

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivica Z. Dimkić

**KARAKTERIZACIJA ANTIMIKROBNIH  
SUPSTANCI PRIRODNIH IZOLATA  
*Bacillus* sp. ZA PRIMENU U BIOLOŠKOJ  
KONTROLI FITOPATOGENIH  
BAKTERIJA I GLJIVA**

Doktorska Disertacija

BEOGRAD, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivica Z. Dimkić

**CHARACTERIZATION OF  
ANTIMICROBIAL SUBSTANCES FROM  
NATURAL ISOLATES OF *Bacillus* sp.  
FOR APPLICATION IN BIOLOGICAL  
CONTROL OF PLANT PATHOGENIC  
BACTERIA AND FUNGI**

Doctoral Dissertation

BELGRADE, 2015

## MENTOR I ČLANOVI KOMISIJE

### Mentor:

---

dr Slaviša Stanković  
vanredni profesor Biološkog fakulteta,  
Univerziteta u Beogradu

### Članovi komisije:

---

dr Tanja Berić  
docent Biološkog fakulteta,  
Univerziteta u Beogradu

---

dr Đorđe Fira  
redovni profesor Biološkog fakulteta,  
Univerziteta u Beogradu

---

dr Jelena Lozo  
vanredni profesor Biološkog fakulteta,  
Univerziteta u Beogradu

---

dr Tatjana Stević  
naučni saradnik Instituta Za Proučavanje  
Lekovitog Bilja "Dr Josif Pančić" iz Beograda

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo i u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu. Ovom prilikom želim da se zahvalim:*

*Mentoru prof. dr Slaviši Stankoviću, koji prati moj naučni rad od samog početka, za uvođenje u svet mikrobiologije i na ukazanom poverenju, na stručnim savetima i diskusijama tokom izrade rada, kao i na sugestijama tokom pisanja i kritičkoj oceni teze. Veliko Vam hvala šefe na svemu, što se učinili za mene.*

*Doc. dr Tanji Berić na neposrednoj i neprocenljivoj pomoći i savetima kako tokom esperimentalne izrade ovog rada, tako i u toku pisanja. Veliku zahvalnost joj dugujem na vremenu i trudu za uloženo vreme u tumačenju rezultata, kao i u kritičkoj oceni teze koja je dosta pomogla pri finalnom oblikovanju iste.*

*Prof. dr Đorđu Firi na ukazanom poverenju i prilici da postanem član važnog naučnog projekta, na pomoći i savetima tokom esperimentalne izrade rada, na tumačenju dobijenih rezultata i na kritičkoj oceni teze.*

*Prof. dr Jeleni Lozo na nesebičnoj pomoći, savetima i korisnim sugestijama, kao i na kritičkoj oceni teze.*

*Dr Tatjani Stević na nesebičnoj i neprocenljivoj pomoći, uloženom trudu i vremenu tokom esperimentalne izrade ove teze, kao i na kritičkoj oceni iste. Dugujem joj veliku zahvalnost za prijatno vreme provedeno tokom zajedničkog rada u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, kao i na svim prijateljskim savetima u teškim trenucima.*

*Posebno želim da se zahvalim kolegama sa Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu, dr Veljku Gavriloviću, dr Žarku Ivanoviću i dr Svetlani Živković na ukazanoj nesebičnoj pomoći i trudu koji su uložili tokom izrade ovog rada, kao i na obezbeđivanju prirodnih fitopatogenih izolata na kojima je veliki deo teze i baziran.*

*Velikom kolektivu i dr Milanu Kojiću, rukovodiocu Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju, dugujem veliku zahvalnost za nesebičnu pomoć i savete u svakom trenutku tokom esperimentalne izrade ove teze.*

*Ovom prilikom se zahvaljujem i koleginicama iz Laboratorije za fizičku hemiju, dr Marijani Petković i Mariji Nišavić, na ukazanoj pomoći tokom izvođenja dela eksperimentalnog rada u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“.*

*Zahvaljujem se i dr Jasmini Nikodinović-Runić, dr Sandri Vojnović i dr Aleksandru Paviću, na velikoj pomoći i savetima tokom izvođenja dela eksperimentalnog rada u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.*

*Posebnu zahvalnost dugujem i dr Marini Soković i dr Snežani Pavlović, na pruženim savetima i uvođenju u svet gljiva.*

*Veliku zahvalnost dugujem i dr Petru Ristivojeviću, na svestranoj pomoći i savetima tokom eksperimentalnog dela rada.*

*Svim članovima Katedre za mikrobiologiju dugujem zahvalnost za kolegijalni i prijateljski odnos tokom svakodnevnog rada.*

