

# Potencijal vrsta roda *Pseudomonas* izoliranih iz spilje u inhibiciji patogene mikrobiote

---

**Sobota, Marta**

**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:204:034083>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**POTENCIJAL VRSTA RODA PSEUDOMONAS  
IZOLIRANIH IZ SPILJE U INHIBICIJI PATOGENE  
MIKROBIOTE**

**DIPLOMSKI RAD**

Marta Sobota

Zagreb, rujan, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Agroekologija - Agroekologija

**POTENCIJAL VRSTA RODA PSEUDOMONAS  
IZOLIRANIH IZ SPILJE U INHIBICIJI PATOGENE  
MIKROBIOTE**

DIPLOMSKI RAD

Marta Sobota

Mentor:

Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, rujan, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA  
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Marta Sobota**, JMBAG 0178113991, rođena 15.11.1998. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**POTENCIJAL VRSTA RODA PSEUDOMONAS IZOLIRANIH IZ SPILJE U  
INHIBICIJI PATOGENE MIKROBIOTE**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica 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 s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

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

\_\_\_\_\_  
*Potpis studentice*

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE  
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice **Marte Sobota**, JMBAG 0178113991, naslova

**POTENCIJAL VRSTA RODA PSEUDOMONAS IZOLIRANIH IZ SPILJE U  
INHIBICIJI PATOGENE MIKROBIOTE**

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

Prvenstveno zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuka na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za stjecanje iskustva, te na ukazanom vremenu, stručnom vodstvu i svim korisnim savjetima bez kojih izrada ovoga rada ne bi bila moguća.

Posebno hvala i djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju, Sandri Matijević, bacc. sanit. ing., te Lauri Dubravac, mag. ing. agr., na vodstvu u laboratoriju, predivnoj radnoj atmosferi i pomoći prilikom laboratorijskih analiza.

Također, veliko hvala dr. sc. Irini Tanuwidjaja na svojoj ukazanoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Za kraj, najveća hvala mojoj obitelji i prijateljima, posebno mojoj majci, dečku i prijateljici Valentini, koji su mi pružili bezuvjetnu podršku tijekom cjelokupnog studiranja.

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja .....	2
2. Pregled literature.....	3
2.1. Spilje kao stanište za razvoj mikrobnih zajednica .....	3
2.2. Opće karakteristike <i>Pseudomonas</i> spp.....	4
2.2.1. Antibiotička rezistencija <i>Pseudomonas</i> spp.....	4
2.2.2. Antimikrobno djelovanje <i>Pseudomonas</i> spp.....	6
2.3. Opće karakteristike humanih patogena.....	6
2.3.1. Opće karakteristike <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.3.2. Opće karakteristike <i>Salmonella enterica</i> .....	7
2.3.3. Opće karakteristike <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
2.3.4. Opće karakteristike <i>Bacillus cereus</i> .....	10
2.3.5. Opće karakteristike <i>Listeria innocua</i> .....	11
2.4. Opće karakteristike biljnih patogena .....	12
2.4.1. Opće karakteristike <i>Pseudomonas syringae</i> .....	12
2.4.2. Opće karakteristike <i>Erwinia amylovora</i> .....	13
2.4.3. Opće karakteristike <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	13
2.4.4. Opće karakteristike <i>Botrytis cinerea</i> .....	14
2.5. Metode genotipizacije .....	16
2.5.1. Rep-PCR .....	16
2.6. Metode određivanja osjetljivosti na antibiotike .....	17
2.6.1. Metoda disk difuzije u agaru .....	17
2.7. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti .....	18
3. Materijali i metode .....	20
3.1. Kemikalije.....	20
3.2. Laboratorijski uređaji .....	20
3.3. Otopine i hranjive podloge .....	20
3.4. Molekularni reagensi, kompleti, markeri i početnice.....	22

3.5.	Mikrobne kulture .....	22
3.6.	Antibiotici.....	23
3.7.	Uzorkovanje .....	23
3.8.	Izolacija genomske DNA <i>Pseudomonas</i> spp. ....	24
3.9.	Genotipizacija izolata <i>Pseudomonas</i> spp. ....	25
3.10.	Ispitivanje osjetljivosti sojeva <i>Pseudomonas</i> spp. na antibiotike.....	26
3.11.	Određivanje antibakterijskog djelovanja sojeva <i>Pseudomonas</i> spp.....	27
3.12.	Određivanje antifungalnog djelovanja sojeva <i>Pseudomonas</i> spp. ....	28
4.	Rezultati.....	30
4.1.	Genotipizacija izolata <i>Pseudomonas</i> spp. ....	30
4.2.	Osjetljivost sojeva <i>Pseudomonas</i> spp. na antibiotike.....	31
4.3.	Antibakterijsko djelovanje sojeva <i>Pseudomonas</i> spp.....	36
4.4.	Antifungalno djelovanje sojeva <i>Pseudomonas</i> spp.....	42
5.	Rasprava .....	44
6.	Zaključci.....	46
7.	Popis literature .....	47
	Životopis .....	55



# Sažetak

Diplomskog rada studentice **Marte Sobota**, naslova

## POTENCIJAL VRSTA RODA *PSEUDOMONAS* IZOLIRANIH IZ SPILJE U INHIBICIJI PATOGENE MIKROBIOTE

Cilj ovog rada je bio ispitati unutarvrstu raznolikost, osjetljivost na antibiotike te antimikrobno djelovanje izolata *Pseudomonas* spp. (n=40) izoliranih iz krške spilje. Svi izolati genotipizirani su pomoću rep-PCR metode. Najveća unutarvrstna raznolikost je uočena kod vrste *P. chlororaphis*, gdje sličnost varira od 50,5 do 100,0 %. Rezistencija na antibiotike utvrđena je disk difuzijskom metodom na šest klasa antibiotika te je dokazana kod 30 ispitanih sojeva. Najveći broj sojeva (75 %) je rezistentan na monobaktame, a jedan izolat *P. chlororaphis* SL2-18 rezistentan na tri klase antibiotika te spada u višestruko rezistentne sojeve. Uzimajući u obzir sve stupnjeve djelovanja, od slabe do potpune, sojevi *Pseudomonas* spp. pokazali su značajnije antimikrobno djelovanje prema Gram negativnim bakterijama (89,0 %) u odnosu na Gram pozitivne bakterije (84,0 %). Općenito, sojevi *Pseudomonas* spp. pokazali su se najdjelotvornijima u suzbijanju rasta fitopatogenih bakterija *E. amylovora* i *A. tumefaciens* te najmanje efikasnim u kontroli rasta humanih patogena *S. aureus* i *S. enterica*. Kao najdjelotvorniji pokazao se soj *Pseudomonas* spp. W2-4 koji u potpunosti suzbija rast tri patogena (*L. innocua*, *E. amylovora* i *A. tumefaciens*), te snažno inhibira rast bakterija *P. syringae* i *E. coli*. Antifungalno djelovanje utvrđeno je kod 13 sojeva (32,5 %) od kojih šest (15,0 %) vrlo jako inhibira rast gljive *B. cinerea* s rasponom smanjenja radijalnog rasta od  $84,1 \pm 1,7$  % od  $93,9 \pm 5,2$  %. Najjače antifungalno djelovanje utvrđeno je kod soja *Pseudomonas* spp. S1-8 koji smanjuje radijalni rast *B. cinerea* za  $93,9 \pm 5,2$  %, te kod soja *P. chlororaphis* SL2-11 koji smanjuje radijalni fungalni rast za  $90,2 \pm 0,0$  %.

**Ključne riječi:** krška spilja, *Pseudomonas* spp., rep-PCR, osjetljivost na antibiotike, antimikrobno djelovanje

## Summary

Of the master's thesis – student **Marta Sobota**, entitled

### **THE POTENTIAL OF SPECIES OF THE GENUS PSEUDOMONAS ISOLATED FROM THE CAVE IN INHIBITION OF PATHOGENIC MICROBIOTA**

The aim of this work was to examine the intraspecific diversity, sensitivity to antibiotics and antimicrobial activity of isolates of *Pseudomonas* spp. (n=40) isolated from a karst cave. All isolates were genotyped using the rep-PCR method. The highest intraspecific diversity was observed in the species *P. chlororaphis*, where the similarity varies from 50,5 to 100,0 %. Resistance to antibiotics was determined by the disk diffusion method for six classes of antibiotics and was proven in 30 tested strains. The largest number of strains (75 %) is resistant to monobactams, and one isolate (*P. chlororaphis* SL2-18) was resistant to three classes of antibiotics and belongs to multidrug resistant strains. Taking into account all degrees of activity, from weak to complete, strains of *Pseudomonas* spp. showed more pronounced antimicrobial activity against Gram-negative bacteria (89,0 %) compared to Gram-positive ones (84,0 %). In general, strains of *Pseudomonas* spp. proved to be the most effective in suppressing the growth of phytopathogenic bacteria *E. amylovora* and *A. tumefaciens* and the least effective in controlling the growth of human pathogens *S. aureus* and *S. enterica*. The strain of *Pseudomonas* spp. W2-4 proved to be the most effective, completely suppressed the growth of three pathogens (*L. innocua*, *E. amylovora* and *A. tumefaciens*), and strongly inhibited the growth of the bacteria *P. syringae* and *E. coli*. Antifungal activity was determined in 13 strains (32,5 %) of which six (15,0 %) inhibited the growth of the fungus *B. cinerea* very strongly with a range of radial growth reduction of  $84,1 \pm 1,7$  % from  $93,9 \pm 5,2$  %. The strongest antifungal activity was found in *Pseudomonas* spp. S1-8 strain, which reduced the radial growth of *B. cinerea* by  $93,9 \pm 5,2$  %, and in the *P. chlororaphis* SL2-11 strain, which reduced the radial fungal growth by  $90,2 \pm 0,0$  %.

**Keywords:** cave, *Pseudomonas* spp., rep-PCR, antibiotic susceptibility, antimicrobial activity

# 1. Uvod

Zbog specifičnih obilježja, poput nedostatka svjetlosti te relativno male količine hranjivih tvari, smatralo se da spiljska staništa nisu bogata životom. Međutim, brojna istraživanja su pokazala da spiljska staništa obiluju različitim organizmima, pa tako i različitim mikrobnim zajednicama. *Pseudomonas* je rod Gram negativnih sveprisutnih bakterija koje su sastavni dio mnogih ekosustava, uključujući i spiljski.

Pripadnici roda *Pseudomonas* izvrstan su izvor enzima i širokog spektra bioaktivnih spojeva antimikrobnog djelovanja prema velikom spektru patogenih bakterija i mikroskopskih gljiva, zbog čega se vrlo često koriste u poljoprivredi u biokontroli patogena. Mnoge vrste, primjerice *P. chlororaphis*, pokazale su se vrlo učinkovite u suzbijanju biljnih i humanih patogena. Neki od mehanizama kojima *Pseudomonas* spp. djeluje inhibitorno na patogenu mikrobiotu su produkcija cijanovodične kiseline, siderofora, pirolnitrina te produkcija antibiotika (Mehmood i sur., 2023).

S druge strane, poznato je da su vrste roda *Pseudomonas* uključene u širenje rezistencije na antibiotike u prirodi. Povećanje rezistencije patogena na antibiotike je globalni problem koji se javlja uslijed prekomjerne upotrebe antibiotika u poljoprivredi i medicini. Mnogi patogeni su razvili različite mehanizme kojima odolijevaju djelovanju antibiotika. Horizontalnim prijenosom gena se geni za rezistenciju prenose na nesrodne bakterije koje izvorno nisu bile rezistentne, što može rezultirati širenjem rezistencije u okolišu i pojavom višestruko rezistentnih (engl. *Multi-Drug Resistant*, MDR) mikroorganizama. Višestruko rezistentne bakterije su one koje pokazuju rezistenciju na barem jedan antibiotik iz tri ili više različitih klase (Gill i sur., 2010). Unutar roda *Pseudomonas*, vrsta koja je najviše uključena u pojavu višestruke rezistentnosti na antibiotike je *P. aeruginosa*. Međutim, novija istraživanja pokazala su da se višestruka rezistencija prisutna i kod drugih vrsta unutar roda *Pseudomonas*, primjerice: *P. fluorescens* i *P. putida* (Kittinger i sur., 2016).

Budući da spilje predstavljaju nedovoljno istražen ekosustav s obzirom na mikrobne zajednice te mogu biti potencijalan izvor korisnih mikroorganizama, od velikog je značaja istražiti podzemne ekosustave i istražiti potencijal vrsta roda *Pseudomonas* izoliranih iz spilje, u inhibiciji rasta biljnih i humanih patogena, te procijeniti njihovu ulogu u širenju antibiotske rezistencije u prirodi.

## 1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

Hipoteze ovog istraživanja su:

- 1.) pojedini sojevi *Pseudomonas* spp. pokazat će rezistenciju na više klasa antibiotika, te će kao takvi predstavljati potencijalnu opasnost za širenje antibiotske rezistencije u okolišu.
- 2.) većina sojeva *Pseudomonas* spp. djelovat će inhibitorno na biljne i humane patogene, te će kao takvi predstavljati alternativno rješenje za kontrolu rasta patogenih bakterija i gljiva.

Opći cilj ovog istraživanja je utvrditi unutarvrstu raznolikost *Pseudomonas* spp. izoliranih iz krške spilje u blizini naselja Konjevrate u Šibensko-kinjskoj županiji, te ispitati osjetljivost sojeva na šest klasa antibiotika te njihovo djelovanje prema najznačajnijim biljnim i humanim patogenima.

Specifični ciljevi istraživanja su:

- 1.) Odrediti unutarvrstu raznolikost *Pseudomonas* spp. rep-PCR metodom nakon izolacije DNA.
- 2.) Ustanoviti djelovanje šest klasa antibiotika (penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami, aminoglikozidi i fluorokinoloni) na sojeve *Pseudomonas* spp. disk difuzijskom metodom.
- 3.) Ustanoviti djelovanje *Pseudomonas* spp. na rast biljnih i humanih patogenih bakterija (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), *Staphylococcus aureus* (DSM 20231), *Bacillus cereus* (DSM 6791), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Pseudomonas syringae* (DSM 10604), *Erwinia amylovora* (DSM 50901) i *Agrobacterium tumefaciens* (DSM 30205).
- 4.) Ustanoviti djelovanje *Pseudomonas* spp. prema patogenoj gljivi *Botrytis cinerea* (DSM 877).

## 2. Pregled literature

### 2.1. Spilje kao stanište za razvoj mikrobnih zajednica

Podzemna staništa su jedna od mnogih prirodnih posebnosti Hrvatske. Obilježja podzemnih staništa (u odnosu na nadzemna) su: nedostatak svjetlosti, vrlo visoka i stabilna relativna vlaga zraka, relativno stabilna temperatura zraka, relativno niska i stabilna temperatura vode, te relativno mala količina hranjivih tvari koja u potpunosti dolaze iz nadzemnih staništa (HAOP, 2017).

Podzemna staništa (podzemlje) se prema Nacionalnoj klasifikaciji staništa (NKS) dijele na: kraške spilje i jame, nekraške špilje i jame, intersticijska podzemna staništa i antropogena podzemna staništa (Narodne novine, 2021).

Na Zemlji se nalazi veliki broj spilja. Globalno govoreći, samo je oko 10 % svih spilja otkriveno. Bez obzira na brojne spiljske aktivnosti u svijetu procjenjuje se da je i u vrlo istraženim područjima, kao što su Europa i Sjeverna Amerika, istraženo samo 50 % svih postojećih spilja (Ghosh i sur., 2017).

Zemljino kontinentalno podzemlje sadrži obilnu i aktivnu mikrobnu biomasu. Spiljski mikroorganizmi prevladavaju u sedimentima i vodi. Kontaktne površine između zraka, vode i stijena nudi pogodna staništa za mikrobnu aktivnost, uključujući i one u spiljskom i krškom krajoliku. Kao takva, spiljska i krška staništa služe kao rezervoari različitih mikroorganizama (White i Culver, 2012).

Metabolizam spiljskih mikroorganizama vrlo je raznolik. Mikrobn metabolizam podrazumijeva način na koji neki mikroorganizam dobiva ugljik (zajedno s drugim nutrijentima) i energiju. Prema tome, mikroorganizmi se dijele u 2 osnovne grupe: autotrofi i heterotrofi. Autotrofi pretvaraju anorganski ugljik (npr. CO<sub>2</sub>) u organske spojeve koje koriste za dobivanje energije, dok heterotrofi koriste postojeće organske spojeve u svojoj okolini (White i Culver, 2012.)

Prema ljudskoj upotrebi, spilje se klasificiraju na dva glavna tipa: 1.) spilje otvorene za javnost (obično za rekreaciju), 2.) prirodni spiljski sustavi. Spilje otvorene za javnost pokazuju raznolik sastav mikrobnih zajednica, zbog uvođenja umjetnog osvjetljenja. U prirodnim spiljskim sistemima nema ljudskog utjecaja, te se tamo još uvijek mogu pronaći i proučavati autohtoni mikroorganizmi (Ghosh i sur., 2017).

Obzirom na količinu svjetlosti koja ulazi, prirodni spiljski unutarjni okoliš se generalno može podijeliti na četiri glavne zone: 1.) ulazna zona (gdje se susreću površina i podzemni okoliš), 2.) zona sumraka (gdje svjetlost postepeno slabi do razine kada više nema svjetla; nakon ove zone nema rasta biljaka), 3.) prijelazna zona (gdje nema svjetlosti, ali se još uvijek osjeća utjecaj površinskog okoliša poput temperature i vlage) i 4.) dubinska zona (gdje je kompletni mrak, visoka vlažnost zraka i konstantna temperatura) (Ghosh i sur., 2017).

U radu Lavoie i sur. (2017), istražena je i uspoređena raznolikost bakterijskih zajednica u spiljama i sloju tla iznad njih. Rezultati istraživanja pokazuju da aktinobakterije dominiraju u svim spiljskim uzorcima, sa udjelom od 39 % u uzorcima iz spilja i 21 % u tlima s površine. Proteobakterije čine do 30 % uzorka iz spilja i 36 % iz površinskog tla. Uzorci tla s površine imaju više operativnih taksonomskih jedinica

nego spiljski uzorci. Iako mikroorganizmi površinskog tla imigriraju u spilje ispod njih, okoliš selektira mikroorganizme koji mogu živjeti u spiljskim staništima, što rezultira vrlo različitim spiljskim zajednicama (Lavoie i sur., 2017).

## 2.2. Opće karakteristike *Pseudomonas* spp.

*Pseudomonas* spp. je grupa štapićastih, Gram negativnih, pokretnih, aerobnih i kemoheterotrofnih bakterija. Veoma je raznovrsna skupina bakterija, koja je u velikom broju i široko rasprostranjena u prirodi (ubikvisti). Zbog jednostavnih zahtjeva za hranjivim tvarima vrlo su dobro prilagođeni različitim ekološkim nišama (Mercado-Blanco i Bakker, 2007).

Neke bakterije ovog roda su poznate kao ljudski, životinjski i biljni patogeni, te uzročnici kvarenja namirnica, dok su druge korisne biljkama. Bakterije koje su korisne biljkama na način da promoviraju rast biljaka ili suzbijaju biljne bolesti, nazivaju se PGPR (engl. *Plant growth promoting rhizobacteria*) bakterije. Neke od *Pseudomonas* vrsta koje su prepoznate kao PGPR bakterije su *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* i neki sojevi *P. aeruginosa* (Mercado-Blanco i Bakker, 2007).

*Pseudomonas* spp. imaju direktne i indirektne mehanizme kojima promoviraju rast biljaka. Direktni mehanizmi uključuju: fiksaciju atmosferskog dušika (N<sub>2</sub>), solubilizaciju fosfora, produkcija HCN-ova (hlapljivih tvari koje imaju antibakterijsko i antifungalno djelovanje), produkcija sidreofora, fitohormona i antibiotika. Indirektni mehanizmi uključuju: antifungalnu aktivnost, induciranu sistemičnu rezistenciju, rizoremedijaciju i kontrolu stresa i upravljanje biljnim bolestima (Mehmood i sur., 2023).

### 2.2.1. Antibiotička rezistencija *Pseudomonas* spp.

Antibiotici ubijaju mikrobnost stanice ili zaustavljaju mikrobnost rast. Pet glavnih mehanizama djelovanja antibiotika su djelovanje na: bakterijsku staničnu stijenku, staničnu membranu, sintezu proteina, sintezu DNA i RNA te na metabolizam folne kiseline (vitamin B<sub>9</sub>) (Wright, 2010).

Rezistencija na antibiotike je prirodna pojava. Poznato je da su mehanizmi otpornosti, koji su se pojavili u kliničkim patogenima, paralelni s onima karakterističnim za bakterije koje proizvode antibiotike. Otpornost na antibiotike javlja se kroz četiri opća mehanizma: izmjena cilja djelovanja, izbacivanje efluks pumpom, imunitet i zaobilazanje djelovanja, te uništenje antibiotika katalizirano enzimima (Wright, 2010).

