

# Antimikrobno djelovanje i antibiotska rezistencija *Peribacillus* spp. izoliranih iz krške spilje

---

Petković, Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:482399>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**ANTIMIKROBNO DJELOVANJE I ANTIBIOTIČKA  
REZISTENCIJA *PERIBACILLUS* SPP. IZOLIRANIH IZ KRŠKE  
SPILJE**

DIPLOMSKI RAD

Lana Petković

Zagreb, rujan, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Agroekologija

**ANTIMIKROBNO DJELOVANJE I ANTIBIOTIČKA  
REZISTENCIJA *PERIBACILLUS* SPP. IZOLIRANIH IZ KRŠKE  
SPILJE**

DIPLOMSKI RAD

Lana Petković

Mentor:  
Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, rujan, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA  
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Lana Petković**, JMBAG 0178113715, rođen/a 09.08.1998. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**ANTIMIKROBNO DJELOVANJE I ANTIBIOTIČKA REZISTENCIJA *PERIBACILLUS* SPP.  
IZOLIRANIH IZ KRŠKE SPILJE**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studenta / studentice*

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Lane Petković**, JMBAG 0178113715, naslova

**ANTIMIKROBNO DJELOVANJE I ANTIBIOTIČKA REZISTENCIJA *PERIBACILLUS SPP.***

**IZOLIRANIH IZ KRŠKE SPILJE**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka mentor

\_\_\_\_\_

2. Doc. dr. sc. Ivana Rajnović član

\_\_\_\_\_

3. Izv. prof. dr. sc. Kristina Krklec član

\_\_\_\_\_

## Zahvala

Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuka na ukazanom povjerenju, strpljenju, izdvojenom vremenu i trudu, te na prenešenom znanju. Zahvaljujem se i mag. ing. agr. Irini Tanuwidjaja na vodstvu u laboratoriju i pomoći oko obrade statističkih podataka, te bacc. sanit. ing. Sandri Matijević na pomoći u laboratoriju prilikom izvođenja analiza.

Također se zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i dečku na podršci, razumijevanju i strpljenju, posebno roditeljima koji su svaki korak mojeg školovanja bili bezuvjetna podrška.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja .....	2
2. Pregled literature .....	3
2.1. Opće karakteristike roda <i>Bacillus</i> i <i>Peribacillus</i> .....	3
2.2. Uloga <i>Bacillus</i> spp. i <i>Peribacillus</i> spp. u tlu .....	5
2.3. Antibiotička rezistencija bakterija.....	7
2.3.1. Antibiotička rezistencija <i>Bacillus</i> i <i>Peribacillus</i> vrsta .....	7
2.4. Antimikrobno djelovanje bakterija <i>Bacillus</i> i <i>Peribacillus</i> spp. ....	8
3. Materijali i metode .....	10
3.1. Kemikalije .....	10
3.2. Laboratorijski uređaji .....	10
3.3. Pufferi i hranjive podloge .....	10
3.3.1. Fiziološka otopina (0,85% NaCl) .....	10
3.3.2. Kruta TSA podloga (eng. <i>Trypticsoy agar</i> , <i>Oxoid</i> , Velika Britanija).....	11
3.3.3. Kruta BHI podloga (eng. <i>Brain Heart Infusion</i> , <i>Biolife</i> , Italija) .....	11
3.3.4. Tekuća BHI podloga (eng. <i>Brain Heart Infusion</i> , <i>Biolife</i> , Italija) .....	11
3.3.5. Kruta R2A podloga (Merck, Njemačka) .....	11
3.3.6. Müller-Hinton podloga (MH podloga, <i>Biolife</i> , Italija) .....	12
3.3.7. Krumpir dekstrozni agar (eng. <i>Potato Dextrose Agar</i> , PDA) .....	12
3.4. Mikrobne kulture .....	12
3.5. Antibiotici .....	13
3.6. Uzorkovanje i prikupljanje izolata.....	13
3.7. Identifikacija prikupljenih bakterijskih izolata pomoću masene spektrometrije MALDI-TOF .....	14
3.8. Ispitivanje osjetljivosti izolata <i>Peribacillus</i> spp. na antibiotike.....	16
3.9. Određivanje antibakterijskog djelovanja izolata <i>Peribacillus</i> spp. ....	18
3.10. Određivanje antifungalnog djelovanja izolata <i>Peribacillus</i> spp. ....	20

4. Rezultati .....	21
4.1. Zastupljenost <i>Peribacillus</i> spp. u spiljskim uzorcima .....	21
4.2. Osjetljivost izolata <i>Peribacillus</i> spp. na antibiotike.....	24
4.3. Antimikrobno djelovanje <i>Peribacillus</i> spp. ....	28
5. Rasprava .....	32
6. Zaključci.....	34
7. Popis literature .....	35
Životopis .....	41



## Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Lane Petković**, naslova

### **ANTIMIKROBNO DJELOVANJE I ANTIBIOTIČKA REZISTENCIJA *PERIBACILLUS* SPP. IZOLIRANIH IZ KRŠKE SPILJE**

Rod *Peribacillus* spada u porodicu *Bacillaceae* i tek je nedavno taksonomski odvojen od roda *Bacillus*. Budući da vrste roda *Bacillus* imaju značajnu ulogu u održavanju terestrijalnih ekosustava i velik potencijal primjene u poljoprivredi, pretpostavka je da pripadnici roda *Peribacillus* također imaju iste značajke. Cilj ovog istraživanja je ispitati potencijal vrsta roda *Peribacillus* izoliranih iz krške spilje za inhibiciju rasta humanih i biljnih patogena te istražiti ulogu ovih vrsta u širenju antibiotičke rezistencije u prirodi. Uzorci sedimenta i vode prikupljeni iz spilje u blizini naselja Konjevrate na području Šibensko-kninske županije korišteni su za izolaciju bakterija. Gram pozitivni izolati porasli na R2 agaru identificirani su MALDI-TOF uređajem. Nakon identifikacije testirana je njihova rezistencija na pet klasa antibiotika (karbapenemi, glikopeptidi, fluorokinoloni, makrolidi/linkozamidi i oksazolidinoni) disk difuzijskom metodom. Antimikrobno djelovanje ispitano je na osam potencijalno patogenih bakterija (*E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua*, *A. tumefaciens*, *E. amylovora*, *P. syringae* i *S. enterica*) koje izazivaju bolesti ljudi i biljaka te na plijesan *Botrytis cinerea*. Od 75 izoliranih Gram pozitivnih izolata, 11,3 % je identificirano kao *Peribacillus* spp. Od 17 testiranih *Peribacillus* izolata, 35,3 % ih je rezistentno na makrolide/linkozamide, 5,9 % ih je rezistentno na fluorokinolone i oksazolidinone, dok niti jedan izolat nije pokazao rezistentnost na karbapeneme i glikopeptide. *Peribacillus* izolati nisu pokazali inhibitorno djelovanje prema patogenim bakterijama ili je ono vrlo slabo izraženo kod 5,9 % izolata. Jako inhibitorno djelovanje prema plijesni *B. cinerea* pokazalo je 47,1 % izolata.

**Ključne riječi:** krška spilja, *Peribacillus*, antibiotička rezistencija, antimikrobno djelovanje

## Summary

Of the master's thesis – student **Lane Petković**, entitled

### **ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *PERIBACILLUS* SPP. ISOLATED FROM A KARST CAVE**

The genus *Peribacillus* belongs to the family *Bacillaceae* and has recently been taxonomically separated from the genus *Bacillus*. Since species from the genus *Bacillus* play a significant role in maintaining terrestrial ecosystems and have great potential for agricultural applications, it is assumed that members of the *Peribacillus* genus also possess similar characteristics. The aim of this research is to investigate the potential of *Peribacillus* species isolated from a karst cave to inhibit the growth of human and plant pathogens and explore the role of these species in the spread of antibiotic resistance in nature. Sediment and water samples were collected from a cave near the settlement of Konjevrate in the Šibenik-Knin County and used for the isolation of bacteria. Gram-positive isolates that grew on R2 agar were identified using MALDI-TOF method. After identification, their resistance to five classes of antibiotics (carbapenems, glycopeptides, fluoroquinolones, macrolides/lincosamides and oxazolidinones) was tested by disk diffusion method. Antimicrobial activity was assessed against eight potentially pathogenic bacteria (*E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua*, *A. tumefaciens*, *E. amylovora*, *P. syringae* and *S. enterica*) that cause diseases in humans and plants and on the phytopathogenic mold *Botrytis cinerea*. Out of 75 isolated Gram positive isolates, 11.3% were identified as *Peribacillus* spp. Out of 17 tested *Peribacillus* isolates, 35.3% were resistant to macrolides/lincosamides and 5.9% were resistant to fluoroquinolones and oxazolidinones, while none of the isolates showed resistance to carbapenems and glycopeptides. *Peribacillus* isolates showed no inhibitory activity against pathogenic bacteria or it was very weak in 5.9% of isolates. 47.1% of the isolates showed strong inhibitory activity against *B. cinerea*.

**Keywords:** karst cave, *Peribacillus*, antibiotic resistance, antimicrobial activity

## 1. Uvod

Do otkrića prvog antibiotika, penicilina, 1928. godine, bakterijske infekcije bile su jedan od glavnih uzroka smrti kod ljudi. Otkrićem i komercijalnom upotrebom antibiotika, životni vijek ljudske populacije je produžen. No upravo je to dovelo do novog problema; rezistencije bakterija na širok spektar antibiotika (Adedeji 2016.). Ta otpornost je s jedne strane rezultat prirodne rezistentnosti nekih bakterija (koju su posjedovale i prije otkrića antibiotika), genetske mutacije i/ili prijenosa gena (Adedeji 2016.; Khameneh et al. 2016.; Pallasch 2003.) što ukazuje da i okolišni mikroorganizmi mogu biti izvor gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike (Bhullar et al. 2012.). S druge strane i najvećim dijelom, rezistencija je rezultat prekomjerne primjene antibiotika u poljoprivredi, veterini i medicini preko kojih dolazi i do zagađenja okoliša antibioticima (Romo i Quirós 2019.). Uz rezistenciju bakterija na antibiotike, veliki problem današnjice je i zagađenje okoliša uzrokovano intenzivnom (konvencionalnom) poljoprivredom. Zagađenja su nastala prekomjernom uporabom mineralnih gnojiva i sredstava za zaštitu bilja, sve u svrhu što većeg prinosa po jedinici površine (Kisić 2012.). Prekomjerna gnojidba i primjena agrokemikalija dovele su i do smanjenja humusa u tlu, tla su postala kisela, nepovoljne strukture, te se stvorio nepropusni sloj tla. Sva ta oštećenja onemogućila su usvajanje makro i mikro hranjiva zbog čega dolazi do manjeg prinosa i sve veće upotrebe gnojiva. Osim gnojiva, veliki problem za okoliš predstavlja i prekomjerna i nekontrolirana upotreba sredstava za zaštitu bilja zbog njihovog dugog vijeka raspada (Jurić 2017.). Osim navedenih problema za poljoprivredu, prekomjerna upotreba mineralnih gnojiva i sredstava za zaštitu bilja, dovela je do njihovog ispiranja i isparavanja, što negativno utječe na tlo, vodu i atmosferu (Jurić 2017.). Prelaskom s konvencionalnog na održivi način gospodarenja u poljoprivredi, istražuju se načini kako na ekološki način zamijeniti mineralna gnojiva i ostale agrokemikalije. Jedan od načina je korištenje bioloških preparata odnosno živih mikroorganizama, koji se nakon detaljne identifikacije i selekcije mogu koristiti kao sredstva za bolju opskrbu tla hranjivima, biostimulatori ili biopesticidi (Mohanty et al. 2021.; Poonam Pandurang 2021.). Bakterije roda *Bacillus* imaju brojne važne uloge u terestrijalnom ekosustavu, poput kruženja hranjiva i antagonističkog djelovanja prema drugim mikroorganizmima, te su stoga sastavni dio mnogih bioloških preparata. Budući da ne postoje literaturni navodi o njima srodnim bakterijama roda *Peribacillus*, naročito onima izoliranim iz spilja, ovo istraživanje dati će uvid u potencijal vrsta roda *Peribacillus* u inhibiciji rasta humanih i biljnih patogena te ulozi u širenju antibiotske rezistencije u prirodi, a kako bi se evaluirao njihov potencijal primjene kao mikrobnih kultura.

## 1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja

Hipoteze ovog istraživanja su da u krškim spiljama:

1. nalazimo bakterije roda *Peribacillus*
2. *Peribacillus* spp. izolati imaju potencijal inhibicije patogene mikrobiote, međutim djelovanje će ovisiti o vrsti patogenog mikroorganizma
3. izolati *Peribacillus* spp. pokazuju rezistenciju na pojedine antibiotike, međutim, s obzirom na izostanak selektivnog pritiska u okolišu u kojem obitavaju, rezistencija će biti sporadična i neće imati značajnu ulogu u širenju antibiotske rezistencije u prirodi.

Cilj ovog istraživanja je identificirati vrste roda *Peribacillus* izolirane iz krške spilje, istražiti njihovo inhibitorno djelovanje prema patogenim mikroorganizmima, te odrediti njihov obrazac rezistencije na antibiotike. Ovim radom želi se pobliže istražiti potencijal ovih vrsta u širenju antibiotske rezistencije u prirodi, te odrediti njihov potencijal u inhibiciji patogene mikrobiote.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Izolirati i identificirati Gram pozitivne bacile prikupljene iz krške spilje MALDI-TOF uređajem.
2. Odrediti obrazac rezistencije *Peribacillus* vrsta na pet klasa antibiotika (karbapenemi, glikopeptidi, fluorokinoloni, makrolidi / linkozamidi, te oksazolidinoni).
3. Odrediti inhibicijsko djelovanje prema biljnim i humanim patogenim mikroorganizmima (*E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua*, *A. tumefaciens*, *E. amylovora*, *P. syringae*, *S. enterica* i *B. cinerea*).

## 2. Pregled literature

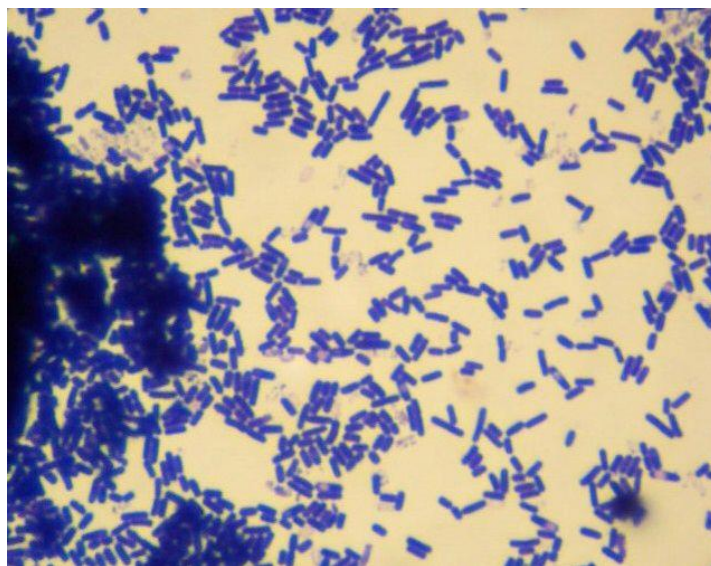
### 2.1. Opće karakteristike roda *Bacillus* i *Peribacillus*

Bacili su bakterije koje nalazimo primarno u tlu (česticama prašine) i vodi (Rogers i Parrott-Sheffer 2020.). Međutim, zbog sposobnosti stvaranja endospora, mogu preživjeti u svim ekosustavima, pa tako i onim ekstremnim. Ovom rodu pripadaju termofilni, acidofilni, alkalofilni, halotolerantni i halofilni organizmi (Baron 1996.). Spore su rezistentne na visoke temperature, hladnoću, UV zračenja i razna kemijska sredstva za dezinfekciju (Baron 1996.; Rogers i Parrott-Sheffer 2020.).

Vrste roda *Bacillus* su pokretne bakterije štapićastog oblika, gram pozitivne (Slika 1.), aerobne ili fakultativno anaerobne. *Bacillus* spp. jedan je od najraznovrsnijih rodova, a sastoji se od 273 potvrđenih vrsta (Borriss 2020.). Najpoznatije vrste ovog roda su patogeni *Bacillus anthracis*, uzročnik antraksa, *B. cereus*, uzročnik kvarenja hrane, te *B. thuringiensis*, koji proizvodi Bt toksin koji se koristi u suzbijanju insekata. Iako su najpoznatije bakterije patogeni, veći je broj korisnih bakterija, saprofita (Baron 1996; Rogers i Parrott-Sheffer 2020.).

Oni su katalaza pozitivni, indol i ureaza negativni te oksidaza varijabilni, mnogi su fermentativni mikroorganizmi korišteni u proizvodnji hrane, te su prisutni i u probioticima (Carter 1990.; Schultz et al. 2017.).

Bakterije ovog roda najbolje rastu pri temperaturi od 35°C, ali se mogu razmnožavati u rasponu temperatura od 10 do 45°C te na pH od 4,35 do 9,30 (Marinčević et al. 2009.).