*Želeo bih da se posebno zahvalim i dragim kolegama Goranu Vukotiću, Diani Šević, Ivanu Nikoliću i Tamari Janakiev za nesebičnu pomoć u eksperimentalnom radu. Kolegama dr Stoimiru Kolareviću, Karolini Sunjog, Bojani Jovanović i Jovani Kostić dugujem zahvalnost za kolegijalnost i prijateljsko radno okruženje u laboratoriji i van nje.*

*Na kraju, najveću zahvalnost dugujem mojoj majci Olgi i bratu Stefanu, za svu pruženu moralnu podršku, razumevanje i ljubav za sve trenutke moga života. Podjednaku zahvalnost dugujem i mojoj Milici, za razumevanje, istrajnost, energiju i ljubav koju bezrezervno i stalno dobijam od nje. Najlepše hvala na svemu.*

*Ovaj rad posvećujem svom ocu Zoranu, osobi kojoj bih prvo pokazao, da mogu...*

## Karakterizacija antimikrobnih supstanci prirodnih izolata *Bacillus* sp. za primenu u biološkoj kontroli fitopatogenih bakterija i gljiva

### Rezime

Bolesti biljaka izazvane infekcijama patogenim bakterijama i gljivama mogu dovesti do smanjenja kapaciteta biljnog rasta ili naneti mnogo ozbiljniju štetu dovodeći do smrti biljaka i značajnih gubitaka u proizvodnji hrane. Veliki broj istraživanja je u poslednje vreme posvećen proučavanju roda *Bacillus* kao producenta sekundarnih metabolita u kontroli različitih biljnih patogena.

Analizom diverziteta gena odgovornih za produkciju neribozomalno sintetisanih lipopeptida kolekcije od 205 *Bacillus* sp. izolata utvrđeno je da je za najveći broj izolata (171) ustanovljen DNK fragment očekivane dužine, koji odgovara bacilomicin D sintetazi, dok su u sličnom broju izolata dobijeni fragmenti očekivanih dužina za kurstakinske (154) i surfaktinske operone (142), a prisustvo iturinskog operona ustanovljeno je kod 84, odnosno 59 izolata u slučaju gena za fengicin sintetazu. Prisustvo svih pet biosintetičkih operona je potvrđeno kod 11 izolata.

Najveća produkcija antimikrobnih jedinjenja za pet izabranih izolata je pokazana u ekspanzionalnoj ili ranoj stacionarnoj fazi rasta. Prikazan je jak antifungalni efekat lipopeptidnih ekstrakata prema više od 30 testiranih gljiva, sa najnižim zabeleženim minimalnim inhibitornim koncentracijama od 0,008 mg/ml protiv *Fusarium semitectum*, kao i izražen antibakterijski potencijal, naročito protiv fitopatogenih vrsta rodova *Xanthomonas* i *Pseudomonas*, sa najnižom minimalnom inhibitornom koncentracijom od 0,06 mg/ml. Proučavanje interakcija pojedinačnih lipopeptidnih ekstrakata u međusobnim, kao i u kombinacijama sa etarskim uljima, ukazalo je na postojanje sinergističkog efekta za neke kombinacije u *in vitro*, odnosno aditivnog efekta u *in situ* uslovima, na bakterijskim i fungalnim patogenima. Utvrđivanjem direktnog antagonističkog efekta lipopeptidnih jedinjenja *in planta*, ustanovljena je značajna redukcija nekroze tkiva listova *Arabidopsis thaliana* L. i *Beta vulgaris* L., tretiranih bakterijskim patogenima. Takođe, u *in situ* uslovima postignuta je značajna redukcija nekroze tkiva ploda jabuke izazvana fungalnom infekcijom.

Strukturna karakterizacija lipopeptidnih jedinjenja iz različitih ekstrakata pokazala je njihovu raznolikost i dominantno prisustvo članova iturinske i surfaktinske familije. Takođe, masenom analizom je utvrđeno da etil-acetatna ekstrakcija daje najbolji prinos, a primenom bioautografije, došlo se do zaključka da su za antimikrobni efekat lipopeptidnih ekstrakata najverovatnije odgovorna jedinjenja iz iturinske familije.

Filogenetska rekonstrukcija odabranih *Bacillus* sp. izolata bazirana na sekvenci gena za 16S rRNK je pokazala da izolati SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 i SS-38.4 pokazuju najviše sličnosti sa *Bacillus amyloliquefaciens*, odnosno *Bacillus pumilus* u slučaju izolata SS-10.7.