Horizontalni prijenos gena za rezistenciju na antibiotike u izvorno neotporne bakterijske vrste i rodove, kao i održavanje otpornosti vertikalno kroz populacije, su rezultat suvremene upotrebe antibiotika u klinikama i na farmama (evolucijski odgovor na snažan selektivni pritisak koji je rezultat izlaganja antibioticima). Postoje dvije vrste rezistencije na antibiotike: primarna (intrinzična) i sekundarna (stečena). Intrinzična rezistencija je rezultat nepostojanja ciljnog mjesta za antibiotik u bakteriji, a stečena rezistencija je rezultat mutacije bakterijskog genoma ili horizontalnog prijenosa gena (Hancock, 1998; Josić, 2020; Wright, 2010).

Među *Pseudomonas* spp. intrizičnu rezistenciju daju mehanizmi koji se istovremeno javljaju, kao što su: niska permeabilnost vanjske membrane, sinteza beta-laktamaza i efluks sustav (Luczkiewicz i sur., 2015).

Vrlo važnu ulogu u horizontalnom prijenosu gena za antibiotsku rezistenciju imaju plazmidi i transpozoni. Plazmidi su male, kružne, dvolančane DNA molekule, pronađene u mnogim tipovima bakterija. Njihova veličina i funkcija variraju. Plazmidi egzistiraju neovisno o kromosomalnoj DNA, te se repliciraju autonomno. Plazmidi ne služe za osnovne stanične funkcije, kao što su rast stanice i razmnožavanje, nego nose genetičke elemente koji pomažu bakteriji da preživi nepovoljne okolišne uvjete kao što je prisustvo letalnih antibiotika. Plazmidi kodiraju enzime koji su zaslužni za rezistenciju na različite antimikrobne tvari poput antibiotika, dezinficijensa, teških metala, pa čak i za rezistenciju na UV radijaciju (Subedi i sur., 2018).

Transpozoni su genetički elementi koji su također važni u horizontalnom prijenosu gena za rezistenciju, te su često prisutni u kliničkim sojevima *Pseudomonas aeruginosa*. Transpozoni se još nazivaju i skakački geni (eng. *jumping genes*), jer se mogu podvrgnuti transpoziciji kako bi se premjestili s jednog na drugo mjesto unutar iste ili različitih DNA molekula (primjerice plazmidi ili kromosomi). Sastoje se od insercijske sekvence i od barem jednog otvorenog okvira za čitanje. Insercijska sekvenca kodira kretanje transpozona, a okvir za čitanje sadrži jedan ili više gena za antibiotsku rezistenciju (Subedi i sur., 2018).

Osim plazmida i transpozona, pri horizontalnom prijenosu gena još su važni i integroni. Integroni su sustavi za hvatanje gena, koji hvataju genske kasete. To uključuje, ali nije ograničeno na gene koji nose rezistenciju na antibiotike, te pomažu njihovoj ekspresiji. Integroni se mogu nalaziti na plazmidu ili na transpozonu (Subedi i sur., 2018).

Unutar roda *Pseudomonas* najproblematičnija vrsta je *P. aeruginosa*, koja je vodeći uzročnik bolničkih infekcija. Bolničke infekcije izazvane *P. aeruginosa* je vrlo teško liječiti zbog intrizične rezistencije vrste i sposobnosti stjecanja dodatnih mehanizama rezistencije na više grupa antimikrobnih sredstava, uključujući beta laktame, aminoglikozide i fluorokinolone. *P. aeruginosa* predstavlja fenomen bakterijske rezistencije jer su kod ove vrste zabilježeni skoro svi poznati mehanizmi rezistencije na antibiotike. Zabrinjavajuća činjenica je da su mehanizmi rezistencije često prisutni istovremeno, čime nastaju višestruko rezistentni (MDR) fenotipovi (Strateva i Yordanov, 2009).

Da bi se bakterija smatrala višestruko rezistentnom (engl. *Multi-drug resistant*, MDR), mora biti rezistentna na barem jedan antibiotik iz tri različite klase (antimikrobne grupe) (Ghogale i Pathak, 2023).

Osim *P. aeruginosa*, rezistencija na antibiotike je zabilježena i kod drugih vrsta roda *Pseudomonas*. Autori Kittinger i sur. (2016) istraživali su prisutnost rezistencije kod *Pseudomonas* spp. u gornjem i donjem toku Dunava. U istraživanju je prikupljeno 520 izolata *Pseudomonas* spp., od čega je 334 (66,0 %) identificirano kao *Pseudomonas putida*, 141 (27,1 %) kao *Pseudomonas fluorescens*, te dva izolata kao *P. aeruginosa*. Najčešću rezistenciju *Pseudomonas* spp. su pokazali na meropenem, piperacilin-tazobaktam i ceftazidim. Također, pronađeno je 16 multirezistentnih izolata. Otkriveni višestruko rezistentni izolati pripadaju vrstama *P. putida* i *P. fluorescens*. Rezultati istraživanja Kittinger i sur. (2016) ukazuju na to da antibiotska rezistencija može biti stečena i perzistirati među *Pseudomonas* vrstama koje nisu u izravnom kontaktu s ljudima, te da ove bakterije pružaju rezervoar gena za rezistenciju na antibiotike koji se mogu prenijeti srodnim ljudskim patogenima putem horizontalnog prijenosa gena.

## 2.2.2. Antimikrobno djelovanje *Pseudomonas* spp.

Potencijal za biokontrolu kod *Pseudomonas* spp. vrlo je dobro dokumentiran. Ove bakterije su u kompeticiji sa ostalim mikroorganizmima tla, posebno sa fitopatogenima, te je poznato da proizvode čitav niz antagonističkih sekundarnih metabolita. Produciranjem bioaktivnih metabolita, *Pseudomonas* spp. imaju vrlo važnu ulogu u stimulaciji biljnog rasta, te kontroli zdravlja tla i biljke (Shahid i sur., 2021).

Antimikrobna aktivnost *Pseudomonas* spp. uglavnom se pripisuje proizvodnji fenazina. Fenazini su velika skupina spojeva građeni od heterocikličkih prstenova dušika, koji su učinkoviti protiv različitih gljivičnih i bakterijskih fitopatogena (Shahid i sur., 2021).

Još jedan biofungicid širokog spektra često korišten u poljoprivrednoj praksi, kojeg proizvode *Pseudomonas* spp., je pirolnitrin. Ovaj metabolit na bazi pirola prvi je put uočen kod *P. aureofaciens* i *P. fluorescens*, te je utvrđeno da djeluje protiv čitavog niza patogenih gljiva, uključujući *Deuteromycota*, *Ascomycota* i *Basidiomycota*. Također, proizvodnja pirolnitrina je zabilježena i kod *P. aurantiaca* i *P. chlororaphis*, no o tome je dostupno vrlo malo literature (Shahid i sur., 2021).

Poznato je da *Pseudomonas* spp. sintetiziraju siderofore, željezne helate male molekulske mase, kako bi namirili svoje potrebe za željezom. Mikrobnim siderofori sekvstriraju dostupno željezo u rizosferi, čineći ga nedostupnim za biljne patogene, čime se suspreže njihov rast (Shahid i sur., 2021).

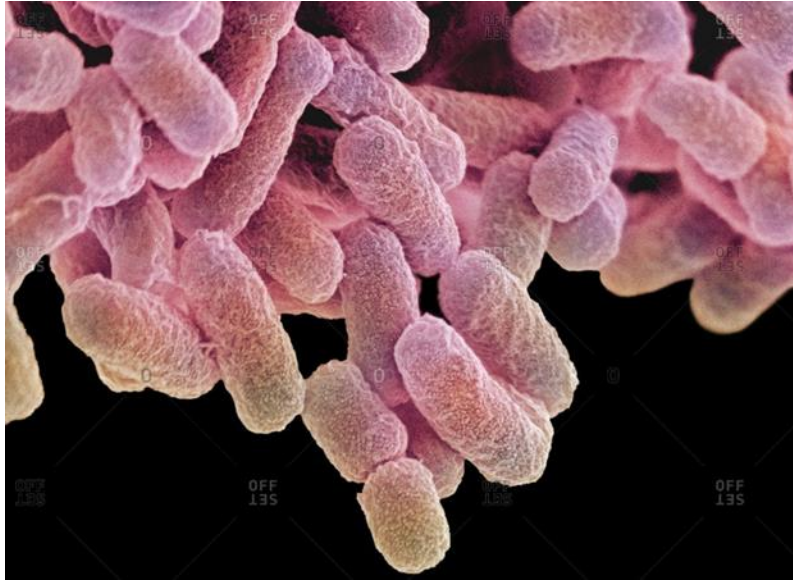
U istraživanju autora Vollenweider i sur. (2023), istražen je inhibitorni utjecaj siderofora pioverdina, produciranih od strane *Pseudomonas* spp. iz okoliša, na ljudske oportunističke patogene (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*). Svi analizirani pioverdini pokazuju visoku učinkovitost u suzbijanju *A. baumannii* i *S. aureus*, dok samo jedan suzbija *K. pneumoniae*.

## 2.3. Opće karakteristike humanih patogena

### 2.3.1. Opće karakteristike *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (dalje u tekstu *E. coli*) pripada porodici *Enterobacteriaceae*. *E. coli* je Gram negativna, štapičasta, fakultativno anaerobna bakterija koje ne stvara spore (Slika 2.3.1.1). Optimalna temperatura rasta pri kojoj stanice zadržavaju pokretljivost je između 25 i 30 °C, a optimalna pH vrijednost je između 6 i 7,5. Međutim, neki sojevi *E. coli* mogu rasti i pri niskom pH (Adler i Templeton, 1967; Makvana i Krilov, 2015; Van Elsas i sur., 2011).





Slika 2.3.1.1. Izgled stanica *E. coli* pod elektronskim mikroskopom.

Izvor: <https://www.offset.com/photos/magnification-of-e-coli-escherichia-coli-bacteria-under-a-color-58000>

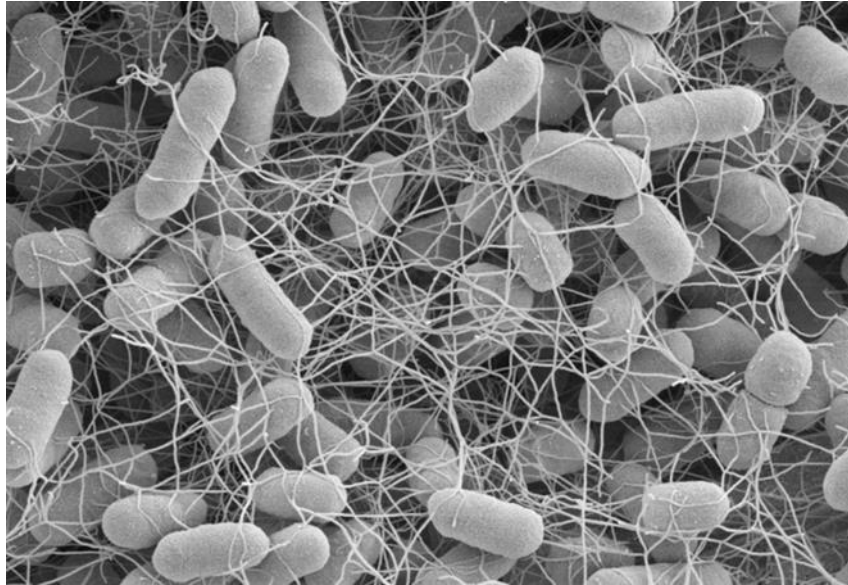
*E. coli* bakterije kao komenzali žive u gastrointestinalnom traktu ljudi i životinja, no određeni sojevi mogu biti patogeni. Prema tipu prisutnog faktora virulencije i kliničkih simptoma domaćina, patogeni sojevi *E. coli* se klasificiraju u patogene tipove (patotipove). Patotip je skupina sojeva iste vrste, koja uzrokuje istu bolest (Allocati i sur., 2013).

Od značajnih patotipova izdvajaju se oni koji uzrokuju crijevne infekcije. To su: enterotoksigena *E. coli* (ETEC) koja uzrokuje putničku dijareju, enteropatogena *E. coli* (EPEC) koja uzrokuje dijareju kod djece, enteroinvazivna *E. coli* (EIEC) koja izaziva dizenteriju, enterohemoragična *E. coli* (EHEC) uzrokuje hemoragični kolitis ili hemolitičko-uremički sindrom (HUS), enteroagregativna *E. coli* (EaggEC) koja često izaziva dijareje kod djece u zemljama u razvoju, dok je enteroadherentna *E. coli* (EAEC) uzrok dijareje kod djece te putničke dijareje. Kao najopasniji se izdvajaju EHEC sojevi jer posjeduju jedan ili više toksina nazvanih *Shiga* toksini, koji svojim djelovanjem uzrokuju vrlo tešku infekciju (Makvana i Krilov, 2015; Meštrović, 2015).

### 2.3.2. Opće karakteristike *Salmonella enterica*

*Salmonella enterica* (dalje u tekstu *S. enterica*) je vrsta roda *Salmonella* koji pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Bakterije roda *Salmonella* su Gram negativne, štapićaste, mobilne (peritrihne flagele) i ne formiraju spore (Slika 2.3.2.1). Fakultativni su anaerobi koji mogu rasti u temperaturnom rasponu 5 – 45 °C, s optimumom od 35 – 37 °C. Optimalna pH vrijednost za rast je 6 – 7, s time da mogu rasti i pri nižem pH od 4,1. U nekim proizvodima, primjerice majoneza i salatni dresinzi, zabilježen je rast ove bakterije pri pH 3,5 – 3,8. Što se tiče osjetljivosti na soli, bakterije roda *Salmonella* su osjetljive na povećanje koncentracije soli (0,5 – 5 %). Također, zabilježeno je da bakterije roda *Salmonella* formiraju duge filamentozne lance kada

budu izložene temperaturnim ekstremima (4 – 8 °C ili 45 °C), te kada rastu pri niskim (4,4) ili visokim (9,4) pH vrijednostima (Andino i Hanning 2015; Bhunia, 2018).



Slika 2.3.2.1. Prikaz stanica *S. enterica* pod elektronskim mikroskopom.

Izvor: [https://www.rki.de/EN/Content/infections/Diagnostics/NatRefCentresConsultantLab/CONSULAB/EM-images/EM\\_Tab\\_Salmonellose\\_en.html](https://www.rki.de/EN/Content/infections/Diagnostics/NatRefCentresConsultantLab/CONSULAB/EM-images/EM_Tab_Salmonellose_en.html)

*S. enterica* obuhvaća šest podvrsta (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diazona*, *houtenae* i *indica*) i 2443 serotipa. Ove bakterije se mogu pronaći u intestinalnom traktu ptica, reptila, kornjača, insekata, domaćih životinja i ljudi. Bolesti koje izazivaju bakterije roda *Salmonella* nazivaju se salmoneloze. Ljudi se najčešće zaraze konzumacijom kontaminirane hrane životinjskog podrijetla kao što je meso, mlijeko, perad, riba (tuna) i jaja. Mliječni proizvodi, uključujući sir i sladoled, također su izvor epidemije salmoneloze. Osim životinjskih proizvoda, *Salmonella* je pronađena i u voću, povrću, te orašastim plodovima, kao što su: salata, rajčica, kikiriki, bademi, mango i dinja. Utvrđeno je da izvor zaraze također mogu biti i brašno, tijesto za kolače i začini. Bolest se može prenijeti sa životinje na čovjeka ili sa čovjeka na čovjeka. Bolesti kod ljudi uzrokuju četiri serotipa: *Typhi*, *Paratyphi*, *Typhimurium* i *Enteritidis*. *Salmonella enterica* serotip *Typhi* je najinvazivniji serotip, uzrokuje tifoidnu vrućicu kod ljudi, ali ne inficira druge sisavce. *S. enterica* serotip *Paratyphi* kod ljudi uzrokuje vrućicu nalik tifoidnoj. Netifoidne salmonele (eng. *non-typhoidal Salmonella*, NTS), kao što su *S. enterica* serotip *Typhimurium* i serotip *Enteritidis*, uzrokuju gastroenteritis ili enterokolitis. Serotipovi *Typhimurium* i *Enteritidis* su najčešći serotipovi, te su odgovorni za 60 % svih epidemija povezanih sa salmonelom globalno. Također, NTS serotipovi mogu uzrokovati sistemične infekcije kod imunokompromitiranih domaćina (Andino i Hanning 2015; Bhunia, 2018).

### 2.3.3. Opće karakteristike *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (dalje u tekstu *S. aureus*) pripada rodu *Staphylococcus* koji je klasificiran je u porodicu *Staphylococceae* (Gherardi i sur., 2018).

*S. aureus* je Gram pozitivna bakterija, okruglog oblika stanica koje se grupiraju u grozdove (slika 2.3.3.1). *S. aureus* nije pokretljiv niti formira spore, ali pokazuje brz i obilan rast u aerobnim uvjetima. Također, utvrđeno je da može rasti pri visokim koncentracijama soli (20 % NaCl) i smatra se jednom od najosmotolerantnijih vrsta bakterija (Foster, 2002).



Slika 2.3.3.1. Prikaz stanica *S. aureus* pod elektronskim mikroskopom.

Izvor: <https://lucbournescienceblog.com/87/clyf-a-novel-chimeolysin-with-a-grudge-against-mrsa/>

*S. aureus* se kod ljudi prirodno kao komenzal nalazi na koži i u nazofarinksu. Može uzrokovati širok raspon bolesti kao što su bakteremija i infektivni endokarditis, te osteoartikularne infekcije, infekcije kože i mekog tkiva, pleuropulmonalne infekcije i sl. (Foster, 2002.; Tong i sur., 2015).

*S. aureus* producira velik broj toksina od kojih su najznačajniji enterotoksini (SE toksini). Značajke ovih toksina su te da su termostabilni i termorezistentni, te ostaju perzistentni pri smrzavanju i sušenju. Također, ne razgrađuju se niti pri niskom pH, što znači da ostaju funkcionalni u gastrointestinalnom traktu i nakon probavljanja. Do trovanja najčešće dolazi konzumacijom unaprijed pripremljene hrane kojom se nije pravilno rukovalo (Kadariya i sur, 2014).

Primjerice, u istraživanju autora Lues i Van Tonder (2007), *S. aureus* je pronađen na rukavicama radnika koji su rukovali hranom, a pritom nisu održavali higijenu ruku.

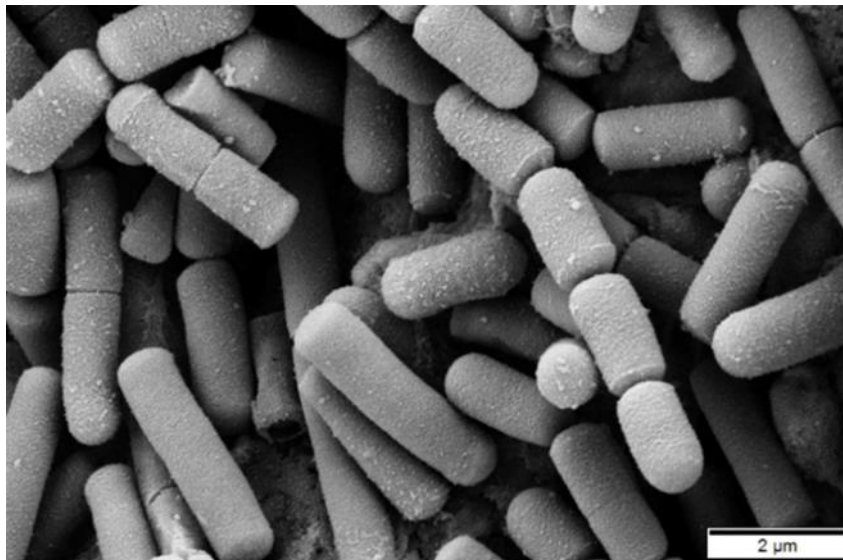
Praksa nošenja rukavica bez pranja ruku kontaminira unutrašnjost i vanjski dio rukavice, čime dolazi do kontaminacije hrane kojom se manipulira. Pranje ruku je jednostavna metoda prevencije mnogih bakterijskih kontaminacija, uključujući i *S. aureus*, ali se često zaboravlja primjenjivati (Kadariya i sur, 2014).



Također, zabrinjavajuća činjenica je pojava rezistentnih sojeva vrste *S. aureus*. Rezistencija je utvrđena na antibiotike širokog spektra djelovanja (fluorokinoloni), meticilin (MRSA sojevi), vankomicin (VRSA sojevi) i dr. (Foster, 2002).

#### 2.3.4. Opće karakteristike *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* (dalje u tekstu *B. cereus*) je Gram pozitivna, štapićasta, sporulirajuća bakterija koja ima sposobnost proizvodnje toksina (Slika 2.3.4.1). *B. cereus* je mezofilan organizam koji raste u rasponu temperature 10 – 50 °C, s optimumom pri 35 – 40 °C. Zbog otpornosti spora na toplinu i kiselost, *B. cereus* se ne može odstraniti iz hrane pomoću pasterizacije ili normalnim sanitarnim postupcima, što predstavlja veliki problem u industriji hrane (Ehling-Schulz i sur., 2010; Kotiranta i sur., 2000; Stenfors Arnesen i sur., 2008).



Slika 2.3.4.1. Prikaz stanica *B. cereus* po elektronskim mikroskopom.

Izvor: <https://step1.medbullets.com/microbiology/104191/bacillus-cereus>

*B. cereus* je široko rasprostranjen u prirodi i može ga se pronaći u različitim tlima, sedimentima, prašini, vodi, biljkama, čak i u gastrointestinalnom traktu pojedinih organizama tla (člankonošci) i zdravih ljudi (Bottone, 2010; Stenfors Arnesen i sur., 2008).

