njihov broj i dalje raste. Bakterije iz ove skupine su veoma ubikvitarne iz razloga što mogu nastaniti veliki broj ekoloških niša; prisutni su u tlu, vodi i zraku, kao i na površinama i rizosferi biljaka te u gastrointestinalnom traktu životinja, ali i u mnogim ekstremnim okruženjima. S biotehnološkog gledišta, najvažnije obilježje roda *Bacillus* je njihov raznoliki sekundarni metabolizam i sposobnost proizvodnje širokog spektra strukturno različitih antagonističkih tvari. Sojevi *Bacillus subtilis* imaju približno 4 do 5 % cijelog genoma posvećenog sintezi sekundarnih metabolita, sa sposobnošću proizvodnje više od dvadesetak strukturno različitih antimikrobnih spojeva. (1)

### **1.2.1. *Bacillus amyloliquefaciens***

*Bacillus amyloliquefaciens* pripada obitelji *Bacillaceae* i rodu *Bacillus*. Ima sposobnost stvaranja endospora, gram – pozitivan je i štapićastog oblika s mogućnošću stvaranja lanaca. Iako je prvi put izoliran 1943. godine, do ranih 1980 – ih se smatralo da se radi o *Bacillus subtilis*. U različitim se

okolišnim uvjetima nalazi uglavnom u hrani, biljkama, tlu i vodi. Na temelju globalnog kataloga mikroorganizama, postoje 273 vrste *B. amyloliquefaciens* izoliranih iz različitih izvora. Iako *B. amyloliquefaciens* ima različite sojeve s različitim svojstvima i primjenama, u proizvodnji se smatra sigurnim i netoksičnim mikroorganizmom. Američka uprava za hranu i lijekove (FDA – prema eng. food and drug administration) smatra ga općenito sigurnim za upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Također je spomenuto da se njegovo djelovanje ne smatra toksičnim. Štoviše, neki sojevi *B. amyloliquefaciens* potiskuju sintezu otrovnih tvari; jedan takav primjer je *B. amyloliquefaciens* HJ18-4 i RD7-7 izoliran iz doenjang-a (fermentirane korejske paste od soje), koji sprječava otrovnu proizvodnju *Bacillus cereus* u prehrambenoj industriji. Time *B. amyloliquefaciens* ima vrlo važnu ulogu u različitim sektorima, uključujući prehrambenu (sinteza enzima, prebiotici i probiotici te funkcionalna i bioaktivna hrana), farmaceutsku (antimikrobnu, antikancerogenu i dijabetičare), poljoprivrednu (prevencija bolesti biljaka i životinja), okolišnu (tretman otpada i biogoriva) i ostale slične industrije. (11)

Njegova sposobnost hidroliziranja različitih biljnih i životinjskih produkata kao što su sinteza različitih enzima, proteina i ugljikohidrata te prebiotičko i probiotičko djelovanje čini ga važnim u prehrambenim sektorima. U određenoj primjeni može se koristiti za proizvodnju enzima, antimikrobnih sredstava, insekticida i biokemikalija, egzopolisaharida (EPS), vitamina, purinskih nukleozida i poli gama glutaminske kiseline. (11)

Primarni i sekundarni metaboliti *B. amyloliquefaciens* mogu se koristiti u hrani i medicini kao novi proizvod. Neki od ovih novih proizvoda uključuju mikrobn EPS (prema eng. extracellular polymeric substance) koji ima mnoge funkcionalne primjene, primjerice antivirusno, antitumorsko, antikancerogeno, imunomodulacijsko i antioksidativno djelovanje. Još jedna osobitost ovog mikroorganizma je sinteza lipopeptida, koji su sekundarni metaboliti, uglavnom uključujući serrawettin, surfaktin i viskozin. Ovi lipopeptidi imaju višestruke funkcije, uključujući antimikrobne, antivirusne, protuupalne i antiadhezivne. (11)

### **1.2.2. Antimikrobne komponente *Bacillus* spp.**

Bakteriocini se definiraju kao ribosomalno sintetizirani peptidi s antimikrobnim djelovanjem. Većina bakteriocina su mali proteini otporni na toplinu koji djeluju protiv ciljnih stanica tako što uglavnom interagiraju sa staničnom ovojnicom. Bakteriocini općenito imaju uski inhibitorski

spektar ograničen na blisko povezane bakterije, iako neki pokazuju i širi inhibitorni spektar protiv različitih vrsta bakterija. Klasifikacijska shema *Bacillus* bakteriocina djelomično se temelji na klasifikaciji bakteriocina uspostavljenoj na bakterijama mliječne kiseline. Prema ovoj shemi, *Bacillus* bakteriocini mogu se podijeliti u tri skupine – klasa I, II i III. (1)

**Klasu I** predstavljaju posttranslacijski modificirani peptidi. Prve tri podklase (I.1, I.2 i I.3) s lantioninom i b-metil lantioninom kao tipične modifikacije pripadaju lantibioticima, dok podklasa I.4 ima različite posttranslacijske modifikacije.

**Klasa II** predstavljena je malim (do 10 kDa), ribosomno sintetiziranim, nemodificiranim peptidima, koje karakterizira stabilnost pH i topline, a ova klasa uključuje tri podklase.

**Klasu III** predstavljaju veliki proteini s antibakterijskim učincima koji se uglavnom temelje na njihovom enzimatskom djelovanju. Osim bakteriocina unutar ove klasifikacijske sheme, među sojevima *Bacillus*, identificirani su mnogi antimikrobni peptidi i veći proteini s antimikrobnim djelovanjem. Budući da ta antimikrobna sredstva nisu dovoljno definirana da bi se mogla klasificirati, nisu uključena u ovu klasifikaciju i općenito su imenovana kao inhibitorne tvari slične bakteriocinu (BLIS – prema eng. bacteriocin – like inhibitory substances). Neki sojevi *Bacillus* koji proizvode bakteriocine se mogu koristiti kao starter kulture u proizvodnji fermentirane hrane te kao probiotici ili aditivi za stočnu hranu, poput *Bacillus cereus ssp. Toyoi*, soj s probiotičkim svojstvima. Ako se koriste u svrhu proizvodnje hrane, sojevi bacilusa moraju se temeljito ispitati na prisutnost bilo kakvih patogenih svojstava, proizvodnje toksina i čimbenika virulencije. U biološkoj kontroli, međutim, sojevi koji proizvode druga antimikrobna sredstva, osobito lipopeptidi i peptidi koji nisu sintetizirani ribosomalno, imaju mnogo veći kapacitet, što je dokazano brojnim istraživanjima. (1)

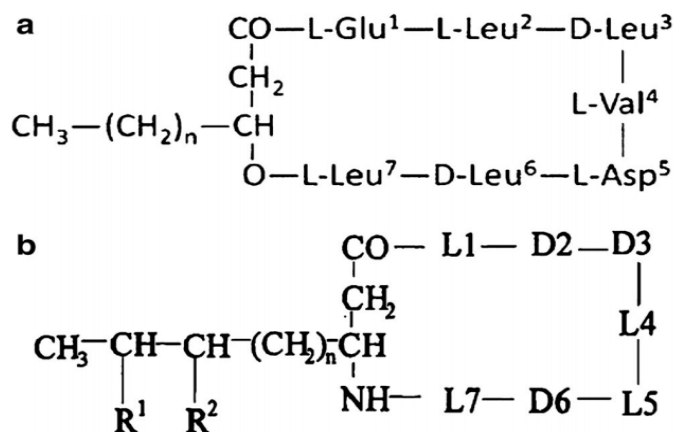
Peptidi i lipopeptidi koji nisu sintetizirani na ribosomima, iznimno su heterogena skupina spojeva koja se sastoji od aminokiselina, amino- ili hidroksi – masnih kiselina s različitim duljinama lanaca ugljikovodika, a mogu se dodatno modificirati aciliranjem, metilacijom ili glikozilacijom. Ove peptide sintetiziraju neribosomalne peptidne sintetaze (NRPS) i veliki enzimski kompleksi s više domena s modularnom strukturom. Tijekom sinteze svaki je modul zadužen za ugradnju određene aminokiseline. (1)

Ovoj skupini pripadaju i neki važni antibiotici kao što je bacitracin, neribosomski peptid koji proizvode *B. licheniformis* i *B. subtilis*. Bacitracin ima snažno baktericidno djelovanje protiv gram – pozitivnih bakterija, a za inhibitorno djelovanje mu je potreban metalni ion poput  $Zn^{2+}$  te se već dugo koristi u terapiji bakterijskih infekcija. Tirocidin, ciklički dekaeptid koji proizvodi *Bacillus brevis*, također je učinkovit protiv gram-pozitivnih bakterija. Antimikrobni lipopeptidi iz *Bacillus* spp. predstavljeni su s tri glavne obitelji – iturini, surfaktini i fengicini. Ove molekule imaju cikličku strukturu i sastoje se od sedam ili deset aminokiselinskih ostataka povezanih s derivatom masnih kiselina; mogu imati mnogo izomernih oblika, zbog različite duljine lanca ugljikovodika masnih kiselina ili varijacija u sastavu aminokiselina. Obitelj surfaktina predstavljena je peptidima od sedam aminokiselina vezanih za  $\beta$  - hidroksilnu masnu kiselinu s 13 do 15 atoma ugljika, a uključuje varijante surfaktina, pumilacidina i halobacilina. Proizvodnja ovih lipopeptida obično doprinosi pokretljivosti rojenja i sposobnosti stvaranja biofilma, posebno u sojevima koji proizvode surfaktin budući da sojevi *Bacillus* koji ne proizvode surfaktine nemaju te karakteristike.

(1)

Najvažniji predstavnici unutar obitelji iturina su iturin A, C, D i E, te varijante mikosubtilina i bacilomicina. Ovi lipopeptidi također se sastoje od sedam aminokiselina, u ovom slučaju vezanih za lanac  $\beta$  - amino masnih kiselina različite duljine. Obitelj fengicina predstavljena je mnogim izomerima fengicina, plipastatina i maltacina; sastoje se od deset aminokiselina povezanih s  $\beta$  - hidroksilnom masnom kiselinom s do 18 atoma ugljika. Osim ove tri glavne skupine, drugi lipopeptidi sa sličnom strukturom iz *Bacillus* uključuju kurstakin, heptapeptid iz *B. thuringiensis*.

(1)



**Slika 1.** Strukturni prikaz surfaktina (a) i iturina (b) (preuzeto od (7))



### **1.2.3. Mehanizam djelovanja**

Mehanizmi djelovanja lipopeptida određeni su njihovom amfifilnošću i sposobnošću interakcije s staničnom membranom ciljnih organizama. Lipopeptidi iz obitelji surfaktina vrlo su snažni biosurfaktanti koji lako stupaju u interakciju s lipidnim dvoslojem i posljedično ometaju strukturu biološke membrane na način ovisan o dozi; visoke koncentracije uzrokuju nepovratno stvaranje pora i dalje do potpunog poremećaja i solubilizacije lipidnog dvosloja. Mehanizam interakcije surfaktina s biološkim membranama bio je predmet brojnih istraživanja. Prema utvrđenom modelu, integracija surfaktina u staničnu membranu započinje hidrofobnim interakcijama između masne kiseline i ugljikovodičnih lanaca membranskih fosfolipida, što dovodi do destabilizacije strukture membrane. Nakon ovog prvog koraka slijede konformacijske promjene cikličkog peptidnog dijela surfaktina, što dodatno olakšava integraciju u staničnu membranu. Drugo istraživanje sugeriralo je da proces destabilizacije membrane uključuje integraciju dimera surfaktina u dvosloj. U skladu s predloženim mehanizmom djelovanja, rezultat ovih strukturnih promjena je dehidracija polarnih glava membranskih fosfolipida, nakon čega slijedi prekid dvosloja i uzrokuje curenje sadržaja stanica. Antagonističko djelovanje lipopeptida iz obitelji iturin je različito; njihovo djelovanje temelji se na stvaranju ionsko - provodnih pora, a ne na prekidu membrane ili otapanju. Lipopeptidi iz klase fengicina također stupaju u interakciju sa staničnom membranom uzrokujući promjene u njenoj strukturi i propusnosti. (1)

#### **1.2.3.1. Surfaktanti**

Surfaktanti su površinski aktivne molekule koje se sastoje i od hidrofilnih i od hidrofobnih dijelova, što rezultira amfifilnom strukturom koja omogućuje smanjenje površinske i međufazne napetosti tekućina. Ova jedinstvena struktura surfaktanata mogla bi objasniti njihova privlačna svojstva, uključujući otapanje, emulgiranje, pjenjenje, vlaženje i deterdžent, dajući im širok spektar primjena u mnogobrojnim industrijskim procesima. Važno je napomenuti da su ostaci surfaktanata otkriveni u vodenom okolišu kao posljedica njihove upotrebe širom svijeta. Nusprodukti površinski aktivnih tvari ispuštaju se u postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, nakon čega slijedi ispuštanje otpadnih voda u površinske vode, koje neprekidno završavaju u vodenim sustavima i tako kronično izlaže okoliš tim sintetičkim spojevima. Mnogobrojni su dokazi koji govore u prilog tome da

kemijski surfaktanti mogu izazvati ozbiljna oštećenja živih organizama. Razlog tome leži u podatku da je njihova toksičnost prvenstveno mala razgradivosti te svojstvo da se apsorbira i prodire u staničnu membranu. (8)

Biosurfaktanti se smatraju obećavajućim terapijskim i biotehnološkim biomolekulima koji će zamijeniti njihove kemijske inačice. Razlog tome su različita funkcionalna svojstva za primjenu u različitim područjima i ekološki prihvatljivo ponašanje. Biosurfaktanti su sekundarni metaboliti bakterija, gljiva i kvasca i obično se klasificiraju ovisno o podrijetlu mikroba i prirodnoj kemijskoj strukturi. Podijeljeni su u pet klasa:

- 1) glikolipidi
- 2) fosfolipidi i masne kiseline
- 3) lipopeptidi ili lipoproteini
- 4) polimerne
- 5) površinski aktivne tvari u obliku čestica

Klasu lipopeptida karakterizira visoka strukturna raznolikost i obuhvaća ciklične ili kratke linearne peptide u kombinaciji s dugim lancem masnih kiselina. Sojevi *Bacillus subtilis* pokazuju veliku ekonomsku važnost u pogledu sposobnosti sinteze širokog spektra bioaktivnih metabolita. Stanice *B. subtilis* su sveprisutne, gram-pozitivne bakterije u obliku štapića, koje rastu na mezofilnoj temperaturi (25 – 37 °C), ali također mogu podnijeti ekstremne uvjete okoliša. Nadalje, ova vrsta je najrelevantniji mikroorganizam u proizvodnji lipopeptidnog surfaktina. (8) No, *B. amyloliquefaciens* ne zaostaje puno za njim.