**Ključne reči:** *Bacillus*; lipopeptidna jedinjenja; biološka kontrola; antimikrobna aktivnost; sinergizam.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Biologija mikroorganizama

**UDK broj:** [[577.112.85:579.852.11]:579.264]:632.937(043.3)

## **Characterization of antimicrobial substances from natural isolates of *Bacillus* sp. for application in biological control of plant pathogenic bacteria and fungi**

### **Abstract**

Plant diseases caused by infection with pathogenic bacteria and fungi can lead to the reduction in the capacity of plant growth or can cause far more serious damage, leading to the death of plants and significant losses in food production. Numerous recent studies are devoted to the genus *Bacillus* as a producer of secondary metabolites in the control of different plant pathogens.

In the analysis of diversity of genes responsible for the nonribosomal synthesized lipopeptides in collections of 205 *Bacillus* sp. isolates, for the largest number of isolates (171) the DNA PCR fragment of the expected length, corresponding to bacillomycin D synthases was obtained, while in a similar number of isolates fragments of the expected length for kurstakin (154) and surfactin operons (142) were obtained. The presence of iturin operon in the 84 or 59 isolates in the case of the gene for fengycin synthetase, was also found. The presence of all five biosynthetic operons in the 11 isolates was confirmed as well.

The maximum production of antimicrobial compounds for five selected isolates in exponential or early stationary phase of growth was determined. Strong antifungal effect of lipopeptide extracts towards more than 30 fungi tested, with lowest recorded minimal inhibitory concentrations of 0,008 mg/ml against *Fusarium semitectum*, as well as expressed antibacterial potential, in particular against phytopathogenic species of the genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas*, with the lowest minimum inhibitory concentration of 0,06 mg/ml was determined. In the analysis of the interaction of individual lipopeptide extracts mutually, as well as in combination with essential oils, the existence of a synergistic effect *in vitro* respectively additive effect *in situ*, on bacterial and fungal pathogens, for some combinations were shown. Establishing a direct antagonistic effect of lipopeptide compounds *in planta*, significant reduction in necrotic lesions of leaves of *Arabidopsis thaliana* L. and *Beta vulgaris* L. treated with bacterial pathogens was obtained. Also, a significant reduction in necrotic lesions of apple fruit caused by fungal infection *in situ* was determined.



Structural characterization of lipopeptide compounds from different extracts showed their diversity and dominant presence of members of iturin and surfactin families. Also, mass analysis revealed that the ethyl acetate extraction has been most efficient procedure with the highest yield of isolated lipopeptides. Simultaneously, applying bioautography, it was concluded that compounds from iturin family were most likely responsible for the antimicrobial effect of lipopeptide extracts.

Phylogenetic reconstructions of selected *Bacillus* sp. isolates based on sequence of 16S rRNA gene showed that isolates SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 and SS-38.4 were the most related to *Bacillus amyloliquefaciens*, or *Bacillus pumilus* for SS-10.7 isolate.

**Keywords:** *Bacillus*; lipopeptides; biological control; antimicrobial activity; synergism.

**Research field:** Biology

**Specific research field:** Microbial biology

**UDK No.:** [[577.112.85:579.852.11]:579.264]:632.937(043.3)

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>BIOLOŠKA KONTROLA, RAZVOJ I PREDNOSTI BIOPESTICIDA .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	ROD <i>BACILLUS</i> KAO IZVOR BIOPESTICIDA .....	3
1.1.2	MEHANIZMI DELOVANJA BIOKONTROLNIH AGENASA .....	6
1.1.2.1	Kompeticija za nišu i nutrijente.....	6
1.1.2.2	Direktna inhibicija fitopatogena produkcijom antimikrobnih jedinjenja.....	7
1.1.2.3	Indukcija sistemske rezistentnosti biljke domaćina.....	10
<b>1.2</b>	<b>PRODUKCIJA ANTIMIKROBNIH SUPSTANCI.....</b>	<b>11</b>
1.2.1	BAKTERIOCINI I BAKTERIOCINIMA-SLIČNE INHIBITORNE SUPSTANCE .....	12
1.2.1.1	Klasifikacija bakteriocina roda <i>Bacillus</i> .....	13
1.2.2	RAZNOVRSNOST NERIBOZOMALNO SINTETISANIH BIOAKTIVNIH PEPTIDA.....	15
1.2.3	BIOSINTEZA LIPOPEPTIDA .....	23
1.3	PERSPEKTIVE BIOKONTROLE.....	29
<b>2</b>	<b>CILJEVI RADA .....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIJAL .....</b>	<b>33</b>
3.1.1	BAKTERIJSKI SOJEVI .....	33
3.1.2	FUNGALNI PATOGENI I SAPROFITNI SOJEVI .....	35
3.1.3	MEDIJUMI ZA GAJENJE BAKTERIJA I GLJIVA.....	36
<b>3.2</b>	<b>METODE.....</b>	<b>38</b>
3.2.1	METODE RADA SA BAKTERIJAMA .....	38
3.2.1.1	Određivanje antibakterijske aktivnosti <i>in vitro</i> .....	38
3.2.1.2	Određivanje krive rasta i produkcije antimikrobnih supstanci .....	38
3.2.1.3	Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija.....	39
3.2.1.4	Određivanje tipa interakcija ekstrakata .....	40
3.2.1.5	<i>In vitro</i> određivanje kinetike rasta patogenih bakterija u prisustvu ekstrakata.....	41
3.2.1.6	<i>In planta</i> određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata na model sistemima <i>Arabidopsis thaliana</i> L. i <i>Beta vulgaris</i> L. ....	41
3.2.1.7	Biohemijska identifikacija <i>Bacillus</i> sp. ....	42
3.2.2	METODE RADA SA GLJIVAMA.....	43
3.2.2.1	Identifikacija gljiva .....	43
3.2.2.2	<i>In vitro</i> određivanje antifungalne aktivnosti.....	43
3.2.2.3	<i>In vitro</i> određivanje antifungalne aktivnosti lipopeptidnih ekstrakata i potencijalnog sinergizma sa etarskim uljima .....	44
3.2.2.4	Pripremanje spora gljiva za mikrodilucionu metodu i biokontrolne testove .....	45
3.2.2.5	<i>In vitro</i> određivanje minimalnih inhibitornih i fungicidnih koncentracija .....	45