*B. cereus* je pronađen u različitim tipovima namirnica, primjerice riža, mliječni proizvodi, povrće, sušena hrana i začini. Kros-kontaminacijom spore *B. cereus* mogu kontaminirati i meso te mesne proizvode (Stenfors Arnesen i sur., 2008).

Dospijećem u ljudski organizam, *B. cereus* izaziva dva tipa bolesti: emetični i dijarejni sindrom (Stenfors Arnesen i sur., 2008).

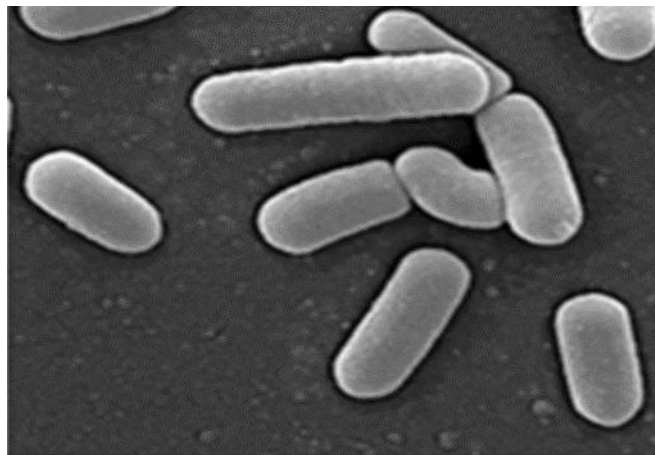
Emetični sindrom je bolest uzrokovana intoksikacijom emetičnog toksina cereulida, koji je prisutan u hrani prije ingestije. Simptomi se pojavljuju nekoliko sati nakon unosa kontaminirane hrane, a javljaju se u vidu mučnine i povraćanja. Bolest

obično traje 6 – 24 h, ali su zabilježeni i mnogo teži slučajevi (Ehling-Schulz i sur., 2010; Jovanovic i sur., 2021; Mahler i sur., 1997; Stenfors Arnesen i sur., 2008).

Dijarejni sindrom je bolest uzrokovana toksikoinfekcijom, odnosno unosom vegetativnih stanica *B. cereus* koje u tankom crijevu produciraju enterotoksine. Simptomi se javljaju nakon 8 – 12 h, a javljaju se kao bolovi u abdomenu, vodenasta dijareja, a povremeno i kao mučnina i povraćanje. Bolest obično traje 12 – 24 h, ali zabilježeni su i slučajevi gdje bolest može imati smrtni ishod (Ehling-Schulz i sur., 2010; Jovanovic i sur., 2021; Lund i sur., 2000; Dierick i sur., 2005; Stenfors Arnesen i sur., 2008).

### 2.3.5. Opće karakteristike *Listeria innocua*

*Listeria innocua* (dalje u tekstu *L. innocua*) pripada rodu *Listeria*. Bakterije roda *Listeria* su male, štapićaste, Gram pozitivne, pokretne, fakultativni anaerobi, te ne stvaraju spore (Slika 2.3.5.1). Također, bakterije ovog roda su psihrotrofne i mogu rasti pri širokom rasponu temperature (-0,1 – 45 °C). Što se tiče odgovarajuće pH vrijednosti za rast ovih bakterija, mogu rasti pri širokom rasponu pH koji se kreće od 4,4 do 9,6, te mogu tolerirati volumni udio soli (NaCl) do 10 % (Milillo i sur., 2012).



Slika 2.3.5.1. Stanice *L. innocua* pod elektronskim mikroskopom

Izvor: Rocha i sur., 2019.

*L. innocua* se koristi kao organizam surogat pri istraživanjima patogena *L. monocytogenes*, jer se ne smatra patogenim organizmom. Međutim, zabilježen je slučajevi bakteremije izazvan bakterijom *L. innocua*, koji su rezultirali smrtnim ishodom (Fernandes i sur., 2013; Milillo i sur., 2012; Orsi i Wiedmann, 2016; Perrin i sur., 2003).

*L. monocytogenes* predstavlja veliku opasnost za ljudsko zdravlje zbog svoje patogenosti i perzistencije u prirodnoj okolini (tlo, more i kopnene vode) i lancu prehrambene industrije (stvaranje biofilmova). *L. monocytogenes* je izolirana iz različitih namirnica, primjerice: nepasterizirano mlijeko, mliječni proizvodi, gotova hrana, meso i riba. Osim u namirnicama, pronađena je i u okruženju pogona koji se

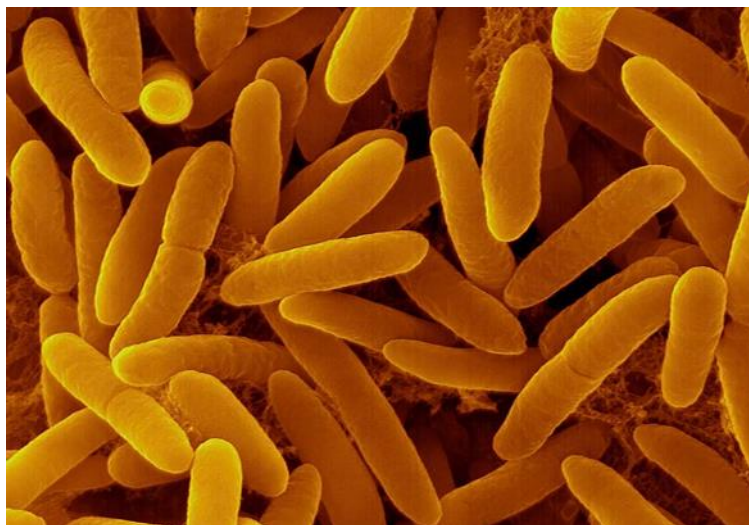
bave preradom hrane (zidovi, podovi, police i oprema) (Milillo i sur., 2012; Swaminathan i Gerner-Smidt, 2007).

Također, *L. monocytogenes* je treći vodeći uzrok smrti uslijed bolesti koje se prenose hranom u SAD-u. Bolesti izazvane bakterijom *L. monocytogenes* se nazivaju listerioze. Najopasnije bolesti koje mogu imati smrtni ishod su: neonatalna (maternofetalna) listerioza, infekcija krvožilnog sustava (sepsa) i meningoencefalitis. Prosječna stopa smrtnosti od ovih bolesti kreće se u rasponu od 20 do 30 % unatoč odgovarajućem liječenju. Također, zabrinjavajuća je činjenica da je zabilježena pojava rezistencije *L. monocytogenes* na neke klase antibiotika, čime je dodatno otežano liječenje bolesti uzrokovane ovim patogenom. Osim smrtonosnih, zabilježeni su i blaži oblici bolesti, a to su febrilni gastroenteritis i kožna listerioza (Milillo i sur., 2012; Orsi i Wiedmann, 2016; Swaminathan i Gerner-Smidt, 2007).

## 2.4. Opće karakteristike biljnih patogena

### 2.4.1. Opće karakteristike *Pseudomonas syringae*

*Pseudomonas syringae* (dalje u tekstu *P. syringae*) pripada rodu *Pseudomonas*. Ove bakterije su Gram negativni štapići, obligatni aerobi i imaju polarne flagele (Slika 2.4.1.1). *P. syringae* jedan je od najučestalijih biljnih patogena, te je jedan od najbolje proučenih biljnih patogena (Xin i sur., 2018; Hirano i Upper, 1990).



Slika 2.4.1.1. Stanice *P. syringae* pod elektronskim mikroskopom

Izvor: <https://fineartamerica.com/featured/pseudomonas-syringae-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html>

*P. syringae* ima dvije međusobno povezane faze rasta: epifitna i endofitna. U epifitnoj fazi bakterije žive na površini biljnih tkiva, obično na nadzemnim dijelovima (stabljika, lišće, cvjetovi i plodovi), dok u endofitnoj fazi bakterije ulaze u biljna tkiva i koloniziraju međustanični apoplastni prostor. Bolest se pojavljuje kada *P. syringae* uđe u biljku i tamo se krene razmnožavati tijekom endofitne faze (Xin i sur., 2018).

### 2.4.2. Opće karakteristike *Erwinia amylovora*

*Erwinia amylovora* (dalje u tekstu *E. amylovora*) je biljni patogen iz porodice *Enterobacteriaceae*. *E. amylovora* je štapićasta, Gram negativna, fakultativno anaerobna, pokretljiva bakterija (Slika 2.4.2.1). Raste pri temperaturi od 5 do 30 °C s optimumom pri 27 °C (Piqué i sur., 2015; Ivanović i sur., 2022).



Slika 2.4.2.1. Izgled stanica *E. amylovora* pod elektronskim mikroskopom

Izvor: <https://fineartamerica.com/featured/erwinia-bacteria-tem-dr-kari-lounatmaa.html>

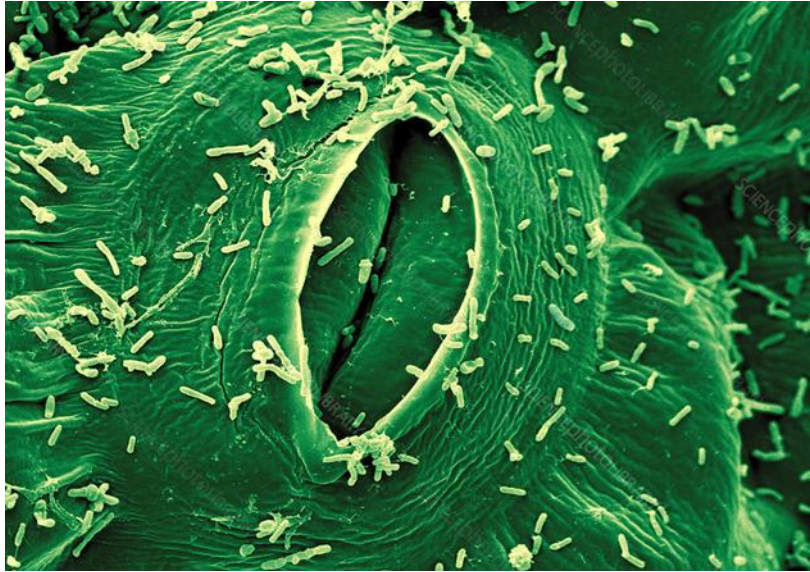
*E. amylovora* izaziva biljnu bolest koja se naziva plamenjača, jer oboljeli dijelovi biljke izgledaju kao da su zahvaćeni plamenom (Ivanović i sur., 2022; Piqué i sur., 2015).

*E. amylovora* ima velik raspon domaćina, te ugrožava globalnu komercijalnu proizvodnju važnih voćnih kultura kao što su kruške i jabuke. *E. amylovora* je uvrštena na popis karantenskih organizama u Europskoj uniji, te je uključena u top 10 svjetskih patogenih bakterija što je objavljeno u članku časopisa *Molecular Plant Pathology* (Donat i sur., 2005; Halupecki i sur., 2006; Ivanović i sur., 2022; Piqué i sur., 2015).

### 2.4.3. Opće karakteristike *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* je bakterija koja je široko rasprostranjena u tlima, te je tipska vrsta roda *Agrobacterium* (Bergey, 1994; Escobar i Dandekar, 2003). Bakterije roda *Agrobacterium* su aerobni, Gram negativni, mobilni štapići, koji ne produciraju spore (Slika 2.4.3.1). Optimalna temperatura za rast i razvoj ovih bakterija je 25 – 28 °C. Neki sojevi mogu vršiti anaerobnu respiraciju u prisutnosti nitrata, a većina sojeva može rasti u uvjetima niske koncentracije kisika u tkivima biljke (Bergey, 1994; Bourras i sur., 2015; Păcurar i sur., 2011).





Slika 2.4.3.1. Stanice *A. tumefaciens* u i oko stome lista duhana.

Izvor: <https://www.sciencephoto.com/media/79553/view>

*A. tumefaciens* je jedan od najznačajnijih biljnih patogena, a izaziva bolest tumor vrata korijena na širokom broju domaćina. Bolest uglavnom nije smrtonosna, osim ako se ne pojavi kod mladih biljaka (Escobar i Dandekar, 2003; Păcurar i sur., 2011).

Biljke zaražene ovom bolešću obično imaju manji rast, što je rezultat nedostatka vode i hranjivih tvari. Razlozi nedostatka vode i hraniva su sljedeći: 1.) oštećenje ili suženje žila na mjestu nastanka tumora, 2.) alokacija vode i hraniva u stanice tumora (Escobar i Dandekar, 2003; Kočmar, 2021).

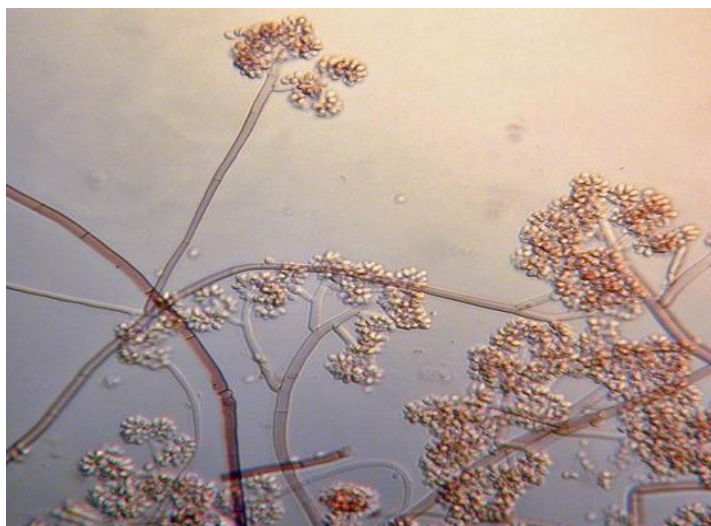
Tumorogena DNA (T-DNA), koja se nalazi na tumor-inducirajućem (Ti) plazmidu, odgovorna je za stvaranje tumora. Kada *A. tumefaciens* inficira biljku, integrira svoju T-DNA u jezgru biljne stanice (transformacija). T-DNA nosi dva seta gena (primarni i sekundarni onkogeni geni) koji kodiraju enzime u biljnoj odgovorne za sintezu fitohormona auksina i citokonina. Modificiranom aktivnošću ovih hormona u biljnoj stanici dolazi do stvaranja tumora (tumorogeneza) (Păcurar i sur., 2011).

#### 2.4.4. Opće karakteristike *Botrytis cinerea*

*Botrytis cinerea* (dalje u tekstu *B. cinerea*) je filamentna mikroskopska gljiva (slika 2.4.4.1.) koja pripada porodici *Sclerotiniaceae* (Bi i sur., 2022; Espino i sur., 2010). Jedan je od ekonomski najznačajnijih biljnih patogena, prenosi se zrakom, te je nekrotrof (Williamson i sur., 2007). Nekrotrofski način života podrazumijeva ubijanje stanica domaćina u području infekcije, a zatim usvajanje nutrijenata iz mrtvog tkiva domaćina (Espino i sur., 2010).

*B. cinerea* je patogen preko 200 različitih biljnih vrsta, uključujući i neke od najznačajnijih poljoprivrednih kultura, primjerice: vinova loza i rajčica (Espino i sur., 2010; Williamson i sur., 2007).





Slika 2.4.4.1. *B. cinerea* pod mikroskopom.

Izvor: <https://fungi.myspecies.info/file-colorboxed/433>

Do pojave bolesti uzrokovane *B. cinerea* može doći prije žetve (u polju, plastenicima i staklenicima), te nakon žetve što obično započne latentnom infekcijom na mjestu uzgoja koja se kasnije razvija tijekom žetve, transporta i skladištenja (Espino i sur., 2010).

Bolest ima niz simptoma, kao što su siva trulež, meka trulež, lezije i dr. Infekciju obično započinju konidije koje se prihvaćaju i kličaju na površini biljnih tkiva. (Williamson i sur., 2007).

Nakon inicijalnog kontakta sa biljkom domaćinom, opisane su dvije faze bolesti: rana faza koju karakterizira stvaranje lokaliziranih žarišta infekcije, te kasna faza za koju karakterizira produkcija obilne gljivične biomase i širenje lezija (Bi i sur., 2022).

Tokom infekcije, utvrđeno je da *B. cinerea* proizvodi niz proteina koji razgrađuju stanične stijenke stanica domaćina, zatim toksine i druge spojeve male molekulske mase (primjerice, oksalna kiselina). Također je ustanovljeno da *B. cinerea* ima mehanizme koji potiču biljku domaćina da izazove programiranu smrt vlastitih stanica (Williamson i sur., 2007).

*B. cinerea* je teško suzbiti jer ima različite načine napada, raznolike domaćine kao izvor inokuluma, te može preživjeti u žetvenim ostacima kao micelij (i/ili konidija) ili dulje vrijeme u obliku sklerocija. Iz tih razloga malo je vjerojatno da će uporaba bilo koje pojedinačne kontrolne mjere biti uspješna. Detaljnije razumijevanje interakcije biljke domaćina i patogena, kao i mikrookruženja u kojem patogen djeluje, te njegovih mikrobnih konkurenata je neophodno za razvijanje novih strategija suzbijanja bolesti izazvane gljivom *B. cinerea*. Trenutno se bolest suzbija kemijski, uporabom različitih fungicida, ili biološkom kontrolom gljivičnim (primjerice, *Trichoderma harzianum*) i bakterijskim (primjerice, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas syringae*) formulacijama (Williamson i sur., 2007).

## 2.5. Metode genotipizacije

### 2.5.1. Rep-PCR

Rep-PCR metoda se temelji na PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) metodi. PCR tehnika se sastoji od tri glavna koraka: denaturacija, vezanje početnica (primera) i produljenje lanaca (Hiett i Seal, 2009; Joshi i Deshpande, 2011). U koraku denaturacije, pri visokoj temperaturi (90 – 97 °C) dvolančana molekula DNA se razdvaja na dvije jednolančane DNA. Nakon denaturacije slijedi vezanje početnica. Ovaj korak se odvija na nižoj temperaturi od denaturacije (50 – 60 °C). U ovom koraku početnice se vežu za komplementarni lanac DNA (predložak). Nakon prijanjanja početnica na komplementarni lanac DNA, započinje produljenje lanaca. *Taq* polimeraza dodaje dostupne nukleotide na krajeve vezanih početnica. Ovaj korak se odvija pri 72 °C, u trajanju od dvije do pet minuta. Nakon 25 – 30 ciklusa, stvori se dovoljan broj kopija DNA za daljnje analize. Krajnji rezultat je eksponencijalno povećanje broja DNA fragmenata (sekvence između početnica), a računa se kao  $2^n$  ( $n$  = broj ciklusa). Nakon zadnjeg ciklusa, uzorci se inkubiraju pri 72 °C, 5 min, kako bi se popunili stršeći krajevi nosintetiziranih PCR produkata. Nakon provođenja PCR reakcije, uzorci se analiziraju i vizualiziraju agaroznom gel elektroforezom (Joshi i Deshpande, 2009).

Mikrobni genomi sadrže različite ponavljajuće DNA sekvence, koje čine do 5% genoma. Te ponavljajuće sekvence obično se sastoje od dupliciranih gena, kao što su oni koji kodiraju rRNA i tRNA, elementi insercijske sekvence, transpozoni, kratka polinukleotidna ponavljanja (3 – 7 mera), mozaički ponavljajući elementi i druge ponavljajuće ili palindromske sekvence (Ishii i Sadowsky, 2009). Korištenje ponavljajućih elemenata za analizu bakterijskih genoma pokazalo se moćnim alatom za studije mikrobne ekologije, mikrobiologije okoliša, molekularne dijagnostike, medicinske mikrobiologije i epidemioloških analiza (Ishii i Sadowsky, 2009).

Dok su neki ponavljajući elementi (npr. HRS1 i RLEP) specifični samo određenu skupinu bakterija, za druge, poput ponavljajućih ekstragenetskih palindromskih (REP) sekvenci DNA, utvrđeno je da su široko rasprostranjeni među mnogim članovima filogenetski različitih bakterija. Budući da svaki mikrobni soj ili izolat ima ponavljajuće sekvence smještene u različitim regijama njihovog genoma, PCR tehnika, koja se izvodi korištenjem sekvenci ovih ponavljajućih elemenata kao početnica i ukupne genomske DNA kao predložka, stvara višestruke PCR produkte koji se razlikuju po veličini, odnosno izravno proporcionalnoj genomskoj udaljenosti između veznih mjesta susjednih ponavljajućih elemenata (Ishii i Sadowsky, 2009).