### **1.2.3.2. Fizikalno – kemijska svojstva**

Sintetički i biogeni surfaktanti posjeduju sposobnost smanjenja površinske napetosti tekućina. Biološki aktivni spoj koji su izolirali Arima, Kakinuma i Tamura (1968.) dobio je naziv surfaktin zbog sposobnosti da smanji površinski napon vode sa 72 mN/m na 27 mN/m pri koncentraciji nižoj od 10 µmol/L, što je znatno niža od kritične koncentracije micela (KKM) u vodi (23 mg/L) i približno dva reda veličine manja od većine ostalih surfaktanata. Kritična koncentracija micela označava se kao minimalna koncentracija za pokretanje stvaranja micela, važno svojstvo

odgovorno za sposobnost deterdženta i otapanja te određuje učinkovitost surfaktanta. Dakle što je niži KKM to je molekula učinkovitija jer je potrebno manje surfaktanata za smanjenje površinske napetosti. (8)

Surfaktin posjeduje snažnu sposobnost samostalnog sastavljanja da tvori nehomogene micelle različitih konfiguracija koje variraju između sfernih, elipsoidnih i/ili cilindričnih struktura promjera 4-20 nm do 160 nm. Lipopeptid stvara velike agregate čak i pri koncentraciji šest puta nižoj od KKM – a, što ukazuje da jaka vodikova veza između peptidnih petlji potiče agregaciju micela surfaktina pri niskim koncentracijama. Sposobnost stvaranja micela može se pripisati jednostavnosti gomilanja molekula surfaktina organiziranih konfiguracijom  $\beta$  – nabrane ploče. (8)

### 1.2.3.3. Mehanizam biosinteze surfaktina

Početak biosinteze surfaktina događa se tijekom stacionarne faze rasta sojeva *Bacillus*, kada kultura postaje deficitarna u hranjivim tvarima i kisiku. U tim uvjetima bakterije aktiviraju različite strategije preživljavanja, uključujući sintezu antibiotika, sporulaciju i proizvodnju izvanstaničnih razgradnih enzima. (8)

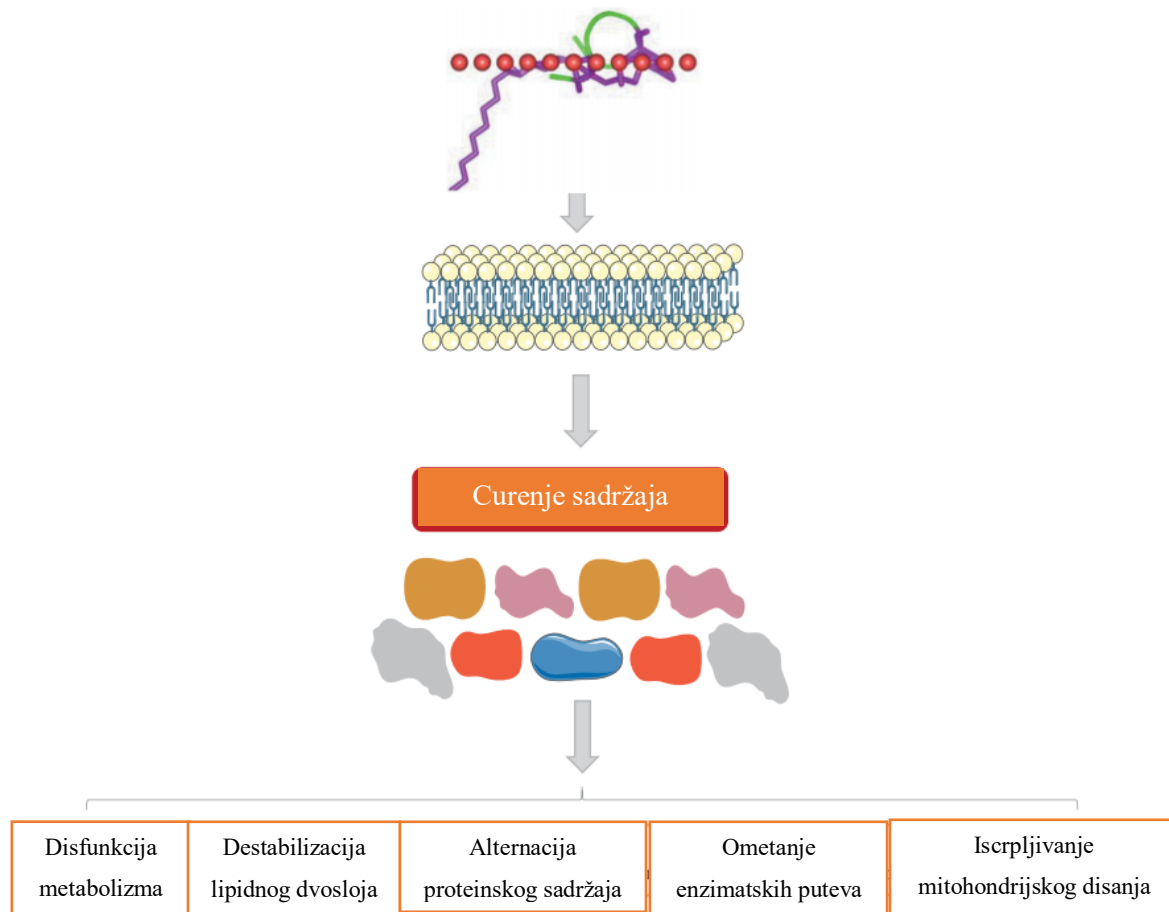
Surfaktin se neribosomski sintetizira pomoću multi – modularnog enzimskog kompleksa nazvanog neribosomalne peptidne sintetaze (NRPS) koji prepoznaje, aktivira, modificira i povezuje aminokiselinski međuprodukt za stvaranje peptida, sastavljajući molekulu uzastopnim dodavanjem aminokiselina. Masni acilni lanac prva je struktura ugrađena u peptidilnu okosnicu putem mehanizma poznatog kao lipoinicijacija. Enzimi NRPS predstavljaju modularnu strukturu sastavljenu od više katalitičkih domena spojenih kao protein s više domena. (8)

Struktura posjeduje tri jezgrene domene:

- a) uzvodnu domenu adenilacije
- b) uzlaznu kondenzacijsku domenu, odgovornu za stvaranje peptidne veze
- c) terminalnu tioesteraznu domenu (TE)

U početku su aminokiseline i supstrati peptida adenilirani i kovalentno vezani za protein peptidil - nosač (PCP). Zatim, uzvodna ili nizvodna kondenzacijska domena katalizira stvaranje peptidne

veze. Završavajući mehanizam, terminalna tioesterazna domena katalizira oslobađanje peptida. Obično je ovaj posljednji korak odgovoran za ciklizaciju zrelih lipopeptida. (8)



**Slika 2.** Shematski prikaz mehanizma djelovanja surfaktina (preuzeto od (8))

#### 1.2.3.4. Surfaktin i biofilm

Surfaktin također pokazuje iznimno svojstvo uklanjanja biofilma koje stvaraju patogeni organizmi. Kao što je prethodno rečeno, biofilm se karakterizira kao strukturirana, višestanična zajednica mikroorganizama sa sposobnošću stvaranja izvanstaničnih polimera za zaštitu stanica. Ova struktura prianja za površine i proizvodi niz zdravstvenih, ekoloških i industrijskih poteškoća. Razne studije su pokazale kako surfaktin značajno smanjuje adheziju bakterija. U niskim

koncentracijama s kratkim razdobljem kontakta, surfaktin je mogao poremetiti strukturu biofilмова čistih i miješanih kultura patogena. Predloženi mehanizam uključivao je adsorpciju molekule na čvrstu površinu praćenu promjenom hidrofobnosti, narušavajući proces prianjanja i stvaranje biofilma. Stoga anti – adhezivne i anti – biofilmske aktivnosti ukazuju na surfaktin kao potencijalni izvor za biomedicinske primjene, uglavnom za uklanjanje bakterijskog biofilma s površina radi zaštite biomaterijala i kirurških uređaja od kolonizacije mikroorganizama, ali i u ostalim industrijama gdje stvaranje biofilma može posredno i neposredno ugroziti zdravlje ljudi. (8)

### **1.3. *Legionella* spp.**

*Legionella* spp. je organizam od javno – zdravstvenog interesa zbog svoje sposobnosti izazivanja infekcije kod osjetljivih ljudi i gotovo ubikvitarne prisutnosti. Vrste legionela karakteristične su gram – negativne bakterije u obliku štapića i uzročnici su legioneloze, ozbiljne i potencijalno po život opasne upale pluća. Legionele su endemi okolišnih slatkovodnih sustava, kao što su jezera i rijeke, kao i vlažna tla i kompostirani materijali poput drvnog otpada i stelje od lišća te mješavine tla. U laboratorijskim uvjetima *Legionella* je prehrambeno zahtjevna i traži specifične dodatke standardnim hranjivim podlogama kako bi došlo do razmnožavanja. (9)

Mnogi projektirani sustavi za vodu, poput rashladnih tornjeva, klima uređaja, sustava tople vode, whirlpoola, prskalica za povrće, tuševa i vodovoda za zubne jedinice, pružaju okruženje pogodno za rast i razmnožavanje *Legionella*. Rast patogena u tako neposrednoj blizini ljudi uvelike povećava vjerojatnost zaraze koja bi inače bila mala iz prirodnih izvora iz okoliša. Unutar vodnih sustava *Legionella* kolonizira biofilmove, nakupine mikroorganizama koji izlučuju izvanstanične polimerne tvari poput polisaharida kako bi stvorili zaštitni matriks koji prianja na površine. Mikrobiološka građa ovih filmova razlikuje se ovisno o sustavnim uvjetima kao što su brzina protoka vode, temperatura, izloženost svjetlosti i sadržaj hranjivih sastojaka. To rezultira širokim spektrom mikrobno raznolikih ekosustava koji sadrže bakterije, gljive, protozoe i alge. Do sada je poznato da su nekoliko vrsta ameba, trepetljikavih praživotinja i najmanje jedna vrsta sluzave plijesni, prirodni domaćini legionela i kao takvi ponašaju se kao sklonište, odnosno štite ove intracelularne bakterije od nepovoljnih uvjeta okoliša. To je rezultat sposobnosti *Legionella* da

parazitira na nizu praživotinja i da se u njima množi u nedostatku bilo kakvih pomoćnih hranjivih tvari. Zbog takve oportunističke eksploatacije, *Legionella* je sposobna izazvati infekciju kod ljudi jer alveolarni makrofazi predstavljaju slične mete za parazitiranje u plućima sisavaca. (10,11)

### 1.3.1. *Legionella pneumophila*

*L. pneumophila* prva je izolirana legionela i vodeći je uzročnik legioneloze u svijetu. Kao takav, najbolje je proučavan i shvaćen član roda *Legionella*. Postoji 16 različitih serogrupa *L. pneumophila* podvrste *pneumophila*, s po jednom serogrupom svake od podvrsta *fraseri* i *pascullei*. Međutim, više od 85% legioneloze uzrokuje *L. pneumophila* subsp. *pneumoniae* serogrupa 1.

*L. pneumophila* je vrsta koja se najčešće izolira iz distribucijskih sustava vode, iako opsežnija distribucija ne znači i povećanu učestalost infekcije *L. pneumophila* jer su *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. anisa* i *L. feeleeii* također relativno česti izolati. Također je vjerojatno da se mnoge druge vrste nepneumofilnih legionela teže izoliraju iz vode pa je njihova stvarna prevalencija možda i veća. (12)

Nakon udisanja kontaminiranog aerosola, *L. pneumophila* se internalizira u alveolarnim makrofagima. Fagosomi koji sadrže *L. pneumophila* ne zakiseljavaju se niti se stapaju s lizosomima. Umjesto toga, bakterija je sposobna manipulirati događajima trgovanja stanicama domaćina i regrutirati sekretorne organele, osobito hrapavi endoplazmatski retikulum, u vakuolu koja sadrži *L. pneumophila*. Unutar ove zaštitne niše *L. pneumophila* se može razmnožavati. Ovakav sustav funkcionira jer preslikava preživljavanje legionele u protozoama. (12)

### 1.3.2. *Legionella longbeachae*

*Legionella longbeachae* je prvi put okarakterizirana kao uzročnik 1981. kada je izolirana iz pluća pacijenta koji je bolovao od pneumonije. Naziv je dobila po gradu u SAD – u. Pripadnik je roda *Legionella*, koji uključuje 48 vrsta s više od 70 serogrupa. Za razliku od većine legionela koje su široko rasprostranjeni u vodenim sredinama, prirodni okoliš *L. longbeachae* je tlo.

Značajan je ljudski patogen u određenim geografskim područjima. U multinacionalnoj studiji koja je ispitala legionarsku bolest stečenu u zajednici u Sjevernoj Americi, Europi, Australiji i na

Novom Zelandu pokazalo se da je *L. longbeachae* odgovorna za ukupno 3,9 % slučajeva legioneloze. Međutim, studija pasivnog nadzora u Australiji tijekom 2006. pokazala je da je 53 % legioneloze uzrokovano *L. longbeachae* u usporedbi s 46 % pneumonija uzrokovanih *L. pneumophila*. U istoj studiji autori sugeriraju kako je stopa smrtnosti od infekcija *L. longbeachae* (4,6%) veća od one za *L. pneumophila* (3,8%), iako je veličina uzorka ove studije ograničila statističku značajnost. (12)

*L. longbeachae* se uglavnom nalazi u tlu, a većina ljudskih infekcija povezana je s kontaminiranom zemljom u vazi, osobito s visećim posudama koje kaplju i lošom higijenom vrta. Glavni put prijenosa legionarske bolesti je, kao što je već rečeno, udisanje ili aspiracija vodenih aerosola kontaminiranih s *L. pneumophila*. Za infekcije povezane s vrtlarstvom i upotrebom komposta, još uvijek je upitno je li *L. longbeachae* prisutna u prašini ili aerosolu. (13)

Upravo iz tog razloga, legioneloze uzrokovane ovom vrstom javljaju se kada su aktualni radovi u vrtu, a to su proljetni i ljetni mjeseci.

Epidemiološka istraživanja govore kako se put prijenosa *L. longbeachae* bitno razlikuje od puta prijenosa ostalih pripadnika roda. Naime, *L. longbeachae* izolirana je iz komercijalnih mješavina tla i komposta u Australiji, SAD-u i Japanu. U Europi je provedeno samo jedno ispitivanje s malim brojem uzoraka i *L. longbeachae* nije izolirana. Mogući razlog je činjenica da se Europi kompost i mješavine tla dezinficiraju. U posljednjoj fazi kompostiranja kompost se termički obrađuje na 70 °C. Pretpostavka je da je kompostiranje ključni faktor za porast broja legionela u mješavini tla. Razlog tome je što se proces kompostiranja vrši na temperaturi od 25 °C do 35 °C, što je optimalna temperatura za rast i razvoj slobodnoživućih ameba, a s time i *L. longbeachae* koja parazitira u njima. Osim mogućeg ulaza legionele u organizam putem aspiracije aerosola odnosno prašine, činjenica da *L. longbeachae* ostaje vijabilna i do 30 minuta na rukama nakon rada s mješavinom tla govori o tome da postoji mogućnost da bi put ulaska ove bakterije bude i ingestija. Ne isključuje se i mogućnost mikroaspiracije legionela iz orofarinksa nakon spomenute ingestije kontaminirane vode odnosno komposta ili mješavine tla.