3.2.2.6	Određivanje tipa interakcija ekstrakata .....	46
3.2.2.7	Određivanje uticaja etil-acetatnih ekstrakata na morfologiju hifa gljiva.....	46
3.2.2.8	Određivanje uticaja etil-acetatnog ekstrakata na redukciju nekroze ploda jabuke <i>in planta</i> .....	47
3.2.2.9	Određivanje uticaja etarskih ulja, supernatanta i ekstrakta na klijavost i inficiranost semena nevena <i>in situ</i> .....	47
3.2.3	METODE RADA SA DNK .....	48
3.2.3.1	Izolovanje ukupne DNK.....	48
3.2.3.2	Umnožavanje fragmenata DNK metodom PCR.....	49
3.2.3.3	Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu .....	51
3.2.3.4	Prečišćavanje DNK fragmenata .....	51
3.2.3.5	Filogenetske analize .....	51
3.2.4	METODE IZOLACIJE, PREČIŠĆAVANJA I DETEKCIJE ANTIMIKROBNIH SUPSTANCI .....	52
3.2.4.1	Izolacija lipopeptidnih jedinjenja etil-acetatnom ekstrakcijom .....	52
3.2.4.2	Izolacija lipopeptidnih jedinjenja kombinacijom kiselinske precipitacije i ekstrakcije metanolom.....	52
3.2.4.3	Reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi (HPLC).....	53
3.2.4.4	Analize masene spektrometrije (MS) .....	53
3.2.4.5	Visokoefikasna tankoslojna hromatografija lipopeptidnih ekstrakata sa indirektnom bioautografskom metodom.....	54
3.2.5	STATISTIČKE ANALIZE .....	56
<b>4</b>	<b>REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>IZOLOVANJE I PRELIMINARNA DETERMINACIJA <i>Bacillus sp.</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2</b>	<b>IZOLOVANJE I DETERMINACIJA GLJIVA .....</b>	<b>58</b>
<b>4.3</b>	<b>PROIZVODNJA I DETEKCIJA ANTIMIKROBNIH SUPSTANCI.....</b>	<b>58</b>
4.3.1	BIOSINTETSKI OPERONI.....	59
4.3.2	<i>IN VITRO</i> ANTIMIKROBNI SPEKTAR IZOLATA .....	65
4.3.3	DINAMIKA SINTEZE ANTIMIKROBNIH SUPSTANCI ODABRANIH IZOLATA .....	70
4.3.4	<i>IN VITRO</i> ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG EFEKTA LIPOPEPTIDNIH EKSTRAKATA ODABRANIH IZOLATA.....	82
4.3.5	<i>IN VITRO</i> ODREĐIVANJE TIPRA INTERAKCIJA I MINIMALNIH INHIBITORNIH, BAKTERICIDNIH I FUNGICIDNIH KONCENTRACIJA LIPOPEPTIDA.....	89
4.3.6	UTVRĐIVANJE POTENCIJALNOG SINERGISTIČKOG EFEKTA SS-12.6 I ETARSKIH ULJA NA RAST FITOPATOGENIH GLJIVA <i>IN VITRO</i> I NA KLIJAVOST I INFICIRANOST SEMENA NEVENA <i>IN SITU</i> .....	102
4.3.7	<i>IN PLANTA</i> UTVRĐIVANJE PROTEKTIVNOG EFEKTA LIPOPEPTIDNIH EKSTRAKATA.....	111