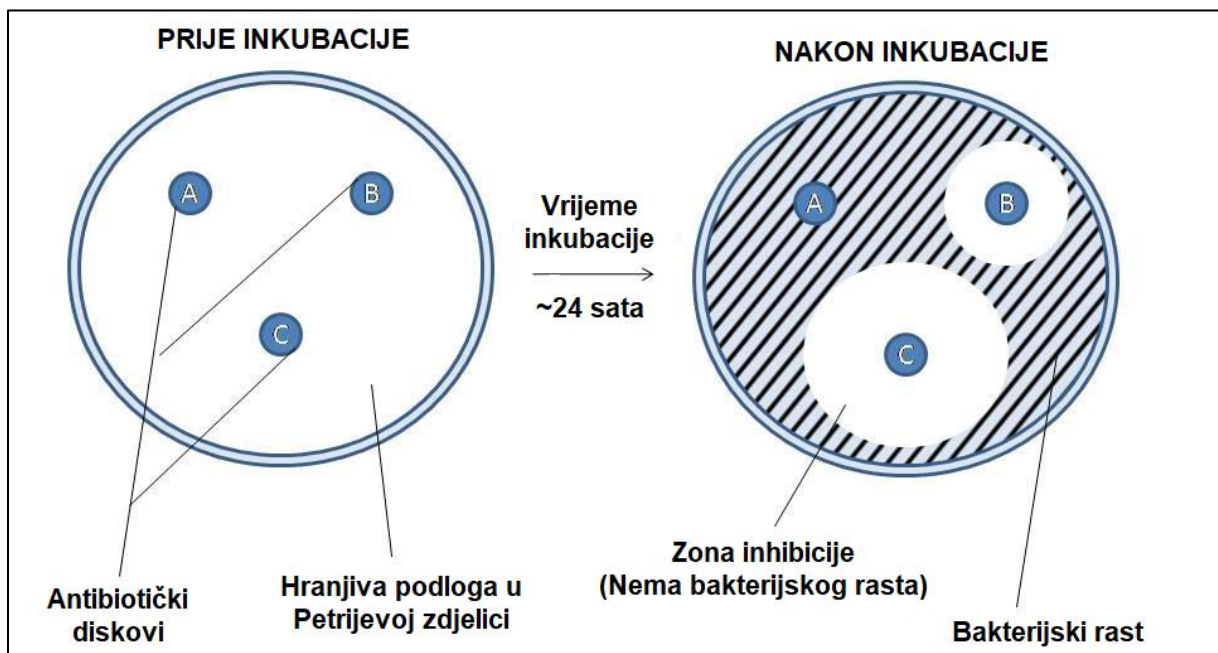
## 2.6. Metode određivanja osjetljivosti na antibiotike

### 2.6.1. Metoda disk difuzije u agaru

Osjetljivosti bakterija na antibiotike često se istražuje metodom disk difuzije u agaru. Metoda se provodi na način da se prvo pripremi biomasa analiziranih bakterijskih kultura izradom McFarland standarda. Nakon pripreme biomase, bakterijske kulture se inokuliraju na Mueller-Hinton (MH) agar, apliciraju se antibiotički diskovi, a zatim se ploče stave na inkubaciju na 37 °C/24 h (Slika 2.6.1.1.) (CLSI, 2020).

Prema Bauer i sur. (1959), određivanje stupnja osjetljivosti bakterijskih kultura temelji se na veličini zone inhibicije bakterijskog rasta oko diska natopljenog antibiotikom određene koncentracije.

Tijekom inkubacije, antimikrobna tvar iz antibiotičkog diska difundira u hranjivu podlogu. Ako je bakterija osjetljiva na djelovanje antibiotika, pojavljuje se zona gdje izostaje bakterijski rast (zona inhibicije). Promjer nastale zone oko antibiotičkog diska mjeri se i izražava u milimetrima (mm). Ovisno o veličini promjera zone inhibicije, bakterije mogu biti klasificirane kao osjetljive (O), umjereno osjetljive (U) i rezistentne (R), a rezultati se interpretiraju prema kriterijima koje određuje CLSI (engl. *Clinical and Laboratory Standard Institute*) (CLSI, 2020.)

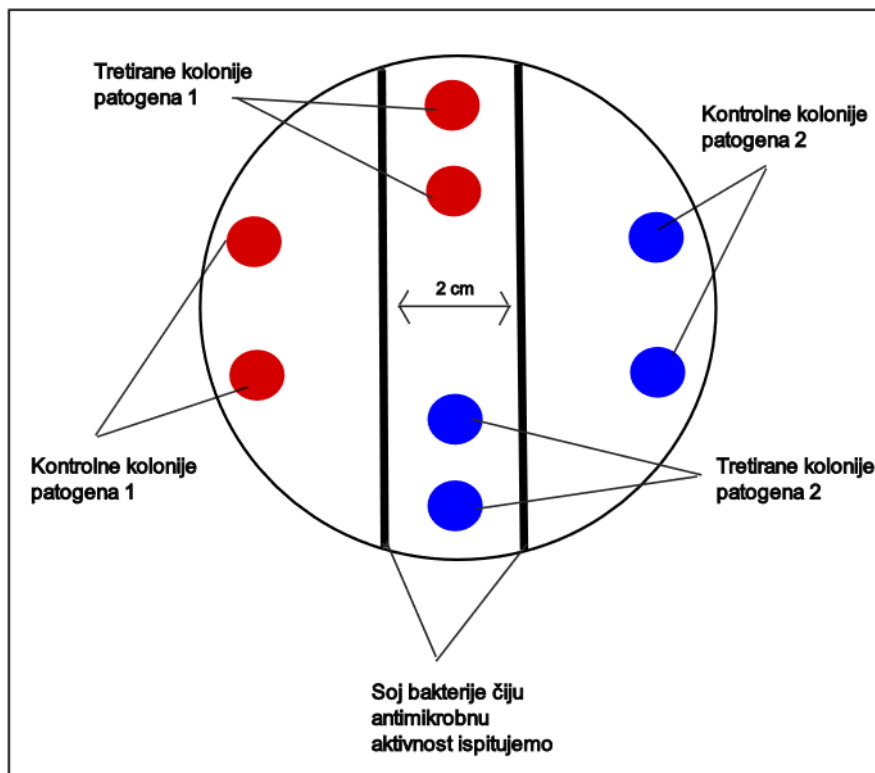


Slika 2.6.1.1. Shematski prikaz disk difuzijske metode

Izvor: <https://www.scientistcindy.com/ex-19---antibiotic-sensitivity-kirby-bauer-method.html>

## 2.7. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti

Jedna od metoda određivanja antimikrobne aktivnosti je ona prema Domig i sur. (2014). Metoda se izvodi na način da se u sredinu Petrijeve zdjelice na BHI podlogu inokuliraju dvije paralelne linije soja čije antimikrobno djelovanje ispitujuemo, te se stavi na inkubaciju. Nakon 24h, uz rub Petrijeve zdjelice i između crta na označena mjesta se nanese kolonije patogena u duplikatima. Kolonije patogena uz rub Petrijeve zdjelice su kontrolne kolonije, a kolonije između linija su tretirane kolonije. Ispitivani soj i patogeni se na BHI ploče nanose prema shemi na Slici 2.7.1. Nakon 24 h, očitavaju se promjeri kontrolnih i tretiranih kolonija. Antimikrobno djelovanje očituje se kao smanjenje promjera tretiranih kolonija, u odnosu na kontrolne kolonije. Razlika u promjerima tretiranih i kontrolnih kolonija mjere se i izražavaju u centimetrima (cm). Na temelju razlike promjera tretiranih i kontrolnih kolonija, stupanj antimikrobnog djelovanja može biti: nema inhibicije (-), vrlo slaba inhibicija (+), srednja inhibicija (++) i jaka inhibicija (+++) i potpuna inhibicija (p.i.) (Domig i sur., 2014).



Slika 2.7.1. Shema ispitivanja antibakterijskog djelovanja

Za ispitivanje antifungalnog djelovanja najčešće se koristi metoda dualnih kultura (engl. *Dual Culture Assay*) prema autorima Ali i sur. (2020) i Tanapichatsakul i sur. (2020).

Ova metoda izvodi se na način da se micelijski disk patogene gljive postavi u sredinu Petrijeve ploče s hranjivom podlogom, a bakterijska biomasa se nanese na udaljenosti od 3,0 cm od micelijskog diska. Antifungalno djelovanje se određuje na

temelju razlike u rastu fungalnog micelija u prisustvu i odsustvu bakterije koja se mjeri u milimetrima (mm), izražava se kao postotak inhibicije (%) koji se računa prema formuli navedenoj u poglavlju 3.12 (Ali i sur., 2020).

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Kemikalije

- Agaroz, Biozym LE Agarose (Biozym Scientific GmbH, Njemačka)
- Glukoza (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, Kemika, Hrvatska)
- Natrij klorid (NaCl, VWR Chemicals, Belgija)
- Voda, reagens za molekularnu biologiju (Sigma-Aldrich Co., SAD)

### 3.2. Laboratorijski uređaji

- Centrifuga 5417R (Eppendorf AG, Njemačka)
- Densitometar, DEN-1 Densitometer (Biosan, Latvija)
- Inkubator, Sanyo Incubator (Sanyo Electronic CO. Ltd., Japan)
- Laboratorijska vaga (Sartorius AG, Njemačka)
- Magnetska mješalica, IKA® big squid (IKA-Werke, Njemačka)
- Orbitalna treskalica/inkubator, Orbital shaker-Incubator ES-20 (Biosan, Latvija)
- Sustav za horizontalnu elektroforezu, SEA 2000® (Elchrom Scientific AG, Švicarska)
- Termoblok, ThermoMixer C (Eppendorf AG, Njemačka)
- Uređaj za hlađenje sustava za horizontalnu elektroforezu, Julabo F12 (Julabo Labortechnik GmbH, Njemačka)
- Uređaj za kvantifikaciju DNA, Qubit™ 2.0 Fluorometer (Life Technologies, SAD)
- Uređaj za PCR, Mastercycler Nexus SX1 (Eppendorf AG, Njemačka)
- Uređaj za vizualizaciju agaroznih gelova, Molecular Imager® Gel Doc® XR+ with Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD)
- Vorteks miješalica, Vorteks V-1-plus (Biosan, Latvija)

### 3.3. Otopine i hranjive podloge

- **Fiziološka otopina (0,85 % NaCl)**

Za pripremu fiziološke otopine korišten je natrij klorid (NaCl, VWR Chemicals, Belgija). Fiziološka otopina je pripremljena otapanjem 8,5 g natrij klorida u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana na temperaturi od 121 °C u trajanju od 15 min. Sterilna fiziološka otopina korištena je za pripremu biomase prilikom ispitivanja osjetljivosti sojeva *Pseudomonas* spp. na antibiotike.

- **Kruta TSA podloga**

Za pripremu ove hranjive podloge korištena je komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga (Tryptone Soya Agar, Oxoid, Velika Britanija). Podloga je pripremljena otapanjem 40 g dehidrirane hranjive podloge u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana na 121 °C/15 min. Potom je ohlađena na 45 –

50 °C, izlivena u Petrijeve zdjelice i ostavljena da polimerizira na sobnoj temperaturi. Ova podloga korištena je za iscrpljenje izolata *Pseudomonas* spp. do monokulture, prvog koraka u pripremi bakterijske biomase za izolaciju genomske DNA.

- **Tekuća TSB podloga**

Za pripremu ove tekuće hranjive podloge korištena je komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga (Difco, BBL™ Bacto™ Tryptonic Soy Broth, BD, Francuska). Podloga je pripravljena otapanjem 30 g dehidrirane podloge u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana pri 120 °C/15 min. Tekuća TSB podloga korištena je za uzgoj prekonoćnih kultura *Pseudomonas* spp., odnosno pripremu biomase dostatne za izolaciju genomske DNA.

- **Mueller-Hinton (MH) agar**

Za pripremu ove krute hranjive podloge korištena je komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga (Mueller-Hinton Agar, Biolife, Italija). Podloga je pripravljena otapanjem 38 g dehidrirane podloge u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana na 121 °C/15 min. Nakon što je podloga ohlađena na 45 – 50 °C, u Petrijeve zdjelice otpipetirano je točno po 20 ml podloge. Nakon pipetiranja, podloge su ostavljene da polimeriziraju na sobnoj temperaturi. Ova podloga je korištena za ispitivanje osjetljivosti sojeva *Pseudomonas* spp. na odabrane antibiotike.

- **Tekuća BHI podloga**

Za pripremu ove podloge korištena je komercijalno dostupna dehidrirana hranjiva podloga (Brain Heart Infusion Broth, Biolife, Italija). Podloga je pripravljena otapanjem 37 g dehidrirane podloge u 1000 ml destilirane vode te je sterilizirana na 121 °C/15 min. Ova podloga je korištena za uzgoj prekonoćnih kultura *Pseudomonas* spp. i odabranih indikatorskih bakterijskih kultura, koje su korištene za određivanje antibakterijske aktivnosti sojeva *Pseudomonas* spp.

- **Kruta BHI podloga**

Za pripremu ove podloge korišteni su komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga (Brain Heart Infusion Broth, Biolife, Italija) i tehnički agar (Agar Technical, Biolife, Italija). Podloga je pripravljena otapanjem 37 g dehidrirane podloge i 15 g tehničkog agara u 1000 ml destilirane vode. Podloga je zatim sterilizirana na 121 °C/15 min i ohlađena na 45 – 50 °C. Nakon hlađenja, u Petrijeve zdjelice otpipetirano je po 20 ml podloge. Podloge su zatim ostavljene na sobnoj temperaturi da polimeriziraju. Ova podloga korištena je za određivanje antibakterijske aktivnosti sojeva *Pseudomonas* spp. prema odabranim indikatorskim bakterijama.

- **Kruta PDA podloga**

Za pripremu krumpir dekstroznog agara (eng. *Potatoe Dextrose Agar*) prvo je pripremljena infuzija krumpira. Infuzija je pripremljena kuhanjem 200 g narezanog, starijeg krumpira s korom u 1000 ml destilirane vode 1 h, a zatim je procijeđena kroz sito. U 1000 ml procijeđene infuzije krumpira otopljeno je 20 g glukoze (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, Kemika, Hrvatska) i 15 g tehničkog agara (Agar Technical, Biolife, Italija). Podloga je zatim sterilizirana na 110 °C/15 min te ohlađena na 45 – 50 °C. Nakon hlađenja, otpipetirano je točno po 20 ml podloge u Petrijeve zdjelice promjera 9 cm te su ploče ostavljene da polimeriziraju na sobnoj temperaturi. Ova podloga je korištena za određivanje antifungalne aktivnosti sojeva *Pseudomonas* spp.

- **Kruta PCA podloga**

Za pripremu ove podloge korištena je komercijalno dostupna, dehidrirana hranjiva podloga (Difco™ Plate Count Agar, BD, Francuska). Podloga je pripremljena otapanjem 23,5 g dehidrirane hranjive podloge u 1000 ml destilirane vode te je sterilizirana na 121 °C/15 min. Nakon sterilizacije, podloga je ohlađena na 45 – 50 °C te je otpipetirano po 20 ml podloge u Petrijeve zdjelice promjera 9 cm. Nakon pipetiranja, podloge su ostavljene da polimeriziraju na sobnoj temperaturi. Ova hranjiva podloga korištena je iscrpljivanje sojeva *Pseudomonas* spp. u ispitivanju njihove osjetljivosti na antibiotike.

### **3.4. Molekularni reagensi, kompleti, markeri i početnice**

- AccuStart™ II PCR SuperMix (2x; Quanta Bioscience, SAD)
- Boja za elektroforezu, 6x LD (Thermo Scientific, SAD)
- Komplet za DNA kvantifikaciju, Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, SAD)
- Chelex® 100 Resin (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD)
- Liofilizirana početnica GTG5 (Metabion, International AG, Njemačka)
- Molekularni biljeg, 100 bp-DNA-Ladder extended (Carl Roth GmbH, Njemačka)
- TAE pufer (50x) za molekularnu biologiju (AppliChem GmbH, Njemačka)

### **3.5. 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:

- *Agrobacterium tumefaciens* (DSM 30205)
- *Bacillus cereus* (DSM 6791)



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

### 3.6. Antibiotici

Osjetljivost sojeva *Pseudomonas* spp. ispitana je na šest klasa antibiotika: penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami, aminoglikozidi i fluorokinoloni. U ovom istraživanju korišteni su komercijalno dostupni antibiotski diskovi BD BBL™ Sensi-Disc™ (Becton, Dickinson and Company, BD, Francuska). U Tablici 3.6.1. prikazani su korišteni antibiotici po klasama, njihove koncentracije (doze) i mehanizam djelovanja.

Tablica 3.6.1. Klase antibiotika i antibiotici korišteni u ovom istraživanju.

Klasa antibiotika	Antibiotik	Koncentracija	Mehanizam djelovanja
Penicilini	Piperacilin-tazobaktam (TZP36)	30/6 µg	Inhibicija sinteze stanične stijenke
Cefalosporini	Cefepim (FEP30)	30 µg	Inhibicija sinteze stanične stijenke
Karbapenemi	Imipenem (IPM10)	10 µg	Inhibicija sinteze stanične stijenke
	Meropenem (MEM10)	10 µg	
Monobaktami	Aztreonam (ATM30)	30 µg	Inhibicija sinteze stanične stijenke
Aminoglikozidi	Gentamicin (GM10)	10 µg	Inhibicija sinteze proteina
	Tobramicin (NN10)	10 µg	
	Amikacin (AN30)	30 µg	
Fluorokinoloni	Ciprofloksacin (CIP5)	5 µg	Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina
	Levofloksacin (LVX5)	5 µg	

### 3.7. Uzorkovanje

Uzorci su sterilno prikupljeni u spilji u blizini naselja Konjevrate u Šibensko-kninskoj županiji u rujnu 2020. i travnju 2022. godine te transportirani u Zavod za mikrobiologiju Sveučilišta u Zagrebu Agronomski fakultet pri temperaturi od 4 °C.

Uzorci su analizirani odmah po zaprimanju. U Tablici 3.7.1. prikazani su podaci o vremenu uzorkovanja, broju uzoraka i izolata.

Tablica 3.7.1. Podaci o vremenu uzorkovanja, broju uzoraka i izolata.

Vrijeme uzorkovanja	Broj uzoraka	Broj izolata
<b>Rujan, 2020.</b>	N=6 sedimenti (n=4) voda (n=2)	62
<b>Travanj, 2022.</b>	N=7 sedimenti (n=6) voda (n=1)	120

U prijašnjim istraživanjima iz prikupljenih uzoraka izolirana su i pročišćena do monokulture ukupno 182 bakterijska izolata. Nadalje, pomoću MALDI-TOF masenog spektrometra utvrđeno je da 40 izolata pripada rodu *Pseudomonas* (neobjavljeni rezultati).

### 3.8. Izolacija genomske DNA *Pseudomonas* spp.

Genomska DNA izolirana je iz izolata *Pseudomonas* spp. (n=40) pomoću 10,0 % (m/V) otopine Chelex® 100 Resin (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD) koja je pripremljena na način da je sterilno odvagano 2 g Chelex® 100 Resin i resuspendirano u 20 ml vode za molekularnu biologiju (Sigma-Aldrich Co., SAD). Zbog brzog odvajanja faza, Chelex® 100 Resin otopinu je stalno miješana na magnetskoj miješalici (IKA® big squid, IKA-Werke, Njemačka).

Prvo je pripremljena bakterijska biomasa za izolaciju genomske DNA na način da su svi izolati iscrpljeni do monokulture na krutoj TSA podlozi. Pojedinačna kolonija svakog izolata je sterilno inokulirana u 1,5 ml tekuće TSB podloge i inkubirana pri 30 °C preko noći.

Nakon inkubacije, bakterijske stanice su od tekuće TSB podloge odvojene centrifugiranjem u centrifugi (5417R, Eppendorf AG, Njemačka) na 16 000 xg/3 min. Nakon centrifugiranja, suvišak podloge je pažljivo odliven. Zaostali pelet je resuspendiran u 200 µL 10,0 % (m/V) otopine Chelex® 100 Resin. Dobivena suspenzija je dobro homogenizirana vorteksiranjem i inkubirana u termobloku (ThermoMixer C, Eppendorf AG, Njemačka) pri 56 °C/20 min/300 rpm. Nakon inkubacije, uzorci su ponovo vorteksirani i inkubirani u termobloku pri 100 °C/80 min/100 rpm.

Nakon druge inkubacije, Chelex smola je odvojena centrifugiranjem na 14 000 xg/2 min. Zatim je u nove, sterilne mikrotubice pažljivo otpipetirano 100 µl supernatanta koji sadrži DNA pazeći pri tom da se ne prenese Chelex smola.

Genomska DNA je kvantificirana pomoću uređaja Qubit™ 2.0 Fluorometer (Life Technologies, SAD) i kompleta za kvantifikaciju genomske DNA Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, SAD). S obzirom da je Qubit™ dsDNA HS Reagent osjetljiv na svjetlost, koncentrirana i radna otopina Qubit™ zaštićene su od svjetlosti.

Svi reagensi (Qubit™ dsDNA HS Reagent 200x, Qubit™ dsDNA HS standard #1 (0 ng/μl), Qubit™ dsDNA HS standard #2 (10 ng/μl), Qubit™ dsDNA HS buffer) ostavljeni su da se temperiraju na sobnoj temperaturi. Zatim je pripravljena radna otopina Qubit™ dsDNA HS Reagent razrjeđenjem koncentriranog reagensa Qubit™ dsDNA HS Reagent 200x u puferu Qubit™ dsDNA HS buffer u omjeru 1:200.

Standardi i genomska DNA su zatim pomiješani s radnom otopinom Qubit™ dsDNA HS Reagent u ukupnom volumenu od 200 μl. Korišteni volumeni standarda, uzoraka DNA i radne otopine prikazani su u Tablici 3.8.1.

Tablica 3.8.1. Priprema standarda i uzoraka za DNA kvantifikaciju.