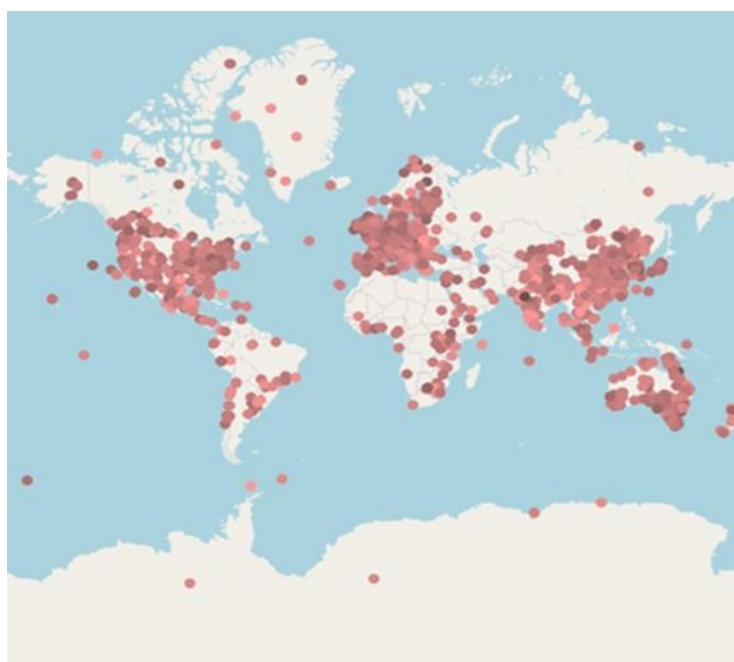
Slika 1. Mikroskopski prikaz *Bacillus subtilis* bojanih po Gramu (Izvor:

[https://id.pinterest.com/pin/316307573819947470/?amp\\_client\\_id=CLIENT\\_ID%28%29&mweb\\_unauth\\_id=%7B%7Bdefault\\_session%7D%7D&url=https%3A%2F%2Fid.pinterest.com%2Famp%2Fpin%2F316307573819947470%2F&open\\_share=t-pristup: 11.08.2023.](https://id.pinterest.com/pin/316307573819947470/?amp_client_id=CLIENT_ID%28%29&mweb_unauth_id=%7B%7Bdefault_session%7D%7D&url=https%3A%2F%2Fid.pinterest.com%2Famp%2Fpin%2F316307573819947470%2F&open_share=t-pristup: 11.08.2023.))

Naziv *Peribacillus* spp. dolazi od grčkog prefiksa “peri” što znači “okolo, blizu” i latinske imenice “bacillus” koja označava “mali štap, štapić”. Stoga “*Peribacillus*” označava mikroorganizme koji su slični štapićastim mikroorganizmima (*Bacillus* spp.). Prvotno su vrste ovog roda pripadale rodu *Bacillus* dok nisu otkrivene karakteristike koje ih dijele od drugih rodova porodice *Bacillaceae*. Bakterije roda *Peribacillus* posjeduju tri proteina (HAMP domain-containing protein, fosfo-N-acetilmuramoil-pentapeptid-transferaza i protein stupnja II sporulacije E) koja *Bacillus* spp. nema (Patel i Gupta 2020.).

Članovi roda *Peribacillus* su štapićaste, gram pozitivne, pokretne bakterije. Mogu se naći u tlu i vodi (Bulgari et al. 2022.; Jiang et al. 2019.) te su aerobni ili fakultativno anaerobni organizmi koji mogu preživjeti temperature od 3 do 45 °C. Iako su termofilni organizmi najviše im za rast odgovara raspon temperature od 25 do 37 °C. Optimalni pH za njihov rast je 4,0, ali rastu i u rasponu od 3,0 do 11,0 i u prisutnosti NaCl-a u rasponu od 0 do 18 %, uz optimum od 10% (w/v) (Jiang et al. 2019.). U laboratoriju se uzgajaju na BHI (eng. *Brain Heart infusion*) podlogama na kojima stvaraju sluzave bijele kolonije (Bulgari et al. 2022.; Patel i Gupta 2020.).

Prema Meier-Kolthoff et. al (2022), do 2022. otkrivena je 21 vrsta roda *Peribacillus*. Najpoznatija vrsta ovog roda je *P. simplex* kojeg nalazimo ponajviše u tlu, u zoni rizosfere (Martínez-Hidalgo et al. 2021.; Patel i Gupta 2020.). Na Slici 2. prikazana je rasprostranjenost vrste *P. simplex* u svijetu.



Slika 2. Rasprostranjenost *Peribacillus simplex* u svijetu (Izvor: <https://bacdive.dsmz.de/strain/790> - pristup 29.07.2023.)

## 2.2. Uloga *Bacillus* spp. i *Peribacillus* spp. u tlu

Budući da je rod *Peribacillus* nedavno odvojen od roda *Bacillus* te ne postoje literaturni podatci o ulozi *Peribacillus* vrsta u tlu, u ovom poglavlju fokus će biti na *Bacillus* vrstama.

Iako su najpoznatije vrste *Bacillus* spp. patogene bakterije, poput *B. anthracis* i *B. cereus*, bakterije ovog roda i njihove srodnike roda *Peribacillus* možemo pronaći ponajviše u terestričkim ekosustavima gdje imaju značajnu ulogu u kruženju elemenata poput dušika, ugljika, fosfora, kalija i metala, te kao biostimulatori (Baron 1996.; Duan et al. 2020.; Hayat et al. 2010.; Kanižai Šarić 2023.; Saxena et al. 2020.).

Kada govorimo u ulozi *Bacillus* vrsta u tlu treba spomenuti njihovu ulogu u kruženju dušika (fiksatori). Za razliku od simbiotskih fiksatora dušika, vrste *Bacillus* spp. ne ulaze u simbiozu s korijenovim sustavom viših biljaka već se nalaze slobodni u zoni rizosfere, gdje atmosferski dušik fiksiraju i transformiraju u oblik pristupačan biljkama. Tu ulogu im omogućuju *nifH* geni. Njih posjeduju brojne vrste ovog roda poput *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. oceanisediminis*, *B. safensis*, *B. circulans* i *B. flexus* (Yousuf et al. 2017.).

Vrste poput *B. circulans*, *B. cereus*, *B. fusiformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. coagulans*, *B. chitinolyticus*, *B. subtilis* imaju ulogu u kruženju fosfora u prirodi (Sharma et al. 2013.). Proizvodnjom organskih kiselina poput glukonske i limunske kiseline otapaju fosfate u tlu i čine ih pristupačnim biljkama (Mehta et al. 2013.). Uz proizvodnju organske kiseline, *Bacillus* vrste poput *B. flexus* i *B. megaterium* posjeduju enzime fosfataze i fitaze pomoću kojih pretvaraju organske fosfate u anorganske oblike (Farhat et al. 2008.; Ibarra-Galeana et al. 2017.).

Osim u kruženju dušika i fosfora, vrste *Bacillus* spp. imaju ulogu i u kruženju kalija. Bakterije poput *B. velezensis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. edaphicus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. firmus*, *B. mycoides*, *B. decolorationis* i *B. horikoshii* (Verma et al. 2015.) pokazale su sposobnost formiranja biljkama pristupačnog oblika kalija iz nepristupačnog pomoću organskih kiselina. Osim proizvodnje organskih kiselina, navedene bakterije proizvode izvanstanične polisaharide pomoću kojih otapaju kalijeve minerale u tlu i time stvaraju povoljan oblik kalija za biljke (Singh et al. 2015.).

Kada govorimo o njihovoj ulozi u kruženju elemenata u prirodi potrebno je još spomenuti i ulogu *Bacillus* spp. u kruženju željeza proizvodnjom siderofora. Njihova je proizvodnja pronađena kod *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. velezensis*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. halodenitrificans* i *B. subtilis* (Goswami et al. 2014.). Siderofori su organske molekule velikog afiniteta prema  $Fe^{3+}$  ionu s kojim tvore kelate te povećavaju dostupnost željeza biljci (Bešić 2017.).

Bakterije roda *Bacillus* također imaju ulogu i u kruženju ugljika. One su u tlu razlagači koji organske tvari razlažu do anorganskih. Članovi ovog roda izlučuju enzime poput proteaza, celulaze, amilaze i fitaze pomoću kojih razlažu organske spojeve (Duan et al. 2020.). Najpoznatiji razlagač ovog roda je *B. subtilis*. Osim u tlu, *Bacillus* spp. nalazimo u probavnom traktu gujavica gdje enzimima mogu razgraditi i pesticide (Kanižai Šarić 2023.).

Bakterije poput *B. paramycoides*, *B. altitudinis*, *B. cereus*, *B. pumilus* i *Peribacillus frigitolerans* proizvode fitohormon auksin (IAA, 3-indoleoctena kiselina) koji je zaslužan za razvoj korijena i korijenovih dlačica kod biljaka (Ganesh et al. 2022.; Mghazli et al. 2022.; Sato et al. 2023.). Osim što proizvode IAA kod bakterija poput *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* i *B. velezensis* otkrivena je i proizvodnja citokinina koji pospješuju diobu i diferencijaciju stanica biljaka (Asari et al. 2017.). Uz navedene hormone rasta dokazana je proizvodnja i drugih hormona poput giberelina, abscizinske kiseline i etilena (Kanižai Šarić 2023.).

Osim uloga u tlu kojima pospješuju rast biljaka, bakterije roda *Bacillus* imaju ulogu i u otpornosti biljaka. *Bacillus* vrste proizvode kemijske spojeve poput salicilne kiseline kojom kod biljaka induciraju otpornost na biotički stres izazvan patogenima i nametnicima (Saxena et al., 2020). Neke od vrsta s ovom ulogom su *B. velezensis*, *B. cereus*, *B. simplex*, *B. subtilis* i *B. thuringiensis* (Burkhanova et al. 2017.; Miao et al. 2018.; Rahman et al. 2015.; Wang et al. 2014.).



## 2.3. Antibiotička rezistencija bakterija

Kad se govori o rezistentnosti bakterija na antibiotike misli se na sposobnost bakterije da se odupre njihovom baktericidnom djelovanju. Mehanizme djelovanja antibiotika na patogene možemo podijeliti na četiri mehanizma; inhibicija sinteze stanične stijenke, inhibicija sinteze proteina, inhibicija sinteze nukleinskih kiselina te inhibiciju enzima (Park et al. 2016.). U posljednjih nekoliko godina raste broj bakterija koje su višestruko rezistentne (*eng. Multi-drug resistance*, MDR), odnosno rezistentne na minimalno jedan antibiotik iz tri različite klase antibiotika (Mulani et al. 2019.; Sweeney et al. 2018.). Pojava višestruke rezistencije prijete globalnom zdravlju zbog toga što rezistentni mikroorganizmi ili zahtijevaju jače doze antibiotika ili alternativna rješenja koja su često opasna po zdravlje. Više od 23 tisuće ljudi godišnje umre od posljedica infekcije rezistentnim mikroorganizmima (Centers for Diseases Control and Prevention, 2016). Stoga je Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, 2015) osmislila program globalnog akcijskog plana za mikrobnu rezistenciju s primarnim planom kontrole antibiotske rezistencije u pet faza: povećanje svijesti i razumijevanje bakterijske rezistentnosti, pojačati nadzor i spoznaje, smanjiti učestalost infekcija, optimizirati upotrebu antibiotika i osigurati održiva ulaganja u borbu protiv rezistencije.

U osnovi antibiotsku rezistenciju dijelimo na dva tipa. To su intrinzična (prenešena s roditelja na potomstvo) i stečena rezistencija (Martinez 2014.). Za stečenu rezistenciju zaslužni su mutacija i horizontalni transfer gena (Adimpong et al. 2012.; Cox i Wright 2013.; Kristich et al. 2014.; Yutin 2013.). Horizontalni prijenos gena često je razlog pojave stečene rezistencije kod bakterija. Taj način prijenosa definiran je kao proces u kojem su nukleinske kiseline (DNA, RNA) prenesene iz jedne stanice u drugu bez potrebe dijeljenja stanice domaćina. Mehanizmi horizontalnog prijenosa su konjugacija, transformacija i transdukcija, a genetički elementi koji prenose rezistentne gene su plazmidi, transpozoni i integri. Od svih navedenih mehanizama konjugacija se smatra najbitnijom za širenje gena za rezistenciju (Perić 2017.).

### 2.3.1. Antibiotička rezistencija *Bacillus* i *Peribacillus* vrsta

Bakterije *Bacillus* spp. pokazale su sposobnost rezistencije na  $\beta$ -laktamske antibiotike poput penicilina, ampicilina ili cefalosporina, te trimetoprima (Baron 1996.). Osim na  $\beta$ -laktamske antibiotike, *Bacillus* vrste pokazale su rezistentnost i na ostale antibiotike poput vankomicina, amikacina, gentamicina, eritromicina, te norfloksacin i cefotaksim (Adamski et al. 2023.). Upravo su za tu rezistentnost odgovorni geni koje posjeduju bakterije roda *Bacillus*, te koje mogu prenijeti na druge bakterije. Gen za rezistentnost na eritromicin se kod *Bacillus* vrsta nalazi na plazmidu pHT73, dok je gen za rezistentnost na tetraciklin (gen tet(M)) lociran na Tn916 sličnom transpozonu. Geni blaA, blaC ili bla1 koji kodiraju klase A  $\beta$ -laktamaze i gen pbp28 koji kodira penicilin vezni protein daju sposobnost rezistencije na  $\beta$ -laktamske

antibiotike. Gen *dfrA* kodira dihidrofolat reduktazu koja je razlog rezistencije na trimetoprim kod vrsta *Bacillus* spp. (Gao et al. 2018.; Zhai et al. 2023.).

Osim gena za rezistenciju, bakterije *Bacillus* spp. posjeduju i efluks pumpe tj. RPP (eng. *Ribosomal Protection Proteins*). Ti proteini služe za prepoznavanje i izlučivanje toksičnih tvari iz unutrašnjosti stanice, te se često pojavljuju kod bakterija koje imaju sposobnost višestruke rezistencije (Perić 2017.). Tako vrsta *B. subtilis* posjeduje RPP VmlR koji mu omogućava rezistentnost na linkomicin i virginiamicin (Crowe-McAuliffe et al. 2018.).

Uz RPP proteine, usko su vezani i ARE-ABCF proteini (eng. *Antibiotic resistance ATP-binding cassette subclass F*) koji omogućavaju rezistenciju bakterija na antibiotike koji se vežu na velike ribosomalne podjedinice. Njih možemo podijeliti na klase s obzirom na njihov profil rezistencije. Vga/Lsa/Sal/Vml klasa omogućava bakterijama rezistentnost na streptogramin A antibiotike i linkosamide, dok Msr klasa omogućava rezistenciju na Streptogramin B antibiotike, makrolide i ketolide (Crowe-McAuliffe et al. 2018.).

Kod vrsta *Peribacillus* spp. također su pronađeni isti mehanizmi rezistencije bakterija, ponajviše na  $\beta$ -laktamske antibiotike i vankomicin, te eflux pumpe koje uzrokuju MDR (Jiang et al. 2021.).

## **2.4. Antimikrobno djelovanje bakterija *Bacillus* i *Peribacillus* spp.**

Bakterije roda *Bacillus* imaju veliki potencijal u medicini, farmaciji, a ponajviše u poljoprivredi i ribarstvu kao biopesticidi, te kao konzervansi upravo zbog svojih inhibitornih učinaka na patogeni mikrobiotu (Barbosa et al. 2015.; Baruzzi et al. 2011.; Domrongpookaphan i Wanchaitanawong 2006.; Rogers i Parrott-Sheffer 2020.).

Razlog njihove široke primjene je njihova sposobnost direktnog i indirektnog suzbijanja patogenih bakterija i gljiva. Direktni način je proizvodnja više od 45 antimikrobnih molekula poput lipopeptida i enzima (Barbosa et al. 2015.; Baruzzi et al. 2011.; Dimkić et al. 2022.; Domrongpookaphan i Wanchaitanawong 2006.) dok se pod indirektnim načinom smatra njihova kompetitivnost s patogenima za životne uvjete i nutrijente (Dimkić et al. 2022.).

Antimikrobne molekule koje bakterije *Bacillus* spp. proizvode mogu se podijeliti na dvije skupine s obzirom na njihov put biosinteze. Prvu skupinu predstavljaju ribosomalno sintetizirani peptidi kojima pripadaju i baktericini, dok drugu skupinu predstavljaju mali enzimski sintetizirani peptidi poput lipopeptida (Baruzzi et al. 2011.; Zhang et al. 2022.).