4.3.8	IZOLACIJA I PREČIŠČAVANJE LIPOPEPTIDNIH EKSTRAKATA I NJIHOVA KARAKTERIZACIJA MASENOM SPEKTROMETRIJOM .....	120
4.3.9	ANALIZA I DETEKCIJA ANTIMIKROBNIH KOMPONENATA IZ LIPOPEPTIDNIH EKSTRAKATA VISOKOEFIKASNOM TANKOSLOJNOM HROMATOGRAFIJOM (HPTLC) PRAČENOM INDIRECTNOM BIOAUTOGRAFIJOM .....	134
<b>4.4</b>	<b>BIOHEMIJSKE I FILOGENETSKE ANALIZE.....</b>	<b>143</b>
<b>5</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>148</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>152</b>
<b>7</b>	<b>PRILOZI .....</b>	<b>180</b>
	<b>Prilog 1.</b> Detekcija biosintetskih operona kod <i>Bacillus</i> sp. izolata poreklom iz sena i slame.....	180
	<b>Prilog 2.</b> Detekcija biosintetskih operona kod <i>Bacillus</i> sp. izolata poreklom iz đubriva. ....	181
	<b>Prilog 3.</b> Detekcija biosintetskih operona kod <i>Bacillus</i> sp. izolata poreklom iz zemljišta.....	183
	<b>Prilog 4.</b> Elektroforeza PCR produkata određenih izolata <i>Bacillus</i> sp. za <i>bamC</i> gen bacilomicin D sintetazu.....	186
	<b>Prilog 5.</b> Elektroforeza PCR produkata određenih izolata <i>Bacillus</i> sp. za <i>fenD</i> gen fengicin sintetazu. ....	187
	<b>Prilog 6.</b> Elektroforeza PCR produkata određenih izolata <i>Bacillus</i> sp. za delove iturinskog operona. ....	188
	<b>Prilog 7.</b> Elektroforeza PCR produkata određenih izolata <i>Bacillus</i> sp. za <i>sfp</i> gen surfaktin sintetazu. ....	189
	<b>Prilog 8.</b> Elektroforeza PCR produkata određenih izolata <i>Bacillus</i> sp. za kurstakinski operon. ....	190
	<b>Prilog 9.</b> MALDI-TOF maseni spektar LB medijuma u vidu pozitivne kontrole.....	191
	<b>Prilog 10.</b> MALDI-TOF maseni spektar supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-10.7. ..	192
	<b>Prilog 11.</b> MALDI-TOF maseni spektar supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-27.2. ..	193
	<b>Prilog 12.</b> MALDI-TOF maseni spektar supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-38.4. ..	194
	<b>Prilog 13.</b> MALDI-TOF maseni spektar supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-10.7 sa uvećanim centroidnim delovima spektra analiziranih klastera .....	195
	<b>Prilog 14.</b> MALDI-TOF maseni spektar supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-27.2 sa uvećanim centroidnim delovima spektra analiziranih klastera .....	196
	<b>Prilog 15.</b> MALDI-TOF maseni spektar supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-38.4 sa uvećanim centroidnim delovima spektra analiziranih klastera .....	197
	<b>Prilog 16.</b> MALDI-TOF maseni spektar supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-12.6 sa uvećanim centroidnim delovima spektra analiziranih klastera .....	198
	<b>Prilog 17.</b> MALDI-TOF maseni spektar supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-13.1 sa uvećanim centroidnim delovima spektra analiziranih klastera .....	199

## **1. UVOD**

## 1 UVOD

Bolesti biljaka izazvane infekcijama patogenim virusima, bakterijama i gljivama mogu dovesti do smanjenja kapaciteta biljnog rasta ili mogu naneti mnogo ozbiljniju štetu dovodeći do smrti biljaka. Oboljenja biljaka su odgovorna za gubitke najmanje 10% svetske proizvodnje hrane, što predstavlja veliki problem (Strange and Scott, 2005). Današnja poljoprivreda se još uvek najviše oslanja na hemijske pesticide u sprečavanju i kontroli ovih oboljenja. Međutim, visoka efektivnost i jednostavna upotreba ovih hemikalija može uticati na kontaminaciju spoljašnje sredine i na akumulaciju ostataka pesticida u lancu ishrane, pojavu rezistentnih sojeva patogena, a pored toga i na društvene, ekonomske i zdravstvene probleme (Cawoy et al., 2011). Prema Stokholmskoj konvenciji o dugotrajnim organskim zagađivačima, deset od dvanaest najopasnijih i dugotrajnih organskih hemikalija jesu pesticidi (Gilden et al., 2010). Sve navedeno dovelo je do osveščivanja javnosti i zahteva za smanjenjem upotrebe hemijskih pesticida. U tom smislu, biološka kontrola korišćenjem prirodnih antagonističkih mikroorganizama se istakla kao obećavajuća alternativa. To je dovelo ne samo do preciznijih i strožijih regulativa u vezi upotrebe pesticida, njihove komercijalizacije i proizvodnje, već i do razvoja alternativnih strategija uključujući genetičke adaptacije useva, modifikacije u načinu njihovog uzgajanja i uvođenje u upotrebu biopesticida. Biopesticidi pokazuju mnogo prednosti u odnosu na hemijske pesticide u smislu održivosti, načina delovanja i toksičnosti u poređenju sa hemijskim.