	Standardi	Uzorci DNA
V (radna otopina Qubit™ dsDNA HS Reagent)	190 μl	198 μl
V (standard ili uzorak)	10 μl	2 μl
Ukupan volumen	200 μl	200 μl

Svi su uzorci zatim dobro vorteksirani i inkubirani na sobnoj temperaturi 2 min. Neposredno prije mjerenja, uređaja Qubit™ 2.0 Fluorometer (Life Technologies, SAD) je kalibriran mjerenjem koncentracije standarda #1 i #2. Nakon kalibracije izmjerena je koncentracija izolirane DNA i izražena u ng/μl. Zatim je za genotipizaciju, prema potrebi, DNA razrijeđena na koncentraciju od 20 ng/ μl u vodi za molekularnu biologiju (Sigma-Aldrich Co., SAD).

### 3.9. Genotipizacija izolata *Pseudomonas* spp.

Izolati su genotipizirani pomoću rep-PCR metode (Domig i sur., 2014) pri čemu je korištena početnica GTG5 (5' GTG GTG GTG GTG GTG 3'; Švec i sur., 2005). Ukupan volumen reakcijske smjese iznosio je 25 μl. Sastav reakcijske smjese je prikazan u Tablici 3.9.1., a temperaturni profili u Tablici 3.9.2. Rep-PCR reakcija je provedena u PCR uređaju (Mastercycler Nexus SX1, Eppendorf AG, Njemačka).

Tablica 3.9.1. Sastav reakcijske smjese za rep-PCR.

Reagens	Početna koncentracija	Završna koncentracija	V [μl]
AccuStart™ II PCR SuperMix	2x	1x	12,5
GTG5	50 pmol/μl	2 pmol/μl	1,0
Voda za molekularnu biologiju			10,5
DNA	20 ng/μl	0,8 ng/μl	1
Ukupan volumen			25

Tablica 3.9.2. Temperaturni profili i trajanje pojedinih koraka rep-PCR reakcije.

Rep-PCR korak	Temperatura/ vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	94 °C/5min	x1
Denaturacija	94 °C/1 min	
Vežanje početnica	52 °C/1min	x30
Produživanje lanca	72 °C/3min	
Završno produživanje lanca	72 °C/10 min	x1

Rep-PCR produkti su vizualizirani u 2,0 % agaroznom gelu koji je pripremljen miješanjem 1,4 g agaroze (Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Njemačka) i 70 ml 0,75x TAE pufera (AppliChem GmbH, Njemačka). Zatim je agarozna u potpunosti otopljena u mikrovalnoj pećnici, izlivena u kadicu za izradu gela i ostavljena na sobnoj temperaturi da polimerizira.

Prije nanošenja u gel svakom rep-PCR produktu (5 µl) dodano je 1,5 µl 6x LD boje (Thermo Scientific, SAD) te su dobro promiješani pipetiranjem. Uz rep-PCR produkte, u agarozni gel je dodano i 5 µl molekularnog biljega (100 bp-DNA-Ladder extended, Carl Roth GmbH, Njemačka). Uzorci su razdvojeni horizontalnom gel elektroforezom (SEA 2000®, Elchrom Scientific AG, Švicarska) na 80 V, 2000 mA, 300 W kroz 1 h i 50 min pri stalnoj temperaturi od 19 °C (Julabo F12, Julabo Labortechnik GmbH, Njemačka).

Nakon završetka elektroforeze, gel je bojan 30 min u 0,028 % otopini GelRed® Nucleic Acid Stain (Biotium, SAD). Suvišna boja je uklonjena odbojavanjem u 0,75x TAE puferu (AppliChem GmbH, Njemačka) 10 min. Nakon odbojavanja gel je vizualiziran i fotografiran pomoću uređaja za vizualizaciju agaroznih gelova (Molecular Imager® Gel Doc® XR+ with Image Lab Software, Bio-Rad Laboratories Inc., SAD).

Rep-PCR obrasci su analizirani pomoću programa BioNumerics verzija 7.6.1 (Applied Maths, Belgija). Sličnost između obrazaca je izračunata na temelju Dice koeficijenta, a izolati *Pseudomonas* spp. su grupirani pomoću UPGMA (engl. *Unweight Paired Group Arithmetic Average*) algoritma. Pri konstrukciji dendrograma korištena je razina tolerancije od 1,0 % i optimizacija od 0,5 %.

### 3.10. Ispitivanje osjetljivosti sojeva *Pseudomonas* spp. na antibiotike

Osjetljivost sojeva *Pseudomonas* spp. na antibiotike je ispitana disk difuzijskom metodom (Bauer i sur., 1959; CLSI, 2020). Ispitivanje je provedeno na šest klasa antibiotika: penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami, aminoglikozidi i fluorokinoloni. Korišteni antibiotici po klasama i njihove koncentracije navedene su u Tablici 3.6.1. (poglavlje 3.6).

Sojevi *Pseudomonas* spp. su prvo iscrpljeni do monokulture na krutim PCA podlogama te inkubirani na 25 °C preko noći. Nakon inkubacije je za svaki ispitani soj pripremljena točno određena biomasa dodavanjem jedne po jedne kolonije u 3 ml sterilne fiziološke otopine do postizanja turbiditeta McFarland standarda 0,5 što

odgovara bakterijskoj koncentraciji  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml. Nakon dodavanja kolonije suspenzija je dobro homogenizirana vorteksiranjem na vorteks miješalici (Vorteks V-1-plus, Biosan, Latvija). Turbiditet je izmjeren denzitrometrom (DEN-1 Densitometer, Biosan, Latvija).

Pripremljene bakterijske suspenzije nacijepljene su na krute MH podloge sterilnim vatenim štapićima, gusto razmazane u tri ponavljanja, a između svakog razmaza ploča je zakrenuta za  $60^\circ$ . Diskovi s odabranim antibioticima nanoseni su na MH ploče. Svaki antibiotik je ispitan u duplikatima. Ploče su zatim stavljene na inkubaciju pri  $37^\circ\text{C}/24$  h.

Nakon inkubacije su izmjereni promjeri zone inhibicije bakterijskog rasta uključujući i promjer antibiotičkog diska te su prikazani su kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama. Sojevi *Pseudomonas* spp. su identificirani kao rezistentni (R), umjereno osjetljivi (U) ili osjetljivi (O) na ispitane antibiotike na temelju smjernica propisanih od strane *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020).

### **3.11. Određivanje antibakterijskog djelovanja sojeva *Pseudomonas* spp.**

Antibakterijsko djelovanje sojeva *Pseudomonas* spp. ispitano je prema Domig i sur. (2014). Ispitivanje je izvršeno prema sljedećim patogenim tzv. indikatorskim bakterijama: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), *Staphylococcus aureus* (DSM 20231), *Bacillus cereus* (DSM 6791), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Pseudomonas syringae* (DSM 10604), *Erwinia amylovora* (DSM 50901) i *Agrobacterium tumefaciens* (DSM 30205).

Za određivanje antibakterijskog djelovanja, sojevi *Pseudomonas* spp. prvo su uzgojeni u 10 ml tekuće BHI podloge i stavljeni na inkubiranje u orbitalnu treskalicu/inkubator (Orbital shaker-Incubator ES-20, Biosan, Latvija) na  $25^\circ\text{C}/250$  rpm/24 h. Nakon inkubacije, u tekuću kulturu soja *Pseudomonas* spp. umočen je sterilni vateni štapić te su u sredini BHI ploče povučene dvije paralelne crte na međusobnoj udaljenosti od 2 cm. Svaki je soj nanosen na zasebnu BHI ploču, te su ovako pripremljene ploče stavljene na inkubaciju na  $25^\circ\text{C}/24$  h. Istovremeno, indikatorske bakterije su nacijepljene u 1 ml tekuće BHI podloge i stavljene na inkubaciju preko noći pri uvjetima rasta optimalnim za njihov rast (Tablica 3.11.1).

Tablica 3.11.1. Optimalni uvjeti rasta indikatorskih bakterija.

Vrsta bakterije	Temperatura (°C)	Odnos prema kisiku
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	30	anaerobno
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (DSM 14221)	30	anaerobno
<i>S. aureus</i> (DSM 20231)	30	aerobno
<i>B. cereus</i> (DSM 6791)	30	aerobno
<i>L. innocua</i> (ATCC 33090)	30	aerobno
<i>P. syringae</i> (DSM 10604)	30	aerobno
<i>E. amylovora</i> (DSM 50901)	25	aerobno
<i>A. tumefaciens</i> (DSM 30205)	25	aerobno

Nakon inkubacije, po 5 µl indikatorske bakterije naci jepljeno je između crta (tretman) i uz rub ploče (kontrola). Nakon naci jepljivanja patogena, ploče su inkubirane pri optimalnim uvjetima za rast indikatorskih bakterija (Tablica 3.11.1.) tijekom 24 h. Antibakterijsko djelovanje svih sojeva *Pseudomonas* spp. na indikatorske bakterije je ispitano u dva ponavljanja.

Antibakterijsko djelovanje sojeva *Pseudomonas* spp. procijenjeno je temeljem razlika u promjeru kolonija indikatorskih bakterija između crta i promjera kontrolnih kolonija uz rub ploče, a kriteriji su navedeni u Tablici 3.11.2.

Tablica 3.11.2. Kriteriji za određivanje antibakterijskog djelovanja *Pseudomonas* spp.

Razlika promjera kolonije indikatorske bakterije i promjera kontrolne kolonije [mm]	Interpretacija antimikrobnog djelovanja [mm]
< 1	nema inhibicije (-)
1 – 2	slaba inhibicija (+)
2 – 4	izražena inhibicija (++)
> 4	vrlo jaka inhibicija (+++)
potpuni izostanak rasta	potpuna inhibicija (p.i.)

### 3.12. Određivanje antifungalnog djelovanja sojeva *Pseudomonas* spp.

Antifungalna aktivnost sojeva *Pseudomonas* spp. prema patogenoj gljivi *Botrytis cinerea* (DSM 877) je određena metodom dvojnih kultura (engl. *Dual Culture Assay*; Ali i sur., 2020; Tanapichatsakul i sur., 2020).

Za određivanje antifungalnog djelovanja *Pseudomonas* sojeva, pripremljeni su micelijski diskovi na načina da je *B. cinerea* naci jepljena na PDA podlogu, a zatim su ploče inkubirane na 25 °C/7 dana. Svaki soj *Pseudomonas* spp. je naci jepljen na

zasebnu PDA ploču 1,5 cm od ruba Petrijeve zdjelice. Micelijski disk promjera 8 mm i starosti 7 dana je postavljen 3 cm od mjesta gdje je naci jepljen soj *Pseudomonas* spp. Istovremeno, pripremljene su i kontrolne ploče nanošenjem samo micelijskog diska na sredinu podloge. Ovako pripremljene ploče inkubirane su na 25°C/7 dana. Nakon inkubacije, izmjeren je radijalni rast gljive *B. cinerea* na pločama s naci jepljenim sojem *Pseudomonas* spp. i njen rast na kontrolnim pločama. Inhibicija fungalnog rasta izražena je u postocima (%), a izračunata je prema sljedećoj formuli:

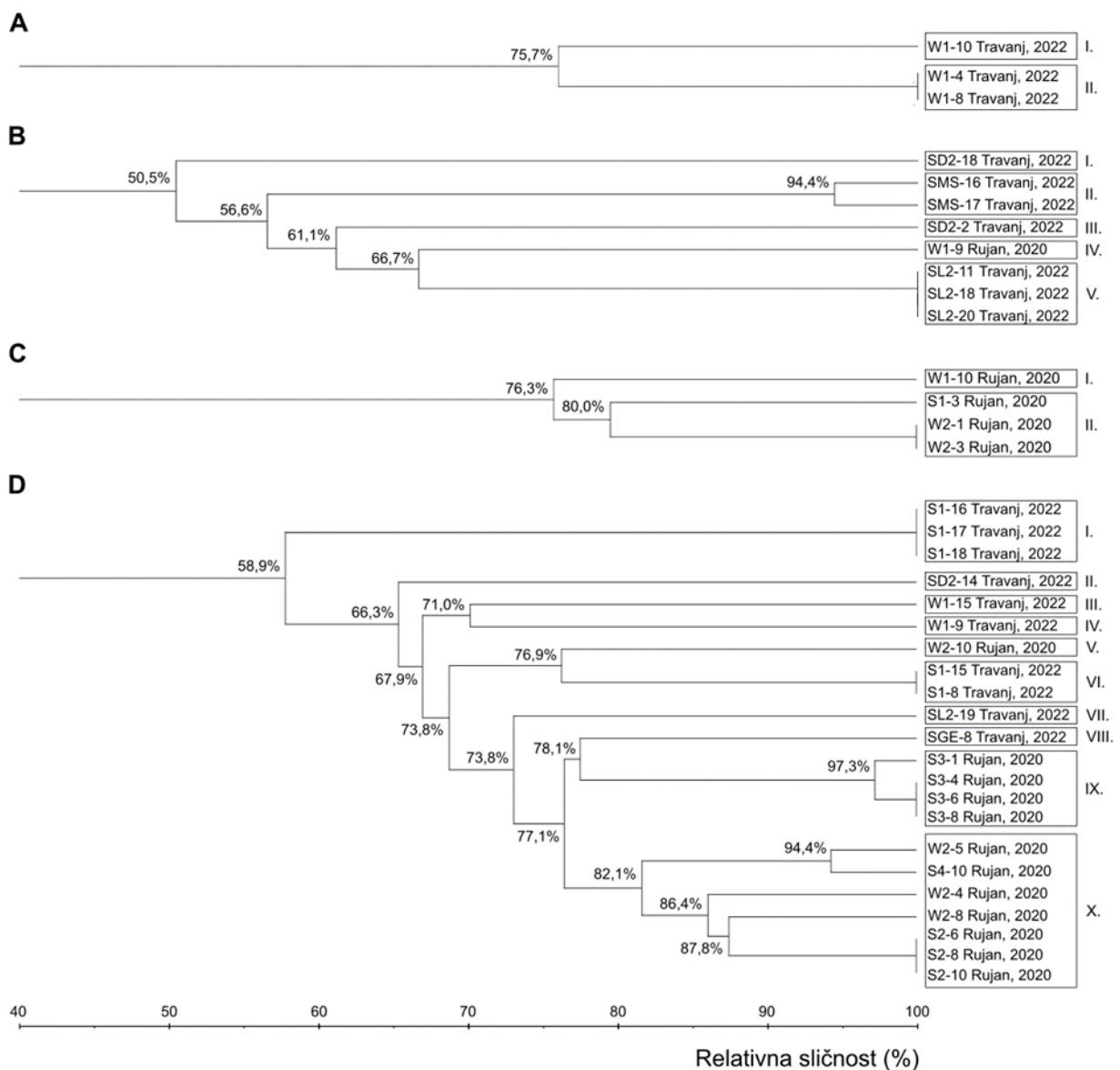
$$\text{Inhibicija fungalnog rasta (\%)} = 100 * \left(1 - \frac{\text{radijalni rast tretmana (mm)}}{\text{radijalni rast kontrole (mm)}}\right)$$

Antifungalno djelovanje svih sojeva *Pseudomonas* spp. je ispitano u dva ponavljanja i rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama.

## 4. Rezultati

### 4.1. Genotipizacija izolata *Pseudomonas* spp.

U prijašnjim istraživanjima pomoću MALDI-TOF masenog spektrometra utvrđeno je da 40 izolata pripada rodu *Pseudomonas*. Od toga, 18 izolata je identificirano na razini vrste, a 22 na razini roda. Nadalje, svi izolati *Pseudomonas* spp. su genotipizirani pomoću rep-PCR metode. Na temelju rep-PCR obrazaca dobivenih amplifikacijom pomoću GTG5 početnice konstruirani su dendrogrami za svaku pojedinačnu vrstu (Slika 4.1.1. A-C) i dodatni dendrogram za izolate koji su identificirani samo do razine roda (Slika 4.1.1. D). Dendrogrami za vrste koje su detektirane samo jednom *P. putida* (W1-8, rujan, 2020.), *P. thivervalensis* (S1-19, travanj, 2022.), *P. corrugata* (SL2-17, travanj, 2022.) nisu prikazani.





Slika 4.1.1. Dendrogrami za sojeve *Pseudomonas* spp. (A - *P. brenneri*; B - *P. chlororaphis*; C - *P. jessenii*; D - *Pseudomonas* spp.) konstruirani na temelju rep-PCR obrazaca dobivenih amplifikacijom s početnicom GTG5. Rimskim brojevima označene su grupe unutar vrste ili roda koje pokazuju 80,0 % sličnosti rep-PCR obrazaca izračunate na temelju Dice koeficijenta.

*Pseudomonas* sojevi su, u pravilu, vrlo raznoliki. Najveća unutarvrstna raznolikost je uočena kod *P. chlororaphis*, gdje sličnost varira od 50,5 % do 100,0 %. Na temelju 80,0 % sličnosti rep-PCR obrazaca sojevi *P. chlororaphis* su grupirani u 5 grupa.

*P. brenneri* (75,7 % do 100,0 %) i *P. jessenii* pokazuju sličnu raznolikost (76,3 % do 100,0 %) i sojevi ovih vrsta su grupirani u dvije grupe (Slika 4.1.1. A-C).

Sojevi identificirani na razini roda su također vrlo raznoliki (58,9 % do 100,0 %) i razlikujemo 10 grupa. Većina grupa je mala tj. čine ih jedan do tri člana. Iznimka su grupe IX. (4 soja) i X. (7 soja) (Slika 4.1.1. D).

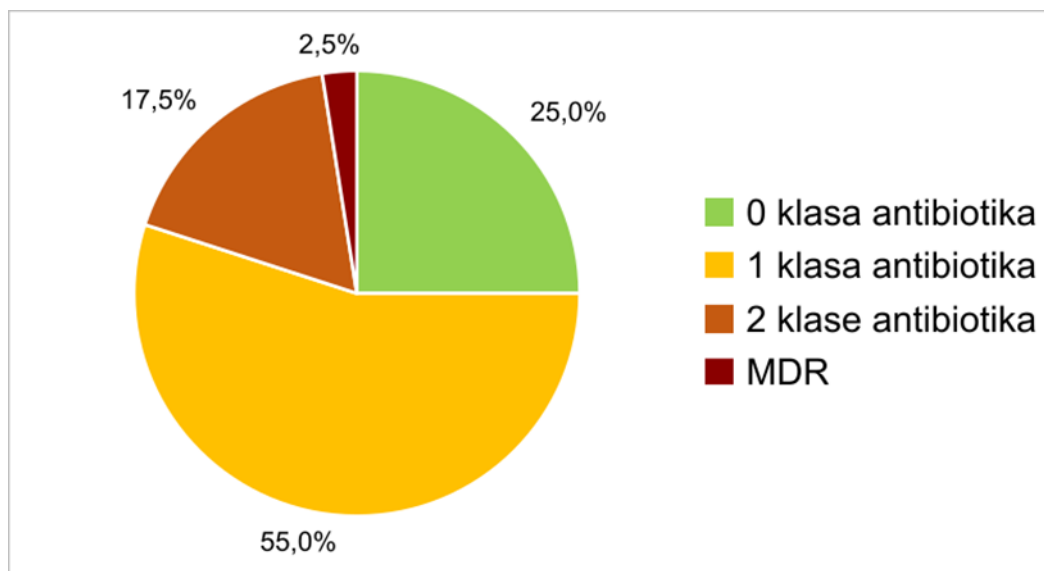
## 4.2. Osjetljivost sojeva *Pseudomonas* spp. na antibiotike

Osjetljivost sojeva *Pseudomonas* spp. ispitana je na šest klasa antibiotika (penicilini, cefalosporini, monobaktami, karbapenemi, aminoglikozidi i fluorokinoloni) disk difuzijskom metodom. Po završetku inkubacije, izmjereni su promjeri zone inhibicije rasta za svaki analizirani antibiotik i za svaki ispitani soj *Pseudomonas* spp. Djelovanje antibiotika očituje se kao prozirna zona oko diska gdje izostaje bakterijski rast, kao što je vidljivo na Slici 4.2.1. gdje je ispitana osjetljivost soja S2-8 izoliranog u rujnu 2020. godine iz sedimenata na odabrane antibiotike. Što je zona inhibicije manja, to je soj otporniji na djelovanje antibiotika.