Infekcija *L. longbeachae* obično uključuje tešku upalu pluća, no međutim, ovaj organizam također je izoliran kao uzročnik endokarditisa aortne valvule, perikarditisa i akutnog pankreatitisa. Kod splenektomiranih pacijenata *L. longbeachae* može uzrokovati klasičnu lobarnu upalu pluća. Ova

vrsta također može uzrokovati životno ugrožavajuću upalu pluća i osteomijelitis kod pacijenata sa sistemskim eritematoznim lupusom. (12)

### 1.3.3. Interakcija *Legionella* spp. i protozoa

*Legionella* spp. je endoparazit koji napada stanice slobodnih praživotinja i tako ih invadira te se razmnožava u njima. Mogućnost uzgajanja legionela i na hranjivim podlogama govori o tome kako su legionele oportunistički patogeni protozoa i makrofaga te su sposobne za izvanstanični rast. Tu je vidljiva razlika između *Legionella* spp. i nekih drugih amebnih patogena koji su obavezni endoparaziti i samim time neuzgojivi u laboratoriju, primjerice *Coxiella burnetii* i *Chlamydomphila pneumoniae*. (10)

*Legionella* ulazi u protozoe i makrofage klasičnom fagocitozom ili fagocitozom namotaja ("coiling") gdje su bakterije uklopljene u zavojnicu stanične membrane domaćina. Nakon što je ušla u fagosom, *Legionella* izlučuje proteine koji inhibiraju adheziju lizosoma i sazrijevanje fagosoma. Zatim slijedi regrutiranje komponenata hrapavog endoplazmatskog retikuluma u fagosom što i dalje sprječava adheziju lizosoma i zakiseljavanje vezikule i tako štiti bakteriju. Unutar tako zaštićene vakuole, *Legionella* se razmnožava sve dok su joj dostupne hranjive tvari, odnosno dok su koncentracije potrebnih aminokiselina dovoljno visoke. Nakon pada koncentracije aminokiselina, *Legionella* formira flagele koje će joj omogućiti bijeg iz stanice domaćina i pomoći u pronalasku novog domaćina kojeg će parazitirati. (10)

Parazitska invazija olakšava rast legioneli i osigurava odjeljak koji je puferiran i bogat hranjivim nutrijentima. Rast *Legionella pneumophila* u vodovodnoj vodi dokazan je u prisustvu domaćina, tj. protozoa, ali ne i u odsustvu istih što dokazuje kako su legionele sposobne rasti u okolišu koji ne posjeduje nikakve hranjive tvari sve dok koristi parazitizam kao mehanizam preživljavanja. Još jedan mehanizam protozoa koji *Legionella* iskorištava je sposobnost ulaska u 'uspavanu' fazu, cistu. Cista je zaštićeni, inkapsulirani oblik protozoa te ih tako štiti od nepovoljnih uvjeta okoliša kao što su isušivanje, nedostatak hrane, toplina, biocidni pripravci, osmotski stres i slično. Sve dok bakterija uđe u protozu prije prelaska u cistu, ostaju unutra zatvorene, preživljavaju i zaštićene su od štetnih vanjskih utjecaja. (10)



Razne amebe koje slobodno žive, poput *Naegleria* i *Acanthamoeba*, mogu koristiti *L. pneumophila* kao jedini izvor hrane. No, kao što je već spomenuto, *Legionella* može djelovati kao parazit, ubijajući protozoe. Dok protozoe mogu progutati legionele i, u nekim slučajevima, na taj način dobiti hranu, a legionele mogu ubiti domaćina, u većini slučajeva, legionele opstaju i repliciraju se unutar vakuola domaćina tijekom duljeg razdoblja. (9)

Otpornost na probavljanje od strane protozoa evolucijski se smatra pretečom patogenosti i danas se svrstava u mehanizam preživljavanja bakterija u negostoljubivom vodenom okolišu (6).

Utvrđeno je da su *Naegleria* i *Acanthamoeba* važni domaćini *L. pneumophila* u vodi. Uočeni su brojni štapići nalik legioneli kako se množe unutar vrsta *Acanthamoeba* izoliranih iz vode za piće što bi moglo ukazivati na ograničenu dostupnost željeza jer, kao što je prije primijećeno, u uvjetima nedostatka željeza, *Legionella* se pretvara iz pleomorfni u tanke štapićaste stanice. Broj *L. pneumophila* koji se unese u stanicu *Acanthamoeba palestinensis* ovisi o veličini amebe. Također, *Tetrahymena pyriformis* je važno stanište za *L. longbeachae* što je pronađeno u kupovnoj zemlji za tegle. *L. pneumophila* će se također razmnožavati kao unutarstanični parazit trepetljikaša, *Tetrahymena pyriformis* u vodovodnoj vodi na temperaturi od 35 °C. Utvrđeno je da amebe i *Tetrahymena* podržavaju unutarstanično razmnožavanje *L. pneumophila* u vodi rashladnih tornjeva i tako sudjeluju u prijenosu legioneloze. (9)

#### **1.3.4. Povezanost rasta *Legionella* spp. i ostalih bakterija**

*Legionella* spp. je sposobna za nekrotrofno hranjenje što bi značilo da potrebnu hranu za rast dobiva iz tkiva i proizvoda mrtvih mikroorganizama u okolnom biofilmu. To je najvjerojatnije primarni mehanizam za dobivanje ugljika, dušika i aminokiselina za razmnožavanje. Parazitska invazija je zapravo oportunistički mehanizam preživljavanja upravo zato što protozoe nisu uvijek prisutne i dostupne. Upravo zato *Legionella* razvija višestruke strategije hranjenja. Primjerice, *Legionella* je sposobna stvoriti mikrokolonije u laboratorijskim biofilmovima dobivenim od više organizama, izuzevši amebe, i na hranjivim podlogama koje ne sadrže L – cistein i željezov pirofosfat u suradnji s *Flavobacterium breve*. Sve to je pokazatelj kako *Legionella* ima sposobnost rasti na temelju nutrijenata koje izluči drugi organizam u vrlo pojednostavljenim uvjetima. (10)

### 1.3.5. *Legionella* spp. u biofilmu

Biofilm se definira kao složena mikrobna zajednica koja karakterizira stanice koje su pričvršćene na granicu supstrata ili faze i međusobno, a ugrađene su u matricu samoproizvedenih izvanstaničnih polimernih tvari. (14)

To je zajednica koja koristi mikrobnu strategiju preživljavanja, odnosno koristi ekstracelularne izlučevine kako bi koncentrirala hranjive sastojke. Takvi složeni mikrobni filmovi imaju običaj koristiti širi spektar tvari za prehranu za razliku od sličnih planktonskih kultura koje nisu povezane biofilmom, odnosno suspendiranih u tekućini. Tendencija za takvim širim spektrom prehrane, omogućuje prehranbeno zahtjevnim organizmima poput *Legionella* spp. da se razmnožavaju u oligotrofnim sustavima. (14)

Kako biofilm nastanjuju razni organizmi, tako je i širi raspon hrane koja se katabolizira što na koncu dovodi do bogatijeg sadržaja hranjivih tvari u biofilmu. Međutim, čak i u koptotrofnim sustavima (sustavi bogati hranjivim tvarima), nesposobnost *Legionella* spp. da iskoristava L – cistein može djelovati kao ograničavajući faktor u vanstaničnom rastu. Tako nešto može utjecati na postojanje mikrokolonija i multiplikaciju istih unutar domaćina. Predložen je još jedan model ekstracelularnog rasta pri kojem se množenje *Legionella* unutar biofilma određuje specifičnim interakcijama adherencije između legionela i prisutnih heterotrofnih bakterija. (14)

Rast legionela u vodenom ekosustavu opisan ovim modelom ovisit će o planktonskom rastu više nego o sesilnom rastu. Konkretno, planktonska faza rasta omogućila bi parazitiranje protozoa, nakon čega bi uslijedila ugradnju novih stanica u postojeći biofilm. Ovaj ciklus podsjeća na parazitiranje, razmnožavanje i izlazak iz makrofaga u kojima stanice postaju flagelirane i kada se koncentracija hranjivih tvari u njihovoj okolini smanji do točke koja više nije dovoljna za kontinuirano razmnožavanje. Niski sadržaj hranjivih tvari unutar biofilma mogu potaknuti *Legionella* da uđe u fazu planktonskog rasta kako bi parazitirala na domaćinu. (10)

U umjetnim vodenim sustavima, kao i u distribuciji pitke vode, rast legionele se detektira isključivo u biofilmovima koji pokrivaju unutrašnjost cijevi, ventilacije i klimatizacijskih sustava. Uz *Legionella* spp., spomenuti biofilmovi mogu biti privremena ili dugoročna staništa drugih, higijenski relevantnih, mikroorganizama. Takvi organizmi su, primjerice, indikatori fekalnog

zagađenja (*Escherichia coli*), obligatni bakterijski patogeni fekalnog porijekla (*Campylobacter* spp.), oportunistički okolišni patogeni (*Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium* spp., *Aeromonas* spp.), enterični virus (adenovirusi, rotavirusi, norovirusi) i parazitske protozoe (*Cryptosporidium parvum*). Spomenuti organizmi se mogu vezati na postojeći biofilm gdje se integriraju i opstaju danima, tjednima ili puno dulje, što ovisi o biologiji i ekologiji samog organizma te o uvjetima okoliša. (14)

Upravo zbog intracelularnog načina života *L. pneumophila* unutar protozoa, teško je odrediti proizlazi li rezistencija legionela u okolišu zbog strukture biofilma, zbog interakcije protozoama, tj. amebama ili je oboje u pitanju. (14)

### 1.3.6. Morfologija i virulencija

*Legionella* pokazuje različite fenotipske karakteristike kao odgovor na okolišne i prehrambene uvjete. Unutar biofilma *Legionella* postaje filamentozna i višejezgretna kako bi se omogućila brza podjela na planktonsku formu kada je to potrebno, primjerice kada su prisutni parazitski domaćini. Ova bi promjena omogućila brzu podjelu kako bi se povećala vjerojatnost da *Legionella* naiđe na domaćina kada prehrambeni uvjeti u okolini postanu nepovoljni za rast. U planktonskom obliku i tijekom razmnožavanja unutar domaćina, stanice *Legionella* se oblikuju u štapiće, a nakon izlaska iz vakuola, stanice razvijaju monopolarne bičeve. Bičevi nisu potrebni da bi legionele mogle zaraziti protozoe i makrofage, ali njihova je prisutnost povezana s virulencijom. *Legionella* s nedostatkom flagela bila je manje virulentna od onih koje su posjedovale bičeve. Ovo sugerira moguću povezanost između stvaranja bičeva i ulaska u stanicu mehanizmom namotajne fagocitoze ili postojanja niza gena potrebnih za izražavanje virulencije koji su poremećeni nakon uklanjanja regije flagelarnog gena. Adhezija legionele na parazitskim domaćinima nije posredovana prisustvom flagela jer one vrste koje ih ne posjeduju, nisu pokazali različite stope vezivanja u usporedbi s flageliranim vrstama. Pokazalo se kako je zapravo adhezija povezana s prisutnošću pila jer se one vrste koje ih nisu mogle proizvesti, pokazale 50% manju stopu prijanjanja na stanice epitela čovjeka. (10)

Za razliku od stanica sa smanjenom virulencijom, stanice legionela koje su se replicirale u amebnom domaćinu imaju tendenciju zaraziti druge makrofage deset puta brže nego one koje su se replicirale izvanstanično. Ovakva povećana virulencija pokazuje implikaciju i na mikrobnu

ekologiju i na ljudsko zdravlje. Visoko virulentne legionele vjerojatnije će uzrokovati bolest kod ljudi nakon parazitske invazije domaćina što upućuje na to da, iako legioneli nisu potrebne protozoe za razmnožavanje, kontrola istih u antropogenim izvorima vode može smanjiti stopu zaraze kod ljudi. Povećana virulencija omogućila bi stanicama legionele da rekoloniziraju sustav nakon tretmana dezinficijensom jer će intracelularne legionele koje prežive tretman nastojati inficirati preostale protozoe nakon izlaska iz prvobitnog domaćina. (10)

### 1.3.7. Izvori legioneloze u okolišu

Legionarska bolest ili legioneloza prvi put je otkrivena 1976. godine nakon izbijanja u Philadelphiji tijekom konvencije Američke Legije. Vrlo je ozbiljan oblik upale pluća uzrokovan *Legionella* spp. iz okoliša. *Legionella pneumophila* uzrokuje  $4 \pm 20$  % slučajeva upale pluća i svrstana je u drugi ili treći uzrok koji zahtjeva hospitalizaciju. Još od spomenutog otkrića kako je za izbijanje legionarske bolesti u Philadelphiji kriva *Legionella* iz hotelskog klimatizacijskog sustava, postoji očita veza s vodom iz okoliša. *L. pneumophila* je, kao što je već spomenuto, dio prirodnog vodenog okoliša te je sposobna preživjeti ekstremne raspone okolišnih uvjeta. Transmisija se odvija putem inficiranog aerosola, a prijenos s osobe na osobu se ne događa. (9)

*L. pneumophila* može se pronaći u 33% uzoraka vode za piće što ukazuje na to da bi voda za piće mogla biti značajan izvor zaraze. Ovaj podatak govori kako javni vodovodi mogu kontaminirati vodovodne sustave bolnica i ostale velike zgrade. (9) Još jedan od uzročnika, *L. longbeachae*, čije je prirodno stanište tlo, može pronaći put do spremnika s vodom i tako se naći u vodovodnoj mreži i tako indirektno predstavlja opasnost.

Biofilmovi koji su veoma rasprostranjeni, ne samo u prirodi već i u medicinskim i dentalnim uređajima, identificirani su kao ekološke niše u kojim *L. pneumophila* živi, razmnožava se i čeka pogodnog domaćina. U vodovodnim sustavima utvrđeno je da je *L. pneumophila* najzastupljenija u biofilmovima koji se mogu naći na plastičnim masama pri temperaturi od 40 °C gdje čini više od 50 % biofilma. Za razliku od plastike, cijevi s bakrenom površinom inhibirale su potpuno obrastanje i sadržavale su mali broj legionela. Ograničena količina željeza dovodi i do smanjene virulencije legionele. Metalne vodovodne konstrukcije i ostali proizvodi povezani s korozijom su važan faktor u pribavljanju željeza i ostalih metala koji su potrebni za rast legionele. (9)

Poseban problem predstavlja biofilm koji se može pojaviti na dentalnoj opremi. Tamo se legionela može razmnožavati, a onda tijekom stomatoloških zahvata pronalazi put u aerosol i tako neposredno dovodi pacijenta u opasnost. Jedinstvenost vodovodnog sustava zubarske stolice je sposobnost brzog razvoja biofilma i tu se javlja problem stvaranja potencijalno kontaminiranog aerosola. *Legionella* spp. je također pronađena i unutar protozoa koje su se našle unutar stomatoloških jedinica. (9)

Iako je *Legionella* uglavnom povezana sa slatkim vodama, pokazalo se da može preživjeti i u morskoj vodi. Utvrđeno je da oceanska voda u koju se ispuštaju kanalizacijske otpadne vode, sadrži legionelu. *Legionella* spp. su unaprijed poslane u svim fazama pročišćavanja otpadnih voda te njihov broj ne opada značajno kroz postupak pročišćavanja. Tako pročišćena voda predstavlja važan resurs za područja s neadekvatnim zalihama vode, ali isto tako može predstavljati i izvor zaraze legionelom. (9)

### **1.3.8. Dezinfekcijski tretmani na *Legionella* spp.**

Kontrola *Legionella* spp. predstavlja nekoliko problema jer postoji više ciljeva za dezinfekciju. To su, primjerice, sve *Legionella* spp., sve ostale bakterije, biofilm, protozoe i slično. Upotreba dezinficijensa najučinkovitija je u smanjenju broja bakterija dok na protozoe ne djeluje u tolikoj mjeri zbog razlike u sastavu stanične membrane, životnom ciklusu, mehanizmima transporta kroz staničnu membranu i slično. Protozoe koje su tretirane tiokarbamatima, izotiozolonima i kvarternim amonijevim spojevima u preporučenoj dozi, pokazale su veću otpornost nego bakterije. Dezinfekcija klorom, klorovim dioksidom, ozonom, monokloraminom te ionizacija bakrom i srebrom djeluje po istom principu, dakle metode su učinkovitije na bakterijama, nego na protozoama. (10)