### 1.1 BIOLOŠKA KONTROLA, RAZVOJ I PREDNOSTI BIOPESTICIDA

Termini “biološka kontrola” i skraćeni sinonim “biokontrola” se uveliko koriste u različitim oblastima biologije, najčešće u entomologiji i biljnoj patologiji. U biljnoj patologiji ovi termini se odnose na korišćenje mikrobioloških antagonista u sprečavanju razvoja infekcije i bolesti, kao i u korišćenju specifičnih patogena domaćina u kontroli razvoja korova. U svakom slučaju, organizmi koji potiskuju štetočine ili patogene mogu se proglasiti biološkim kontrolnim agensima (Pal and Gardener, 2006). Šire posmatrano, termin biološka kontrola se može odnositi i na korišćenje prirodnih produkata ekstrahovanih ili dobijenih iz različitih izvora. Ovakva formulacija se može

odnositi na veoma prostu mešavinu prirodnih sastojaka sa specifičnim aktivnostima ili kompleksnu mešavinu sa mnogostrukim efektima na domaćina ili na ciljani patogeni organizam. Najuže posmatrano, biološka kontrola predstavlja namensko korišćenje introdukovanih ili postojećih rezidentnih organizama u suzbijanju aktivnosti i populacija jednog ili više biljnih patogena (Pal and Gardener, 2006). U proteklih pedesetak godina, istraživanja su dovela do razvoja komercijalnog sektora odgovornog za proizvodnju velikog broja proizvoda za biokontrolu. Danas smo svedoci povećane potražnje organski uzgajane hrane, kao i sve glasnijih zahteva za sigurnijim pesticidima u poljoprivredi, šumarstvu i urbanizmu. Sve to dovodi biološku kontrolu u fokus velikog broja naučnih istraživanja kao i pažnje javnosti.

Biopesticidi koji se danas koriste u suprimiranju rasta populacija patogena i na taj način sprečavaju razvoj bolesti biljaka, su živi organizmi ili njihovi produkti. Mogu se podeliti u četiri glavne grupe: mikroorganizme (mikrobiološki pesticidi), druge organizme (nematode, insekti itd.), prirodne supstance dobijene iz živih organizama (biohemijski pesticidi) i biljno-integrisane protektante (genetički modifikovane biljke) (Thakore, 2006; U.S. Environmental Protection Agency (EPA), 2011). Biopesticidi pokazuju nekoliko prednosti u odnosu na hemijske proizvode. Oni se mnogo lakše razlažu u spoljašnjoj sredini i generalno su manje ili uopšte netoksični prema ne-ciljanim vrstama (Thakore, 2006; Cawoy et al., 2011). Dodatno, njihov način delovanja je često drugačiji od konvencionalnih pesticida. Ovo upućuje na to da oni često mogu pomoći u redukciji rezistentnih patogena i mogu se primeniti zajedno sa drugim pesticidima u izbegavanju razvoja rezistencije, generalno (Cawoy et al., 2011). Biopesticidi se koriste često kod ratarskih kultura i u staklenicima kako bi smanjili bolesti raznih žitarica, mahunarki, voća, cveća i ukrasnog bilja uzrokovanih zemljišnim, folijarnim i post-žetvenim patogenima (Ryan et al., 2009). Jedna od prednosti mikrobioloških biopesticida u poređenju sa većinom drugih fitosanitarnih produkata je raznovrsnost njihovih načina delovanja u načelu zasnovanih na kompeticiji za nutrijente i prostor, direktnom antagonizmu prema biljnom patogenu i imunizaciji biljke domaćina. U poređenju sa prirodnim ekstraktima, mikrobiološki pesticidi često zadržavaju prednost u pogledu dužine aktivnosti, odnosno mikrobiološki agensi mogu uspostaviti rast u fitosferi i proizvoditi kontinuirano bioaktivna jedinjenja *in situ* (Cawoy et al., 2011). Dodatno, njihovom potencijalu u smislu direktne redukcije

učestalosti bolesti, pojedini mikrobiološki produkti mogu imati i druge pozitivne efekte na useve podsticanjem rasta biljke i njene ishrane (biofertilizatori i fitostimulatori) i/ili ubrzavanjem interakcije između biljke domaćina i drugih korisnih organizama (Antoun and Prevost, 2006). Biofertilizatori i fitostimulatori su važan faktor u kontekstu stalne potrebe da se proizvede više hrane na istim ili manjim površinama sa istovremenom željom da se smanji oslanjanje na hemijska đubriva (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Štaviše, mikroorganizmi koji poseduju kombinaciju ovih aktivnosti u smislu promocije rasta i biokontrolnog potencijala, predstavljaju prednost u snabdevanju useva jedinstvenom primenom biopesticida i biofertilizatora. Pored toga, bolja ishrana biljke često povećava ukupnu otpornost protiv patogena i drugih faktora stresa (Bent, 2006).