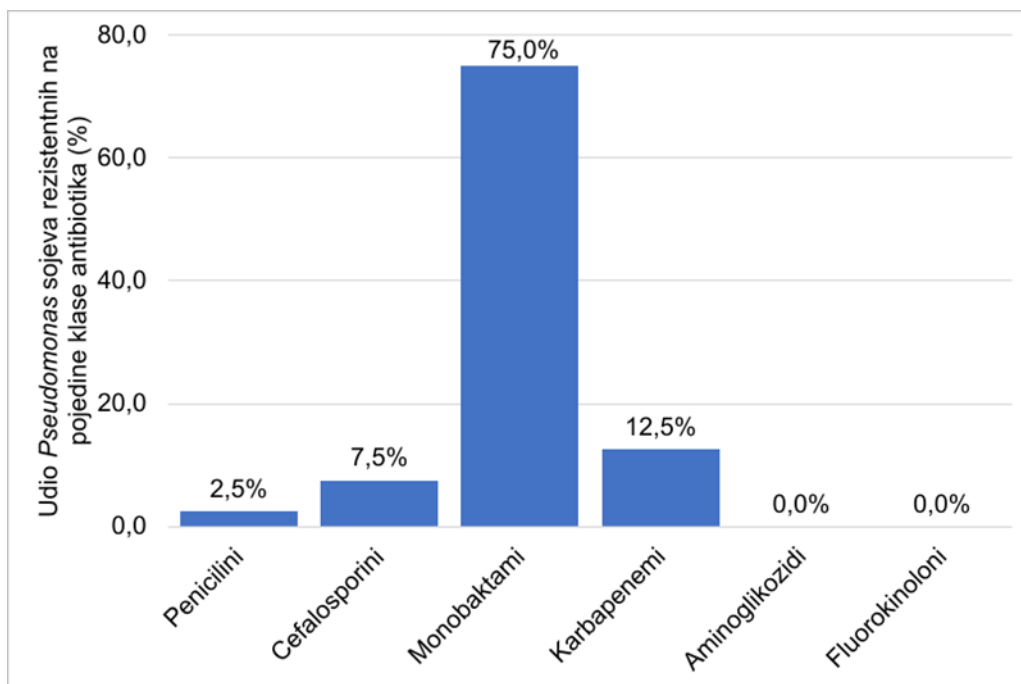
Slika 4.2.1. Osjetljivost soja S2-8 (*Pseudomonas* spp.) na odabrane antibiotike: 1. - ATM30, 2. - FEP30, 3. - IPM10 i 4. - TZP36.

Među ispitanim sojevima samo jedan (2,5 %; SL2-18, travanj, 2022., *P. chlororaphis*) je rezistentan tri različite klase antibiotika, što ga svrstava u višestruko rezistentne (engl. *multi-drug resistant*, MDR) bakterije. Sedam sojeva (17,5 %) je rezistentno na dvije klase, a 22 (55,0 %) na jednu klasu antibiotika. Preostali sojevi (25,0 %) su osjetljivi na sve ispitane klase antibiotika (Graf 4.2.1.; Tablica 4.2.1).



Graf 4.2.1 Udio sojeva *Pseudomonas* spp. rezistentnih na različite klase antibiotika.

U pravilu, *Pseudomonas* sojevi ispitani u ovom istraživanju, su rezistentni na inhibitore sinteze stanične stijenke (monobaktami, karbapenemi, cefalosporini i penicilini). Najveći udio sojeva (75,0 %) pokazuje rezistentnost na monobaktame. Zatim slijede *Pseudomonas* sojevi rezistentni na karbapeneme (12,5 %), cefalosporine (7,5 %) i peniciline (2,5 %). Konačno, svi sojevi su osjetljivi ili umjereno osjetljivi na antibiotike koji inhibiraju sintezu proteina (aminoglikozidi) odnosno sintezu nukleinskih kiselina (fluorokinoloni) (Graf 4.2.2., Tablica 4.2.1).



Graf 4.2.2. Udio sojeva *Pseudomonas* spp. rezistentnih na pojedine klase antibiotika.

Slično rezistenciji na pojedine klase antibiotika, kod 30 sojeva (75,0 %) utvrđena je rezistencija na aztreonam (ATM30) predstavnika monobaktama. Dva soja (5,0 %) su umjereno osjetljiva, dok su preostali sojevi osjetljivi (20,0 %) na prije navedeni antibiotik. Samo jedan soj (2,5 %, W2-1, rujanj, 2020., *P. jessenii*) je rezistentan na oba predstavnika karbapenema, imipenem (IMP10) i meropenem (MEM10). Kod četiri soja (10,0 %) utvrđena je rezistencija na meropenem (MEM10) i kod jednog soja (2,5 %) umjerena osjetljivost na imipenem (IMP10). Nadalje, detektirana su tri soja (7,5 %) rezistentna na cefepim (FEP30, predstavnik cefalosporina) te jedan (2,5 %) rezistentan i pet (12,5 %) umjereno osjetljiva na piperacilin-tazobaktam (TZP36, predstavnik penicilina). Svi ispitani sojevi *Pseudomonas* spp. su osjetljivi na dva predstavnika aminoglikozida (gentamicin, GM10 i tobramicin, NN10), dok je kod jednog soja (2,5 %) utvrđena umjerena osjetljivost na trećeg predstavnika aminoglikozida, amikacin (AN30). Konačno, jedan soj (2,5 %; SL2-18, travanj, 2022., *P. chlororaphis*) je umjereno osjetljiv na oba predstavnika fluorokinolona (ciprofloksacin, CIP5 i levofloksacin, LVX5), dok su dva soja (5,0 %) umjereno osjetljiva samo na ciprofloksacin (CIP5) odnosno jedan (2,5 %) na levofloksacin (LVX5). Konačno, ukupno deset sojeva (25,0 %) je osjetljivo na sve ispitane antibiotike.

Soj SL2-18 (travanj, 2022., *P. chlororaphis*) se pokazao kao najotporniji (rezistentan je na tri antibiotika). Slijede ga sojevi S2-8, S2-10, S3-1 i W2-4 (rujan, 2020., *Pseudomonas* spp.), W2-1 (rujan, 2020., *P. jessenii*) te SMS-16 i SMS-17 (travanj, 2022., *P. chlororaphis*) koji su rezistentni na dva antibiotika. Međutim, nema indikacije da kod ispitanih sojeva učestalost rezistencije na klase odnosno pojedinačne antibiotike ovisi o *Pseudomonas* vrsti (Tablica 4.2.1.).

Tablica 4.2.1. Osjetljivost sojeva *Pseudomonas* spp. na odabrane antibiotike.

Vrijeme uzorkovanja	Soj	Rod/vrsta	TZP36 <sup>a</sup>	FEP30 <sup>b</sup>	ATM30 <sup>c</sup>	IPM10 <sup>d</sup>	MEM10 <sup>d</sup>	GM10 <sup>e</sup>	NN10 <sup>e</sup>	AN30 <sup>e</sup>	CIP5 <sup>f</sup>	LVX5 <sup>f</sup>
Rujan, 2020.	S1-3	<i>P. jessenii</i>	23,0±0,0 <sup>(O)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	38,0±0,0 <sup>(O)</sup>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	S2-6	<i>Pseudomonas</i> spp.	21,5±0,7 <sup>(O)</sup>	32,5±0,7 <sup>(O)</sup>	12,5±0,7 <sup>(R)</sup>	26,5±0,7 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	33,0±0,0 <sup>(O)</sup>	41,5±2,1 <sup>(O)</sup>	37,0±2,8 <sup>(O)</sup>	26,5±0,7 <sup>(O)</sup>	22,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	S2-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	20,0±0,0 <sup>(U)</sup>	6,0±0,0 <sup>(R)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>	20,0±0,0 <sup>(O)</sup>	19,0±0,0 <sup>(O)</sup>	22,0±0,0 <sup>(O)</sup>	23,0±0,0 <sup>(U)</sup>	23,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	S2-10	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	10,5±0,7 <sup>(R)</sup>	33,0±0,0 <sup>(O)</sup>	33,5±0,7 <sup>(O)</sup>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,5±0,7 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	S3-1	<i>Pseudomonas</i> spp.	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	30,5±0,7 <sup>(O)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	25,5±0,7 <sup>(O)</sup>	24,5±0,7 <sup>(U)</sup>	22,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	S3-4	<i>Pseudomonas</i> spp.	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,5±0,7 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	41,0±0,0 <sup>(O)</sup>	39,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	S3-6	<i>Pseudomonas</i> spp.	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>	35,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	33,0±0,0 <sup>(O)</sup>	23,0±0,0 <sup>(O)</sup>	21,5±0,7 <sup>(O)</sup>	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	S3-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	44,0±0,0 <sup>(O)</sup>	37,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,5±0,7 <sup>(O)</sup>	26,5±0,7 <sup>(O)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	S4-10	<i>Pseudomonas</i> spp.	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	33,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	45,0±0,0 <sup>(O)</sup>	38,0±1,4 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	W1-8	<i>P. putida</i>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>	33,0±0,0 <sup>(O)</sup>	33,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	24,5±0,7 <sup>(O)</sup>	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±1,4 <sup>(O)</sup>	26,5±0,7 <sup>(O)</sup>
	W1-9	<i>P. chlororaphis</i>	20,0±0,0 <sup>(U)</sup>	23,5±0,7 <sup>(O)</sup>	11,0±0,0 <sup>(R)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	20,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±1,4 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	21,0±0,0 <sup>(U)</sup>
	W1-10	<i>P. jessenii</i>	21,0±0,0 <sup>(O)</sup>	22,0±0,0 <sup>(O)</sup>	10,0±0,0 <sup>(R)</sup>	19,0±0,0 <sup>(O)</sup>	36,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	39,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	W2-1	<i>P. jessenii</i>	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	7,0±0,0 <sup>(R)</sup>	14,0±0,0 <sup>(R)</sup>	9,0±0,0 <sup>(R)</sup>	28,5±0,7 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	W2-3	<i>P. jessenii</i>	19,0±0,0 <sup>(U)</sup>	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	11,0±0,0 <sup>(R)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	23,5±0,7 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	33,5±0,7 <sup>(O)</sup>	31,0±1,4 <sup>(O)</sup>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	22,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	W2-4	<i>Pseudomonas</i> spp.	21,0±0,0 <sup>(O)</sup>	23,5±0,7 <sup>(O)</sup>	10,0±0,0 <sup>(R)</sup>	20,0±0,0 <sup>(O)</sup>	12,0±0,0 <sup>(R)</sup>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	W2-5	<i>Pseudomonas</i> spp.	22,0±0,0 <sup>(O)</sup>	33,5±0,7 <sup>(O)</sup>	33,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	32,5±0,7 <sup>(O)</sup>	25,5±0,7 <sup>(O)</sup>	25,0±1,4 <sup>(O)</sup>	26,5±0,7 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	W2-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	22,0±0,0 <sup>(O)</sup>	36,5±2,1 <sup>(O)</sup>	6,0±0,0 <sup>(R)</sup>	16,0±0,0 <sup>(U)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>	39,5±0,7 <sup>(O)</sup>	41,0±1,4 <sup>(O)</sup>	36,0±0,0 <sup>(O)</sup>	34,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>
W2-10	<i>Pseudomonas</i> spp.	21,0±0,0 <sup>(O)</sup>	22,0±0,0 <sup>(O)</sup>	15,0±0,0 <sup>(R)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	28,0±1,4 <sup>(O)</sup>	38,0±0,0 <sup>(O)</sup>	41,5±0,7 <sup>(O)</sup>	37,5±2,1 <sup>(O)</sup>	28,5±0,7 <sup>(O)</sup>	24,5±0,7 <sup>(O)</sup>	
Travanj, 2022.	S1-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	40,0±0,0 <sup>(O)</sup>	37,0±0,0 <sup>(O)</sup>	39,5±0,7 <sup>(O)</sup>	30,5±0,7 <sup>(O)</sup>	48,0±0,0 <sup>(O)</sup>	33,0±0,0 <sup>(O)</sup>	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,5±0,7 <sup>(O)</sup>
	S1-15	<i>Pseudomonas</i> spp.	30,5±0,7 <sup>(O)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>	21,0±0,0 <sup>(U)</sup>	38,0±0,0 <sup>(O)</sup>	39,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,5±0,7 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,5±0,7 <sup>(O)</sup>	26,5±0,7 <sup>(O)</sup>
	S1-16	<i>Pseudomonas</i> spp.	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	46,0±0,0 <sup>(O)</sup>	37,0±0,0 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	S1-17	<i>Pseudomonas</i> spp.	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	36,0±0,0 <sup>(O)</sup>	17,0±0,0 <sup>(U)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	43,5±0,7 <sup>(O)</sup>	20,0±0,0 <sup>(O)</sup>	22,5±0,7 <sup>(O)</sup>	22,5±0,7 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	35,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	S1-18	<i>Pseudomonas</i> spp.	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	42,5±0,7 <sup>(O)</sup>	37,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,5±0,7 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	28,0±1,4 <sup>(O)</sup>
	S1-19	<i>P. thivervalensis</i>	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	34,5±0,7 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	45,5±0,7 <sup>(O)</sup>	39,0±0,0 <sup>(O)</sup>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30±1,4 <sup>(O)</sup>
	SD2-2	<i>P. chlororaphis</i>	27,5±0,7 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	26,5±0,7 <sup>(O)</sup>	38,0±0,0 <sup>(O)</sup>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,5±0,7 <sup>(O)</sup>	37,5±0,7 <sup>(O)</sup>	39±1,4 <sup>(O)</sup>
	SD2-14	<i>Pseudomonas</i> spp.	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	33,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	46,0±0,0 <sup>(O)</sup>	38,5±0,7 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	35,0±0,0 <sup>(O)</sup>	32,5±0,7 <sup>(O)</sup>
	SD2-18	<i>P. chlororaphis</i>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	50,0±0,0 <sup>(O)</sup>	38,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	39,0±0,0 <sup>(O)</sup>	38,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	SL2-11	<i>P. chlororaphis</i>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	41,0±0,0 <sup>(O)</sup>	36,0±0,0 <sup>(O)</sup>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>

Tablica 4.2.1. Osjetljivost sojeva *Pseudomonas* spp. na odabrane antibiotike – nastavak.

Vrijeme uzorkovanja	Soj	Rod/vrsta	TZP36 <sup>a</sup>	FEP30 <sup>b</sup>	ATM30 <sup>c</sup>	IPM10 <sup>d</sup>	MEM10 <sup>d</sup>	GM10 <sup>e</sup>	NN10 <sup>e</sup>	AN30 <sup>e</sup>	CIP5 <sup>f</sup>	LVX5 <sup>f</sup>
Travanj, 2022.	SL2-17	<i>P. corrugata</i>	26,5±0,7 <sup>(O)</sup>	33,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	45,0±0,0 <sup>(O)</sup>	37,5±0,7 <sup>(O)</sup>	29,5±0,7 <sup>(O)</sup>	30,5±0,7 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	SL2-18	<i>P. chlororaphis</i>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	24,5±0,7 <sup>(O)</sup>	14,0±0,0 <sup>(R)</sup>	19,5±0,7 <sup>(O)</sup>	17,0±0,0 <sup>(O)</sup>	16,0±0,0 <sup>(U)</sup>	23,0±0,0 <sup>(U)</sup>	20,5±0,7 <sup>(U)</sup>
	SL2-19	<i>Pseudomonas</i> spp.	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	50,0±0,0 <sup>(O)</sup>	39,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>	32,0±0,0 <sup>(O)</sup>	35,0±0,0 <sup>(O)</sup>	37,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	SL2-20	<i>P. chlororaphis</i>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	33,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	43,0±1,4 <sup>(O)</sup>	36,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±1,4 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	SMS-16	<i>P. chlororaphis</i>	19,5±0,7 <sup>(U)</sup>	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	25,5±0,7 <sup>(O)</sup>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>	28,0±0,0 <sup>(O)</sup>	42,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	SMS-17	<i>P. chlororaphis</i>	20,0±0,0 <sup>(U)</sup>	22,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	42,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	SGE-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	23,5±0,7 <sup>(O)</sup>	33,5±0,7 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,5±0,7 <sup>(O)</sup>	33,5±0,7 <sup>(O)</sup>	24,0±0,0 <sup>(O)</sup>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>	23,5±0,7 <sup>(O)</sup>	32,5±0,7 <sup>(O)</sup>	32,5±0,7 <sup>(O)</sup>
	W1-4	<i>P. brenneri</i>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>	35,5±0,7 <sup>(O)</sup>	33,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±1,4 <sup>(O)</sup>	24,5±0,7 <sup>(O)</sup>	24,5±0,7 <sup>(O)</sup>	26,0±0,0 <sup>(O)</sup>	37,0±0,0 <sup>(O)</sup>	36,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	W1-8	<i>P. brenneri</i>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	48,0±0,0 <sup>(O)</sup>	38,0±0,0 <sup>(O)</sup>	25,5±0,7 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	37,0±0,0 <sup>(O)</sup>	36,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	W1-9	<i>Pseudomonas</i> spp.	30,5±0,7 <sup>(O)</sup>	31,5±0,7 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	45,0±0,0 <sup>(O)</sup>	39,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,5±0,7 <sup>(O)</sup>	34,5±0,7 <sup>(O)</sup>	34,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	W1-10	<i>P. brenneri</i>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	0,0±0,0 <sup>(R)</sup>	51,0±0,0 <sup>(O)</sup>	39,0±0,0 <sup>(O)</sup>	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	30,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	35,0±0,0 <sup>(O)</sup>	36,0±0,0 <sup>(O)</sup>
	W1-15	<i>Pseudomonas</i> spp.	29,0±0,0 <sup>(O)</sup>	31,0±0,0 <sup>(O)</sup>	23,0±0,0 <sup>(O)</sup>	36,0±0,0 <sup>(O)</sup>	37,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	27,0±0,0 <sup>(O)</sup>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>	25,0±0,0 <sup>(O)</sup>

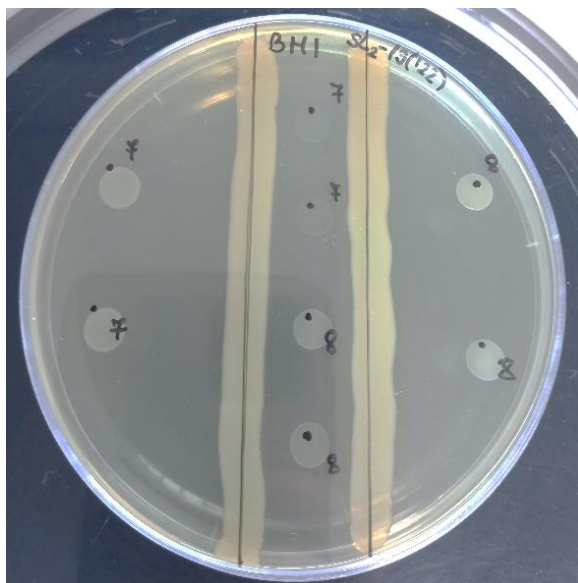
<sup>a</sup>penicilini; <sup>b</sup>cefalosporini; <sup>c</sup>monobaktami; <sup>d</sup>karbapenemi; <sup>e</sup>aminoglikozidi; <sup>f</sup>fluorokinoloni

TZP36 – piperacilin-tazobaktam (30/6 mg); FEP30 – cefepim (30 mg); ATM30 – aztreonam (30 mg); IPM10 – imipenem (10 mg); MEM10 – meropenem (10 mg); GM10 – gentamicin (10 mg); NN10 – tobramicin (10 mg); AN30 – amikacin (30 mg); CIP5 – ciprofloksacin, (5 mg); LVX5 – levofloksacin, (5 mg).

O – osjetljiv, U – umjereno osjetljiv, R – rezistentan

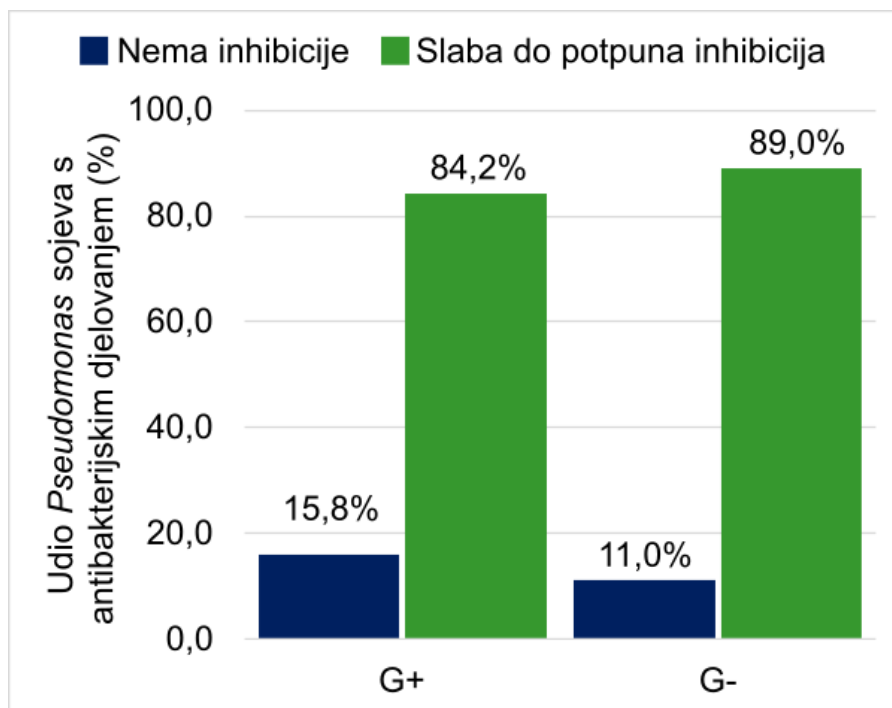
### 4.3. Antibakterijsko djelovanje sojeva *Pseudomonas* spp.

Antibakterijsko djelovanje sojeva *Pseudomonas* spp. prema potencijalnim humanim (*E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. innocua*) i biljnim patogenima (*P. syringae*, *E. amylovora*, *A. tumefaciens*) ispitano je prema Domig i sur. (2014). Antimikrobno djelovanje očituje se kao razlika između promjera kontrolne kolonije patogena i promjera kolonije patogena koja se nalazi između crta na koje je nanesen ispitivani soj (Slika 4.3.1). Što je promjer kolonije patogena između crta manji od promjera kontrolne kolonije, to je antibakterijsko djelovanje snažnije.