Povećana otpornost na mnoge, često korištene biocide, omogućava protozoama opstanak u biofilmu i djeluje kao ekološki zaštićen rezervoar za legionelu. Legionele koje se mogu pronaći u encistiranom obliku amebe pokazuju vrlo visoku otpornost na okolišni stres te također preživljavaju izloženost slobodnom kloru (100 ppm) i izloženost temperaturi od 80 °C tijekom 10 minuta što su uvjeti koji bi inače ubili većinu, ako ne i sve legionele unutar sustava. Nakon dezinfekcije sustava, legionele koje su sekvestrirane unutar cista protozoa, mogu vrlo brzo rekolonizirati sustav. U protivnom, ako se sustav ne održava redovito, vrlo brzo dolazi do

rekolonizacije. Kao alternativno rješenje, potrebno je odvojeno djelovati na protozoe i bakterijsku kontaminaciju te je u tom slučaju učinkovitije smanjenje razine *Legionella* spp. i biofilma. (10)

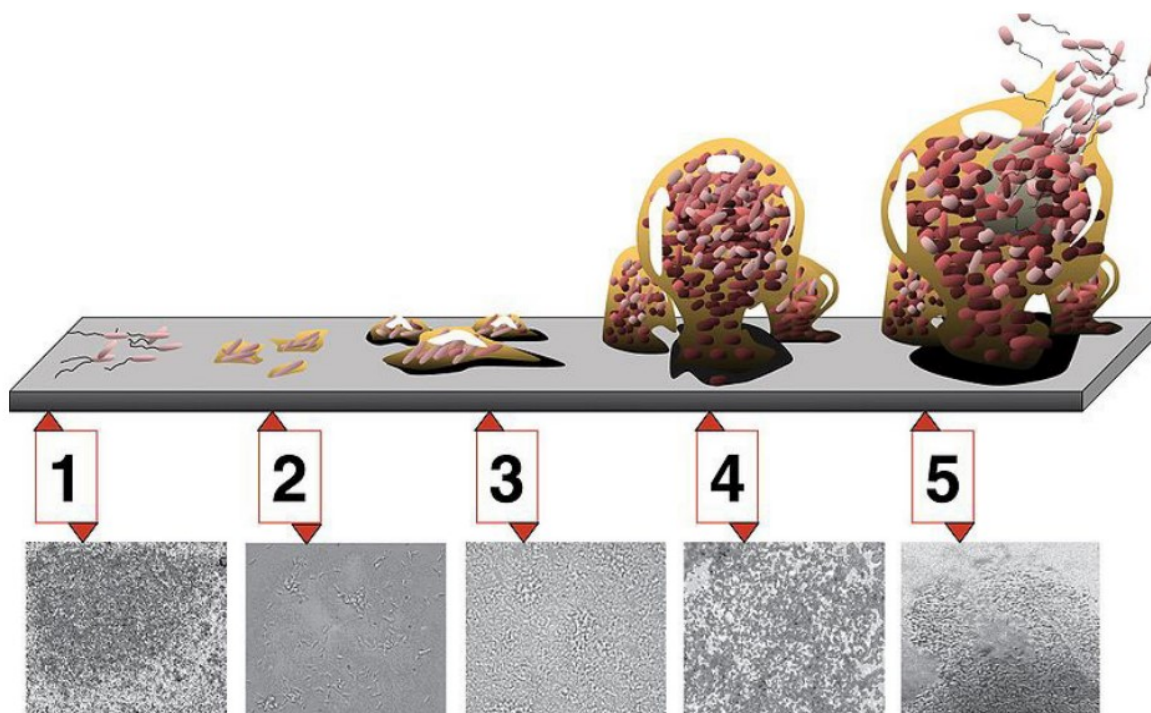
Tretmani koji nisu kemijski, dostupni su za mikrobnu kontrolu, ali imaju različitu učinkovitost u različitim sustavima. Obrada sustava vodom zagrijanom na 80 °C tijekom 10 minuta vrlo je učinkovita u smanjenju broja bakterija i trofozoita, ali je neučinkovita u ubijanju cista. No, bez obzira na učinkovitost, toplinska obrada nije prikladna za sve sustave. Sustavi s osjetljivim ili toplinski osjetljivim komponentama, poput zamrzivača, mogu se oštetiti izlaganjem povišenim temperaturama, dok u nekim sustavima, zbog njihove veličine ili konfiguracije, povišenje temperature od čak nekoliko stupnjeva može biti jednostavno previše energetski skupo ili pak nemoguće. UV dezinfekcija vodenih sustava pokazuje učinkovitost kod ubijanja planktonskih bakterija, ali nema rezidualni učinak što bi značilo da inaktivira mikroorganizme samo kad je u izravnom kontaktu s njima. UV inaktivacija protozoa je moguća, ali za razliku od bakterija, inaktivacija zahtjeva mnogo veći intenzitet UV zraka kako bi učinkovitost bila na razini. UV tretman vodenih izvora također je ograničen bistrinom vode, razinom čvrstih čestica, turbiditetom vode ili bilo kojim elementom koji utječe na prijenos svjetlosti, odnosno smanjuje prodor i učinkovitost zračenja. (10)

#### **1.4. Stvaranje biofilma u distribucijskom sustavu pitke vode**

S obzirom da je vodoopskrbni sustav veoma širok i raznolik, biofilm se može stvoriti u raznim fazama prilikom obrade i distribucije pitke vode pod uvjetom da voda dodiruje čvrstu površinu, primjerice cjevovodi, čestice filtra, stjenke vodospreme, slivnici, slavine, glave tuša i slično.

Biofilm se opisuje kao sesilna zajednica mikroorganizama koji su međusobno ireverzibilno povezani i uronjeni u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera koji je stvoren od njih samih i na taj način su zaštićeni od vanjskih utjecaja. Može se stvoriti na raznim abiotiskim i biotskim podlogama. Može posjedovati jednu bakterijsku ili gljivičnu vrstu, ali uglavnom je to zajednica od više različitih mikroorganizama.

Ovakva zajednica funkcionira na vrlo složen način, ali organiziran i skladan, dok mehanizam nastanka i međuovisnost još nisu potpuno razjašnjeni. Ovo je jedini biocenoza koja je nastala isključivo zbog ljudske aktivnosti i svakako zahtjeva daljnja istraživanja. (2)



**Slika 3.** Prikaz nastanka i stvaranja biofilma (preuzeto od (2))

Kao što je vidljivo iz slike 3., razvitak i stvaranje biofilma može se podijeliti u pet koraka:

1. reverzibilno pričvršćivanje – slobodni mikroorganizmi se adheriraju na površinu van der Waalsovima silama
2. ireverzibilno pričvršćivanje – bakterije su se čvrsto povezale, međustanična interakcija im je poboljšana što im olakšava suživot s drugim, različitim vrstama; automatski se stvaraju skupine koje osnažuju adherenciju
3. maturacija I – počinje stvaranje ekstracelularnog matriksa i raste broj kolonija
4. maturacija II – kolonije su narasle i dosegle svoj maksimum, ali strukture se i dalje stvaraju i razvijaju se tzv. intraspecijska arhitektura s raznim porama i kanalima o kojima odlučuju članovi biofilma
5. disperzija – bakterije su dosegle svoj maksimum u biofilmu te izlaze i u potrazi su za prikladnijim izvorom hrane

75 – 95 % volumena biofilma zauzima polisaharidni matriks ispunjen vodom, a ostatak su mikroorganizmi. upravo zbog velike količine vode, površina biofilma je skliska i želatinozna. Najčešći mikroorganizmi koji se mogu naći u biofilmovima su protozoe, gljive, bakterije i to većinski bakterije sklone stvaranju sluzi i spora, nitrificirajuće, sulfat reducirajuće i ostale anaerobne bakterije. Polisaharidni matriks osigurava strukturu biofilma, pruža hranu mikroorganizmima i štiti ih od raznih biocida koji toksično djeluju na ovakve strukture. To je način na koji biofilmovi štite mikroorganizme i pomažu im da prežive uvjete koji su daleko od optimalnih za rast i razmnožavanje. Osim spomenutog, biofilmovi su i fizička zaštita od vanjskih faktora – UV, toplina, promjena pH i temperature. (2)

Zaključno, biofilmovi u vodoopskrbnom sustavu uzrokuju nepovoljne, čak i opasne promjene pitke vode što se opisuje promjenom organoleptičkih svojstava vode, ali tu su i higijensko – zdravstveni pokazatelji koji na koncu mogu biti uzročnici raznih bolesti. (2)

#### **1.4.1. Kemijski sastav, hranjive tvari, dezinfekcijska sredstva, temperatura vode i njihov utjecaj na razvoj biofilma**

Kao i kod svih živih organizama, presudni faktori za preživljavanje su prisutnost i koncentracija hranjivih tvari, koncentracija kisika, optimalna temperatura i pH vrijednost. Prilikom života u biofilmu, bakterije mijenjaju svoja svojstva ovisno o dostupnosti i sastavu nutrijenata. Moglo bi se reći da mutiraju kako bi višestruko povećali svoju sposobnost i šanse za preživljavanjem. (2)

Mikroorganizmi koji žive u biofilmu vrlo često imaju veću toleranciju na biocide i to je jedan od razloga zašto se teško uklanjaju dezinfekcijom, posebice ako je površina teže dostupna ili se radi o površinama na kojima se voda zadržava. To mogu biti slijepi završetci u sustavu vodoopskrbe – bojleri, bazeni, vodospreme, što za posljedicu ima kontaminaciju vode nakon izvršene dezinfekcije što neposredno dovodi do moguće pojave raznih bolesti. (2)

Nastanak biofilmova i preživljavanje mikroorganizama najčešće je u sustavima za zagrijavanje vode upravo zato jer se temperature tamo kreću između 30 i 50 °C što je optimum za njihovu rast i razmnožavanje. (2)



### 1.4.2. Quorum sensing

Bakterije međusobno komuniciraju putem malih difuznih signalnih molekula koje pripadaju različitim kemijskim klasama. Ponašanje bakterijske skupine kontrolira se komunikacijskim procesom stanica – stanica koji se naziva quorum sensing ili detekcija kvoruma, uključujući signalne molekule 'autoinduktora'. Nakon dostizanja granične koncentracije ("kvorum"), autoinduktori pokreću populacijsku promjenu ekspresije gena i izvode procese koji obično nisu produktivni kada ih poduzima pojedinačna bakterija. (15)

Kod gram-negativnih bakterija signalne molekule uključuju spojeve N – acil-homoserin lakton (HSL), autoinduktor – 2 (AI – 2) i njegov prekursor 4,5 – dihidroksi – 2, 3 – pentandion (DPD), faktor difuzijskog signala ( DSF), 2 – heptil – 3 – hidroksi – 4 – kinolon (PQS), kao i molekule dialkilresorcinola (DAR) i a – hidroksiketona (AHK). (15)

Mikroorganizmi žive u složenim zajednicama i nailaze na mješavinu molekula autoinduktora koje se moraju sortirati kroz određene putove otkrivanja signala i transdukcije. U tu svrhu, sustavi za detekciju kvoruma povezani su s drugim putevima senzora, integrirajući tako znakove okoliša i sastave vrsta ekoloških niša. Nije iznenađujuće da je sveprisutna detekcija kvoruma također osjetljivo na smetnje koje se nazivaju gašenje kvoruma. Inhibicija ili gašenje kvoruma može biti obećavajući antivirulencijski pristup za prevladavanje patogena otpornih na antibiotike u kliničkim uvjetima. (15)

## 2. Materijali i postupci

### 2.1. Materijali

#### 2.1.1. Laboratorijski pribor

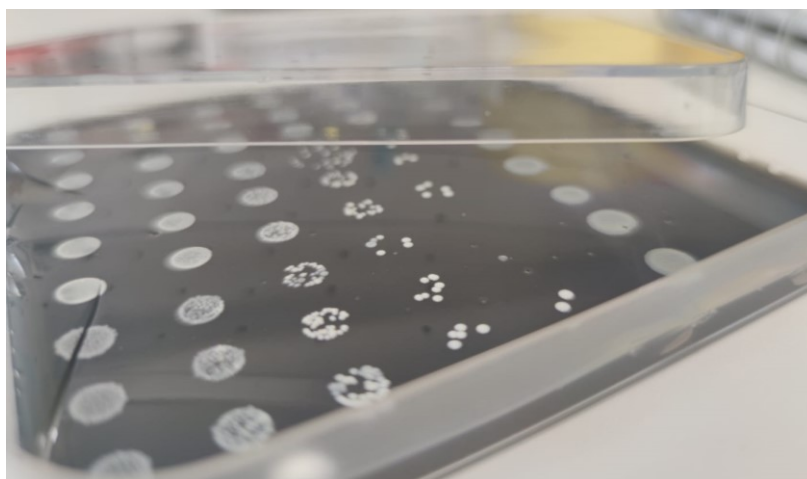
- Epruvete
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Müller – Hinton bujon (infuzija krutih govedih tvari, škrob, hidrolizat kazeina, pH 7, 4 ± 0,2)
- BHI bujon (infuzija govedeg srca i teleceg mozga, natrijev klorid, dinatrijevhidrogen fosfat, pepton i glukoza, pH 7, 4 ± 0,2)
- Nutrijent bujon (glukoza, pepton, natrijev klorid, kvašcev ekstrakt, pH 7, 5 ± 0,2)
- AYE bujon (kvašcev ekstrakt, pepton, ekstrakt jetre, natrijev klorid, L – cistein, željezov pirofosfat, natrijev selenit, pH 6.9±0.2)
- BCYE agar (alfa – ketoglutarat, L – cistein, željezov pirofosfat, agar, kalijev hidroksid, aktivni ugljen, pufer, kvašcev ekstrakt, pH 6.9±0.2)
- Multikanalna pipeta s nastavcima
- Vodena kupelj
- Inkubator
- Bunsenov plamenik
- Ultrazvučna kupelj
- Spektrofotometar
- Tresilica
- Mikrotitarska pločica s jažicama
- Pinceta
- Automatske pipete: 10-1000 µL, 20-200 µL
- Nastavci za automatske pipete

#### 2.1.2. Kemikalije

- Fiziološka otopina
- Autoklavirana voda iz slavine

## 2.2. Mikroorganizmi

Prilikom provođenja pokusa, mikroorganizmi koji su korišteni jesu *Legionella pneumophila* 130b, *Legionella longbeachae* NSW te *Bacillus amyloliquefaciens* SS – 12, 6 i SS – 38, 4. Sojevi *Legionella* su uzgajani na BCYE agaru 3 – 5 dana na  $35 \pm 2$  °C, dok su bacilusi su uzgajani na MH agaru 24 sata pri  $35 \pm 2$  °C.