Iako je učinjen značajan prodor na tržištu, proizvodnja biopesticida još uvek čini mali procenat sredstava u kontroli štetočina, ali postoji trend porasta. Globalno gledano, upotreba biopesticida raste godišnje, za razliku od tradicionalnih pesticida čija je upotreba u stalnom padu. Severna Amerika ima najveći procenat učešća biopesticida na tržištu sa 44%, zatim EU i Okeanija sa po 20%, Južna Amerika sa 10%, dok je oko 6% u upotrebi u Aziji i Indiji (Bailey et al., 2010). Jasno je da tržište biopesticida raste brzo (15.6% godišnja stopa rasta), a očekuje se da će porasti na oko 7.7% globalnog agrohemijskog tržišta u narednom petogodišnjem periodu (Lehr, 2010). Oko 50% biopesticida se koristi u hortikulturi, 30% za ispašu, a oko 12% u ratarskim kulturama (Lehr, 2010; Glare et al., 2012).

### 1.1.1 ROD *BACILLUS* KAO IZVOR BIOPESTICIDA

Rod *Bacillus* u širem smislu pokazuje veliku taksonomsku i metaboličku raznovrsnost. *Bacillus sensu stricto* predstavlja samo malu frakciju u poređenju sa velikim taksonomskim konzorcijumom bakterija koje produkuju endospore i odnose se na *Bacillus sensu lato* (Hamdache et al., 2013). Rod *Bacillus* se sastoji od velikog i različitog seta gram-pozitivnih bakterija koji imaju jednu zajedničku, ali ipak distinktivnu karakteristiku: sposobnost aerobne produkcije dormantnih endospora u nepovoljnim uslovima za rast mikroorganizama. Pored toga, sve pripadnike roda karakteriše i štapićasta morfologija ćelija, produkcija katalaze i široka rasprostranjenost (Logan et al., 2007; Zeigler and Perkins, 2009). Sposobnost proizvodnje antimikrobnih supstanci i sporulacioni kapacitet daju *Bacillus* sojevima dvostruku prednost u smislu



njihovog opstanka u različitim staništima. Oni su fenotipski i genotipski heterogeni (Slepecky and Hemphill, 2006), a samim tim oni pokazuju sasvim različita fiziološka svojstva, poput sposobnosti da razlože mnogo različitih supstrata dobijenih iz biljnih i životinjskih izvora, uključujući celulozu, škrob, proteine, agar, ugljovodonike i čak biogoriva (Zeigler and Perkins, 2009). Objavljen je veliki broj radova u kojima se potvrđuje izolacija sojeva roda *Bacillus* iz širokog spektra prirodnih okruženja, uključujući biljke i zemljište (Kunst et al., 1997; Stanković et al., 2007), hidrotermalne izvore (Takami et al., 2004), ekstremna okruženja (Takami et al., 2000; Rey et al., 2004), mora (Siefert et al., 2000), kao i plitke vodene oligotrofne sredine (Alcaraz et al., 2008). Primarna staništa su zemljište i njemu pridružene biljke (*Bacillus amyloliquefaciens*), ali i reke i estuarske vode (*Bacillus coahuilensis*). Takođe, dobro su poznati i po sposobnosti kontrole biljnih oboljenja kroz različite mehanizme, uključujući i produkciju sekundarnih metabolita (Chen et al., 2008). Fenomen sporulacije se može iskoristiti u industrijskoj proizvodnji, jer sporulacija može biti indukovana pri kraju kultivisanja bakterija (Monteiro et al., 2005), a bakterijske suspenzije se mogu pretvoriti u praškastu formulaciju, jednostavnu za rukovanje bez značajnog bakterijskog mortaliteta u odnosu na nesporulišuće bakterije (Lalloo et al., 2010). Rok upotrebe ovakvih biopesticida, baziranih na sporulišućim bakterijama, generalno je duži i oni zahtevaju daleko manje mere predostrožnosti pri skladištenju u odnosu na ostale proizvode koji sadrže žive organizme. Ove bakterije su relativno jednostavne za industrijsku proizvodnju pošto nemaju velike nutritivne zahteve. Pored toga, određeni sojevi poput *B. subtilis* poseduju nekoliko karakteristika koje im omogućavaju i olakšavaju preživljavanje u rizosferi, a jedna od mogućnosti je i fakultativni anaerobni rast u sredinama sa niskom koncentracijom kiseonika (Nakano and Hulett, 1997). To zaista predstavlja prednost jer koncentracija kiseonika može fluktuirati u zavisnosti od vremenskih uslova. Još jedan od razloga velike zainteresovanosti za rod *Bacillus* je raznolikost u njihovom načinu delovanja. Oni mogu da ispolje gotovo sve mehanizme biokontrole i biostimulacije/fertilizacije (Cawoy et al., 2011). Veoma često jedan soj može delovati kroz nekoliko mehanizama biokontrole. Ovo omogućava ovim bakterijama veću efikasnost u raznim stanjima u odnosu na različite patogene, biljne domaćine i spoljašnje uslove, gde jedan mehanizam može delovati umesto drugog.