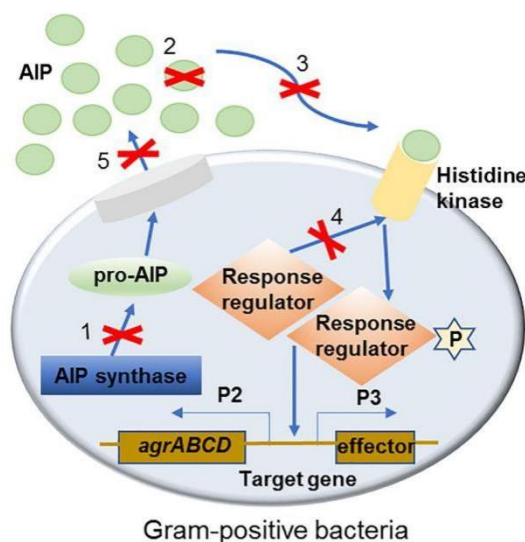
Prvoj skupini molekula pripadaju peptidi (antibiotici) poput makrolaktina, dificidina, polimiksina, bacitracina, gramicidina S, tirotricidina, grmucidin, subtilin, sirkulin itd. (Baron 1996.; Kivanç et al. 2014.; Rogers i Parrott-Sheffer 2020.; Yilmaz et al. 2006.).

Uz peptide, bakterije roda *Bacillus* proizvode i enzime kojima negativno djeluju na patogeni mikrobiotu. Neki od enzima su amilaze, galkaktanaze, izoamilaze, mananaze, ksilanaze, metal proteaze, serin proteaze, alkalne fosfataze i deoksiribonukleaze i sl. (Domrongpookaphan i Wanchaitanawong 2006.).

*Bacillus* spp. najvećim dijelom inhibira gram pozitivne patogene, no postoji i iznimka, *B. cereus* je pokazao inhibitorno djelovanje prema gram negativnim, kao i prema gram pozitivnim patogenima (Yilmaz et al. 2006.).

Vrste roda *Bacillus* koje su pokazale inhibitorno djelovanje prema humanoj i fitopatogenoj mikrobioti direktnim načinom inhibicije, tj. proizvodnjom inhibitornih molekula su *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. paramycoides*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. cereus*, *B. atrophaeu* te *B. natto* (Mghazli et al. 2022.; Rogers i Parrott-Sheffer, 2020.; Yilmaz et al. 2006.; Zhang et al. 2022.).

Kod bakterija roda *Peribacillus* antimikrobno djelovanje se osim već na navedenim mehanizmima temelji i na prekidanju quorum sensing sustava (Slika 3.) patogenih bakterija koji služi za izvanstaničnu komunikaciju (Rodríguez et al. 2022.). Ovaj način djelovanja bakterija na patogene se temelji na enzimatskog degradaciji AIP (eng. *Autoinducing peptides*) signalnih molekula. Neki od enzima koji djeluju na degradaciju tih molekula su acilaze, laktonaze i oksidoreduktaze (Rodríguez et al. 2022.).



Slika 3. Mehanizam djelovanja quorum sensing inhibitora kod gram pozitivnih bakterija (izvor: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.589640/full> - pristupljeno 29.07.2023.)

### 3. Materijali i metode

U ovom poglavlju će biti navedeni i detaljno opisani materijali (kemikalije, puferi i podloge) te metode korištene u ovom ispitivanju.

#### 3.1. Kemikalije

- Etanol (96%, Gram mol, Hrvatska)
- Glukoza (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, Kemika, Hrvatska)
- Mravlja kiselina (Carl Roth, Njemačka)
- Natrij klorid (NaCl, VWR Chemicals, Belgija)
- Izopropanol (VWR Chemicals, Belgija)
- α-cijano-4-hidroksicimetna kiselina (HCCA) (Bruker Daltonics, Njemačka)
- Acetonitril (50%, Bruker Daltonics, Njemačka)
- Trifluoroctena kiselina (2,5%, Bruker Daltonics, Njemačka)
- Tehnički agar (Biolife, Italija)

#### 3.2. Laboratorijski uređaji

- Denzitometar, DEN-1 Densitometer (Biosan, Latvija)
- Inkubator, Sanyo Incubator (Sanyo Electronic CO. Ltd., Japan)
- Laboratorijska vaga (Santarius AG, Njemačka)
- Orbitalna treskalica/inkubator, Orbital shaker-incubator ES-20 (Biosan, Latvija)
- MALDI-TOF maseni spektrometar (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics, Njemačka)
- Vorteks mješalica, Vorteks V-1-plus (Biosan, Latvija)
- Sigurnosni biološki kabinet klase II., BIO130, verzija A2 (Alpina, Poljska)

#### 3.3. Puferi i hranjive podloge

##### 3.3.1. Fiziološka otopina (0,85% NaCl)

Fiziološka otopina pripravljena je otapanjem 8,5 g natrijevog klorida (NaCl, VWR Chemicals, Belgija) u 1000 ml destilirane vode.

Korištena je za pripremu biomase za određivanje osjetljivosti sojeva *Peribacillus* spp. na antibiotike.

### 3.3.2. Kruta TSA podloga (eng. *Trypticsoy agar*, Oxoid, Velika Britanija)

Kruta TSA podloga pripravljena je otapanjem 40 g dehidrirane podloge u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana autoklaviranjem pri 121 °C/15 min. Nakon sterilizacije podloga je ohlađena na 45-50 °C, te je izlivena u sterilne Petrijeve zdjelice (u svaku po 20 ml) i ostavljena da polimerizira na sobnoj temperaturi.

Ovako pripravljena podloga je korištena za uzgoj preko noćnih bakterijskih kultura za identifikaciju MALDI-TOF masenom spektrometrijom.

### 3.3.3. Kruta BHI podloga (eng. *Brain Heart Infusion*, Biolife, Italija)

Kruta BHI podloga pripravljena je otapanjem 37 g dehidrirane podloge i 15 g agra (Biolife, Italija) u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana autoklaviranjem pri 121 °C/15 min. Nakon sterilizacije podloga je izlivena u Petrijeve zdjelice (po 20 ml) i ostavljena da polimerizira na sobnoj temperaturi.

Korištena je za ispitivanje antibakterijske aktivnosti sojeva *Peribacillus* spp. prema odabranim bakterijskim patogenima.

### 3.3.4. Tekuća BHI podloga (eng. *Brain Heart Infusion*, Biolife, Italija)

Tekuća BHI podloga pripravljena je otapanjem 37 g dehidrirane podloge u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana autoklaviranjem pri 121 °C /15 min.

Ova podloga korištena je za uzgoj preko noćnih kultura *Peribacillus* spp. te potencijalnih patogena (poglavlje 3.4.) korištenih za određivanje antimikrobne aktivnosti sojeva *Peribacillus* spp.

### 3.3.5. Kruta R2A podloga (Merck, Njemačka)

Kruta R2A podloga pripravljena je otapanjem 15,2 g dehidrirane podloge u 1000 ml destilirane vode, te je sterilizirana autoklaviranjem na 121 °C/15 min. Nakon sterilizacije podloga je ohlađena te izlivena (20 ml) u Petrijeve zdjelice i ostavljena da polimerizira na sobnoj temperaturi.

Podloga je korištena za izolaciju i pročišćavanje izolata iz uzoraka sedimenata i vode do monokulture.

### 3.3.6. Müller-Hinton podloga (MH podloga, Biolife, Italija)

Müller-Hinton podloga pripravljena je otapanjem 38 g dehidrirane podloge i 3 g agra (Biolife, Italija) u 1000 ml destilirane vode. Tako pripravljena otopina stavljena je na sterilizaciju autoklaviranjem na 121 °C na 15 min. Nakon sterilizacije, podloga je izlivena (20 ml) u Petrijeve zdjelice te je ostavljena na sobnoj temperaturi da polimerizira.

MH podloga je korištena pri ispitivanju osjetljivosti sojeva *Peribacillus* spp. na antibiotike.

### 3.3.7. Krumpir dekstrozni agar (eng. *Potato Dextrose Agar*, PDA)

PDA je pripravljena otapanjem 20 g glukoze (Kemika, Hrvatska) i 15 g tehničkog agara (Biolife, Italija) u 1000 ml infuzije krumpira.

Infuzija krumpira je pripravljena kuhanjem 200 g starog krumpira s korom u 1000 ml vode. Otopinu sterilizirati autoklaviranjem na 110 °C/ 15 min. Nakon sterilizacije podloga je izlivena (20 ml) u Petrijeve zdjelice te je ostavljena na sobnoj temperaturi da polimerizira.

PDA korištena je za ispitivanje antifungalne aktivnosti *Peribacillus* spp. prema patogenoj gljivi (poglavlje 3.4.).

## 3.4. Mikrobne kulture

Mikrobne kulture korištene u ovom istraživanju su komercijalno dostupne i kupljene od DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, American Type Culture Collection (ATCC) ili BCCM/LMG Bacteria Collection, a popis korištenih kultura je u nastavku:

- *Escherichia coli* (ATTC 25922)
- *Bacillus cereus* (DSM 6791)
- *Staphylococcus aureus* (DSM 20231)
- *Listeria innocua* (ATCC 33090)
- *Agrobacterium tumefaciens* (DSM 30205)
- *Erwinia amylovora* (DSM 50901)
- *Pseudomonas syringae* (DSM 10604)
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221)
- *Botrytis cinerea* (DSM 877)

### 3.5. Antibiotici

U ovom istraživanju ispitana je osjetljivost sojeva *Peribacillus* spp. na pet klasa antibiotika (karbapenemi, glikopeptidi, fluorokinoloni, makrolidi/linkozamidi te oksazolidinoni).

Diskovi s antibioticima (BD BBL™ Sensi-Disc™) korišteni u ovom istraživanju su kupljeni od Becton, Dickinson and Company (BD, SAD). U Tablici 1. prikazani su predstavnici ispitanih klasa antibiotika, korištene doze i mehanizam djelovanja.

Tablica 1. Klase antibiotika, nazivi antibiotika, doze i mehanizmi djelovanja antibiotika korištenih u istraživanju

Klasa antibiotika	Naziv	Oznake	Doza (µg)	Način djelovanja
Karbapenemi	Imipenem	IPM	10	Inhibicija sinteze stanične stijenke
	Meropenem	MEM	10	
Glikopeptidi	Vankomicin	VA	5	
Fluorokinoloni	Ciprofloksacin	CIP	5	Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina
	Levofloksacin	LVX	5	
Makrolidi i linkozamidi	Eritromicin	E	15	Inhibicija sinteze proteina
	Klindamicin	CC	2	
Oksazolidinoni	Linezolid	LZD	10	

### 3.6. Uzorkovanje i prikupljanje izolata

Uzorci sedimenta i vode su sterilno prikupljeni u spilji u blizini naselja Konjevrate u Šibensko-kninskoj županiji u travnju 2022. godine (n=8). Tijekom uzorkovanja prikupljeno je šest uzoraka sedimenta i jedan uzorak vode u spilji te jedan uzorak tla iznad spilje. Prikupljeni uzorci su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Uzorci sedimenta, vode i tla, vrijeme uzorkovanja i broj prikupljenih izolata

Vrijeme uzorkovanja	Vrsta uzorka	Oznake uzoraka
Travanj 2022	Sediment	S1
Travanj 2022	Sediment	SD2
Travanj 2022	Sediment	SL2
Travanj 2022	Sediment	SMS
Travanj 2022	Sediment	SGE
Travanj 2022	Sediment	SWS
Travanj 2022	Voda	W1
Travanj 2022	Tlo	NOD

Uzorci su transportirani u Laboratorij za mikrobiologiju tla, Zavoda za mikrobiologiju, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet u sterilnim Falcon tubama volumena 50 ml na 4 °C. Prikupljanje i pročišćivanje izolata je počelo odmah po zaprimanju uzoraka.

Prvo, 10 g sedimenta ili 10 ml vode je homogenizirano u 90 ml sterilne fiziološke otopine miješanjem na orbitalnoj treskalici/inkubatoru pri 250 okretaja/min tijekom 30 min na sobnoj temperaturi. Svi uzorci su serijski razrijeđeni u sterilnoj fiziološkoj otopini u omjeru 1:10 u rasponu  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ . Po 0,1 ml svakog razrjeđenja je naciepljeno na krute R2A podloge. Ploče su inkubirane na 25 °C/24 - 72 h. Nakon inkubacije, nasumično je prikupljeno 20 morfološki različitih kolonija iz uzoraka sedimenta i vode, te 10 morfološki različitih kolonija iz uzoraka tla iznad spilje. Kolonije su sterilno precijepljene u 1,5 ml tekuće R2A podloge i inkubirane na 25 °C/24 – 72 h. Nakon inkubacije, izolati su iscrpljeni na krutim R2A podlogama i inkubirani na 25 °C/24 – 72 h.

Svaki izolat je pročišćen najmanje četiri puta. Nakon svakog pročišćavanja, čistoća svakog izolata je provjerena bojanjem po Gramu. Čisti izolati spremljeni su u tekućoj R2A podlozi pomiješanoj s glicerolom (25%) na -20 °C do daljnjih analiza.

Ukupno je prikupljeno 150 izolata. Od toga, u prvom oživljavanju nije bilo moguće ponovno uzgojiti 34 izolata (22,7 %).

### **3.7. Identifikacija prikupljenih bakterijskih izolata pomoću masene spektrometrije MALDI-TOF**

Bakterijske kulture izolirane iz spiljskih sedimenta i vode te tla iznad spilje identificirane su pomoću MALDI-TOF masenog spektrometra (engl. *matrix-assited laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics, Njemačka).

Uzorci su pripremljeni prema uputama proizvođača, točnije prema protokolu „*extended direct transfer*“. Ukratko, svaki izolat je iscrpljen do monokulture na krutim TSA podlogama (Oxoid, Velika Britanija) i inkubiran preko noći na 30 °C. Pojedinačna kolonija svakog izolata je sterilnom čačalicom nanešena na MSP96 pločicu za MALDI-TOF, prekrivena s 1 µl 70% mravlje kiseline (Carl Roth, Njemačka) i ostavljena da se osuši na zraku. Uzorcima na pločici je zatim dodan 1 µl MALDI matrice (10 mg/ml α-cijano-4-hidroksicimetne kiseline (HCCA) u 50%-tnom acetonitrilu i 2,5%-tnoj trifluorocetnoj kiselini, Bruker Daltonics, Njemačka).

Nakon što je matrica osušena na sobnoj temperaturi na zraku, pločica s uzorcima je stavljena u komoru MALDI-TOF uređaja i snimljeni su spektri svakog uzorka, u rasponu masa od 2000 – 20000 Da, pomoću Microflex LT spektrometra masa (Bruker Daltonics, Njemačka) pod kontrolom računalnog programa FlexControl verzija 3.4 (Bruker Daltonics, Njemačka). Za svaki izolat spektri su snimljeni u dva ponavljanja. Maseni spektri su obrađeni pomoću računalnog programa Biotyper verzija 4.1 (Bruker Daltonics, Njemačka) i uspoređeni s bazom Biotyper koja sadrži 8223 referentna MALDI-TOF MS spektra.

Identifikacija izolata se temelji na sličnosti masenog spektra izolata određenom referentnom spektru te je izražena numeričkim kategorijama gdje vrijednosti variraju od 0,00



do 3,00. Vrijednost  $\geq 2,00$  [zeleno boja (+++)] ukazuje da je izolat točno identificiran na razini vrste, vrijednost  $\geq 1,70$  i  $< 2,00$  [žuta boja (+)] da je izolat točno identificiran na razini roda, a vrijednost  $< 1,70$  [crvena boja (-)] da ne postoje sličnosti između masenog spektra izolata i referentnih spektara, odnosno da identifikacija nije moguća ni na razini vrste ni na razini roda (Tablica 3.).

Tablica 3. Interpretacija pouzdanosti identifikacije izolata na temelju vrijednosti dodijeljenih masenim spektarima snimljenim MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Njemačka) uređajem

Vrijednost	Interpretacija	Kategorija	Boja
2,00 – 3,00	pouzdana identifikacija na razini vrste	(+ + +)	zeleno
1,70 – 1,99	pouzdana identifikacija na razini roda	(+)	žuta
0,00 – 1,69	identifikacija nije moguća	(-)	crvena

### 3.8. Ispitivanje osjetljivosti izolata *Peribacillus* spp. na antibiotike

Osjetljivost sojeva *Peribacillus* spp. na pet klasa antibiotika (karbapenemi, fluorokinoloni, glikopeptidi, makrolidi/linkozamidi, te oksazolidinoni; poglavlje 3.5., Tablica 1.) ispitana je disk difuzijskom metodom (Bauer 1959.; CLSI, 2015). Sve analize su izvedene u sigurnosnom biološkom kabinetu klase II, BIO130, verzija A2 (Alpina, Poljska).

Svi izolati koji su identificirani kao *Peribacillus* spp. su iscrpljeni do monokulture na krutim BHI podlogama, te su inkubirani 24 h na 30 °C. Nakon inkubacije, za svaki izolat pripravljena je biomasa dodavanjem pojedinačnih kolonija (jedna do tri kolonije) u 5 ml sterilne fiziološke otopine (0,85 % NaCl) do postizanja turbiditeta koji odgovara turbiditetu McFarland standarda 0,5. Turbiditet je izmjeren pomoću denzitometra DEN-1 (Biosan, Latvija). Koncentracija ovako pripremljenih bakterijskih suspenzija iznosila je  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml.