Slika 4.3.1. Antibakterijsko djelovanje soja SL2-19 izoliranog 2022. iz sedimenta na odabrane biljne patogene: 7 - *E. amylovora*; 8 - *A. tumefaciens*.

Uzimajući u obzir sve stupnjeve inhibicije, od slabe do potpune, vidljivo je da su Gram negativni patogeni (*E. coli*, *S. enterica*, *P. syringae*, *E. amylovora* i *A. tumefaciens*) nešto osjetljiviji na djelovanje *Pseudomonas* sojeva od Gram pozitivnih patogena (*S. aureus*, *B. cereus* i *L. innocua*), pa tako 89,0 % *Pseudomonas* sojeva inhibira Gram negativne u usporedbi s 84,2 % sojeva koji inhibiraju Gram pozitivne (Graf 4.3.1.).

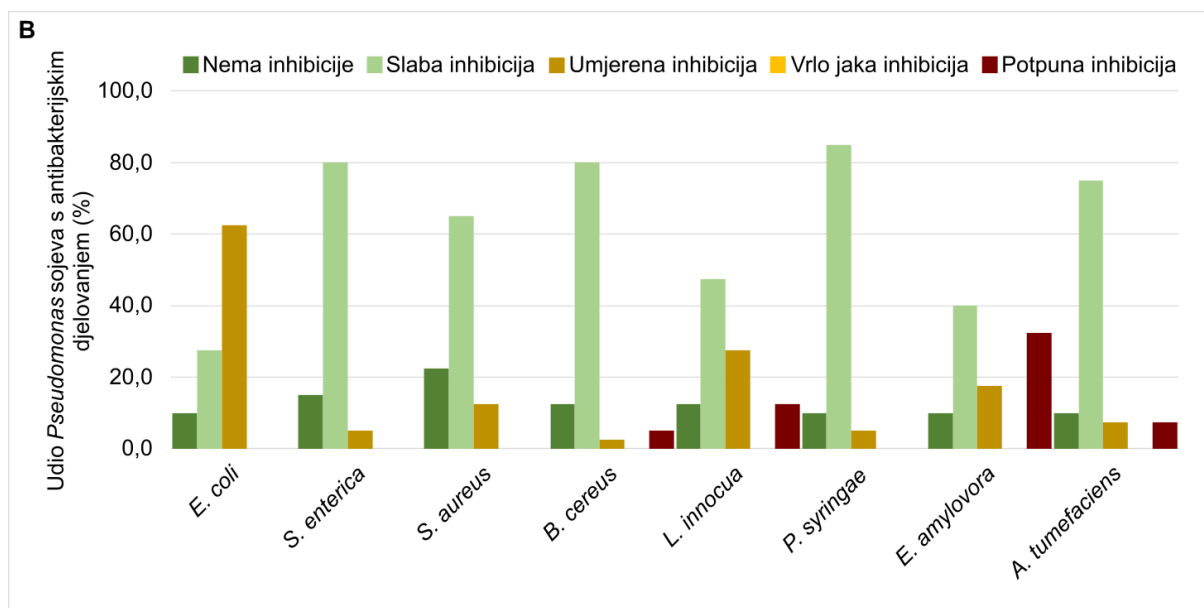
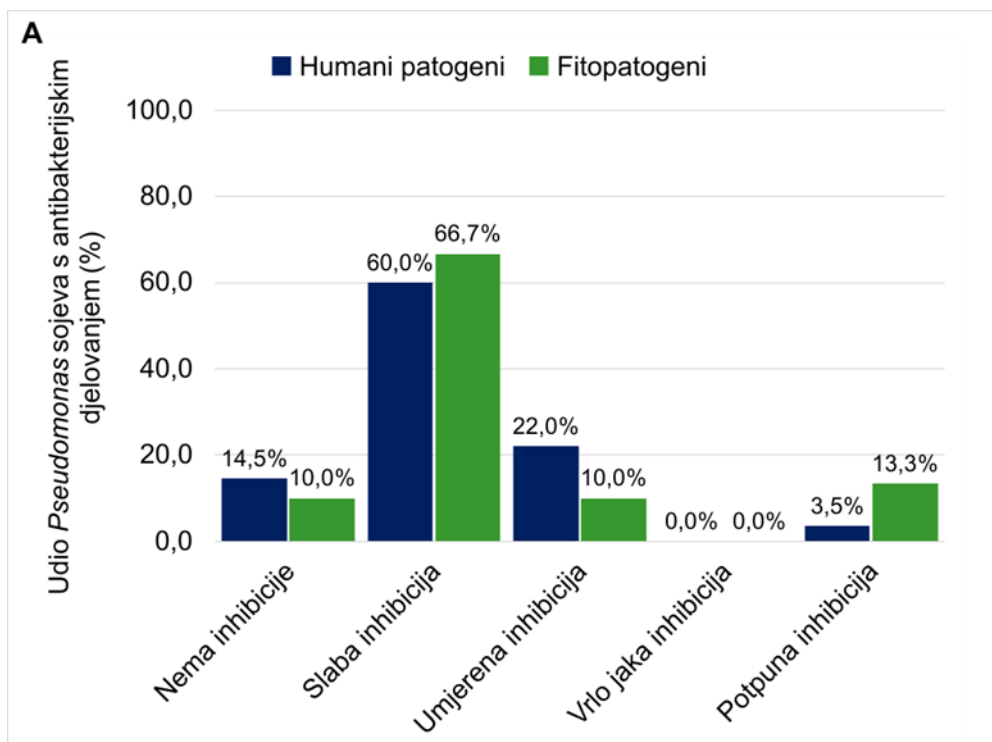


Graf 4.3.1. Udio sojeva *Pseudomonas* spp. koji pokazuje antibakterijsko djelovanje prema Gram pozitivnim i Gram negativnim patogenim bakterijama.

Što se tiče utjecaja prema biljnim (*P. syringae*, *E. amylovora* i *A. tumefaciens*) i humanim (*E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus*, *B. cereus* i *L. innocua*) patogenim bakterijama, veći udio sojeva djeluje inhibitorno na biljne patogene. Iako sveukupno prevladava slaba inhibicija (66,7 % sojeva slabo inhibira fitopatogene i 60,0 % humane patogene), kod *Pseudomonas* sojeva je uočen nezanemariv umjereni inhibitorni učinak na humane patogene (22,0 % sojeva) te potpuni inhibitorni učinak na fitopatogene (13,3 %) (Graf 4.3.2A).

*Pseudomonas* sojevi su naročito efikasni u suzbijanju rasta biljnih patogena, gdje 32,5 % sojeva u potpunosti inhibira rast bakterije *E. amylovora* i 7,5 % u potpunosti inhibira rast *A. tumefaciens*. Nadalje, pokazano je da *Pseudomonas* sojevi umjereno inhibiraju fitopatogene *E. amylovora* (17,5 % sojeva), *A. tumefaciens* (7,5 %) i *P. syringae* (5,0 %).

Antibakterijsko djelovanje *Pseudomonas* sojeva na humane patogene pokazuje nešto drugačiji obrazac. Kod njih prevladava umjereni inhibicija rasta, naročito bakterija *E. coli* (62,5 % sojeva), *L. innocua* (27,5 % sojeva) i *S. aureus* (12,5 % sojeva), dok su *Pseudomonas* sojevi u potpunosti suzbili rast samo bakterije *L. innocua* (12,5 % sojeva) (Graf 4.3.2B).



Graf 4.3.2. Udio sojeva *Pseudomonas* spp. koji pokazuje antibakterijsko djelovanje prema biljnim i humanim patogenim bakterijama (%)

Utvrđeno je da svi *Pseudomonas* sojevi suzbijaju rast barem jednog od istraživanih patogena. Općenito, sojevi *Pseudomonas* spp. pokazali su se najdjelotvornijima u suzbijanju rasta fitopatogena *E. amylovora* i *A. tumefaciens* te najmanje efikasnim u kontroli rasta humanih patogena *S. aureus* i *S. enterica* (Graf 4.3.2B, Tablica 4.3.1).



Kao najdjelotvorniji pokazao se soj W2-4 (rujan, 2020., *Pseudomonas spp.*). Osim što u potpunosti suzbija rast triju patogena (*L. innocua*, *E. amylovora* i *A. tumefaciens*), soj W2-4 (rujan, 2020.) snažno inhibira i rast bakterija *P. syringae* i *E. coli*. Uz njega se ističu i sojevi W2-1 (rujan, 2020., *P. jessenii*) koji potpuno inhibira bakterije *L. innocua* i *E. amylovora* te snažno inhibira patogene *A. tumefaciens* i *E. coli*, zatim, soj SMS-16 (travanj, 2022., *P. chlororaphis*) koji potpuno inhibira rast bakterija *L. innocua*, *E. amylovora* i *A. tumefaciens* i konačno, SMS-17 (travanj, 2022., *P. chlororaphis*) koji potpuno suzbija rast bakterija *L. innocua* i *A. tumefaciens* te snažno inhibira patogene *E. coli*, *S. aureus* i *E. amylovora*.

Najslabije antibakterijsko djelovanje pokazuje soj S1-8 (travanj, 2022., *Pseudomonas spp.*) koji uopće ne utječe na rast pet patogena (*E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. innocua* i *E. amylovora*) te vrlo slabo inhibira rast tri patogena (*S. enterica*, *P. syringae* i *A. tumefaciens*). Slijedi ga soj SD2-14 (travanj, 2022.) koji također ne utječe na rast pet patogena (*E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. innocua* i *P. syringae*) i slabo suzbija rast dva patogena (*S. enterica* i *A. tumefaciens*) (Tablica 4.3.1).

Tablica 4.3.1. Antibakterijsko djelovanja sojeva *Pseudomonas* spp. (n=40) prema istraživanim patogenim bakterijama (n=8).

Vrijeme uzorkovanja	Soj	Rod/vrsta	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>S. enterica</i> (DSM 14221)	<i>S. aureus</i> (DSM 20231)	<i>B. cereus</i> (DSM 6791)	<i>L. innocua</i> (ATCC 33090)	<i>P. syringae</i> (DSM 10604)	<i>E. amylovora</i> (DSM 50901)	<i>A. tumefaciens</i> (DSM 30205)
Rujan, 2020.	S1-3	<i>P. jessenii</i>	++	-	+	+	++	+	p.i.	+
	S2-6	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	+	+	+	+	+	p.i.	+
	S2-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	+	+	+	++	+	+	+
	S2-10	<i>Pseudomonas</i> spp.	+	-	+	-	+	+	+	+
	S3-1	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	+	+	p.i.	++	+	+	+
	S3-4	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	+	+	+	+	+	p.i.	-
	S3-6	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	-	+	p.i.	++	+	+	+
	S3-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	+	+	+	++	+	++	+
	S4-10	<i>Pseudomonas</i> spp.	+	+	++	+	+	+	+	+
	W1-8	<i>P. putida</i>	+	-	+	+	++	+	+	+
	W1-9	<i>P. chlororaphis</i>	++	-	+	+	+	+	p.i.	+
	W1-10	<i>P. jessenii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	W2-1	<i>P. jessenii</i>	++	+	-	+	p.i.	+	p.i.	++
	W2-3	<i>P. jessenii</i>	++	+	+	+	+	+	+	+
	W2-4	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	+	+	+	p.i.	++	p.i.	p.i.
	W2-5	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	+	++	+	+	+	p.i.	+
	W2-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	+	-	+	++	+	p.i.	++
	W2-10	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	+	+	+	+	+	+	-
Travanj, 2022.	S1-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	+	-	-	-	+	-	+
	S1-15	<i>Pseudomonas</i> spp.	+	-	-	+	+	-	-	+
	S1-16	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	++	+	+	++	+	++	+
	S1-17	<i>Pseudomonas</i> spp.	+	+	-	+	-	+	-	-
	S1-18	<i>Pseudomonas</i> spp.	+	+	+	+	+	+	p.i.	+
	S1-19	<i>P. thivervalensis</i>	+	+	-	+	-	+	+	-
	SD2-2	<i>P. chlororaphis</i>	-	+	+	+	+	+	-	+
	SD2-14	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	+	-	-	-	-	++	+
	SD2-18	<i>P. chlororaphis</i>	+	+	-	-	-	-	+	+

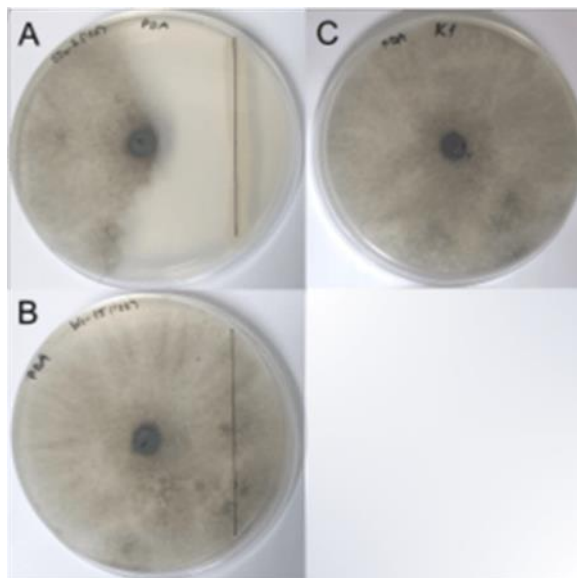
Tablica 4.3.1. Antibakterijsko djelovanja sojeva *Pseudomonas* spp. (n=40) prema istraživanim patogenim bakterijama (n=8) – nastavak.

Vrijeme uzorkovanja	Soj	Rod/vrsta	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>S. enterica</i> (DSM 14221)	<i>S. aureus</i> (DSM 20231)	<i>B. cereus</i> (DSM 6791)	<i>L. innocua</i> (ATCC 33090)	<i>P. syringae</i> (DSM 10604)	<i>E. amylovora</i> (DSM 50901)	<i>A. tumefaciens</i> (DSM 30205)
Travanj, 2022.	SL2-11	<i>P. chlororaphis</i>	++	+	++	+	p.i.	+	++	+
	SL2-17	<i>P. corrugata</i>	++	+	-	+	++	+	++	++
	SL2-18	<i>P. chlororaphis</i>	+	+	+	-	+	-	p.i.	+
	SL2-19	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	+	+	+	+	-	+	+
	SL2-20	<i>P. chlororaphis</i>	++	+	+	+	++	+	p.i.	+
	SMS-16	<i>P. chlororaphis</i>	+	+	+	+	p.i.	+	p.i.	p.i.
	SMS-17	<i>P. chlororaphis</i>	++	+	++	+	p.i.	+	++	p.i.
	SGE-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	+	+	+	+	+	+	+
	W1-4	<i>P. brenneri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	W1-8	<i>P. brenneri</i>	++	+	+	+	+	+	+	+
	W1-9	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	++	-	+	+	+	++	+
	W1-10	<i>P. brenneri</i>	+	+	-	++	+	+	+	+
	W1-15	<i>Pseudomonas</i> spp.	++	+	-	+	+	+	p.i.	+

- = nema inhibicije, + = slaba inhibicija, ++ = umjerena inhibicija, +++ = vrlo jaka inhibicija, p.i. = potpuna inhibicija

#### 4.4. Antifungalno djelovanje sojeva *Pseudomonas* spp.

Antifungalno djelovanje sojeva *Pseudomonas* spp. prema gljivi *B. cinerea* ispitano je metodom dvojnih kultura. Antifungalno djelovanje očituje se kao smanjenje radijalnog rasta odnosno izostanak rasta gljive u smjeru ispitivanog soja (Slika 4.4.1). Što je smanjenje radijalnog rasta veće, to je jače antifungalno djelovanje.



Slika 4.4.1. Antifungalno djelovanje odabranih sojeva *Pseudomonas* spp. na *B. cinerea*. A – *Pseudomonas* spp. SD2 (vidljiva inhibicija); B – *Pseudomonas* spp. W1 (izostanak inhibicije); C - kontrola.

Od 40 ispitanih sojeva, utvrđeno je da 13 sojeva (32,5 %) inhibira rast *B. cinerea*, dok preostali (67,5 %) uopće ne utječu na njezin rast.

Općenito, šest soja (15,0 %) su vrlo jako inhibirali gljivu *B. cinerea* gdje se raspon smanjenja radijalnog rasta kretao od  $84,1 \pm 1,7$  % od  $93,9 \pm 5,2$  %. Među njima, najjače antifungalno djelovanje utvrđeno je kod soja S1-8 (travanj, 2022.) koji smanjuje radijalni rast *B. cinerea* za  $93,9 \pm 5,2$  %, te kod soja SL2-11 (travanj, 2022.) koji smanjuje radijalni fungalni rast za  $90,2 \pm 0,0$  %. Dodatno, pet sojeva (12,5 %) izraženo inhibiraju gljivu *B. cinerea* (raspon smanjenja radijalnog rasta od  $52,0 \pm 0,9$  % do  $59,9 \pm 0,9$  %).

Od sojeva koji pokazuju slabo antifungalno djelovanje, najslabije djelovanje utvrđeno je kod sojeva SMS-16 (travanj, 2022.) čiji postotak inhibicije iznosi  $32,9 \pm 1,7$  %, te SMS-17 (travanj, 2022.) čiji postotak inhibicije iznosi  $36,6 \pm 0,0$  % (Tablica 4.4.1).

Tablica 4.4.1. Antifungalno djelovanje sojeva *Pseudomonas* spp. prema gljivi *B. cinerea*. Za svaki soj (n=40) prikazana je srednja vrijednost postotka inhibicije radialnog fungalnog rasta (%) s pripadajućim standardnim devijacijama.

Vrijeme uzorkovanja	Soj	Rod/vrsta	Inhibicija rasta (%)	
Rujan, 2020.	S1-3	<i>P. jessenii</i>	0,0±0,0 (n.i.)	
	S2-6	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
	S2-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
	S2-10	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
	S3-1	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
	S3-4	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
	S3-6	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
	S3-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
	S4-10	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
	W1-8	<i>P. putida</i>	0,0±0,0 (n.i.)	
	W1-9	<i>P. chlororaphis</i>	53,3±0,9 (++)	
	W1-10	<i>P. jessenii</i>	0,0±0,0 (n.i.)	
	W2-1	<i>P. jessenii</i>	52,0±0,9 (++)	
	W2-3	<i>P. jessenii</i>	0,0±0,0 (n.i.)	
	W2-4	<i>Pseudomonas</i> spp.	57,2±0,9 (++)	
	W2-5	<i>Pseudomonas</i> spp.	59,9±0,9 (++)	
	W2-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	53,3±0,9 (++)	
	W2-10	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
	Travanj, 2022.	S1-8	<i>Pseudomonas</i> spp.	93,9±5,2 (+++)
		S1-15	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)
S1-16		<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
S1-17		<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
S1-18		<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
S1-19		<i>P. thivervalensis</i>	87,8±0,0 (+++)	
SD2-2		<i>P. chlororaphis</i>	85,4±0,0 (+++)	
SD2-14		<i>Pseudomonas</i> spp.	87,8±0,0 (+++)	
SD2-18		<i>P. chlororaphis</i>	0,0±0,0 (n.i.)	
SL2-11		<i>P. chlororaphis</i>	90,2±0,0 (+++)	
SL2-17		<i>P. corrugata</i>	84,1±1,7 (+++)	
SL2-18		<i>P. chlororaphis</i>	0,0±0,0 (n.i.)	
SL2-19		<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
SL2-20		<i>P. chlororaphis</i>	0,0±0,0 (n.i.)	
SMS-16		<i>P. chlororaphis</i>	32,9±1,7 (+)	
SMS-17		<i>P. chlororaphis</i>	36,6±0,0 (+)	
SGE-8		<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
W1-4		<i>P. brenneri</i>	0,0±0,0 (n.i.)	
W1-8		<i>P. brenneri</i>	0,0±0,0 (n.i.)	
W1-9		<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)	
W1-10	<i>P. brenneri</i>	0,0±0,0 (n.i.)		
W1-15	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,0±0,0 (n.i.)		

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

## 5. Rasprava

U ovom radu ispitana je osjetljivost sojeva *Pseudomonas* spp. (n=40) na šest klasa antibiotika, te antimikrobno djelovanje prema biljnim i humanim patogenima. Rezistencija na antibiotike je utvrđena kod 30 (75 %) ispitanih sojeva. Od šest klasa antibiotika, najveći broj sojeva (75 %) pokazuje rezistentnost na monobaktame, dok niti jedan soj nije rezistentan na aminoglikozide i fluorokinolone. Također, važno je napomenuti da soj *P. chlororaphis* SL2-18 pokazuje rezistenciju na barem po jedan antibiotik iz tri različite klase, što ga svrstava u višestruko rezistentne (engl. *Multi-Drug Resistant*, MDR) bakterije.

Iako su brojna istraživanja usredotočena na proučavanje antibiotske rezistencije kod vrste *P. aeruginosa* (Hancock, 1998), dokazano je da i druge vrste roda *Pseudomonas* (*P. putida* i *P. fluorescens*) mogu biti važni izvori rezistencije na antibiotike (Kittinger i sur., 2016). Kittinger i sur. (2016) su u istraživanju uzoraka sakupljenih iz Dunava, potvrdili pojavu rezistentnih i višestruko rezistentnih izolata unutar roda *Pseudomonas*. Najčešća kombinacija rezistencije utvrđena je na meropenem (monobaktami) i piperacilin/tazobaktam (penicilini), te je pronađeno osam izolata koji su višestruko rezistentni. Višestruko rezistentni izolati pripadaju vrstama *P. fluorescens* i *P. putida*. Također, ustanovljeno je da se najmanje rezistentnih sojeva javlja u klasi aminoglikozida. Rezultati istraživanja Kittinger i sur. (2016.) podudaraju se sa rezultatima dobivenim ovim istraživanjem, te je potvrđeno da se rezistencija i višestruka rezistencija javljaju i kod drugih vrsta unutar roda *Pseudomonas*.