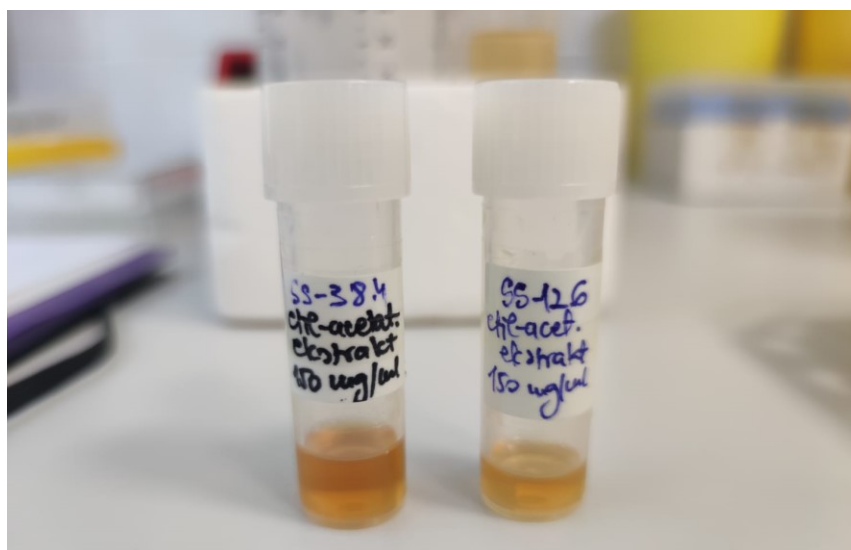
**Slika 4.** *Legionella* spp. na BCYE agaru



**Slika 5.** *Bacillus amyloliquefaciens* SS – 12, 6 i SS – 38, 4 na MH agaru

### 2.2.1. Bakterijski izolati i ekstrakcija lipopeptida

Prilikom provođenja ovog istraživanja korištena su dva soja *Bacillus* spp. – SS – 12, 6 i SS – 38, 4. Sojevi potječu iz uzoraka tla iz Srbije, a dobiveni su ljubaznošću profesora Stankovića iz mikrobiološkog laboratorija Biološkog fakulteta Sveučilišta u Beogradu.



**Slika 6.** Ekstrakti *Bacillus amyloliquefaciens*

Nakon termalne inaktivacije vegetativnih stanica na 80 °C kroz 10 minuta, uzorci su inkubirani na 30 °C 48 sati na Luria – Bertani agaru (LB), a različite pojedinačne kolonije prethodno su karakterizirane mikroskopskim izgledom, bojanjem po Gramu i ispitivanjem katalaze. Stanice su uzgajane u LB bujonu u aerobnim uvjetima na 30 °C tijekom 24 sata i korištene su za daljnje pokuse. (16)

Svaki od sojeva *Bacillus* uzgojen je u 1000 mL LB bujona uz snažno mućkanje 24 sata na 30 °C. Cjelokupni volumen upotrijebljen je za pročišćavanje lipopeptida iz svakog soja. Stanice su uklonjene centrifugiranjem ( $5\ 000 \times g$ , 20 min) na 4 °C, a supernatant bez stanica upotrijebljen je za ekstrakciju lipopeptida etil acetatom. Supernatant kulture i etil acetat su pomiješani u volumenskom omjeru 1:1,1 (v/v), uz dodatak NaCl (30 g/L). Suspenzija se miješa 2 sata na magnetskoj miješalici. Frakcija etil acetata je sakupljena i osušena do kraja u rotacijskom isparivaču. Metaboliti su resuspendirani u metanolu i filtrirani kroz 0,45 µm filter. (16)

## 2.3. Testiranje antimikrobnog potencijala *Bacillus amyloliquefaciens*

### 2.3.1. Priprema bakterijske suspenzije

Nakon inkubacije *Legionella* spp. na BCYE agaru 3 – 5 dana, pripremila se suspenzija u AYE bujonu koji sadrži željezo i L – cistein, suplemente koji su neophodni za njezin rast. Mjerenjem na spektrofotometru odredila se optička gustoća suspenzije u vrijednosti 1 pri 600 nm te je računski razrijeđena suspenzija do koncentracije od  $10^6$  bakterija, a tu suspenzija se u daljnjem postupku koristi za ispitivanje minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) te za određivanje adhezije na polistirenu i nehrđajućem čeliku.

### 2.3.2. Metoda difuzije agarnih jažica – orijentacijska metoda osjetljivosti

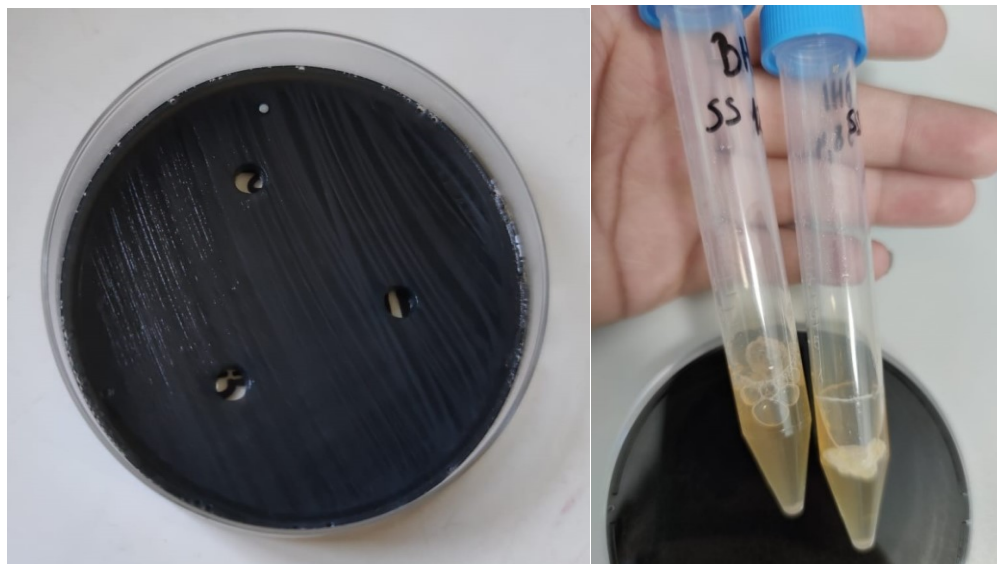
#### Princip

Metoda difuzije agarnih jažica jedna je od najjednostavnijih metoda u mikrobiologiji, a temelji se na Kirby – Bauerovoj metodi disk difuzije. Razlika leži u tome što se kod metode disk difuzije na površinu agara postavljaju diskovi sa tvari za koju se ispituje antimikrobni učinak, dok se kod difuzije agarnih jažica buše rupe u agaru sa sterilnim bušačem, a zatim se te rupe, odnosno jažice pune sa ispitivanom tvari. Obje metode zahtijevaju inkubaciju nakon koje slijedi mjerenje zona inhibicije, ukoliko je do njih došlo. Rezultati su kvalitativni, a koriste kako bi vidjeli pokazuje li mikroorganizam osjetljivost ili otpornost na ispitivanu tvar.

#### Postupak

Bakterijske suspenzije *L. pneumophila* 130b i *L. longbeachae* NSW, koja iznosi približno  $10^8$  CFU/mL nasadene su na BCYE agar sterilnim brisnim štapićem, a zatim slijedi bušenje agara. Jažice u agaru su načinjene metalnim cilindrom, promjera 5 mm, koji je prethodno steriliziran na plamenu. U jažice se dodaje 10  $\mu$ L *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6 I *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4. Oba soja su prethodno inkubirana 24 sata u različitim hranjivim bujonima te u fiziološkoj otopini ne bi li se uočila razlika u potentnosti antimikrobnih svojstava ovisno o različitostima hranjivih bujona. Mediji korišteni za rast *Bacillus* spp. su fiziološka otopina, nutrijent bujon, Müller – Hinton bujon i BHI (*eng. brain and heart infusion*). Osim korištenja raznih medija, također je

mjerena pH vrijednost, provedena termička obrada *Bacillus* spp. te filtracija istog, odnosno ispitivanje antimikrobne aktivnosti supernatanta *Bacillus* spp. Nakon upijanja suspenzije i ispitivane tvari u hranjivu podlogu, ista ide na inkubaciju na  $35 \pm 2$  °C tijekom 3 – 5 dana. Rezultati se očitavaju tako što se mjeri zona inhibicije oko jažice s *Bacillus* spp.



**Slika 7.** Prikaz hranjive podloge s jažicama prije inkubacije i suspenzija sojeva *Bacillus*

### 2.3.3. Metoda dvostruke mikrodilucije

Metode razrjeđenja, odnosno dilucijske metode, koriste se kako bi se odredila minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK). Minimalna inhibitorna koncentracija označava vrijednost, tj. najnižu koncentraciju ispitivane tvari koja je potrebna da se spriječi rast mikroorganizama, što se laboratorijski vidi kao prestanak zamućenja u jažicama nakon potrebne inkubacije. S druge strane, minimalna baktericidna koncentracija je ona koncentracija koja je dovoljna da uništi mikroorganizam i tako spriječi njegov rast. Točne koncentracije i MIK – a i MBK – a se očitavaju nakon nasađivanja na hranjivu podlogu i inkubacije iste.

#### **Princip**

Metoda mikrodilucije temelji se na seriji razrjeđenja ispitivane tvari u krutoj ili tekućoj hranjivoj podlozi te se prati rast mikroorganizama u nizu različitih koncentracija. Spomenuta metoda zapravo

opisuje izlaganje točno određenog broja mikroorganizama točno određenom nizu koncentracija tvari koja se ispituje te se nakon inkubacije očitava MIK vrijednost koja se očituje izostankom замуćenja u jažici mikrotitarske pločice. Nakon toga slijedi nasađivanje uzoraka iz jažica na hranjivu podlogu te i ona ide na inkubaciju, a nakon inkubacije se očitava i MBK vrijednost. Najniža koncentracija ispitivane antimikrobne tvari, u ovom slučaju ekstrakt *B. amyloliquefaciens*, u kojoj se ne pojavljuje замуćenje, odnosno inhibiran je rast mikroorganizma, predstavlja MIK, a izražena je u mg/mL. (17)

### Postupak

Nakon uzgajanja bakterija koje se ispituju, u ovom slučaju *L. pneumophila* 130b i *L. longbeachae* NSW, priprema se bakterijska suspenzija koja u konačnici mora iznositi  $10^6$  CFU/mL. Turbiditet suspenzije je izmjeren na spektrofotometru na 600 nm valne duljine. Zatim slijedi priprema mikrotitarskih pločica. U svaku jažicu (osim u 1.) dodaje se 50  $\mu$ L AYE bujona, a zatim se u prvi red, koji je s početka prazan, dodaje ispitivana tvar s antimikrobnim potencijalom što je u ovom slučaju ekstrakt *B. amyloliquefaciens*. Slijedi priprema razrjeđenja. Kao zadnji korak, dodaju se sojevi bakterija (50  $\mu$ L). Tako pripremljena pločica ide na inkubaciju na  $35 \pm 2$  °C kroz 24 sata. Sljedeći dan vidljiva je MIK vrijednost, što se potvrđuje nasađivanjem na BCYE agar i inkubacije od 3 – 5 dana koliko je potrebno za rast *Legionella* spp. MIK vrijednost je ona koja je inhibirala porast od 90% bakterija, dok je MBK vrijednost viša od MIK – a ispitivane antimikrobne tvari i ubila sve mikroorganizme iz tog razrjeđenja, a to je vidljivo tako što nema porasta na hranjivoj podlozi.



**Slika 8.** Mikrotitarska pločica pripremljena za određivanje MIK – a i MBK – a i hranjiva podloga nakon inkubacije

#### **2.3.4. Antibakterijski učinak supernatanta *B. amyloliquefaciens***

Antibakterijski učinak supernatanta bacilusa prvo je ispitan metodom difuzije u agar iz jažica, no kako nakon inkubacije nije bilo vidljivih zona inhibicije, htjelo se i kvantitativno ispitati je li to zaista tako ili supernatant pokazuje nekakav, pa i minoran antimikrobni učinak na *Legionella* spp.

##### **Postupak**

Nakon inkubacije supernatanta *B. amyloliquefaciens*, slijedi priprema različitih omjera razrijeđenja supernatanta bacilusa. Omjeri su bili 1:1, 2:1 i 3:1. Zatim se priprema mikrotitarske pločica gdje se rade razrijeđenja. Tako pripremljena pločica ide na inkubaciju na  $35\pm 2$  °C kroz 24 sata. zatim se određivao broj bakterija u uzorcima.

#### **2.3.5. Formacija biofilma na polistirenskim mikrotitarskim pločicama i na nehrđajućem čeliku – "metoda anti – adhezije"**

Obzirom da *Legionella* spp. ima tendenciju stvaranja biofilma, ovom metodom se ispituje inhibicija nastanak istog nakon tretiranja ekstraktima *Bacillus* spp.

##### **Princip**

Metoda anti – adhezije temelji se također na seriji razrijeđenja ispitivane tvari u tekućoj hranjivoj podlozi, a prati se koja koncentracija ispitivane antimikrobne tvari bila dovoljna da spriječi nastanak biofilma, odnosno da djeluje anti – adhezivno. Pločica sa razrijeđenjima ide na inkubaciju, a zatim se nakon ispiranja i ultrazvučne kupelji, sadržaj nasaduje na hranjivu podlogu (BCYE) i vraća na inkubaciju. Nakon 3 – 5 dana slijedi očitavanja koncentracija koje su djelovale anti – adhezivno.

##### **Postupak**

Postupak pripreme mikrotitarske pločice za ispitivanje anti – adhezije je jednak kao i za ispitivanje minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije. Nakon izbacivanja supernatanta slijedi ispiranje jažica sterilnom vodom dva puta. Nakon dvostrukog ispiranja dodaje se 200  $\mu$ L sterilne vode, a mikrotitarska pločica ide na ultrazvučnu kupelj. Ultrazvučna kupelj služi kako bi se biofilm odvojio od jažica. Nakon ultrazvuka slijedi grubo struganje jažica i nasadivanje istih na hranjivu podlogu (BCYE). Agar zatim ide na inkubaciju 3 – 5 dana na  $35\pm 2$  °C, a nakon inkubacije



slijedi očitavanje ploča na kojima je jasno vidljivo koja koncentracija ekstrakta je bila dovoljna da spriječi formaciju biofilma.

Prilikom ispitivanja anti – adhezije na nehrđajući čelik, u mikrotitarsku pločicu dodaju se inox diskovi koji prolaze isti postupak kao i sama pločica, ali s jednom razlikom, a ta razlika je da se diskovi nakon ispiranja premještaju u čistu pločicu, dodaje se 200  $\mu$ L sterilne vode i onda slijedi ultrazvučna kupelj. razlog tome je što se tako sprječava "lažni porast", odnosno u obzir se uzima samo onaj biofilm koji je obložio inox diskove, a ne i onaj što je obrastao i polistirenske jažice.

### 3. Rezultati

#### 3.1. Antibakterijsko djelovanje *Bacillus amyloliquefaciens* na različite sojeve *Legionella* spp.

Prilikom provođenja istraživanja anti – *Legionella* učinka *B. amyloliquefaciens* potrebno je bilo ekstrahirati metabolite bacilusa koji posjeduju antimikrobna svojstva što je i učinjeno etil – acetatom. Dobiveni ekstrakt je korišten u metodi dvostruke mikrodilucije. Prethodno je provedena orijentacijska antimikrobno djelovanje same bakterije i njenog supernatanta metodom difuzije u agar iz jažica.

Ispitan je učinak dva soja *B. amyloliquefaciens* (SS – 12, 6, SS – 38, 4) te učinak njihovog supernatanta od kojih je jedan bio termički obrađen na 50 °C kroz 15 minuta, na dvije vrste *Legionella* (*L. pneumophila* 130b, *L. longbeachae* NSW). Bacilus je inkubiran u 4 različita medija te je u sva četiri pokazao zapaženu zonu inhibicije što je jasno dalo do znanja o potentnosti antimikrobnog učinka. Zone inhibicije su vidljive u tablici 1. i 2 te iz slike 9. Oba soja *Bacillus* pokazuju sličan antimikrobni učinak koji je djelotvorniji na *L. pneumophila* 130b.

S druge strane, supernatant u oba slučaja nije pokazao zone inhibicije.