Tako pripravljene bakterijske suspenzije su sterilnim vatenim štapićima inokulirane na MH podloge. Svaki izolat je gusto nacijepljen tri puta na istu ploču. Između svakog razmaza podloga je zarotirana za 60°. Nakon što je MH podloga upila bakterijsku suspenziju (otprilike 5 minuta) na ploče su nanešeni diskovi s odgovarajućim antibioticima (tablica 1, BD BBL™ Sensi-Disc™, SAD ). Djelovanje svakog antibiotika na svaki izolat *Peribacillus* spp. je ispitano u dva ponavljanja. Ovako pripravljene MH podloge su inkubirane 24 h na 37 °C.

Nakon inkubacije izmjerene su zone inhibicije rasta pomoću pomičnog mjerila. U zone inhibicije rasta uključen je promjer diska s antibiotikom i izražene su kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama u milimetrima (mm). Obzirom da trenutno ne postoje smjernice za članove roda *Peribacillus*, izolati su okarakterizirani kao rezistentni (R) ili osjetljivi (O) na temelju smjernica propisanih od strane European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2022.) za vrste roda *Bacillus* s kojima pokazuju filogenetsku sličnost. Nadalje, obzirom da granične vrijednosti za fluorokinolone nisu jasno propisane EUCAST smjernicama, odnosno da M45 CLSI smjernice (CLSI, 2015) propisuju samo granične vrijednosti za mikrodilucijsku metodu, rezultati disk difuzijske metode za fluorokinolone su interpretirani na temelju M100 CLSI smjernica (CLSI, 2020) za sve vrste roda *Staphylococcus* (Fiedler et al. 2019.; Frenzel et al. 2015.; Zhang et al. 2020.; Tablica 4.).

Tablica 4. Interpretacija zona inhibicije rasta izolata *Peribacillus* spp. (EUCAST 2022; CLSI, 2020.).

Klasa antibiotika	Antibiotik	Doza ( $\mu\text{g}$ )	Zona inhibicije rasta (mm)	
			O	R
Karbapenemi	Imipenem	10	$\geq 30$	$< 30$
	Meropenem	10	$\geq 25$	$< 25$
Glikopeptidi	Vankomicin	5	$\geq 10$	$< 10$
Fluorokinoloni	Ciprofloksacin*	5	$\geq 23^*$	$< 23$
	Levofloksacin*	5	$\geq 23^*$	$< 23$
Makrolidi i linkozamidi	Eritromicin	15	$\geq 24$	$< 24$
	Klindamicin	2	$\geq 17$	$< 17$
Oksazolidinoni	Linezolid	10	$\geq 22$	$< 22$

\*granične vrijednosti preuzete iz M100 CLSI smjernica za vrste roda *Staphylococcus* (CLSI, 2020.)

### 3.9. Određivanje antibakterijskog djelovanja izolata *Peribacillus* spp.

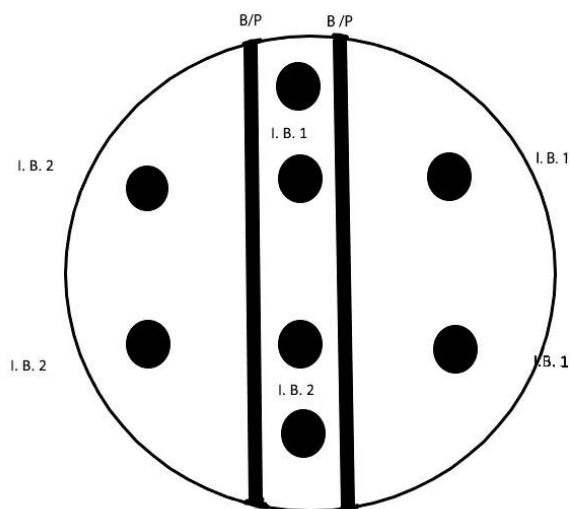
U ovom istraživanju ispitano je antibakterijsko djelovanje izolata *Peribacillus* spp. prema potencijalnim patogenima, tj. indikatorskim bakterijama (*E. coli* (ATTC 25922), *B. cereus* (DSM 6791), *S. aureus* (DSM 20231), *L. innocua* (ATCC 33090), *A. tumefaciens* (DSM 30205), *E. amylovora* (DSM 50901), *P. syringae* (DSM 10604), *S. enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), *B. cinerea* (DSM 877)) kao što su opisali Domig et al.. (2014.). Sve analize su izvedene u sigurnosnom biološkom kabinetu klase II, BIO130, verzija A2 (Alpina, Poljska).

Svi izolati *Peribacillus* spp. su iscrpljeni do monokulture na krutim BHI podlogama. Inokulirane podloge su inkubirane na 30 °C, 24 h.

Idući dan, po jedna kolonije svakog izolata *Peribacillus* spp. je sterilno naciepljena u 5 ml tekuće BHI podloge te inkubirana na 30 °C, 24 h. Istog dana indikatorske bakterije su iscrpljene na krutim BHI podlogama do monokulture te inkubirane 24 h u uvjetima optimalnim za njihov rast. Bakterije *E. coli* i *S. enterica* subsp. *enterica* su inkubirane u anaerobnim uvjetima na 30 °C, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. innocua* i *P. syringae* na 30 °C u aerobnim uvjetima, a *E. amylovora* i *A. tumefaciens* na 25 °C u aerobnim uvjetima.

Nakon 24 h, svaki izolat *Peribacillus* spp. je sterilno naciepljen na zasebne krute BHI podloge na sljedeći način: sterilni vateni štapić je umočen u tekuću preko noćnu kulturu i na sredini krute BHI podloge povučene su dvije paralelne crte međusobno udaljene 2 cm. Svaki izolat naciepljen je u dva ponavljanja. Ovako pripremljene ploče su inkubirane na 30 °C, 24 h. U istom danu, indikatorske bakterije sa krutih BHI podloga su sterilno naciepljene u 1,5 ml tekuće BHI podloge te inkubirane u uvjetima optimalnim za njihov rast.

Nakon inkubacije na krute BHI ploče inokulirano je po 5 µl indikatorskih bakterija između paralelnih crta (tretman) i uz rub ploče (kontrola). Na jednu ploču inokulirane su po dvije indikatorske bakterije (Slika 4.).



Slika 4. Shematski prikaz BHI ploča za određivanje antibakterijskog djelovanja *Peribacillus* spp. : B/P-soj *Peribacillus* spp.; I.B.1- indikatorna bakterija 1; I.B.2- indikatorna bakterija 2.

Ovako pripremljene ploče su inkubirane u uvjetima optimalnim za rast potencijalnih patogena.

Zadnji dan očitani su rezultati. Antibakterijsko djelovanje sojeva *Peribacillus* spp. procijenjeno je na temelju razlika između promjera kolonija indikatorskih bakterija između crta i promjera kontrolnih kolonija uz rub ploče. Razlike u promjeru prikazane su kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama u milimetrima (mm). Također, kod procjene antibakterijskog djelovanja u obzir su uzete i razlike u gustoći između tretiranih i kontrolnih kolonija. Kriteriji za procjenu antibakterijskog djelovanja prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Kriterij za procjenu antibakterijskog djelovanja izolata *Peribacillus* spp prema indikatorskim bakterijama

Razlika između promjera kolonije patogena i promjera kontrolne kolonije (mm)	Gustoća rasta kolonija patogena u odnosu na kontrolne kolonije	Interpretacija
< 1 mm	++ do +++	Nema inhibicije (-)
1-2 mm	++ do +++	Slaba inhibicija (+)
2-4 mm	+ do ++	Izražena inhibicija (++)
> 4 mm	+ do ++	Vrlo jaka inhibicija (+++)
Nema rasta	nema rasta	Potpuna inhibicija (p.i.)

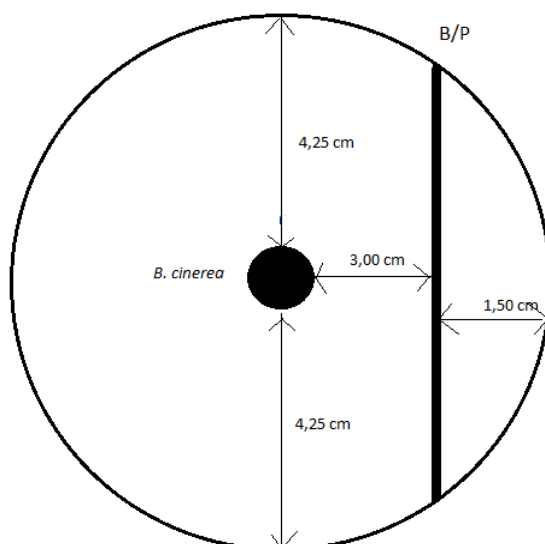
### 3.10. Određivanje antifungalnog djelovanja izolata *Peribacillus* spp.

Antifungalna aktivnost izolata *Peribacillus* spp. prema gljivi *Botrytis cinerea* (DSM 877) ispitana je metodom dvojnih kultura (engl. *dual culture assay*) (Ali et al. 2020.; Tanapichatsakul et al. 2020.). Prvo je uzgojena dostatna masa gljive *B. cinerea* za pripremu micelijskih diskova na krutoj PDA podlozi. Nakon naciepljivanja na krutu PDA podlogu gljiva je inkubirana na 25 °C, 5 dana.

Dan prije postavljanja pokusa, svi izolati *Peribacillus* spp. sterilno su inokulirani u 1,5 ml tekuće BHI podloge i inkubirani na 30 °C, 24 h.

Sljedeći dan na zasebne krute PDA podloge su aplicirani izolati *Peribacillus* spp. Sterilnim vatenim štapićima, povlačeći crte udaljene 1,5 cm od ruba petrijeve zdjelice. Svi izolati su naciepljeni u dva ponavljanja. Ovako pripremljene PDA ploče su inkubirane na 30 °C, 24 h.

Nakon 24 h, na krute PDA ploče, tri cm od apliciranog izolata *Peribacillus* spp. je nanešen micelijski disk gljive *B. cinerea* promjera 8 mm i star 5 dana (Slika 5.).



Slika 5. Shematski prikaz PDA ploča za određivanje antifungalnog djelovanja izolata *Peribacillus* spp. (B/P- izolat *Peribacillus* spp.; *B. cinerea*- gljiva *Botrytis cinerea* (DSM 877))

Istovremeno su pripremljene i kontrolne ploče gdje je na sredinu krute PDA podloge nanešen samo micelijski disk gljive *B. cinerea* promjera 8 mm i star 5 dana. Sve ploče su inkubirane na 25 °C/5 dana.

Nakon inkubacije izmjeren je radijalni rast gljive *B. cinerea*, te radijalni rast kontrole. Inhibicija fungalnog rasta je izračunata pomoću formule:

$$\text{Inhibicija rasta [\%]} = 100 \times \left[ 1 - \left( \frac{\text{radijalni rast tretmana}}{\text{radijalni rast kontrole}} \right) \right]$$

Inhibicija je izražena kao srednja vrijednost s pripadajućim standardnim devijacijama i prikazana u postocima (%).

## 4. Rezultati

### 4.1. Zastupljenost *Peribacillus* spp. u spiljskim uzorcima

U ovom istraživanju prikupljeno je ukupno 150 izolata iz sedimenata i vode te tla iznad krške spilje, međutim, pri oživljavanju nije bilo moguće ponovno uzgojiti 34 (22,7 %) izolata. Ostali izolati identificirani su pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije (Slika 6.).

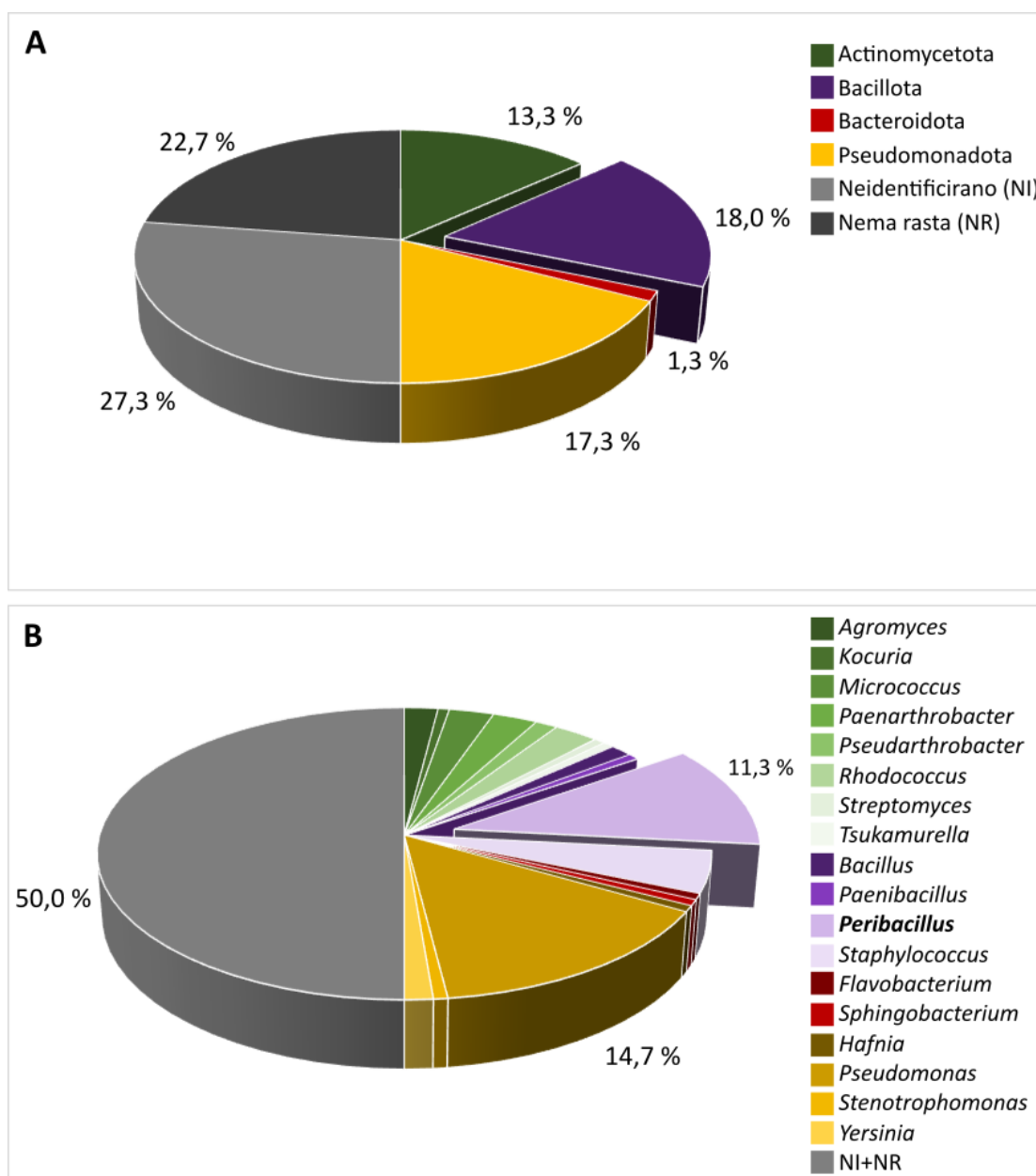
Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<a href="#">C9</a> (+) (B)	007 (Standard)	<a href="#">Peribacillus simplex</a>	1.82	<a href="#">Peribacillus simplex</a>	1.72
<a href="#">C10</a> (+) (B)	008 (Standard)	<a href="#">Peribacillus simplex</a>	1.75	No Organism Identification Possible	1.44
<a href="#">C11</a> (+) (B)	009 (Standard)	<a href="#">Peribacillus muralis</a>	1.88	No Organism Identification Possible	1.58
<a href="#">C12</a> (+) (B)	010 (Standard)	<a href="#">Peribacillus muralis</a>	1.83	No Organism Identification Possible	1.69
<a href="#">D1</a> (-) (C)	011 (Standard)	No Organism Identification Possible	1.47	No Organism Identification Possible	1.44
<a href="#">D2</a> (-) (C)	012 (Standard)	No Organism Identification Possible	1.39	No Organism Identification Possible	1.40
<a href="#">D3</a> (-) (C)	013 (Standard)	No Organism Identification Possible	1.68	No Organism Identification Possible	1.53
<a href="#">D4</a> (+) (B)	014 (Standard)	<a href="#">Peribacillus simplex</a>	1.70	No Organism Identification Possible	1.62
<a href="#">D5</a> (+) (B)	015 (Standard)	<a href="#">Peribacillus muralis</a>	1.79	No Organism Identification Possible	1.64
<a href="#">D6</a> (+) (B)	016 (Standard)	<a href="#">Peribacillus muralis</a>	1.75	No Organism Identification Possible	1.66
<a href="#">D7</a> (+) (B)	017 (Standard)	<a href="#">Peribacillus simplex</a>	1.90	<a href="#">Peribacillus simplex</a>	1.75
<a href="#">D8</a> (+++)(A)	018 (Standard)	<a href="#">Peribacillus simplex</a>	2.11	<a href="#">Peribacillus muralis</a>	1.81
<a href="#">D9</a> (+) (B)	019 (Standard)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1.94	<a href="#">Pseudomonas corrugata</a>	1.86
<a href="#">D10</a> (+++)(A)	020 (Standard)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2.01	<a href="#">Pseudomonas corrugata</a>	1.95
<a href="#">D11</a> (+) (B)	021 (Standard)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1.93	<i>Pseudomonas brassicaearum</i>	1.89
<a href="#">D12</a> (+) (B)	022 (Standard)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1.93	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	1.89

Result overview table--continued on next page

Slika 6. Primjer rezultata identifikacije MALDI-TOF MS (Brucker Daltonics, Njemačka). 007 – S1-20; 008 – SD2-7; 009 – SD2-10; 010 – SL2-1; 011 – SL2-3; 012 – SL2-7; 013 – SMS-1; 014 – SL2-4; 015 – SL2-8; 016 – SMS-13; 017 – SGE-1; 018 – SL2-15; 019 – SL2-16; 020 – SL2-18; 021 – SD2-14; 022 – SGE-8.

Pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije (Brucker Daltonics, Njemačka) identificirano je ukupno 75 (50,0 %) izolata. Od toga svi izolati su identificirani na razini roda, dok je identifikacija na razini vrste bila moguća za 32 (21,3 %) izolata. 41 (27,3 %) izolat uopće nije bilo moguće identificirati pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije (Graf 1.).

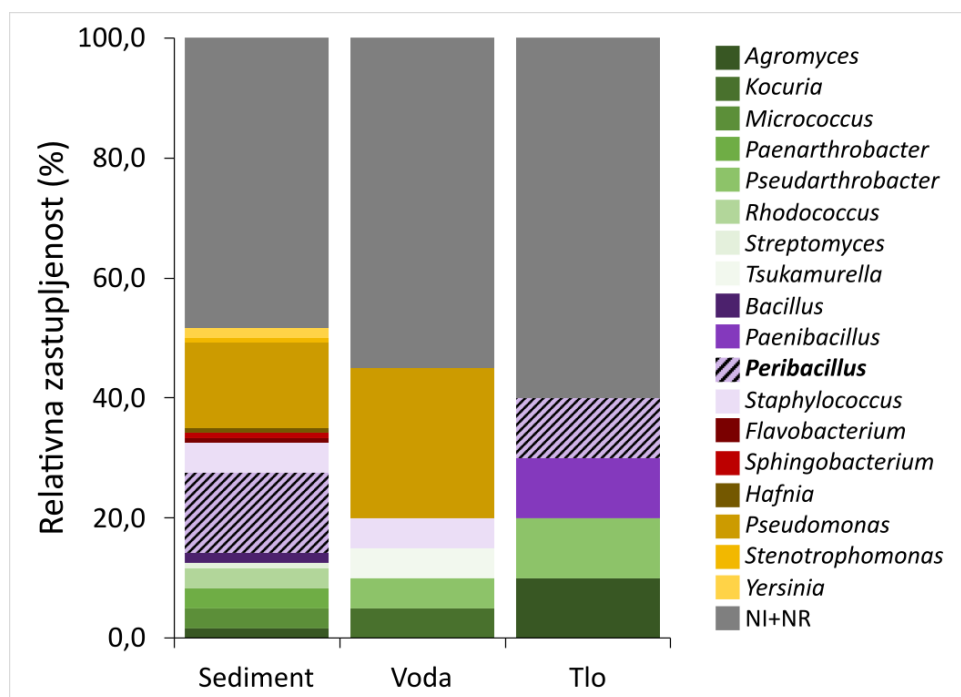
Identificirani su izolati svrstani u četiri razreda, među kojima su najzastupljeniji *Bacillota* (18,0 %) i *Pseudomonadota* (17,3 %) (graf 1.A) i 18 rodova među kojima dominiraju rodovi *Pseudomonas* (14,7 %) i *Peribacillus* (11,3 %). Relativna zastupljenost ostalih rodova je niža od 3,0 % (Graf 1.B).



Graf 1. Relativna zastupljenost (%) pojedinih A) razreda i B) rodova u spiljskim sedimentima i vodi te tlu iznad spilje.



Izolati *Peribacillus* spp. su primarno izolirani iz uzoraka spiljskih sedimenata i tla iznad spilje, dok u uzorku vode uopće nisu prisutni (Graf 2.; Tablica 6.).



Graf 2. Distribucija bakterija roda *Peribacillus* u spiljskim sedimentima i vodi te tlu iznad spilje. Rod *Peribacillus* je istaknut kosim crtama u grafu i deblje otisnut u legendi.

Pripadnost rodu *Peribacillus* potvrđena je za 17 izolata, od toga samo jedan izolat (SL2-15) je identificiran na razini vrste kao *P. simplex* (Tablica 6.).

Tablica 6. Izolati roda *Peribacillus* prikupljeni u ovom istraživanju i vrijednosti dodijeljene masenim spektarima snimljenim MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Njemačka) uređajem.

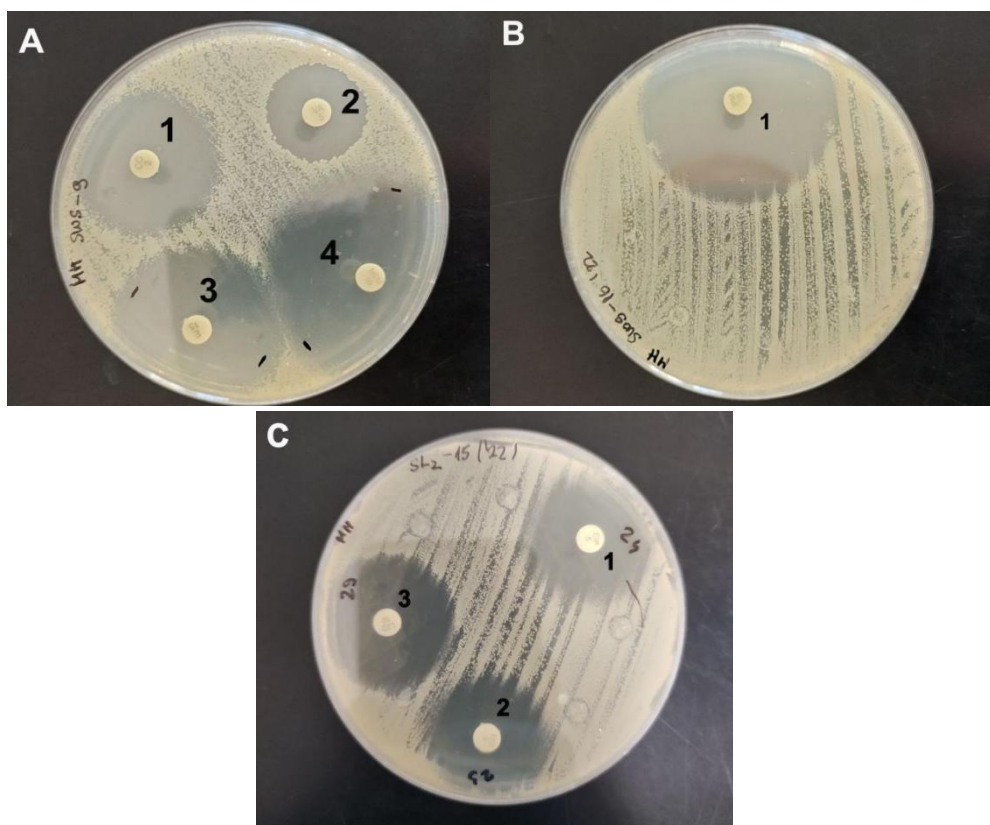
Porijeklo izolata	Izolat	Identifikacija	MALDI vrijednosti
Sediment	S1-2	<i>Peribacillus</i> spp.	1,78 (+) (B)
Sediment	S1-3	<i>Peribacillus</i> spp.	1,79 (+) (B)
Sediment	S1-20	<i>Peribacillus</i> spp.	1,82 (+) (B)
Sediment	SD2-7	<i>Peribacillus</i> spp.	1,89 (+) (B)
Sediment	SD2-10	<i>Peribacillus</i> spp.	1,85 (+) (B)
Sediment	SD2-19	<i>Peribacillus</i> spp.	1,95 (+) (B)
Sediment	SL2-1	<i>Peribacillus</i> spp.	1,92 (+) (B)
Sediment	SL2-4	<i>Peribacillus</i> spp.	1,82 (+) (B)
Sediment	SL2-8	<i>Peribacillus</i> spp.	1,91 (+) (B)
Sediment	SL2-15	<i>P. simplex</i>	2,11 (+++) (A)
Sediment	SMS-13	<i>Peribacillus</i> spp.	1,94 (+) (B)
Sediment	SGE-1	<i>Peribacillus</i> spp.	1,92 (+) (B)
Sediment	SWS-6	<i>Peribacillus</i> spp.	1,90 (+) (B)
Sediment	SWS-9	<i>Peribacillus</i> spp.	1,82 (+) (B)

Sediment	SWS-10	<i>Peribacillus</i> spp.	1,73 (+) (B)
Sediment	SWS-16	<i>Peribacillus</i> spp.	1,90 (+) (B)
Tlo iznad spilje	NOD-5	<i>Peribacillus</i> spp.	1,88 (+) (B)

Izolati čija pripadnost rodu *Peribacillus* spp. je potvrđena MALDI-TOF masenom spektrometrijom su korišteni u daljnjim analizama.

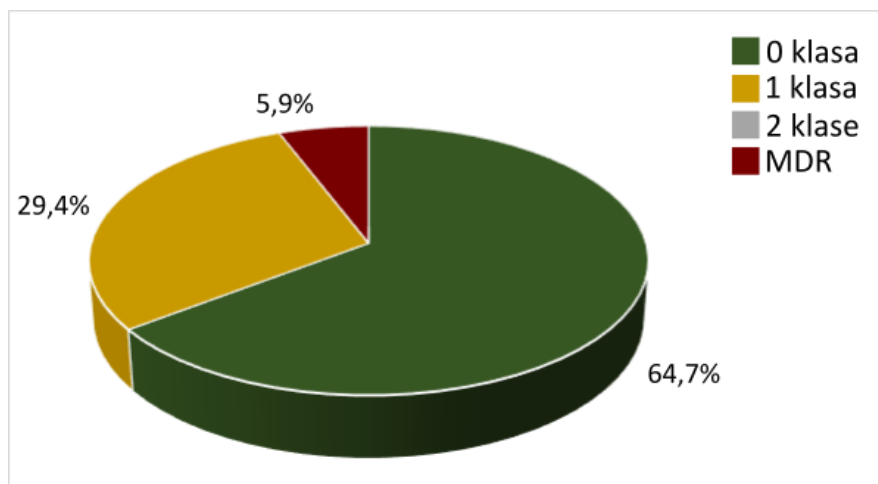
#### 4.2. Osjetljivost izolata *Peribacillus* spp. na antibiotike

U ovom istraživanju ispitana je osjetljivost izolata *Peribacillus* spp. na pet klasa antibiotika (karbapenemi, glikopeptidi, fluorokinoloni, makrolidi/linkozamidi te oksazolidinoni) pomoću disk difuzijske metode. Inhibitorno djelovanje antibiotika prema ispitanim izolatima očituje se kao zona oko diskova gdje izostaje bakterijski rast (Slika 7.).



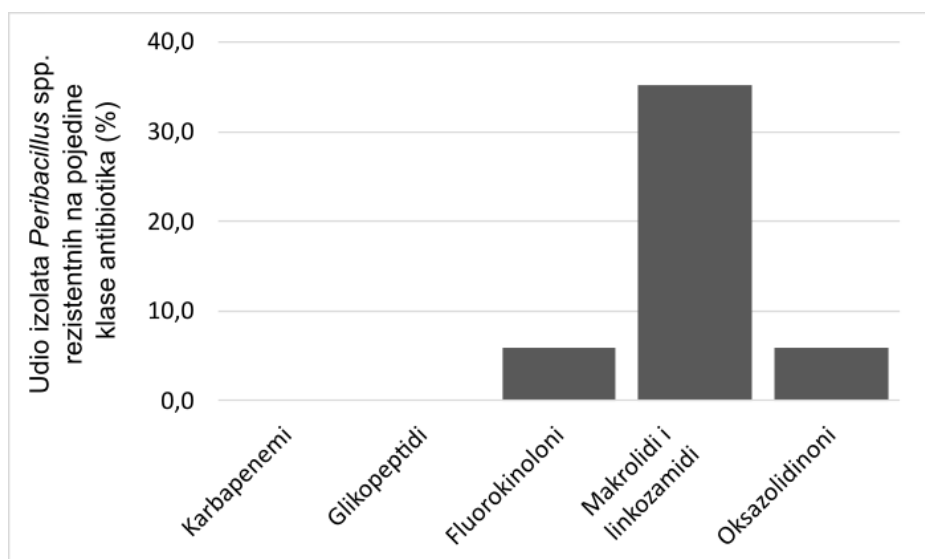
Slika 7. Utjecaj antibiotika na izolate *Peribacillus* spp. A. SWS-9 (1-klindamicin (CC 2  $\mu$ g) ; 2-vankomicin (VA 5  $\mu$ g) ; 3-eritromicin (E 15  $\mu$ g) ; 4-meropenem (MEM 10  $\mu$ g)); B. SWS-16 (1-imipenem (IPM 10  $\mu$ g)); C. SL2-15 (1-ciprofloksacin (CIP 5  $\mu$ g); 2- levofloksacin (LVX 5  $\mu$ g); 3-linezolid (LZD 10  $\mu$ g)).

Od 17 izolata samo je jedan (5,9 %) izolat (S1-3) rezistentan na više klasa antibiotika (fluorokinoloni, makrolidi/linkozamidi te oksazolidinoni), a pet (29,4 %) izolata (S1-2, S1-20, SL2-4, SL2-15 i SWS-10) je rezistentno na jednu klasu antibiotika. Preostali izolati (64,7 %) su osjetljivi na sve ispitane klase antibiotika (Graf 3.).



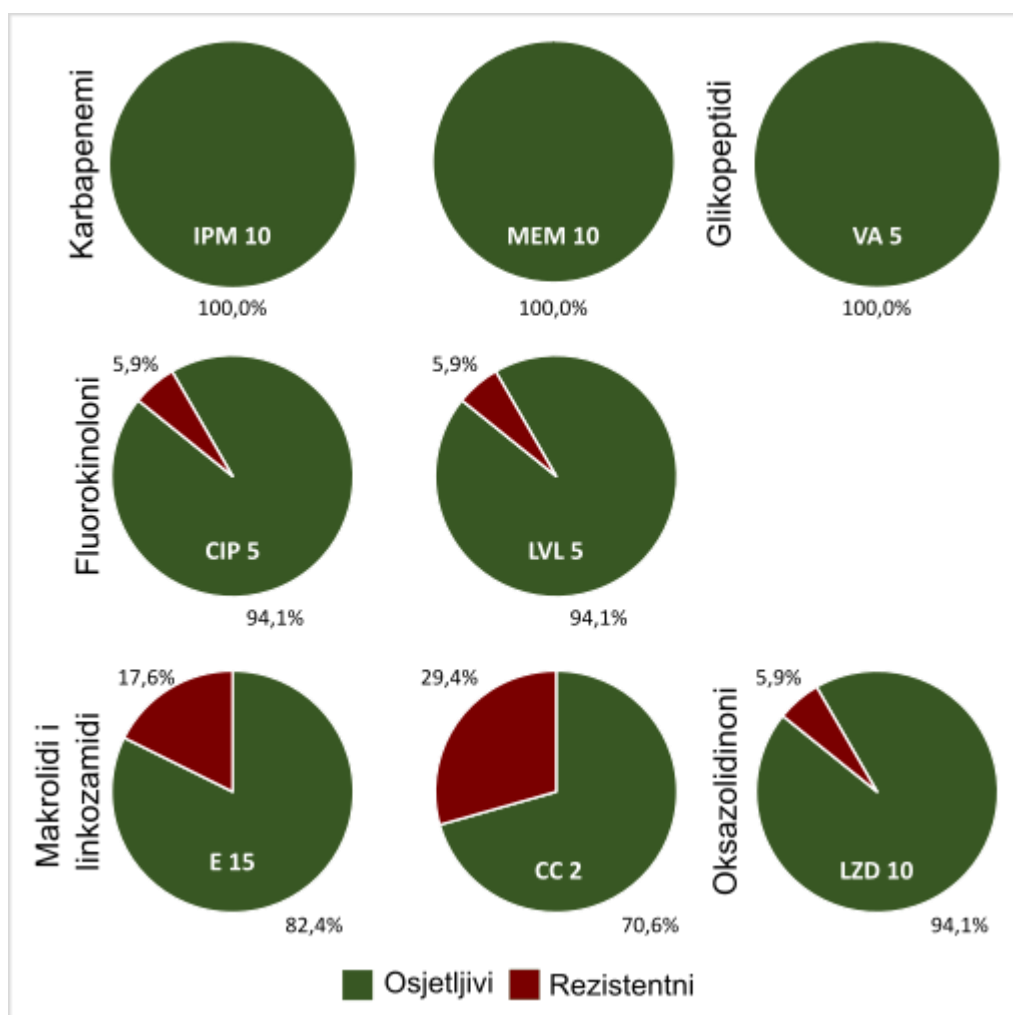
Graf 3. Rezistencija izolata *Peribacillus* spp. na različite klase antibiotika. MDR (eng. *multiple drug resistance*) – višestruka rezistencija na antibiotike.