Antimikrobno djelovanje *Pseudomonas* spp. procijenjeno je na dva načina u ovom radu, kao antibakterijsko i antifungalno djelovanje. Antibakterijsko djelovanje određeno je prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama koje izazivaju bolesti kod ljudi i biljaka. U ovom istraživanju sojevi *Pseudomonas* spp. pokazali su intenzivnije djelovanje prema Gram negativnim bakterijama u odnosu na Gram pozitivne te su se pokazali djelotvorniji prema biljnim patogenima u odnosu na humane patogene bakterije. Sojevi *Pseudomonas* spp. pokazali su se najdjelotvorniji u suzbijanju *E. amylovora*, pri čemu je 32,5 % sojeva pokazalo potpunu inhibiciju ovog fitopatogena. Najslabije antibakterijsko djelovanje sojevi *Pseudomonas* spp. pokazuju prema patogenu *S. aureus*, pri čemu 12 sojeva uopće ne inhibira rast ove bakterije. Najdjelotvorniji sojevi općenito pokazali su se W2-4 i SMS-16 koji su potpuno inhibirali tri patogena (*L. innocua*, *E. amylovora* i *A. tumefaciens*). Najlošije antibakterijsko djelovanje ustanovljeno je kod soja S1-8 koji ne djeluje na pet patogena (*E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. innocua* i *E. amylovora*), te pokazuje vrlo slabo djelovanje prema tri patogena (*S. enterica*, *P. syringae* i *A. tumefaciens*).

Antimikrobno djelovanje *Pseudomonas* spp. na ljudske patogene dokumentirano je u radu Vollenweider i sur. (2023). Naime, iz nepatogenih fluorescentnih *Pseudomonas* spp. (npr. *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* i *P. chlororaphis*) izolirali su siderofor pioverdin, te su ispitali njegov antimikrobni učinak na sljedeće patogene: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Pioverdin se pokazao učinkovit za suzbijanje *A. baumannii* i

*S. aureus*. Mohan i sur. (2020) su istraživali antimikrobno djelovanje sojeva *Pseudomonas fluorescens* na vrste *Listeria* spp. (*L. monocytogenes*, *L. seelgeri* i *L. innocua*). Tri izolirana soja *P. fluorescens* (PFR46H07, PFR46H08 i PFR46H09) inhibirali su rast svih analiziranih listerija.

U radu autora Li i sur. (2020) ispitano je *in vitro* i *in vivo* antimikrobno djelovanje soja *Pseudomonas mosselli* LWB10 na sojeve *Agrobacterium tumefaciens*. Soj LWB10 pokazao je *in vitro* vrlo snažno antagonističko djelovanje prema sojevima *A. tumefaciens*. Rezultati *in vivo* analize pokazuju da soj LWB10 snažno inhibira stvaranje tumora na stabljici rajčice. Autori Ligon i sur. (2000) smatraju da je za antagonističko i baktericidno djelovanje *Pseudomonas* spp. na *A. tumefaciens* odgovoran metabolit agrocin 84.

U ovom istraživanju, utvrđeno je da 13 sojeva (32,5 %) *Pseudomonas* spp. inhibira rast *B. cinerea*, s time da je najjače antifungalno djelovanje utvrđeno kod soja S1-8 koji smanjuje radialni rast *B. cinerea* za  $93,9 \pm 5,2$  % i SL2-11 soja koji smanjuje radialni fungalni rast za  $90,2 \pm 0,0$  %.

*Pseudomonas* spp. pokazuju antifungalno djelovanje prema različitim fitopatogenim gljivama, uključujući i *B. cinerea*. U radu Maurya i sur. (2014), ispitano je antifungalno djelovanje *P. fluorescens* na fitopatogene gljive *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani* i *Alternaria alternata*. Rezultati istraživanja pokazali su da su tri izolata identificiranih kao *P. fluorescens* značajno inhibirali sve tri patogene gljive. Najdjelotvornije antifungalno djelovanje pokazao je soj *P. fluorescens* 07, prema patogenu *R. solani*. Autori Ligon i sur. (2000), u svom radu antifungalno djelovanje *Pseudomonas* spp. na *B. cinerea* pripisuju djelovanju metabolita pirolnitrina.

Obzirom da su *Pseudomonas* spp. bakterije tla, autori Shahid i sur. (2021) smatraju da je široka paleta antagonističkih metabolita prisutnih kod *Pseudomonas* spp. vezana uz njihovu kompeticiju s ostalim mikroorganizmima tla, posebno fitopatogenim mikroorganizmima.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na mogućnost korištenja sojeva *Pseudomonas* spp. izoliranih iz spilje u kontroli biljnih i humanih patogena budući da su se sojevi *Pseudomonas* spp. korišteni u ovom istraživanju pokazali ne samo vrlo učinkoviti u suzbijanju biljnih i pojedinih humanih patogenih bakterija nego i u suzbijanju fitopatogene gljive *B. cinerea*.

## 6. Zaključci

1. Rep-PCR je odgovarajuća metoda za određivanje unutarvrstne varijabilnosti *Pseudomonas* spp. (n=40) izoliranih iz krške spilje. Najveću unutarvrstnu varijabilnost pokazuje *P. chlororaphis*, gdje sličnost varira od 50,5 do 100,0 %.
2. Najveći broj sojeva (75 %) je rezistentan na monobaktame, a jedan je izolat *P. chlororaphis* SL2-18 rezistentan na tri klase antibiotika te spada u višestruko rezistentne sojeve.
3. Analizirani sojevi *Pseudomonas* spp. (n=40) pokazuju antibakterijsko djelovanje prema barem jednom biljnom (n=4) ili humanom (n=5) patogenu.
4. Analizirani sojevi *Pseudomonas* spp. uspješnije inhibiraju Gram negativne u odnosu na Gram pozitivne bakterije, te biljne u odnosu na humane patogene.
5. Najdjelotvornije antibakterijsko djelovanje općenito pokazuju sojevi *Pseudomonas* spp. W2-4 i SMS-16, koji u potpunosti inhibiraju tri patogena (*L. innocua*, *E. amylovora* i *A. tumefaciens*).
6. Najdjelotvornije antifungalno djelovanje pokazuju sojevi *Pseudomonas* spp. S1-8 i *P. chlororaphis* SL2-11 koji smanjuju radialni rast *B. cinerea* za  $93,9 \pm 5,2$  % i  $90,2 \pm 0,0$  %.



## 7. Popis literature

1. Adler J., Templeton B. (1967). The Effect of Environmental Conditions on the Motility of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 46(2), pp. 175 – 184. doi: 10.1099/00221287-46-2-175
2. Ali S., Hameed S., Shahid M., Iqbal M., Lazarovits G., Imran A. (2020). Functional characterization of potential PGPR exhibiting broad-spectrum antifungal activity. *Microbiological Research*. 232: 126389.
3. Allocati N., Masulli M., Alexeyev M., Di Ilio C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), pp. 6235 – 6254. doi:10.3390/ijerph10126235
4. Andino A., Hanning I. (2015). *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *The Scientific World Journal*, pp. 1 – 16. doi:10.1155/2015/520179
5. Bauer A. W., Perry D. M., Kirby W. M. M. (1959). Single disc antibiotic sensitivity testing of *Staphylococci*. *AMA Archives of Internal Medicine*. 104(2), pp. 208 – 216.
6. Bergey D. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9. izdanje. Lippincott Williams & Wilkins, USA, pp. 74.
7. Bhunia A. K. (2018). *Salmonella enterica*. *Food Science Text Series*, pp. 271 – 287. doi:10.1007/978-1-4939-7349-1\_15
8. Bi K., Liang Y., Mengiste T., Sharon A. (2022). Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in Plant Science*, 28(2), pp. 211 – 222.
9. Bottone E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), pp. 382 – 398. doi:10.1128/cmr.00073-09
10. Bourras S., Rouxel T., Meyer M. (2015). *Agrobacterium tumefaciens* Gene Transfer: How a Plant Pathogen Hacks the Nuclei of Plant and Nonplant Organisms. *Phytopathology*, 105(10), pp. 1288 – 1301. doi:10.1094/phyto-12-14-0380-rvw
11. CLSI (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania, SAD.

12. Dierick K., Coillie E. van., Swiecicka I., Meyfroidt G., Devlieger H., Meulemans A., Hoedemaekers G., Fourie L., Heyndrickx M., Mahillon J. (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of clinical microbiology*, 43(8), pp. 4277 – 4279.
13. 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. *Beneficial Microbes*. 5(3), pp. 263 – 272.
14. Donat V., Biosca E. G., Rico A., Penalver J., Borrueal M., Berra D., Basterretxea T., Murrilo J., Lopez M. M. (2005). *Erwinia amylovora* strains from outbreaks of fire blight in Spain: phenotypic characteristics. *Annals of Applied Biology*, 146(1), pp. 105 – 114. doi:10.1111/j.1744-7348.2005.04079.x
15. Ehling-Schulz M., Knutsson R., Scherer S. (2010). *Bacillus cereus*. In: *Genomes of foodborne and waterborne pathogens* (P. Fratamico, Y. Liu i S. Kathariou, ed), pp.147 – 164.
16. Escobar M. A., Dandekar A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8(8), pp. 380 – 386. doi:10.1016/s1360-1385(03)00162-6
17. Espino J. J., Gutiérrez-Sánchez G., Brito N., Shah P., Orlando R., González C. (2010). The *Botrytis cinerea* early secretome. *PROTEOMICS*, 10(16), pp. 3020 – 3034. doi:10.1002/pmic.201000037
18. Fernandes M. S., Cruz A. G., Dias Arroyo D. M., Faria J. de A. F., Cristianini M., Sant'Ana A. S. (2013). On the behavior of *Listeria innocua* and *Lactobacillus acidophilus* co-inoculated in a dairy dessert and the potential impacts on food safety and product's functionality. *Food Control*, 34(2), pp. 331 – 335. doi:10.1016/j.foodcont.2013.04.040
19. Foster T. J. (2002). *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medical Microbiology*, pp. 839 – 888. doi:10.1016/b978-012677530-3/50258-0
20. Gherardi G., Di Bonaventura G., Savini V. (2018). *Staphylococcal Taxonomy. Pet-To-Man Travelling Staphylococci*, pp. 1 – 10. doi:10.1016/b978-0-12-813547-1.00001-7
21. Ghogale S., Pathak K. (2023). Occurrence of Gram-negative bacterial pathogens that are Section A-Research paper multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR), and pan-drug-resistant (PDR) In an Indian tertiary care hospital. *European Chemical Bulletin* 2023, 12 (S3), pp. 5271 – 5275

22. Ghosh S., Kuisiene N., Cheeptham N. (2017). The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? *Biochemical Pharmacology*, 134, pp. 18 – 34. doi:10.1016/j.bcp.2016.11.018
23. Gill M. M., Usman J., Kaleem F., Hassan A., Khalid A., Anjum R., Fahim Q. (2010). Frequency and AntibioGram of Multi-drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, Vol. 21(9), pp. 531 – 534.
24. Halupecki E., Bazzi C., Jock S., Geider K., Đermić D., Cvjetković B. (2006). Characterization of *Erwinia amylovora* Strains from Croatia. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), pp. 435 – 440. doi:10.1007/s10658-006-0003-7
25. Hancock R. E. W. (1998). Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 27(s1), pp. 93 – 99. doi:10.1086/514909
26. Hiett K. L., Seal B. S. (2009). Use of Repetitive Element Palindromic PCR (rep-PCR) for the Epidemiologic Discrimination of Foodborne Pathogens. *Molecular Epidemiology of Microorganisms*, pp. 49 – 58. doi:10.1007/978-1-60327-999-4\_5
27. Hirano S. S., Upper C. D. (1990). Population Biology and Epidemiology of *Pseudomonas Syringae*. *Annual Review of Phytopathology*, 28(1), pp. 155 – 177. doi:10.1146/annurev.py.28.090190.001103
28. Hrvatska agencija za okoliš i prirodu, HAOP (2017). Staništa i ekosustavi: špiljsko stanište. Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja, Zavod za zaštitu okoliša i prirode, web stranica: <https://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/stanista-i-ekosustavi/spiljska-stanista>, [pristupljeno: 10.7.2023.]
29. Ishii S., Sadowsky M. J. (2009). Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental Microbiology*, 11(4), 733 – 740. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01856.x
30. Ivanović M., Šević M., Obradović A. (2022). Bakterioze jabuke. *Biljni lekar*, 50(6), pp. 493 – 508.

31. Joshi M., Deshpande J. D. (2011). . Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), pp. 81 – 97. doi:10.7439/ijbr.v2i1.83
32. Josić J. (2020). Antibiotiska rezistencija: prošlost, sadašnjost i buduće strategije. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
33. Jovanovic J., Ornelis V. F. M., Madder A., Rajkovic A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), pp. 3719 – 3761. doi:10.1111/1541-4337.12785
34. Kadariya J., Smith T. C., Thapaliya D. (2014). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International*, pp. 1 – 9. doi:10.1155/2014/827965
35. Kittinger C., Lipp M., Baumert R., Folli B., Koraimann G., Toplitsch D., Liebmann A., Grisold A. J., Farnleitner A. H., Kirschner A., Zarfel G. (2016). Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube. *Frontiers in Microbiology*, 7, 586. doi:10.3389/fmicb.2016.00586
36. Kočmar V. (2021). Bakterije roda *Agrobacterium* i njihov značaj u biotehnologiji. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.
37. Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, 2(2), pp. 189 – 198. doi:10.1016/s1286-4579(00)00269-0
38. Li W., Wang J., Jiang X., Zhu Q., He Y., Fu T., Wang Z. (2020). Identification and Characterization of a *Pseudomonas mosselii* strain and its Antibacterial Function against *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Science* 4(2), pp. 223 – 231. doi: 10.25177/JPS.4.2.RA.10701
39. Ligon J. M., Hill D. S., Hammer P. E., Torkewitz N. R., Hofmann D., Kempf H. J., van Pée K. H. (2000). Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science*, 56(8), pp. 688 – 695. doi:10.1002/1526-4998(200008)56:8<688::aid-ps186>3.0.co;2-v
40. Lavoie K. H., Winter A. S., Read K. J. H., Hughes E. M., Spilde M. N., Northup D. E. (2017). Comparison of bacterial communities from lava cave microbial mats to overlying surface soils from Lava Beds National Monument, USA.

41. Luczkiewicz A., Kotlarska E., Artichowicz W., Tarasewicz K., Fudala-Ksiazek S. (2015). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), pp. 19823 – 19834. doi:10.1007/s11356-015-5098-y
42. Lues J. F. R., Van Tonder I. (2007). The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group, *Food Control*, 18(4), pp. 326 – 332.
43. Lund T., De Buyser M. L., Granum P. E. (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular microbiology*, 38(2), pp. 254 – 261.
44. Mahler H., Pasi A., Kramer J. M., Schulte P., Scoging A. C., Bär W., Krähenbühl S. (1997). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New England Journal of Medicine*, 336(16), pp. 1142 – 1148.
45. Makvana S., Krilov L. R. (2015). *Escherichia coli* Infections. *Pediatrics in Review*, 36(4), pp. 167 – 171. doi: 10.1542/pir.36-4-167
46. Maurya M. K., Singh R., Tomer A. (2014). In vitro evaluation of antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* against fungal pathogen. *JBiopest* 7(1), pp. 43-46
47. Mehmood N., Saeed M., Zafarullah S., Hyder S., Rizvi Z.F., Gondal A.S., Jamil N., Iqbal R., Ali B., Ercisli S., Kupe M., (2023). Multifaceted Impacts of Plant-Beneficial *Pseudomonas* spp. in Managing Various Plant Diseases and Crop Yield Improvement. *ACS omega*, 8(25), pp. 22296-22315. doi: 10.1021/acsomega.3c00870
48. Mercado-Blanco J., Bakker P. A. (2007). Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92, pp. 367 – 389. doi: 10.1007/s10482-007-9167-1
49. Meštrović T. (2015). *Escherichia coli*. *PLIVAzdravlje*. Dostupno na: <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/26315/Escherichia-coli.html> [pristupljeno: 28.6.2023.]

50. Milillo S. R., Friedly E. C., Saldivar J. C., Muthaiyan A., O'bryan C., Crandall P. G., Johnson M. G., Ricke S. C. (2012). A Review of the Ecology, Genomics, and Stress Response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(8), pp. 712 – 725. doi:10.1080/10408398.2010.507909
51. Mohan V., Fletcher G., Leroi F. (2020). In-vitro evaluation of *Pseudomonas fluorescens* antibacterial activity against *Listeria* spp. isolated from New Zealand horticultural environments. bioRxiv. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.03.183277>
52. Narodne novine (2021). Pravilnik o popisu stanišnih tipova. Zagreb: Narodne novine d.d., 27(588), pp. 1 – 7.
53. Orsi R. H., Wiedmann M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), pp. 5273 – 5287. doi:10.1007/s00253-016-7552-2
54. Păcurar D. I., Thordal-Christensen H., Păcurar M. L., Pamfil D., Botez C., Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), pp. 76 – 81. doi:10.1016/j.pmp.2011.06.004
55. Perrin M., Bemer M., Delamare C. (2003). Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), pp. 5308 – 5309. doi:10.1128/jcm.41.11.5308-5309.2003
56. Piqué N., Miñana-Galbis D., Merino S., Tomás J. (2015). Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), pp. 12836 – 12854. doi:10.3390/ijms160612836
57. Rocha K. R., Perini H. F., Souza C. M. de., Schueler J., Tosoni N. F., Furlaneto M. C., Furlaneto-Maia L. (2019). Inhibitory effect of bacteriocins from enterococci on developing and preformed biofilms of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria innocua*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, pp. 1 – 11.
58. Shahid I., Han J., Hardie D., Baig D. N., Malik K. A., Borchers C. H., Mehnaz S. (2021). Profiling of antimicrobial metabolites of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. isolated from different plant hosts. *3 Biotech*, 11(2). doi:10.1007/s13205-020-02585-8

59. Strateva T., Yordanov D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology*, 58(9), pp.1133 – 1148. doi: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
60. Stenfors Arnesen L. P., Fagerlund A., Granum P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), pp. 579 – 606. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x
61. Subedi D., Vijay A. K., Willcox M. (2018). Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective, *Clinical and Experimental Optometry*, 101(2), pp. 162 – 171. doi: 10.1111/cxo.12621
62. Swaminathan B., Gerner-Smidt P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10), pp. 1236 – 1243. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.011
63. Švec P., Vancanneyt M., Seman M., Snauwaert C., Lefebvre K., Sedláček I., Swings J. (2005). Evaluation of (GTG) 5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 247(1), pp. 59 – 63.
64. 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*. 8: e9103.
65. Tong S. Y. C., Davis J. S., Eichenberger E., Holland T. L., Fowler V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), pp. 603 – 661. doi:10.1128/cmr.00134-14
66. Van Elsas J. D., Semenov A. V., Costa R., Trevors J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal*, 5(2), pp. 173 – 183. doi: 10.1038/ismej.2010.80
67. Vollenweider V., Rehm K., Chepkirui C., Pérez-Berlanga M., Polymenidou M., Piel J., Bigler L., Kümmerli R. (2023). Antimicrobial activity of iron-depriving pyoverdines against human opportunistic pathogens. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/2023.07.18.549568>
68. White W. B., Culver D. C. (2012). *Encyclopedia of Caves*, 2. izdanje. Academic Press, Oxford, pp. 490 – 499.

69. Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., Kan J. A. L. van. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), pp. 561 – 580. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x
70. Wright G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology*, 8(123), pp. 1 – 6. doi:10.1186/1741-7007-8-123
71. Xin X. F., Kvitko B., He S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), pp. 316 – 328. doi:10.1038/nrmicro.2018.17



## Životopis

Marta Sobota je rođena 15. studenog 1998. godine u Zagrebu. Osnovnu školu je pohađala u Osnovnoj školi Medvedgrad od 2005. do 2013. godine nakon čega upisuje Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga, smjer ekološki tehničar. Osnovnu glazbenu školu je pohađala u Glazbenoj školi Ladislava Račića – Rock akademiji od 2015. do 2020. godine, smjer gitara. Tijekom osnovnog i srednjoškolskog obrazovanja je stekla stupanj A2 razine njemačkog jezika te C1 razine engleskog jezika. Bila je član Hrvatskog Seljačkog Pjevačkog Društva – HSPD Sljeme „Šestine“ u sekcijama: dječji folklor, folklor, tamburaši i švelje. Trenirala je taekwondo i dosegla crni pojas 1. DAN. Posjeduje vještine rada na računalu i korištenja programskih alata. 2017. godine upisuje preddiplomski sveučilišni studij Agroekologija na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kojeg završava 2021. godine nakon čega upisuje diplomski studij Agroekologija na istom Sveučilištu.