Sljedeći pokus bio je istražiti kvantitativna antimikrobna svojstva ekstrakta bacilusa, a to je odrediti minimalni inhibitornu i minimalnu baktericidnu koncentraciju. Kao i u prethodnom pokusu, korištena su dva soja bacilusa i dvije vrste legionele. Ekstrakt *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6 pokazuje najjače antibakterijsko svojstvo prema *L. pneumophila* 130b gdje MIK iznosi 1, 56 mg/mL, dok je prema *L. longbeachae* NSW nešto slabiji što se vidi iz vrijednosti MIK – a koja iznosi 3, 12 mg/mL. Ekstrakt *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4 pokazuje nešto slabiju antimikrobnu aktivnost kod obje vrste legionela gdje MIK iznosi 3, 12 mg/mL. Rezultati mikrodilucije vidljivi su u tablici 4.

**Tablica 1. Difuzija ekstrakta *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6 u agar iz jažica**

SS 12, 6	Zona inhibicije (mm)	
	<i>Legionella longbeachae</i> NSW	<i>Legionella pneumophila</i> 130b
<b>Vrsta bujon</b>		
Nutrijent	44	62
Muller - Hinton bujon	40	52
BHI	41	54
Fiziološka otopina	31	41
Supernatant	0	0
Supernatant, termički obrađen	0	0

**Tablica 2. Difuzija ekstrakta *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4 u agar iz jažica**

SS 38, 4	Zona inhibicije (mm)	
	<i>Legionella longbeachae</i> NSW	<i>Legionella pneumophila</i> 130b
<b>Vrsta medija</b>		
Nutrijent bujon	46	60
Müller - Hinton bujon	46	66
BHI	45	61
Fiziološka otopina	38	57
Supernatant	0	0
Supernatant, termički obrađen	0	0



Slika 9. Zone inhibicije dobivene metodom difuzije *B. amyloliquefaciens* na *L. pneumophila* 130 b i *L. longbeachae* NSW

Tablica 3. Izmjerena pH vrijednost

	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
	pH	
	SS – 12, 6	SS – 38, 4
Müller - Hinton bujon	8	8
Fiziološka otopina	7	7

Tablica 4. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK) testiranih bakterijskih sojeva (mg/mL)

<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Legionella pneumophila</i> 130b		<i>Legionella longbeachae</i> NSW	
	MIK	MBK	MIK	MBK
SS 12, 6	1, 56	1, 56	3, 12	6, 25
SS 38, 4	3, 12	3, 12	3, 12	6, 25

### 3.2. Formacija biofilma – "metoda anti – adhezije"

Nakon što je ispitano djelovanje ekstrakata bacilusa, sljedeći korak bio je utvrditi posjeduje li *B. amyloliquefaciens* svojstvo sprečavanja nastanka biofilma obzirom na prethodno dokazano antimikrobno djelovanje. Nakon što je utvrđena minimalna koncentracija ekstrakata supernatanata bacilusa koja je potrebna za inhibiciju adhezije legionela, a koja je vidljiva u tablicama 5, 6, 7 i 8, potrebno je bilo utvrditi i koliki je točan broj bakterija porastao u danim koncentracijama. Pokus je proveden na polistirenu i na nehrđajućem čeliku u vremenskom razdoblju od 2 i 24 sata, a rezultati su vidljivi iz grafova 10 do 29.

Tablica 5. Anti – adhezija *Legionella spp.* na polistiren nakon 2h (mg/mL)

Ekstrakti <i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i>	<i>Legionella pneumophila</i> 130b	<i>Legionella longbeachae</i> NSW		
SS 12, 6	3, 12	3, 12	3, 12	> 3, 12
SS 38, 4	> 3, 12	> 3, 12	3, 12	> 3, 12

Tablica 6. Anti – adhezija *Legionella spp.* na polistiren nakon 24h (mg/mL)

Ekstrakti <i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i>	<i>Legionella pneumophila</i> 130b	<i>Legionella longbeachae</i> NSW		
SS 12, 6	3, 12	3, 12	3, 12	3, 12
SS 38, 4	> 3, 12	> 3, 12	> 3, 12	> 3, 12

**Tablica 7. Anti-adhezija *Legionella spp.* na nehrđajući čelik nakon 2h (mg/mL)**

<b>Ekstrakti <i>B.</i></b>				
<i>amyloliquefaciens</i>	<i>Legionella pneumophila</i> 130b		<i>Legionella longbeachae</i> NSW	
SS 12, 6	3, 12	3, 12	3, 12	> 3, 12
SS 38, 4	> 3, 12	> 3, 12	>3, 12	> 3, 12

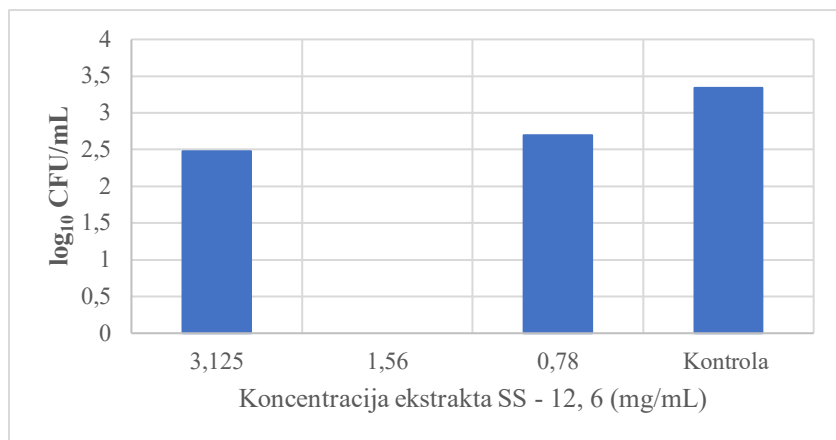
**Tablica 8. Anti-adhezija *Legionella spp.* na nehrđajući čelik nakon 24h (mg/mL)**

<b>Ekstrakti <i>B.</i></b>				
<i>amyloliquefaciens</i>	<i>Legionella pneumophila</i> 130b		<i>Legionella longbeachae</i> NSW	
SS 12, 6	0, 78	1, 56	3, 12	3, 12
SS 38, 4	1, 56	3, 12	3, 12	3, 12

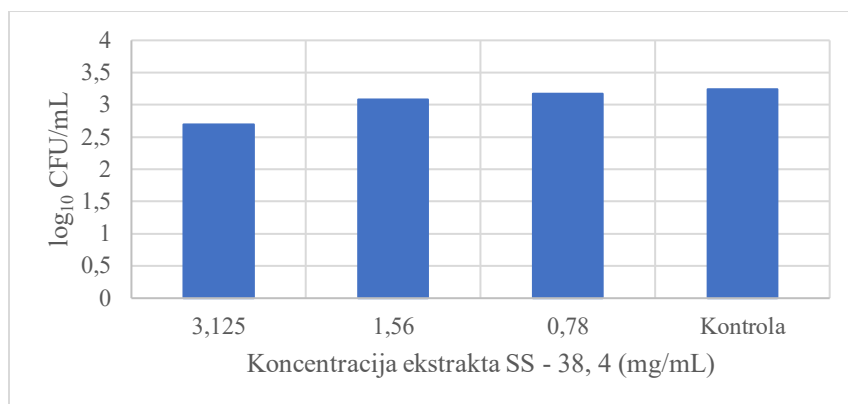
### **3.2.1. Antiadhezivni učinak ekstrakta *B. amyloliquefaciens* na polistirenu**

Zatim se ispitaio antiadhezivni učinak odabranih koncentracija ekstrakata bacilusa. Slike 10., 11., 12. i 13. prikazuju rezultate, odnosno inhibiciju adhezije na polistiren *L. longbeachae* NSW i *L. pneumophila* 130b 2 sata nakon tretiranja ekstraktima bacilusa – SS – 12, 6 i SS – 38, 4. Iz grafova je vidljiv očiti pad broja bakterija primjenom veće koncentracije ekstrakta. Usporedivši anti – adhezivni potencijal oba ekstrakta, može se zaključiti kako je ekstrakt SS – 12, 6 potentniji.

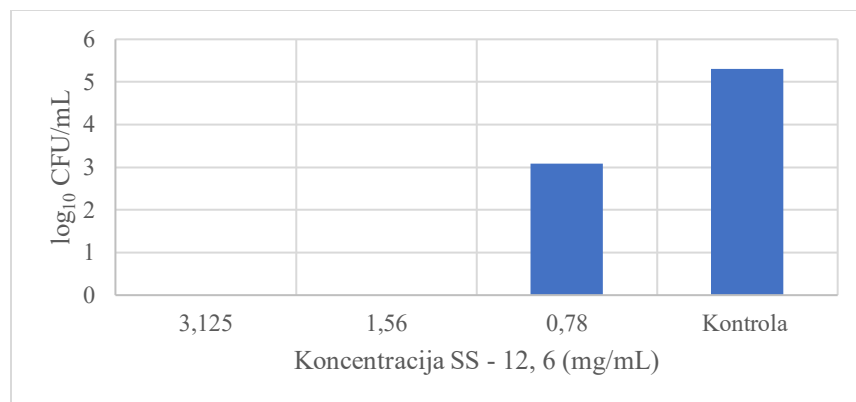
Nadalje, slike 14., 15., 16. i 17. prikazuju rast *L. longbeachae* NSW i *L. pneumophila* 130b 24 sata nakon tretiranja ekstraktima bacilusa – SS – 12, 6 i SS – 38, 4. I u ovom slučaju, SS – 12, 6 pokazuje veću anti – adhezivnu moć što je vidljivo i iz slike 14. gdje je koncentracija od 1, 56 mg/mL doza koja pokazuje potpuni anti – adhezivni učinak na *L. pneumophila* 130b.



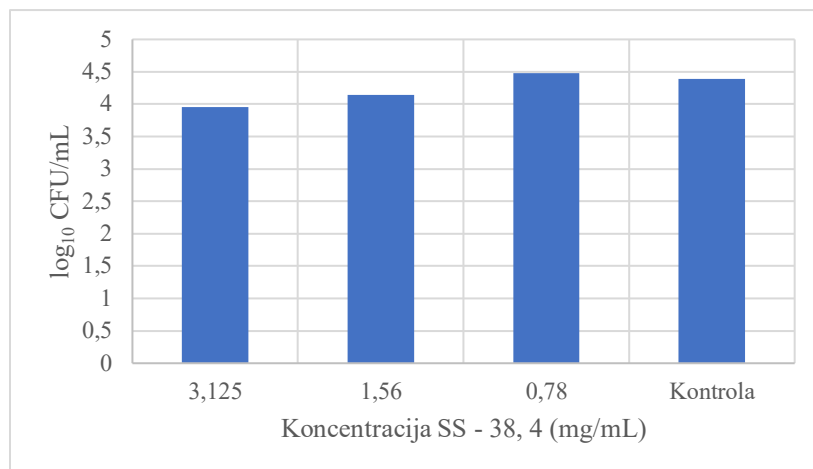
**Slika 10.** Prikaz broja adherentnih *L. longbeachae* NSW na polistirenu nakon 2 h tretmana ekstraktom *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6



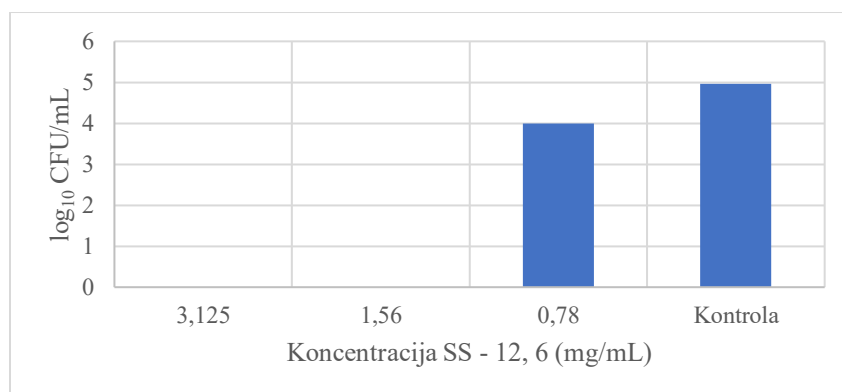
**Slika 11.** Prikaz broja adherentnih *L. longbeachae* NSW na polistirenu nakon 24 h tretmana ekstraktom *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4



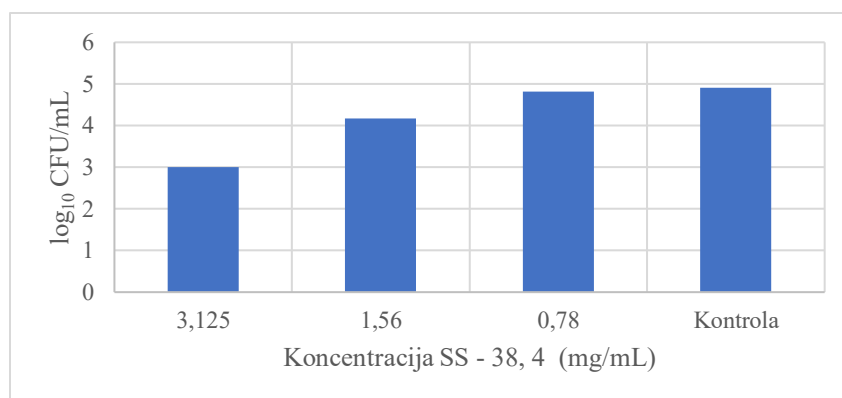
**Slika 12.** Prikaz broja adherentnih *L. pneumophila* 130b na polistirenu nakon 2 h tretmana ekstraktom *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6



**Slika 13.** Prikaz broja adherentnih *L. pneumophila* 130b na polistirenu nakon 2h tretmana ekstraktom *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4

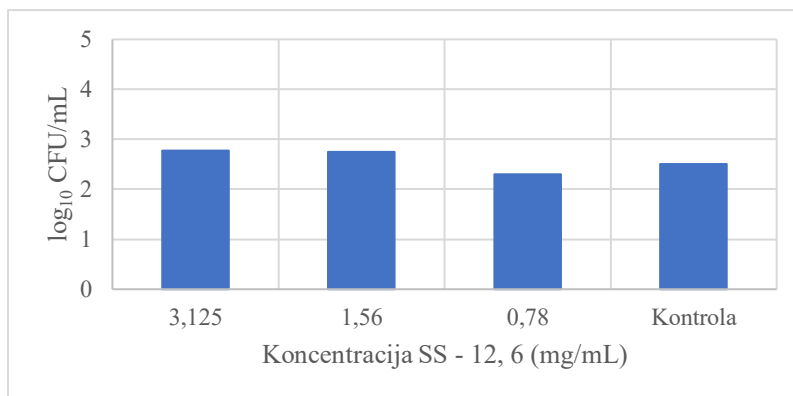


**Slika 14.** Prikaz broja adherentnih *L. pneumophila* 130b na polistirenu nakon 24 h tretmana ekstraktom *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6

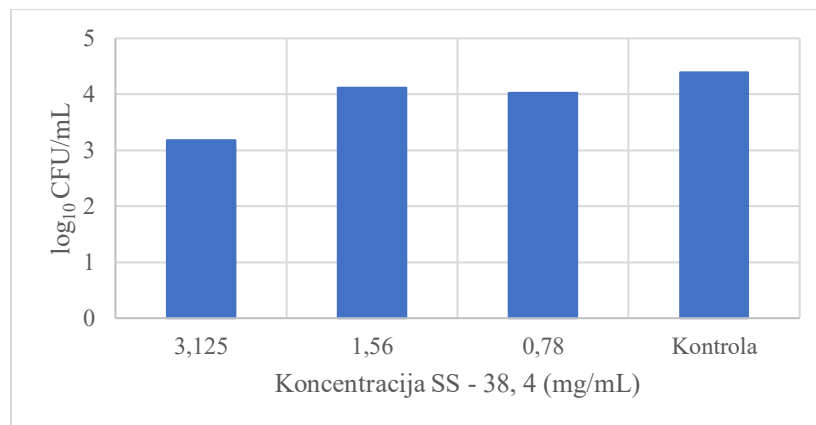


**Slika 15.** Prikaz broja adherentnih *L. pneumophila* 130b na polistirenu nakon 24h tretmana ekstraktom *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4