Šest izolata (35,3 %; S1-2, S1-3, S1-20, SL2-4, SL2-15 i SWS-10) *Peribacillus* spp. rezistentno je na makrolide/linkozamide, inhibitore sinteze proteina, jedan izolat (5,9 %; S1-3) je rezistentan na fluorokinolone, inhibitore sinteze nukleinskih kiselina i jedan (5,9 %; S1-3) je rezistentan na oksazolidinone koji inhibiraju sintezu proteina. Konačno, svi izolati *Peribacillus* spp. su osjetljivi na inhibitore sinteze stanične stijenke (karbapenemi i glikopeptidi) (Graf 4., Graf 5., Tablica 7.).



Graf 4. Distribucija rezistencije unutar izolata *Peribacillus* spp. na pojedine klase antibiotika

Osjetljivost izolata *Peribacillus* spp. na pojedinačne antibiotike slijedi isti trend kao i osjetljivost na pojedine klase antibiotika, pa su tako svi izolati osjetljivi na imipenem (IPM 10) i meropenem (MEM 10) predstavnike karbapenema, kao i na antibiotik iz klase glikopeptida, vankomicin (VA 5). Na oba antibiotika iz klase fluorokinoloni, ciprofloksacin (CIP 5) i levofloksacin (LVX 5) rezistentan je samo jedan izolat (S1-3), dok su ostali izolati (94,1 %) osjetljivi na njihovo djelovanje. Rezistentnost izolata *Peribacillus* spp. na pojedinačne antibiotike iz klase makrolida varira, pa su na eritromicin (E 15) rezistentna tri izolata (17,6 %), a na klindamicin (CC 2) pet (29,4 %) izolata. Ostali izolati su osjetljivi na njihovo djelovanje. Na antibiotik iz klase oksazolidinoni, linezolid (LZD 10) jedan (5,9 %) izolat je rezistentan, a preostali izolati (94,1 %) su osjetljivi (Graf 5., Tablica 7.).



Graf 5. Distribucija rezistentnosti na različite antibiotike *Peribacillus* spp. na različite antibiotike. Udio osjetljivih i rezistentnih izolata izražen je u postocima.

Tablica 7. Pregled osjetljivosti izolata *Peribacillus* spp. na različite antibiotike. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti promjera zona inhibicije rasta (n=2) s pripadajućim standardnim devijacijama u milimetrima (mm). Rezistentni izolati su deblje otisnuti.

Izolot	Vrsta	Karbapenemi*		Glikopeptidi*	Fluorokinoloni**		Makrolidi i linkozamidi***		Oksazolidinoni***
		IPM 10 (mm)	MEM 10 (mm)	VA 5 (mm)	CIP 5 (mm)	LVX 5 (mm)	E 15 (mm)	CC 2 (mm)	LZD 10 (mm)
S1-2	<i>Peribacillus</i> spp.	39,0 ± 0,0 (O)	37,0 ± 0,0 (O)	22,0 ± 0,0 (O)	31,0 ± 0,0 (O)	31,0 ± 0,0 (O)	<b>19,0 ± 0,0 (R)</b>	<b>16,0 ± 0,0 (R)</b>	33,0 ± 0,0 (O)
S1-3	<i>Peribacillus</i> spp.	42,0 ± 0,0 (O)	36,0 ± 0,0 (O)	22,0 ± 0,0 (O)	<b>16,0 ± 0,0 (R)</b>	<b>16,0 ± 0,0 (R)</b>	<b>20,0 ± 0,0 (R)</b>	17,0 ± 0,0 (O)	<b>19,0 ± 0,0 (R)</b>
S1-20	<i>Peribacillus</i> spp.	31,0 ± 0,0 (O)	32,0 ± 0,0 (O)	21,0 ± 0,0 (O)	30,0 ± 0,0 (O)	28,0 ± 0,0 (O)	28,0 ± 0,0 (O)	<b>16,0 ± 0,0 (R)</b>	31,0 ± 0,0 (O)
SD2-7	<i>Peribacillus</i> spp.	40,0 ± 0,0 (O)	35,0 ± 0,0 (O)	20,0 ± 0,0 (O)	31,0 ± 0,0 (O)	27,0 ± 0,0 (O)	30,0 ± 0,0 (O)	26,0 ± 0,0 (O)	30,0 ± 0,0 (O)
SD2-10	<i>Peribacillus</i> spp.	47,0 ± 0,0 (O)	38,0 ± 0,0 (O)	22,0 ± 0,0 (O)	31,5 ± 0,7 (O)	29,0 ± 0,0 (O)	33,0 ± 0,0 (O)	30,0 ± 0,0 (O)	32,0 ± 0,0 (O)
SD2-19	<i>Peribacillus</i> spp.	44,0 ± 0,0 (O)	39,0 ± 0,0 (O)	23,0 ± 0,0 (O)	31,0 ± 0,0 (O)	30,0 ± 0,0 (O)	32,0 ± 0,0 (O)	30,0 ± 0,0 (O)	31,0 ± 0,0 (O)
SL2-1	<i>Peribacillus</i> spp.	46,0 ± 0,0 (O)	46,5 ± 0,7 (O)	23,0 ± 0,0 (O)	35,0 ± 0,0 (O)	34,0 ± 0,0 (O)	35,0 ± 0,0 (O)	32,5 ± 2,1 (O)	30,0 ± 0,0 (O)
SL2-4	<i>Peribacillus</i> spp.	36,0 ± 0,0 (O)	34,0 ± 0,0 (O)	20,0 ± 0,0 (O)	35,0 ± 0,0 (O)	34,0 ± 0,0 (O)	26,0 ± 0,0 (O)	<b>15,0 ± 0,0 (R)</b>	27,0 ± 0,0 (O)
SL2-8	<i>Peribacillus</i> spp.	45,0 ± 0,0 (O)	37,0 ± 0,0 (O)	18,0 ± 0,0 (O)	34,0 ± 0,0 (O)	33,0 ± 0,0 (O)	27,0 ± 0,0 (O)	20,0 ± 0,0 (O)	27,0 ± 0,0 (O)
SL2-15	<i>P. simplex</i>	36,0 ± 0,0 (O)	33,0 ± 0,0 (O)	16,0 ± 0,0 (O)	24,0 ± 0,0 (O)	28,0 ± 0,0 (O)	26,0 ± 0,0 (O)	<b>12,0 ± 0,0 (R)</b>	29,0 ± 0,0 (O)
SMS-13	<i>Peribacillus</i> spp.	46,0 ± 0,0 (O)	36,0 ± 0,0 (O)	20,0 ± 0,0 (O)	31,0 ± 0,0 (O)	30,0 ± 0,0 (O)	34,0 ± 0,0 (O)	28,0 ± 0,0 (O)	31,0 ± 0,0 (O)
SGE-1	<i>Peribacillus</i> spp.	39,0 ± 0,0 (O)	33,0 ± 0,0 (O)	19,0 ± 0,0 (O)	33,0 ± 0,0 (O)	36,0 ± 0,0 (O)	26,0 ± 0,0 (O)	24,0 ± 0,0 (O)	30,5 ± 0,7 (O)
SWS-6	<i>Peribacillus</i> spp.	45,0 ± 0,0 (O)	40,0 ± 0,0 (O)	23,0 ± 0,0 (O)	32,0 ± 0,0 (O)	34,0 ± 0,0 (O)	33,0 ± 0,0 (O)	30,0 ± 0,0 (O)	30,5 ± 0,7 (O)
SWS-9	<i>Peribacillus</i> spp.	44,0 ± 0,0 (O)	40,0 ± 0,0 (O)	23,0 ± 0,0 (O)	33,0 ± 0,0 (O)	34,0 ± 0,0 (O)	32,0 ± 0,0 (O)	30,0 ± 0,0 (O)	27,0 ± 0,0 (O)
SWS-10	<i>Peribacillus</i> spp.	41,0 ± 0,0 (O)	41,0 ± 0,0 (O)	23,0 ± 0,0 (O)	31,0 ± 0,0 (O)	29,0 ± 0,0 (O)	<b>13,0 ± 0,0 (R)</b>	<b>16,0 ± 0,0 (R)</b>	32,0 ± 0,0 (O)
SWS-16	<i>Peribacillus</i> spp.	39,0 ± 0,0 (O)	36,0 ± 0,0 (O)	19,0 ± 0,0 (O)	31,5 ± 2,1 (O)	31,0 ± 0,0 (O)	27,0 ± 0,0 (O)	27,0 ± 0,0 (O)	34,0 ± 0,0 (O)
NOD-5	<i>Peribacillus</i> spp.	46,0 ± 0,0 (O)	37,0 ± 0,0 (O)	18,0 ± 0,0 (O)	34,0 ± 0,0 (O)	33,0 ± 0,0 (O)	26,0 ± 0,0 (O)	17,0 ± 0,0 (O)	29,0 ± 0,0 (O)

\*\*\*\* mehanizam djelovanja: \* inhibicija sinteze stanične stijenke, \*\* inhibicija sinteze nukleinskih kiselina, \*\*\*inhibicija sinteze proteina

IPM 10 – imipenem (10 µg); MEM 10 – meropenem (10 µg); VA 5 – vankomicin (5 µg); CIP 5 – ciprofloksacin (5 µg); LVX 5 – levofloksacin (5 µg); E 15 – eritromicin (15 µg); CC 2 – klindamicin (2 µg); LZD 10 – linezolid (10 µg)

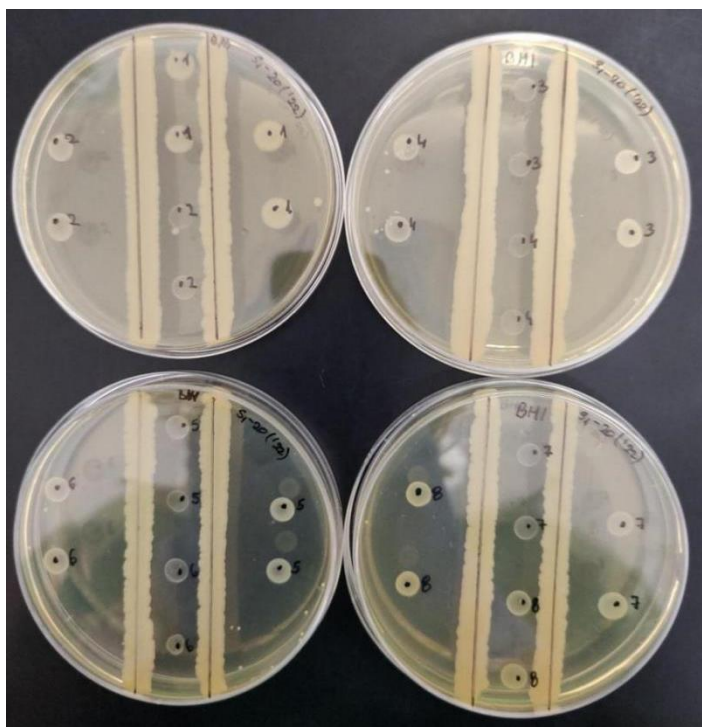
O – osjetljiv; R - rezistentan

U ovom istraživanju izolat S1-3 se pokazao kao najrezistentniji (rezistentan na tri klase antibiotika), te zajedno s izolatima rezistentnim na jednu klasu antibiotika (S1-2, S1-20, SL2-4, SL2-15 i SWS-10) predstavlja potencijani izvor gena odgovornih za širenje antibiotske rezistencije. S druge strane, 11 izolata (SD2-7, SD2-10, SD2-19, SL2-1, SL2-8, SMS-13, SGE-1, SWS-6, SWS-9, SWS-16 i NOD-5) je osjetljivo na sve ispitane antibiotike te bi potencijalno mogli biti primjenjeni u poljoprivredi.

#### 4.3. Antimikrobno djelovanje *Peribacillus* spp.

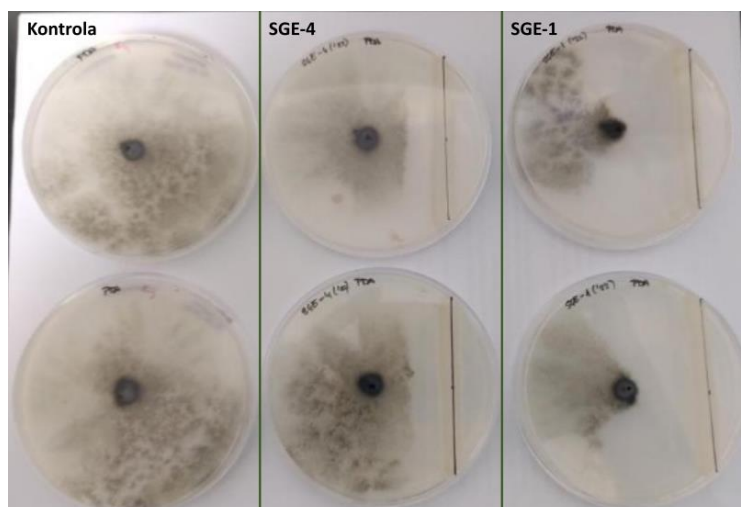
Drugi dio ovog istraživanja vezan je uz ispitivanje antimikrobnog djelovanja izolata *Peribacillus* spp. na humane (*E. coli*, *S. enteric*, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. innocua*) i biljne (*P. syringae*, *E. amylovora*, *A. tumefaciens*, *B. cinerea*) patogene mikroorganizme. Ispitivanje antimikrobnog učinka izolata *Peribacillus* spp. sastojalo se od dva dijela, utvrđivanja njihovog antibakterijskog i antifungalnog djelovanja.

Antibakterijski učinak sojeva je vidljiv iz redukcije promjera i gustoće kolonija patogenih bakterija (između linija izolata) u odnosu na kontrolne kolonije (uz rub petrijeve ploče) (Slika 8.).



Slika 8. Antibakterijsko djelovanje izolata S1-20 na indikatorske bakterije. 1) *E. coli* (ATTC 25922), 2) *S. enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), 3) *S. aureus* (DSM 20231), 4) *B. cereus* (DSM 6791), 5) *L. innocua* (ATTC 33090), 6) *P. syringae* (DSM 10604), 7) *E. amylovora* (DSM 50901), 8.) *A. tumefaciens* (DSM 30205).

Antifungalno djelovanje izolata *Peribacillus* spp. na *B. cinerea* je vidljivo kao smanjenje radijalnog rasta gljive u odnosu na kontrolu (Slika 9.).



Slika 9. Antifungalno djelovanje izolata SGE-1 i SGE-4 u odnosu na kontrolu gljive *B. cinerea* (DSM 877)

U pravilu, izolati *Peribacillus* spp. slabo inhibiraju ili uopće ne inhibiraju rast patogenih bakterija. Potencijalni humani patogeni, *E. coli* čiji rast je slabo inhibiralo 15 izolata (88,2 %) i *B. cereus* čiji rast je slabo inhibiralo 7 izolata (41,2 %) su se pokazali kao najosjetljiviji na antibakterijsko djelovanje izolata *Peribacillus* spp. Suprotno tome, biljni patogen, *P. syringae* čiji rast je inhibirao samo jedan izolat (5,9 %; SL2-15) se pokazao kao najotporniji na inhibitorno djelovanje izolata *Peribacillus* spp. Ostale humane i biljne patogene sličan broj izolata (3-5) *Peribacillus* spp. je slabo inhibirao.

Izolat SL2-15 je slabo inhibirao rast svih bakterijskih patogena korištenih u ovom istraživanju i kao takav pokazao najširi spektar inhibitornog djelovanja u usporedbi s ostalim izolatima. Slijede ga izolati S1-20 i SD2-19 koji su slabo inhibirali po pet patogena (S1-20: *E. coli*, *S. enterica*, *B. cereus*, *L. innocua* i *E. amylovora*; SD2-19: *E. coli*, *S. enterica*, *B. cereus*, *L. innocua* i *A. tumefaciens*) te izolati SMS-13 i SWS-10 koji su slabo inhibirali po četiri patogena (SMS-13: *E. coli*, *B. cereus*, *L. innocua* i *E. amylovora*; SWS-10: *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus* i *B. cereus*). Suprotno njima, izolat SWS-9 nije inhibirao ni jednu patogenu bakteriju (Tablica 8.).

Tablica 8. Antibakterijsko djelovanje izolata *Peribacillus* spp. prema indikatorskim bakterijama.