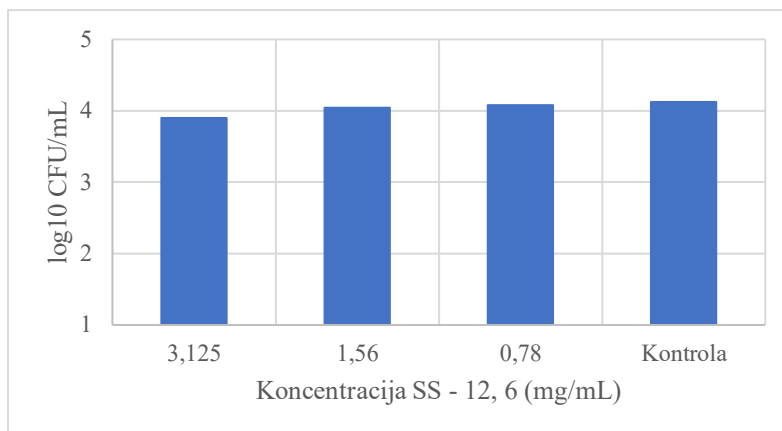
**Slika 16.** Prikaz broja adherentnih *L. longbeachae* NSW na polistirenu nakon 24h tretmana ekstraktom *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6



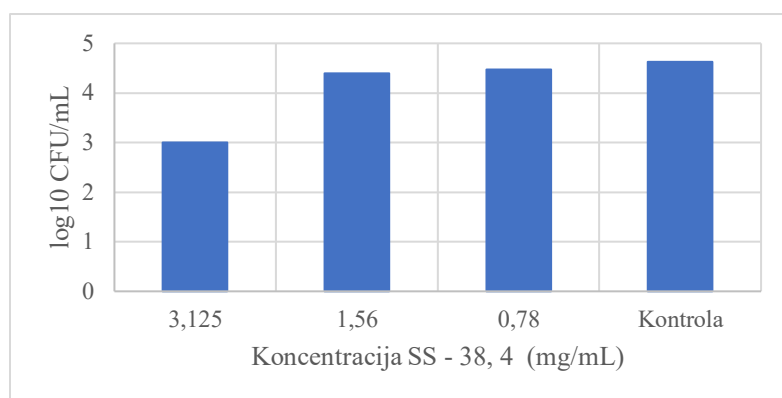
**Slika 17.** Prikaz broja adherentnih *L. longbeachae* NSW na polistirenu nakon 24h tretmana ekstraktom *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4

### 3.2.2. Antiadhezivni učinak ekstrakta *B. amyloliquefaciens* na nehrđajući čelik

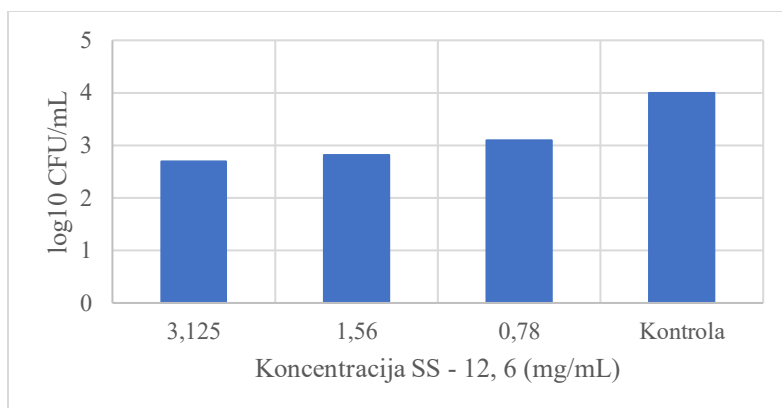
Slike 18., 19., 20. i 21. prikazuju anti – adhezivni učinak na nehrđajući čelik 2 sata od tretiranja legionela ekstraktima bacilusa. Iz grafova je vidljivo kako se povećanjem koncentracije ekstrakta, smanjuje broj adherentnih bakterija što je vidljivo iz usporedbe s kontrolom. Usporedivši rezultate anti – adhezije na polistiren i na nehrđajući čelik, može se reći da nema značajne razlike, odnosno pad broja bakterija nije značajno niži ili viši u odnosu na rezultat dobiven kod tretiranja polistirena, a najučinkovitija vrijednost na sve sojeve je izmjerena minimalna inhibitorna koncentracija koja iznosi 3, 12 mg/mL.



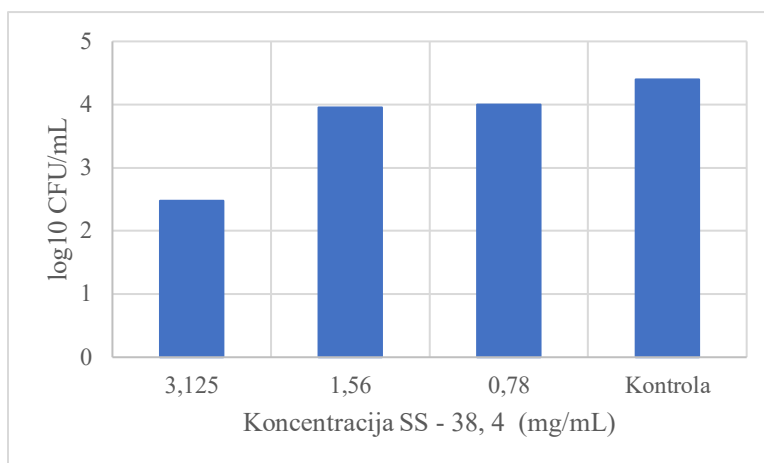
**Slika 18.** Prikaz broja adherentnih *L. pneumophila* 130b na nehrđajućem čeliku nakon 2h tretmana ekstraktom *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6



**Slika 19.** Prikaz broja adherentnih *L. pneumophila* 130b na nehrđajućem čeliku nakon 2 sata tretmana ekstraktom *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4



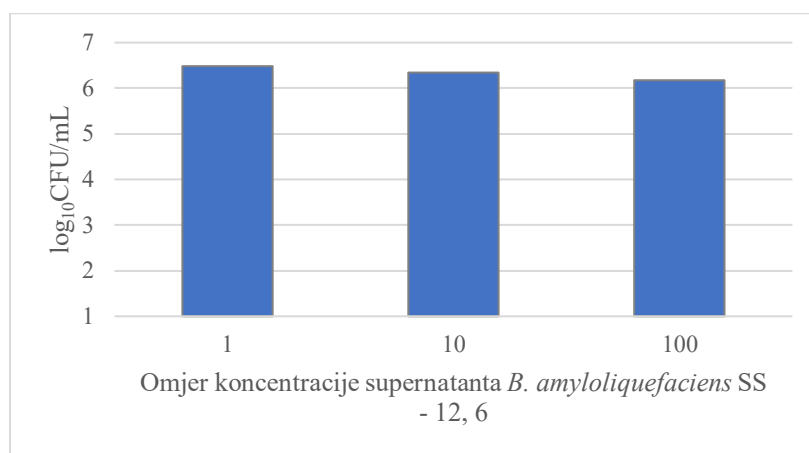
**Slika 20.** Prikaz broja adherentnih *L. longbeachae* NSW na nehrđajućem čeliku nakon 2h tretmana ekstraktom *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6



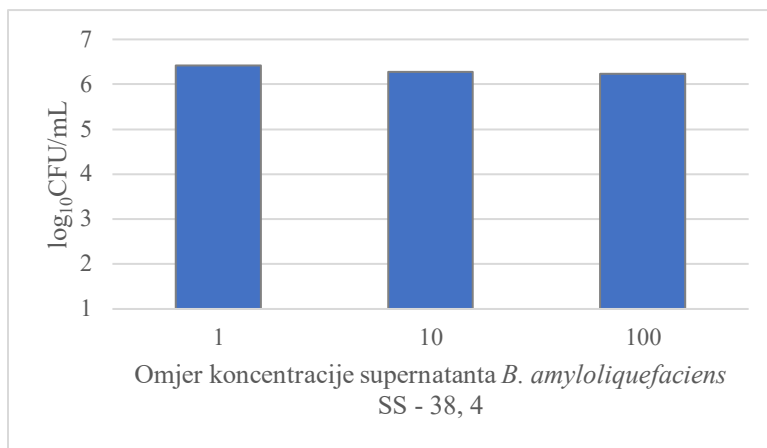
**Slika 21.** Prikaz broja adherentnih *L. longbeachae* NSW na nehrđajućem čeliku nakon 2 h tretmana ekstraktom *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4

### 3.2.3. Utjecaj supernatanta *B. amyloliquefaciens* na legionele

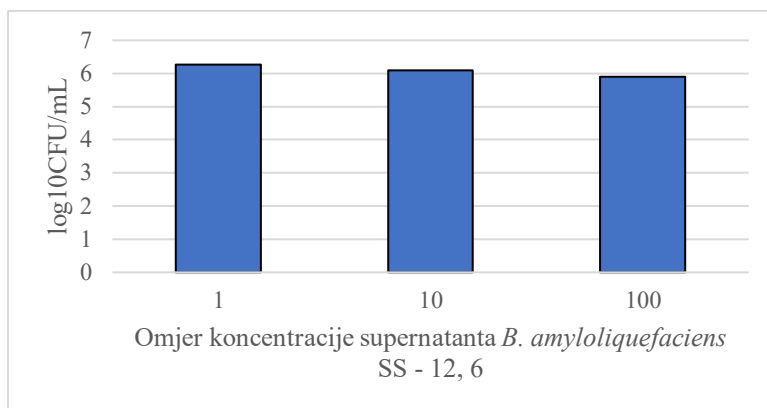
Sljedeći pokus bio je ispitati antibakterijski učinak supernatanta oba soja bacilusa. Rezultati su vidljivi na slikama 22., 23., 24. i 25. Obzirom da zona inhibicija kod metode difuzije nije bilo, htjelo se utvrditi postoji li ipak antimikrobni učinak, a iz grafova je vidljivo kako primjenom većeg omjera supernatanta bacilusa, broj bakterija je u padu. Rezultati su jednaki i nakon 24 sata od primjene supernatanta, dakle većim omjerom postiže se bolji antimikrobni učinak.



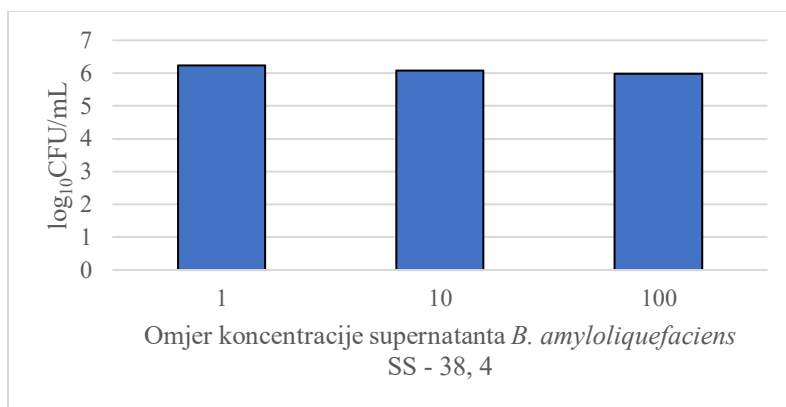
**Slika 22.** Prikaz rasta *L. pneumophila* 130b tretirane supernatantom *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6 tijekom 2 sata



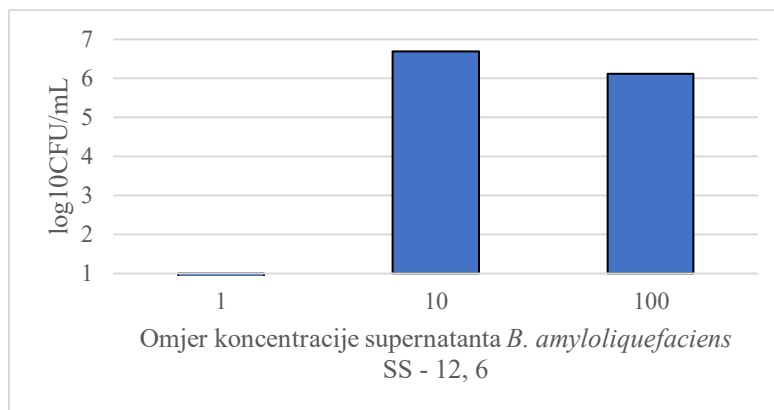
**Slika 23.** Prikaz rasta *L. pneumophila* 130b tretirane supernatantom *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4 tijekom 2 sata



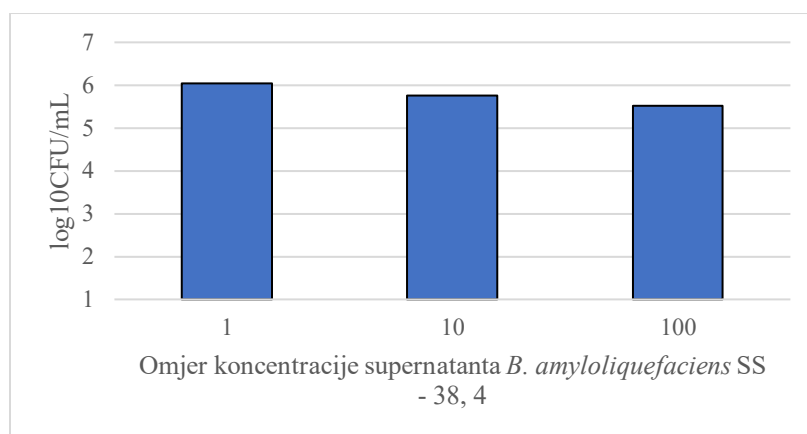
**Slika 24.** Prikaz rasta *L. longbeachae* NSW tretirane supernatantom *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6 tijekom 2 sata



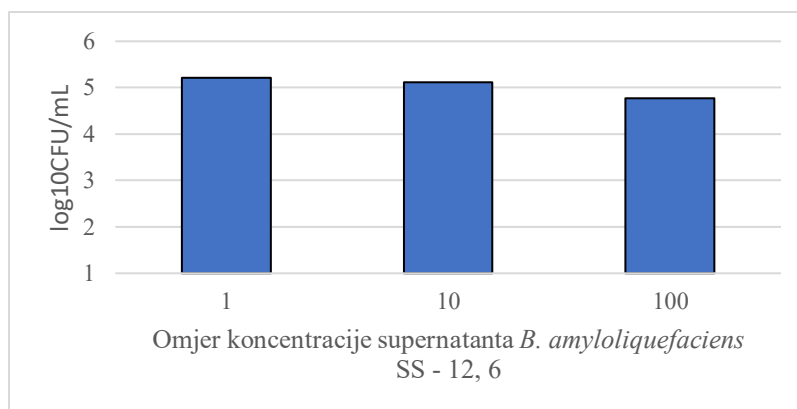
**Slika 25.** Prikaz rasta *L. longbeachae* NSW tretirane supernatantom *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4 tijekom 2 sata



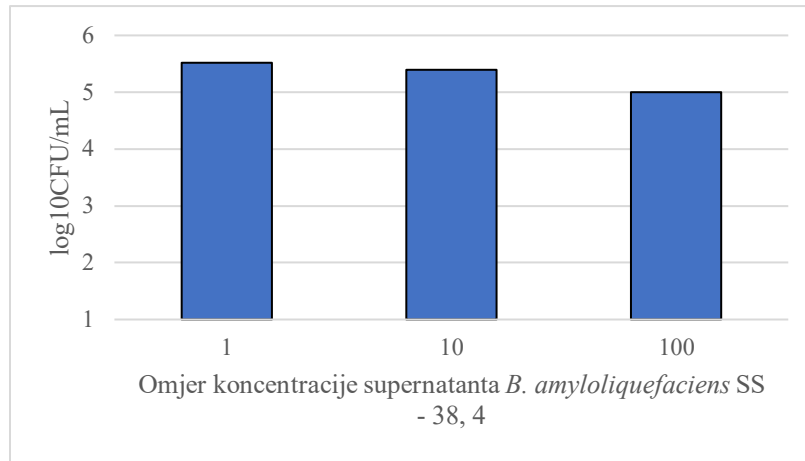
**Slika 26.** Prikaz rasta *L. pneumophila* 130b tretirane supernatantom *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6 tijekom 24 sata



**Slika 27.** Prikaz rasta *L. pneumophila* 130b tretirane supernatantom *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4 tijekom 24 sata



**Slika 28.** Prikaz rasta *L. longbeachae* NSW tretirane supernatantom *B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6 tijekom 24 sata



**Slika 29.** Prikaz rasta *L. longbeachae* NSW tretirane supernatantom *B. amyloliquefaciens* SS – 38, 4 tijekom 24 sata

#### 4. Rasprava

*Legionella* spp. je organizam od javno – zdravstvenog interesa zbog svoje sposobnosti izazivanja infekcije kod osjetljivih ljudi i svoje sveprisutnosti kako u vodi, tako i u tlu. Kontrola *Legionella* spp. predstavlja nekoliko problema jer postoji više ciljeva za dezinfekciju. To su, primjerice, sve *Legionella* spp., sve ostale bakterije, biofilm i protozoe.

Obzirom na današnju sve veću upotrebu kemijskih sredstava u suzbijanju neželjenih organizama, čovjek je počeo pribjegavati manje štetnim alternativama. Primjer takve alternative je biološka kontrola. Kao idealni kandidat biokontrole javlja se *Bacillus* spp. zato što njegov sekundarni metabolizam ima široki spektar proizvodnje raznih antimikrobnih spojeva. Jedni od glavnih sekundarnih metabolita su skupina lipopeptida. Lipopeptidi iz obitelji surfaktina vrlo su snažni biosurfaktanti koji interagiraju s lipidnim dvoslojem i tako ometaju strukturu biološke membrane ovisno o dozi; visoke koncentracije uzrokuju nepovratno stvaranje pora što dovodi do potpunog poremećaja i solubilizacije lipidnog dvosloja. Do sinteze surfaktina dolazi kada se sojevi *Bacillus* nađu u stacionarnoj fazi rasta, dakle kada ponestane hranjivih tvari i kisika. U takvim uvjetima bakterije pokreću razne mehanizme preživljavanja što uključuje sintezu aktivnih metabolita, sporulaciju, pa i proizvodnju antibiotika.

Surfaktin je također pokazao i svojstvo uklanjanja biofilma stvorenog od strane patogenih mikroorganizama. Mehanizam uklanjanja je u tome što surfaktin znatno smanjuje adheziju bakterijskih stanica na površinu, ali i svojim prijanjanjem direktno remeti strukturu samog biofilma.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi posjeduje li *B. amyloliquefaciens* antimikrobno, točnije anti – *Legionella* svojstvo s obzirom na slične karakteristike koje dijeli sa *B. subtilis*, a koji je već desteljećima prepoznat kao bakterija s antimikrobnom aktivnošću i proizvodnjom brojnih sekundarnih metabolita. Sljedeći cilj bio je dokazati, uz antibakterijsko djelovanje, kako *B. amyloliquefaciens* posjeduje i svojstvo anti – adhezije te je kao vrsta idealan kandidat da biološku kontrolu u vodenim sustavima.

Tijekom istraživanja koristile su se dvije vrste legionela (*L. pneumophila* 130b i *L. longbeachae* NSW) i dva soja bacilusa (*B. amyloliquefaciens* SS – 12, 6 i SS – 38, 4). Istraživanje je provedeno u *in vitro* uvjetima, a korištene metode su difuzija u agar iz jažica, metoda dvostruke mikrodilucije te anti – adhezijski učinak ekstrakta i supernatanta.

Korišteni uzorci bacilusa su njegov ekstrakt i čista kultura. Ekstrakt je dobiven ekstrakcijom lipopeptida etil acetatom, a metaboliti su resuspendirani i filtrirani.

Metoda difuzije je orijentacijska metoda koja je kvalitativna i služi kako bi se približno odredilo posjeduje li ispitivani ekstrakt ili u ovom slučaju subkultura, antimikrobno svojstvo. Obje ispitivane vrste su pokazale značajnu zonu inhibicije. Prilikom provođenja pokusa korišteni su različiti mediji u kojima je bacilus inkubiran kroz 24 sata– BHI, nutrijent, Müller - Hinton bujon i fiziološka otopina. Pokus je također proveden i koristeći supernatante bacilusa od kojih je jedan bio termički obrađen. Kod sva tri medija je zona inhibicije približno jednaka dok je kod fiziološke otopine nešto manja. Također, oba soja bacilusa su polučila podjednake rezultate, odnosno antimikrobni učinak je bio neznatno snažniji na *L. pneumophila* 130b.

Gledajući rezultate difuzije kod supernatanta, zona inhibicije nije bilo. Jedan od razloga je taj što su se termičkom obradom uništili svi aktivni metaboliti i nije postojalo tvari koja će ishodovati antimikrobni učinak. Mogli bi reći da je u supernatantu koncentracija antimikrobnih tvari premala te ne uspeva djelovati antimikrobno na način da je to detektabilno ovom metodom.

Eksperiment se nastavio kvantitativnom metodom, a to je dvostruka mikrodilucija. Cilj ove metode je odrediti minimalnu inhibitornu i minimalnu baktericidnu koncentraciju. Metoda se zasniva na seriji razrjeđenja u kojima se prati porast bakterija u određenim koncentracijama nakon inkubacije. Dobiveni rezultati odgovaraju onim orijentacijskim. Ekstrakt SS – 12, 6 pokazao je najjače antimikrobno svojstvo sa MIK vrijednošću od 1, 56 mg/mL i to prema *L. pneumophila* 130b, dok je prema *L. longbeachae* NSW nešto slabiji što se vidi iz MIK – a koji je 3, 12 mg/mL. Ekstrakt SS – 38, 4 podjednako je djelovao na obje vrste legionele s MIK vrijednošću od 3, 12 mg/mL. Opažajući MBK kod obje legionele, može se uočiti kako je *L. longbeachae* NSW rezistentnija na ekstrakt od *L. pneumophila* 130b što se vidi iz vrijednosti od 6, 25 mg/mL kod oba soja.

Zadnji provedeni pokus bio je utvrditi posjeduje li *B. amyloliquefaciens* anti – adhezivno svojstvo i u kojoj mjeri sprječava formaciju biofilma na polistirenu i nehrđajućem čeliku tijekom 2 i 24 sata.

Metoda određivanja anti – adhezijske doze se također temelji na seriji razrjeđenja, a razlika od mikrodilucije je u tome što se kod polistirena jažice ispiru i zatim idu u ultrazvučnu kupelj, a kod čelika se diskovi prebacuju u posebnu pločicu, a postupak s ultrazvukom dalje je isti. Nakon što je



određena minimalna koncentracija pri kojoj više nema formacije biofilma ispitao se antiadheivni i antibiofilm učinako pojedinih doza ekstrakta bacilusa.

Osim što je ispitivano koliki je točan pad broja bakterija kod formacije biofilma na polistirenu i nehrđajućem čeliku. Kod provedenog pokusa na polistirenu, grafovi pokazuju kako porastom koncentracije ekstrakta bacilusa, opada broj bakterija. Nakon 24 sata, broj bakterija je i dalje u padu što ukazuje na povoljan antimikrobni potencijal. Isti slučaj je dokaza i na pokusu s inox pločicama.

Zatim je ispitan antimikrobni učinak supernatanata bacilusa na porast legionela. Korišteni su različiti omjeri suspenzije legionela supernatanata bacilusa – 1:1, 2:1 i 3:1. Dobiveni rezultati jasno pokazuju kako je veći omjer koncentracije supernatanta djelovao baktericidnije.

Za provedeno istraživanje anti – *Legionella* učinka *B. amyloliquefaciens* još uvijek ne postoje zapisi u literaturi što isključuje usporedbu se nekakvim prijašnjim istraživanjem. Ipak, 2011. godine na Univerzitetu u Beogradu Berić T. i sur. proveli su slično istraživanje koje se referira na antimikrobni učinak prirodnih izolata *Bacillus* spp. na fitopatogene bakterije i njihov potencijal kao biokontrole u agrikulturi. Rezultati su se pokazali pozitivinima, odnosno metaboliti *Bacillus* su pokazali izraziti antagonistički učinak na *Xanthomonas oryzae* koji je prepoznat kao važan rižin patogen. Oba provedena istraživanja pokazuju potencijal *Bacillus* spp. kao biokontrole, no iziskuje daljnja istraživanja.

## 5. Zaključak

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti kako oba soja *B. amyloliquefaciens* (SS – 12, 6 i SS – 38, 4) pokazuju antimikrobni učinak na obje ispitivane vrste, *L. pneumophila* 130b i *L. longbeachae* NSW. *L. pneumophila* je bila osjetljivija na djelovanje ekstrakta supernatanata bacilusa. Ekstrakti supernatanta oba soja bacilusa pokazuju anti-adhezivna i anti-biofilm svojstva na obje vrste legionela. Dokazan je antimikrobni učinak supernatanata oba soja bacilusa na porast legionela.

Dokazavši kako potencijal za antimikrobno djelovanje postoji, sljedeći korak je provesti daljnja istraživanja koja će omogućiti upotrebu ovakvih, korisnih mikroorganizama i njihovih ekstrakata.

## 6. Literatura

1. Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*. 2018; 285: 44–55.
2. Rakić A. Povezanost fizikalnih i kemijskih pokazatelja kakvoće vode s pojavom bakterija *Legionella* spp. u sustavima opskrbe toplom vodom [doktorski rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2014
3. Ravlić M. Baličević R. Biološka kontrola korova biljnim patogenima. *Poljoprivreda*; 2014;. str. 34 - 40
4. Handelsman J, Stabb E.. *Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens*. Vol. 8, *The Plant Cell*. American Society of Plant Physiologists; 1996.
5. Thomas M.B. Willis A.J. Biocontrol – risk or necessity? *TREE* vol. 13, no. 8 August 1998
6. Woldemariamyohannes K., Wan Z., Yu Q., Li H., Wei X., Liu Y., i sur. Prebiotic, Probiotic, Antimicrobial, and Functional Food Applications of *Bacillus amyloliquefaciens*. Vol. 68, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society; 2020. str. 14709–14727.
7. Deng Q., Wang W., Sun L., Wang Y., Liao J., Xu D., i sur. A sensitive method for simultaneous quantitative determination of surfactin and iturin by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017 Jan 1;409(1):179–91.
8. Santos VSV., Silveira E., Pereira BB. Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. Vol. 21, *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*. Taylor and Francis Inc.; 2018. p. 382–99.
9. Atlas RM. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control.
10. Taylor M, Ross K, Bentham R. *Legionella*, protozoa, and biofilms: Interactions within complex microbial systems. Vol. 58, *Microbial Ecology*. 2009. p. 538–47.

11. Kozak NA., Lucas CE., Winchell JM. Identification of legionella in the environment. *Methods in Molecular Biology*. 2013;954:3–25.
12. Gobin I., Newton PR., Hartland EL., Newton HJ.. Infections caused by nonpneumophila species of legionella. Vol. 20, *Reviews in Medical Microbiology*. 2009. str. 1–11.
13. Potočnjak M., Magdalenić Z., Dijan M., Rebić D., Gobin I. Environmental factors affecting the survival of soil dwelling *Legionella longbeachae* in water. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2016;23(3):.452–455.
14. Berjeaud JM., Chevalier S., Schlüsselhuber M., Portier E., Loiseau C., Aucher W. i sur. *Legionella pneumophila*: The paradox of a highly sensitive opportunistic waterborne pathogen able to persist in the environment. Vol. 7, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2016.
15. Personnic N., Striednig B., Hilbi H. *Legionella* quorum sensing and its role in pathogen–host interactions. Vol. 41, *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2018. str. 29–35.
16. Dimkic I., Stankovic S., Nišavic M., Petkovic M., Ristivojevic P., Fira D., i sur. The profile and antimicrobial activity of Bacillus lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in Microbiology*. 2017.
17. Jurica K. Fenolne tvari iz obične planike (*Arbutus unedo* L.) i njihovi biološki učinci [doktorski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, biološki odsjek; 2016.

## 7. Popis skraćenica i akronima

HSL – N – acil – homoserin lakton

AI – 2 – autoinduktor – 2

DPD – 4, 5 – dihidroksi – 2, 3 – pentadion

DSF – faktor difuzijskog signala

PQS – 2 – heptil – 3 – hidroksi – 4 – kinolon

DAR – dialkilresorcinol

AHK – a – hidroksiketon

PPM – 'parts per million' – 1 dio od mi 1 000 000 dijela

FDA – američka uprava za hranu i lijekove (eng. food and drug administration)

EPS – egzopolisaharid (eng. extracellular polymeric substance)

BLIS – inhibitorne tvari slične bakteriocinima (eng. bacteriocin – like inhibitory substances)

NRPS – neribosomalne peptidne sintetaze (eng. nonribosomal peptide - synthetase)

KKM – kritična koncentracija micela

TE - tioesteraza

PCP – peptidil nosač (eng. peptidil carrier protein)

LB – Luria Bertani agar

BCYE – 'buffered charcoal yeast extract agar' – diferencijalna podloga za rast *Legionella*

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MBK – minimalna baktericidna koncentracija

CFU – 'colony forming unit' – mjerna jedinica formiranja kolonija

BHI – 'brain heart infusion broth' – hranjivi bujon od infuzije srca i mozga

## 8. Životopis

### **DALILA SADIKU**

Dalila Sadiku rođena je 8. prosinca 1996. godine u Rijeci. Osnovnoškolsko obrazovanje završava u Opatiji, 2011. godine. Srednjoškolsko obrazovanje završava 2015. godine u Medicinskoj školi u Rijeci gdje stiče zvanje zdravstveno – laboratorijskog tehničara. Naredne godine upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, a 2019. stiče zvanje sveučilišne prvostupnice (baccalaurea) sanitarnog inženjerstva. Iste godine upisuje diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.

Tijekom preddiplomskog i diplomskog studija sudjelovala je na studentskom kongresu zaštite zdravlja "Sanitas" kao dio organizacijskog odbora i kao aktivni sudionik. Radila je i kao demonstratorica na Zavodu za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta kao ispomoć na laboratorijskim vježbama Također je volontirala na Kliničkom zavodu za kliničku mikrobiologiju u KBC Rijeka tijekom COVID 19 pandemije. Tijekom pandemije zaposlena je i na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije gdje je radila studentski posao djelatnice u call – centru i kao pomoćnica koordinatora cijepljenja.