Izolat	Vrsta	<i>E. coli</i> (ATTC 25922)	<i>S. enterica</i> (DSM 14221)	<i>S. aureus</i> (DSM 20231)	<i>B. cereus</i> (DSM 6791)	<i>L. innocua</i> (ATTC 33090)	<i>P. syringae</i> (DSM 10604)	<i>E. amylovora</i> (DSM 50901)	<i>A. tumefaciens</i> (DSM 30205)
S1-2	<i>Peribacillus</i> spp.	+	-	-	-	-	-	+	-
S1-3	<i>Peribacillus</i> spp.	+	-	-	-	-	-	-	-
S1-20	<i>Peribacillus</i> spp.	+	+	-	+	+	-	+	-
SD2-7	<i>Peribacillus</i> spp.	+	-	+	+	-	-	-	-
SD2-10	<i>Peribacillus</i> spp.	-	-	-	+	-	-	+	-
SD2-19	<i>Peribacillus</i> spp.	+	+	-	+	+	-	-	+
SL2-1	<i>Peribacillus</i> spp.	+	-	-	-	-	-	-	-
SL2-4	<i>Peribacillus</i> spp.	+	-	-	-	-	-	-	-
SL2-8	<i>Peribacillus</i> spp.	+	-	-	-	-	-	-	+
SL2-15	<i>P. simplex</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
SMS-13	<i>Peribacillus</i> spp.	+	-	-	+	+	-	+	-
SGE-1	<i>Peribacillus</i> spp.	+	-	-	-	-	-	-	-
SWS-6	<i>Peribacillus</i> spp.	+	-	-	-	-	-	-	-
SWS-9	<i>Peribacillus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-
SWS-10	<i>Peribacillus</i> spp.	+	+	+	+	-	-	-	-
SWS-16	<i>Peribacillus</i> spp.	+	+	-	-	-	-	-	+
NOD-5	<i>Peribacillus</i> spp.	+	-	-	-	-	-	-	-

- = nema inhibicije; + = slaba inhibicija;

++ = izražena inhibicija;

+++ = vrlo jaka inhibicija; p.i.= potpuna inhibicija



S druge strane, izolati *Peribacillus* spp. su se pokazali kao iznimno efikasni u suzbijanju rasta gljive *B. cinerea*. Čak 8 izolata (47,1 %) je snažno inhibiralo njen rast, gdje se redukcija radijalnog rasta kretala u rasponu od 73,3 % (SWS-10) do 93,0 % (SL2-1). Ostali izolati uopće nisu utjecali na rast gljive *B. cinerea* (Tablica 9.).

Tablica 9. Antifungalno djelovanje izolata *Peribacillus* spp. prema gljivi *B. cinerea* (DSM 877). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti inhibicije radijalnog rasta (n=2) s pripadajućim standardnim devijacijama u postocima (%).

Izolat	Vrsta	Inhibicija radijalnog rasta (%)	Inhibicija
S1-2	<i>Peribacillus</i> spp.	0,0 ± 0,0	n.i.
S1-3	<i>Peribacillus</i> spp.	0,0 ± 0,0	n.i.
S1-20	<i>Peribacillus</i> spp.	0,0 ± 0,0	n.i.
SD2-7	<i>Peribacillus</i> spp.	0,0 ± 0,0	n.i.
SD2-10	<i>Peribacillus</i> spp.	0,0 ± 0,0	n.i.
SD2-19	<i>Peribacillus</i> spp.	0,0 ± 0,0	n.i.
SL2-1	<i>Peribacillus</i> spp.	93,0 ± 0,0	+++
SL2-4	<i>Peribacillus</i> spp.	88,4 ± 0,0	+++
SL2-8	<i>Peribacillus</i> spp.	90,7 ± 1,4	+++
SL2-15	<i>P. simplex</i>	0,0 ± 0,0	n.i.
SMS-13	<i>Peribacillus</i> spp.	0,0 ± 0,0	n.i.
SGE-1	<i>Peribacillus</i> spp.	90,7 ± 1,4	+++
SWS-6	<i>Peribacillus</i> spp.	90,7 ± 0,0	+++
SWS-9	<i>Peribacillus</i> spp.	90,7 ± 0,0	+++
SWS-10	<i>Peribacillus</i> spp.	73,3 ± 16,3	+++
SWS-16	<i>Peribacillus</i> spp.	0,0 ± 0,0	n.i.
NOD-5	<i>Peribacillus</i> spp.	88,4 ± 0,0	+++

p.i. = potpuna inhibicija (100 %); +++ = vrlo jaka inhibicija (70 - < 100 %); ++ = izražena inhibicija (40 - < 70 %); + = slaba inhibicija (> 0 - < 40 %); n.i. = nema inhibicije (0 %)

## 5. Rasprava

U ovom radu identificirane vrste roda *Peribacillus* iz uzoraka sedimenta i vode uzorkovanih iz krške spilje testirane su na pet klasa antibiotika, tj. na osam pojedinačnih antibiotika. Od 17 testiranih izolata samo je jedan (S1-3, *P. simplex*) pokazao rezistentnost na više klasa antibiotika te spada u skupinu višestruko rezistentnih bakterija (MDR). Za usporedbu, *Bacillus* vrste u istraživanjima Shammi i Ahmed (2013.), te Mbhele i Zishiri (2016.) pokazuju visok postotak (oko 100%) rezistentnosti na tri i više klasa antibiotika (MDR). Međutim, uzevši u obzir mjesto uzorkovanja, dobivene razlike u rezultatima su očekivane budući da izolati u ovom radu nisu bili izloženi selektivnom pritisku antibiotika kao što je bio slučaj u navedenim radovima.

Kad govorimo o sposobnosti rezistencije bakterija *Peribacillus* spp. na pojedinačne antibiotike, vidimo da je najveći postotak ispitanih bakterija (29,4 %, pet izolata) sposobno oduprijeti se mehanizmu djelovanja klindamicina s prosjekom promjera oko 15,0 mm ± 0,0. Slične rezultate dobili su i Berić et al. (2018.) u svojem istraživanju, između ostalih i *Bacillus* vrsta izoliranih iz okolišnih uzoraka na području Republike Srbije. Zaključili su kako je gen koji posjeduju ispitane bakterije, gen za rezistenciju na eritromicin (*erm*), zaslužan za rezistenciju na klindamicin. Otkrili su kako je ovaj gen distribuiran između srodnih i nesrodnih vrsta, tj. da su vrste *Bacillus* spp. iz okoline potencijalni izvor otpornosti na ovaj antibiotik. Dublja analiza rezistencije na klindamicin koju su proveli Jeong et al. (2020.) pokazala je da se radi o intrinzičnoj otpornosti njihovih izolata *Bacillus* spp. što dovodi u pitanje zaključak koji su donjeli Berić et al. (2018.). S obzirom na dobivene rezultate njihovih istraživanja, za izolate *Peribacillus* spp. testirane u ovom istraživanju potrebno je provesti dodatne analize kako bi se utvrdilo o kojem se tipu rezistencije radi.

Na djelovanje eritromicina sposobnost rezistencije ima 17,6 % (tri) izolata s promjerom 17,3 mm ± 0,0. Na antibiotike ciprofloksacin i levofloksacin sposobnost rezistencije je imao jedan izolat (5,9%) s promjerima u prosjeku 16,0 mm ± 0,0, kao i na linezolid, ali s prosječnom vrijednosti promjera 19,0 mm ± 0,0. Na djelovanje imipenema, meropenema i vankomicina svi su izolati pokazali osjetljivost.

Svi ispitani izolati *Peribacillus* spp. slabo su ili uopće nisu inhibirali humane i biljne bakterijske patogene korištene u ovom istraživanju. Jedino je izolat SL2-15 pokazao slabo inhibitorno djelovanje na sve testirane patogene, te je time pokazao najširi spektar inhibitornog djelovanja. Ostali izolati pokazuju slabu inhibiciju prema nekolicini ili samo jednoj od patogenih bakterija. Do sličnih saznanja došli su i Berić et al. (2011.) kada su istraživali djelovanje bakterija roda *Bacillus* na *E. coli* i fitopatogenu bakteriju *A. tumefaciens*. Njihovo ispitivanje pokazalo je da analizirani izolati nemaju nikakvo djelovanje na testirane patogene bakterije.

S druge strane u mnogobrojnim istraživanjima roda *Bacillus* (Amin et al. 2015.; Domrongpakkaphan i Wanchaitanawong 2006.; Kivanç et al. 2014.; Maela et al. 2022.; Singh et al. 2018.) dokazano je izrazito inhibitorno djelovanje pojedinih vrsta ovog roda na patogene bakterije poput *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, pa čak i *Vibrio* spp.

iz čega možemo zaključiti da postoje velike varijacije u antibakterijskom djelovanju *Bacillus* i *Peribacillus* vrsta te da ispitani izolati *Peribacillus* spp. iz krške spilje nemaju potencijal za antagonističko djelovanje i inhibiciju patogenih bakterija.

Suprotno rezultatima prvog dijela istraživanja, skoro 50 % (47,1 %) *Peribacillus* izolata izoliranih u ovom istraživanju, inhibiralo je fitopatogenu gljivu *B. cinerea*. Djelovanje *Peribacillus* spp. na patogene gljive nije do sada istraženo, međutim postoje mnogobrojna istraživanja o utjecaju vrsta roda *Bacillus* na fitopatogene gljive. Usporedimo li brojna istraživanja *Bacillus* vrsta (Balouiri et al. 2015.; Bjelić et al. 2017.; Girardin et al. 2002.; Hou et al. 2006.; Khan et al. 2018.; Matić i Siber 2019.; Mghazli et al. 2022.; Strafella et al. 2021.) koja su pokazala široko inhibitorno djelovanje prema biljnim patogenim gljivama poput *B. cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cepae*, *Alternaria padwickii*, *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria brassicae* i *Leptosphaeria maculans* te potencijalno humanoj patogenoj gljivi *Candida albicans*, s dobivenim rezultatima ovog istraživanja, možemo zaključiti da rod *Peribacillus* ima potencijalnu primjenu kao biofungicid u poljoprivredi te da je potrebno detaljno istražiti djelovanje *Peribacillus* spp. izoliranih iz krške spilje i na ostale fitopatogene gljive, ali i one koje izazivaju bolesti kod ljudi.

## 6. Zaključci

1. Od 75 izoliranih izolata, 11,3 % (17) ih je identificirano kao *Peribacillus* spp., od toga je samo jedan izolat identificiran do razine vrste (*P. simplex*).
2. 35,3 % izolata je rezistentno na makrolide/linkozamide, 5,9 % ih je rezistentno na fluorokinolone i oksazolidinone, dok niti jedan izolat nije pokazao rezistentnost na karbapeneme i glikopeptide.
3. Ovisno o izolatima, vrste *Peribacillus* izolirane iz krške spilje, ne pokazuju potencijal u širenju rezistentnosti na testirane antibiotike u prirodi, ali su potrebne dodatne analize vezane uz njihovu rezistentnost na djelovanje klindamicina.
4. *Peribacillus* vrste pokazale su slabo ili nikakvo inhibitorno djelovanje prema testiranim biljnim i humanim patogenim bakterijama (*E.coli*, *S. enteric*, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. innocua*, *P. siringae*, *E. amylovora* i *A. tumefaciens*).
5. Vrste *Peribacillus* spp. pokazale su zadovoljavajuće inhibitorno djelovanje prema fitopatogenoj gljivi *B. cinerea*. 47 % izolata uspješno inhibira rast ove plijesni.
6. Velika osjetljivost *Peribacillus* spp. izoliranih iz krške spilje na različite klase antibiotika kao i njihov potencijal u inhibiciji rasta plijesni, predstavljaju dobru početnu točku za daljnja istraživanja ovih izolata kao potencijalnih biofungicida.

## 7. Popis literature

1. Adamski P., Byczkowska-Rostkowska Z., Gajewska J., Zakrzewski A.J., Kłębukowska L. (2023). Prevalence and Antibiotic Resistance of *Bacillus* sp. Isolated from Raw Milk. *Microorganisms* 11 (4). doi:10.3390/microorganisms11041065
2. Adedeji W.A. (2016). THE TREASURE CALLED ANTIBIOTICS. *Ann Ib Postgrad Med* 14 (2): 56–57
3. Adimpong D.B., Sørensen K.I., Thorsen L., Stuer-Lauridsen B., Abdelgadir W.S., Nielsen D.S., Derkx P.M.F., Jespersen L. (2012). Antimicrobial Susceptibility of *Bacillus* Strains Isolated from Primary Starters for African Traditional Bread Production and Characterization of the Bacitracin Operon and Bacitracin Biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 78 (22): 7903–7914. doi:10.1128/AEM.00730-12
4. Ali S., Hameed S., Shahid M., Iqbal M., Lazarovits G., Imran A. (2020). Functional characterization of potential PGPR exhibiting broad-spectrum antifungal activity. *Microbiol Res* 232. doi:10.1016/j.micres.2019.126389
5. Amin M., Rakhisi Z., Ahmady A.Z. (2015). Isolation and Identification of *Bacillus* Species From Soil and Evaluation of Their Antibacterial Properties . *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection* 2 (1): 23233. doi:10.17795/ajcmi-23233
6. Asari S., Tarkowská D., Rolčík J., Novák O., Palmero D.V., Bejai S., Meijer J. (2017). Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta* 245 (1): 15–30. doi:10.1007/s00425-016-2580-9
7. Balouiri M., Bouhdid S., Hark E.H., Sadik M., Ouedrhiri W., Ibensouda S.K. (2015). ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *BACILLUS* SPP. ISOLATED FROM CALOTROPIS PROCERA AIT. RHIZOSPHERE AGAINST *CANDIDA ALBICANS*. *Asian journal of Pharmaceutical and clinical research* 8 (2): 213–217
8. Barbosa J., Caetano T., Mendo S. (2015). Class I and Class II Lanthipeptides Produced by *Bacillus* spp. *J Nat Prod* 78 (11): 2850–2866. doi:10.1021/np500424y
9. Baron S. (1996). *Medical Microbiology*. 4th edition, University of Texas Medical Branch at Galveston. University of Texas Medical Branch at Galveston, chapter 26 p.
10. Baruzzi F., Quintieri L., Morea M., Caputo L. (2011). Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp . and applications in food. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A Méndez-Vilas (Ed)
11. Bauer A.W. (1959). Single-Disk Antibiotic-Sensitivity Testing of Staphylococci. *AMA Arch Intern Med* 104 (2): 208. doi:10.1001/archinte.1959.00270080034004
12. Berić T., Biočanin M., Stanković S., Dimkić I., Janakiev T., Fira D., Lozo J. (2018). Identification and antibiotic resistance of *Bacillus* spp. isolates from natural samples. *Arch Biol Sci* 70 (3): 581–588. doi:10.2298/ABS180302019B
13. Berić T., Kojić M., Slavica Stanković, Ljubica Topisirovi}, Degrassi G., Myers M., Venturi V., Fira D. (2011). Antimicrobial Activity of *Bacillus* sp. Natural Isolates and Their Potential Use in the Biocontrol of Phytopathogenic Bacteria
14. Bešić S. (2017.). *Biološki ligandi za metalne ione*
15. Bhullar K., Waglechner N., Pawlowski A., Koteva K., Banks E.D., Johnston M.D., Barton H.A., Wright G.D. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* 7 (4). doi:10.1371/journal.pone.0034953

16. Bjelic D., Ignjatov M., Marinkovic J., Spremo N., Karaman M., Nikolic Z., Ivanovic Z. (2017). Antifungal activity of indigenous *Bacillus* spp. isolated from soil. *Zb Matice Srp Prir Nauk* (133): 261–269. doi:10.2298/zmspn1733261b
17. Borriss R. (2020). *Bacillus*. In: *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, Elsevier, pp. 107–132. doi:10.1016/B978-0-12-823414-3.00007-1
18. Bulgari D., Filisetti S., Montagna M., Gobbi E., Faoro F. (2022). Pathogenic potential of bacteria isolated from commercial biostimulants. *Arch Microbiol* 204 (3): 162. doi:10.1007/s00203-022-02769-1
19. Burkhanova G.F., Veselova S. V., Sorokan' A. V., Blagova D.K., Nuzhnaya T. V., Maksimov I. V. (2017). Strains of *Bacillus* ssp. regulate wheat resistance to *Septoria nodorum* Berk. *Appl Biochem Microbiol* 53 (3): 346–352. doi:10.1134/S0003683817030048
20. Carter G.R. (1990). *Bacillus*. In: *Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology*, Elsevier, pp. 221–228. doi:10.1016/B978-0-12-161775-2.50022-0
21. Centers for Diseases Control and Prevention. (2016)
22. CLSI. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. CLSI supplement M100. . Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pennsylvania, SAD
23. CLSI. (2015). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. 3rd ed. CLSI guideline M45. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pennsylvania, SAD
24. Cox G., Wright G.D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.009
25. Crowe-McAuliffe C., Graf M., Huter P., Takada H., Abdelshahid M., Nováček J., Murina V., Atkinson G.C., Hauryliuk V., Wilson D.N. (2018). Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (36): 8978–8983. doi:10.1073/pnas.1808535115
26. Dimkić I., Janakiev T., Petrović M., Degrassi G., Fira D. (2022). Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. *Physiol Mol Plant Pathol* 117: 101754. doi:10.1016/j.pmpp.2021.101754
27. Domig K.J., Kiss H., Petricevic L., Viernstein H., Unger F., Kneifel W. (2014). Strategies for the evaluation and selection of potential vaginal probiotics from human sources: an exemplary study. *Benef Microbes* 5 (3): 263–272. doi:10.3920/BM2013.0069
28. Domrongpakkaphan V., Wanchaitanawong P. (2006). In vitro antimicrobial activity of *Bacillus* spp. Against pathogenic *Vibrio* spp. in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Kasetsart Journal - Natural Science* 40 (4)
29. Duan M., Zhang Y., Zhou B., Qin Z., Wu J., Wang Q., Yin Y. (2020). Effects of *Bacillus subtilis* on carbon components and microbial functional metabolism during cow manure–straw composting. *Bioresour Technol* 303: 122868. doi:10.1016/j.biortech.2020.122868
30. EUCAST. (2022). . In: *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters*. Version 12.0.
31. Farhat A., Chouayekh H., Ben Farhat M., Bouchaala K., Bejar S. (2008). Gene Cloning and Characterization of a Thermostable Phytase from *Bacillus subtilis* US417 and Assessment of its Potential as a Feed Additive in Comparison with a Commercial Enzyme. *Mol Biotechnol* 40 (2): 127–135. doi:10.1007/s12033-008-9068-1

32. Fiedler G., Schneider C., Igbinosa E.O., Kabisch J., Brinks E., Becker B., Stoll D.A., Cho G.-S., Huch M., Franz C.M.A.P. (2019). Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. *BMC Microbiol* 19 (1): 250. doi:10.1186/s12866-019-1632-2
33. Frenzel E., Kranzler M., Stark T.D., Hofmann T., Ehling-Schulz M. (2015). The Endospore-Forming Pathogen *Bacillus cereus* Exploits a Small Colony Variant-Based Diversification Strategy in Response to Aminoglycoside Exposure. *mBio* 6 (6). doi:10.1128/mBio.01172-15
34. Gao T., Ding Y., Wu Q., Wang J., Zhang J., Yu S., Yu P., Liu C., Kong L., Feng Z., Chen M., Wu S., Zeng H., Wu H. (2018). Prevalence, Virulence Genes, Antimicrobial Susceptibility, and Genetic Diversity of *Bacillus cereus* Isolated From Pasteurized Milk in China. *Front Microbiol* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00533
35. Ganesh J., Singh V., Hewitt K., Kaundal A. (2022). Exploration of the rhizosphere microbiome of native plant *Ceanothus velutinus* - an excellent resource of plant growth-promoting bacteria. *Front.Plant Sci.* 13:979669. doi: 10.3389/fpls.2022.979069
36. Girardin H., Albagnac C., Dargaignaratz C., Nguyen-The C., Carlin F. (2002). Antimicrobial Activity of Foodborne *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. against *Clostridium botulinum*. *J Food Prot* 65 (5): 806–813. doi:10.4315/0362-028X-65.5.806
37. Goswami D., Dhandhukia P., Patel P., Thakker J.N. (2014). Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiol Res* 169 (1): 66–75. doi:10.1016/j.micres.2013.07.004
38. Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60 (4): 579–598. doi:10.1007/s13213-010-0117-1
39. Hou X., Boyetchko S.M., Brkic M., Olson D., Ross A., Hegedus D. (2006). Characterization of the anti-fungal activity of a *Bacillus* spp. associated with sclerotia from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 72 (4): 644–653. doi:10.1007/s00253-006-0315-8
40. Ibarra-Galeana J.A., Castro-Martínez C., Fierro-Coronado R.A., Armenta-Bojórquez A.D., Maldonado-Mendoza I.E. (2017). Characterization of phosphate-solubilizing bacteria exhibiting the potential for growth promotion and phosphorus nutrition improvement in maize (*Zea mays* L.) in calcareous soils of Sinaloa, Mexico. *Ann Microbiol* 67 (12): 801–811. doi:10.1007/s13213-017-1308-9
41. Jeong D.-W., Lee B., Heo S., Oh Y., Heo G., Lee J.-H. (2020). Two genes involved in clindamycin resistance of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* identified by comparative genomic analysis. *PLoS One* 15 (4): e0231274. doi:10.1371/journal.pone.0231274
42. Jiang L., Jung W.Y., Li Z., Lee M.-K., Park S.-H., Kang S.W., Lee J.-S., Jung H., Hur T.-Y., Kim H.B., Kim J.-K., Lee J.-H., Lee J.H., Lee J. (2019). *Peribacillus faecalis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from the faeces of a cow. *Int J Syst Evol Microbiol* 71 (3). doi:10.1099/ijsem.0.004721
43. Jiang L., Jung W.Y., Park S.H., Kang S.W., Lee M.K., Lee J.S., Lee J.H., Lee J. (2021). Draft genome sequence of *Peribacillus* sp. AGMB 02131 isolated from feces of a Korean cow. *Korean Journal of Microbiology* 57 (1): 66–68. doi:10.7845/kjm.2021.0119
44. Jurić B. (2017). Sustavi poljoprivredne proizvodnje – utjecaj na prehranu stanovništva i okoliš. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, Osijek
45. Kanižai Šarić G. (2023). Korisni mikroorganizmi u poljoprivredi. *Gospodarski list*

46. Khameneh B., Diab R., Ghazvini K., Bazzaz B.S.F. (2016). Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb Pathog* 95: 32–42. doi:10.1016/j.micpath.2016.02.009
47. Khan N., Martínez-Hidalgo P., Ice T.A., Maymon M., Humm E.A., Nejat N., Sanders E.R., Kaplan D., Hirsch A.M. (2018). Antifungal activity of bacillus species against fusarium and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Front Microbiol* 9 (OCT). doi:10.3389/fmicb.2018.02363
48. Kisić I. (2012). Sanacija onečišćenoga tla. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
49. Kivanç S.A., Takim M., Kivanç M., Güllülü G. (2014). Bacillus Spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens. *Afr Health Sci* 14 (2). doi:10.4314/ahs.v14i2.11
50. Kristich C.J., Rice L.B., Arias C.A. (2014). Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance, *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*
51. Maela M.P., van der Walt H., Serepa-Dlamini M.H. (2022). The Antibacterial, Antitumor Activities, and Bioactive Constituents' Identification of *Alectra sessiliflora* Bacterial Endophytes. *Front Microbiol* 13. doi:10.3389/fmicb.2022.870821
52. Marinculić A., Habrun B., Barbić Lj., Beck R. (2009). Biološke opasnosti u hrani. Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek, 14–15 pp.
53. Martinez J.L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol*. doi:10.1016/j.ddtec.2014.02.001
54. Martínez-Hidalgo P., Flores-Félix J.D., Sánchez-Juanes F., Rivas R., Mateos P.F., Regina I.S., Peix Á., Martínez-Molina E., Igual J.M., Velázquez E. (2021). Identification of canola roots endophytic bacteria and analysis of their potential as biofertilizers for canola crops with special emphasis on sporulating bacteria. *Agronomy* 11 (9). doi:10.3390/agronomy11091796
55. Matic M., Siber T. (2019). Gljive i bakterije u biološkoj kontroli uzročnika bolesti biljaka. *Glasnik zaštite bilja* 38–43
56. Mbhele Z.N., Zishiri S.L.A.B.O.T. (2016). BSc Genetics (Honours) Cum-Laude. Cellular Biology and Genetics
57. Mehta P., Walia A., Chauhan A., Kulshrestha S., Shirkot C.K. (2013). Phosphate solubilisation and plant growth promoting potential by stress tolerant *Bacillus* sp. isolated from rhizosphere of apple orchards in *trans* Himalayan region of Himachal Pradesh. *Annals of Applied Biology* 163 (3): 430–443. doi:10.1111/aab.12077
58. Meier-Kolthoff J.P., Carbasse J.S., Peinado-Olarte R.L., Göker M. (2022). TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Res* 50 (D1): D801–D807. doi:10.1093/nar/gkab902
59. Mghazli N., Bruneel O., Zouagui R., Hakkou R., Sbabou L. (2022). Characterization of plant growth promoting activities of indigenous bacteria of phosphate mine wastes, a first step toward revegetation. *Front Microbiol* 13. doi:10.3389/fmicb.2022.1026991
60. Miao G., Han J., Wang C., Zhang K., Wang S. (2018). Growth inhibition and induction of systemic resistance against *Pythium aphanidermatum* by *Bacillus simplex* strain HS-2. *Biocontrol Sci Technol* 28 (12): 1114–1127. doi:10.1080/09583157.2018.1514585
61. Mohanty P., Singh P.K., Chakraborty D., Mishra S., Pattnaik R. (2021). Insight Into the Role of PGPR in Sustainable Agriculture and Environment. *Front Sustain Food Syst*. doi:10.3389/fsufs.2021.667150



62. Mulani M.S., Kamble E.E., Kumkar S.N., Tawre M.S., Pardesi K.R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front Microbiol* 10 (APR). doi:10.3389/fmicb.2019.00539
63. Pallasch T.J. (2003). Antibiotic resistance. *Dent Clin North Am* 47 (4): 623–639. doi:10.1016/S0011-8532(03)00039-9
64. Park A.J., Krieger J.R., Khursigara C.M. (2016). Survival proteomes: The emerging proteotype of antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol Rev*. doi:10.1093/femsre/fuv051
65. Patel S., Gupta R.S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus bacillus: Proposal for six new genera of bacillus species, peribacillus gen. nov., cytobacillus gen. nov., mesobacillus gen. nov., neobacillus gen. nov., metabacillus gen. nov. and alkalihalobacillus gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 70 (1): 406–438. doi:10.1099/ijsem.0.003775
66. Perić A.M. (2017). Mehanizmi bakterijske rezistencije i tolerancije na antibiotike. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
67. Poonam Pandurang K. (2021). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) : A Review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 10 (4). doi:10.20546/ijcmas.2021.1004.093
68. Rahman A., Uddin W., Wenner N.G. (2015). Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Mol Plant Pathol* 16 (6): 546–558. doi:10.1111/mpp.12209
69. Rodríguez M., Reina J.C., Sampedro I., Llamas I., Martínez-Checa F. (2022). *Peribacillus castrilensis* sp. nov.: A Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Species Isolated From a River Otter in Castril, Granada, Southern Spain. *Front Plant Sci* 13. doi:10.3389/fpls.2022.896728
70. Rogers K., Parrott-Sheffer C. (2020). 'Bacillus'. *Encyclopaedia Britannica*
71. Romo A.L., Quirós R. (2019). Appropriate use of antibiotics: an unmet need. *Ther Adv Urol*. doi:10.1177/1756287219832174
72. Saxena A.K., Kumar M., Chakdar H., Anuroopa N., Bagyaraj D.J. (2020). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *J Appl Microbiol* 128 (6): 1583–1594. doi:10.1111/jam.14506
73. Sato S., Ichiyanagi N., Sugiyama K., Aburai N., Fujii K. (2023). Production of polyglutamic acid-like mucilage protein by *Peribacillus simplex* strain 8h. *Folia Microbiologica* 68(1): 101-113. doi: 10.1007/s12223-022-01000-4
74. Schultz M., Burton J.P., Chanyi R.M. (2017). Use of *Bacillus* in Human Intestinal Probiotic Applications. In: *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, Elsevier, pp. 119–123. doi:10.1016/B978-0-12-804024-9.00011-2
75. Shammi T., Ahmed S. (2013). Heavy Metal Tolerance and Antibiotic Resistance of *Bacillus* spp. Isolated from Two Major Rivers in Bangladesh. *Original Article Bangladesh J Microbiol*
76. Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi T.A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* 2 (1): 587. doi:10.1186/2193-1801-2-587
77. Singh N.P., Singh R.K., Meena V.S., Meena R.K. (2015). Can we use Maize ( *Zea mays* ) Rhizobacteria as Plant Growth Promoter ? *Vegetos- An International Journal of Plant Research* 28 (1): 86. doi:10.5958/2229-4473.2015.00012.9
78. Singh P., Sharma R., Mahatma R.S., Chitrakoot G., Vishwavidyalaya G., Shukla A.K., Singh R. (2018). Adv Biotech & Micro Isolation of *Bacillus* spp. from Soil for Antimicrobial

- Production and Antibiotic Resistance Molecular characterization of Geminivirus/es and their management View project Antimicrobial production View project Adv Biotech & Micro Isolation of *Bacillus* spp. from Soil for Antimicrobial Production and Antibiotic Resistance. doi:10.19080/AIBM.2018.08.555741
79. Strafella S., Simpson D.J., Khanghahi M.Y., Angelis M. De, Gänzle M., Minervini F., Crecchio C. (2021). Comparative genomics and in vitro plant growth promotion and biocontrol traits of lactic acid bacteria from the wheat rhizosphere. *Microorganisms* 9 (1): 1–18. doi:10.3390/microorganisms9010078
  80. Sweeney M.T., Lubbers B. V., Schwarz S., Watts J.L. (2018). Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73 (6). doi:10.1093/jac/dky043
  81. Tanapichatsakul C., Pansanit A., Monggoot S., Brooks S., Prachya S., Kittakoop P., Panuwet P., Pripdeevech P. (2020). Antifungal activity of 8-methoxynaphthalen-1-ol isolated from the endophytic fungus *Diatrype palmicola* MFLUCC 17-0313 against the plant pathogenic fungus *Athelia rolfsii* on tomatoes. *PeerJ* 2020 (3). doi:10.7717/peerj.9103
  82. Verma P., Yadav A.N., Khannam K.S., Panjjar N., Kumar S., Saxena A.K., Suman A. (2015). Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India. *Ann Microbiol* 65 (4): 1885–1899. doi:10.1007/s13213-014-1027-4
  83. Wang X., Wang L., Wang J., Jin P., Liu H., Zheng Y. (2014). *Bacillus cereus* AR156-Induced Resistance to *Colletotrichum acutatum* Is Associated with Priming of Defense Responses in Loquat Fruit. *PLoS One* 9 (11): e112494. doi:10.1371/journal.pone.0112494
  84. WHO. (2015). Available at: [https://healthemergencyappeal.who.foundation/#utm\\_source=google&utm\\_medium=adgrants&utm\\_campaign=campaign\\_name&utm\\_term=who](https://healthemergencyappeal.who.foundation/#utm_source=google&utm_medium=adgrants&utm_campaign=campaign_name&utm_term=who) [Accessed 17 July 2023]
  85. Yilmaz M., Soran H., Beyatli Y. (2006). Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiol Res* 161 (2): 127–131. doi:10.1016/j.micres.2005.07.001
  86. Yousuf J., Thajudeen J., Rahiman M., Krishnankutty S., P. Alikunj A., A. Abdulla M.H. (2017). Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. *J Basic Microbiol* 57 (11): 922–932. doi:10.1002/jobm.201700072
  87. Yutin N. (2013). Horizontal Gene Transfer. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Second Edition) (Ur. Maloy S., Hughes K., eds), Academic Press, pp. 530–532
  88. Zhai Z., Cui C., Li X., Yan J., Sun E., Wang C., Guo H., Hao Y. (2023). Prevalence, antimicrobial susceptibility, and antibiotic resistance gene transfer of *Bacillus* strains isolated from pasteurized milk. *J Dairy Sci* 106 (1): 75–83. doi:10.3168/jds.2022-22199
  89. Zhang Bo, Xu L., Ding J., Wang M., Ge R., Zhao H., Zhang Bolin, Fan J. (2022). Natural antimicrobial lipopeptides secreted by *Bacillus* spp. and their application in food preservation, a critical review. *Trends Food Sci Technol* 127: 26–37. doi:10.1016/j.tifs.2022.06.009
  90. Zhang Y., Chen Mengfei, Yu P., Yu S., Wang J., Guo H., Zhang Junhui, Zhou H., Chen Moutong, Zeng H., Wu S., Pang R., Ye Q., Xue L., Zhang S., Li Y., Zhang Jumei, Wu Q., Ding Y. (2020). Prevalence, Virulence Feature, Antibiotic Resistance and MLST Typing of *Bacillus cereus* Isolated From Retail Aquatic Products in China. *Front Microbiol* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.01513

## Životopis

Lana Petković rođena je 09. kolovoza 1998. godine u Zagrebu. Osnovnu školu je pohađala u Osnovnoj školi „Bogumil Toni“ u Samoboru od 2006. do 2013. godine nakon čega upisuje Opću gimnaziju „Antun Gustav Matoš“, također u Samoboru. Tijekom osnovnog i srednjoškolskog obrazovanja stekla je stupanjeve A1 razine španjolskog jezika, razinu A2 njemačkog jezika, te razinu B2 engleskog jezika. Po završetku gimnazije 2017. godine, upisuje preddiplomski sveučilišni studij Agroekologija na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kojeg završava 2021. godine. Iste godine upisuje diplomski sveučilišni studij Agroekologije na istom sveučilištu kojeg završava 2023. godine. Posjeduje vještine rada na računalu i korištenje programskih alata, te vozačku dozvolu B kategorije. Od 2017. do 2023. radila je studentske poslove u Tommy d.o.o. , gdje je stekla znanja i vještine za rad u trgovini i s ljudima, te u struci, u Agrocentru „Nada“ d.o.o. gdje je stekla potrebna znanja i vještine vezana uz struku, posebice fitomedicinu i stočarstvo. Tijekom studiranja također je volontirala u plesnom klubu te držala instrukcije iz matematike i fizike na osnovnoj i srednjoškolskoj razini. Godine 2022.-2023. odradila je praksu u Laboratoriju za mikrobiologiju tla, Zavoda za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.