Bakterijski produkti predstavljaju većinu biopesticida baziranih na mikroorganizmima, ali se pored toga i fungalni produkti razvijaju kao veoma efikasni biokontrolni agensi (Shoresh et al., 2010). Među bakterijskim biokontrolnim agensima, *Bacillus thuringiensis* (Bt) čini preko 70% totalne tržišne potražnje (Cawoy et al., 2011). Ova vrsta se esencijalno koristi u kontroli insekatskih štetočina zbog proteina koje proizvodi, Cry i Cyt, koji su značajno toksični za insekte, ali ne i za ljude i životnu sredinu. Ove karakteristike doprinose objašnjenju ranog korišćenja ovakvog biopesticida, koji je prvi put primenjen 1938. godine (Sanahuja et al., 2011). Veliki deo istraživanja u vezi sa ovim biopesticidom je urađen sa fokusom otkrivanja novih Cry toksina ili na kombinaciji toksina koji pokrivaju širi opseg insekatskih štetočina. Raznovrsni produkti bazirani na Bt toksinu su korišćeni na mnogim usevima kao i u pokušajima ograničenja populacija komaraca u kontekstu sprečavanja razvoja malarije (Sanahuja et al., 2011).

*B. thuringiensis* je svakako najznačajniji mikrobijalni pesticid koji je bio dugo u centru svih dosadašnjih istraživanja. Međutim, u poslednje vreme zbog povećanog poljoprivrednog interesa ogroman broj istraživanja je posvećen drugim vrstama iz roda *Bacillus* u kontroli višestrukih oboljenja različitih biljaka domaćina. To potvrđuje i ogroman broj komercijalizovanih biopesticida zahvaljujući raznovrsnosti sojeva iz roda *Bacillus*, a posebno vrste *B. subtilis*. Najveći broj do sada komercijalizovanih biopesticida u svom sastavu sadrži *B. subtilis* kao biokontrolni agens sa različitim načinima delovanja na biljne patogene: Avogreen® (Ocean Agriculture, Južna Afrika), Ballad® (AgraQuest Inc., SAD), Bio safe® (Lab. Biocontrolle Farroupilha, Brazil), Biosubtilin (Biotech International Ltd., Indija), Cease® (BioWorks Inc., SAD), Companion® (Growth Products Ltd., SAD), Ecoshot (Kumiai Chemical Industry, Japan), FZB 24®WG (ABiTEP GmbH, Nemačka), HiStick N/T® / Subtilex® / Pro-Mix® (Becker Underwood, SAD i Premier Horticulture Inc., Kanada), Kodiak® (Gustafson Inc., SAD), Rhapsody® (AgraQuest Inc., SAD), Rhizo Plus® (ABiTEP GmbH, Nemačka) i Serenade® (AgraQuest Inc., SAD) (Cawoy et al., 2011). Međutim, pored velikog broja biopesticida baziranih na svojstima *B. subtilis* vrste u upotrebi su i biopesticidi koji uključuju ostale vrste ovog roda poput: *B. pumilus* [Ballad® i Sonata® (AgraQuest Inc., SAD), Yield Shield® (Bayer CropScience, SAD)], *B. amyloliquefaciens* RhizoVital® 42 i RhizoVital® 42 TB (ABiTEP GmbH, Nemačka),

*B. licheniformis* EcoGuard TM Biofungicide (Novozymes A/S, Danska i Novozymes Biologicals, SAD) i *B. velezensis* Botrybel (Agricaldes, Španija) (Cawoy et al., 2011).

### **1.1.2 MEHANIZMI DELOVANJA BIOKONTROLNIH AGENASA**

Korišćenjem hranljivih sastojka koji se konstantno otpuštaju sa korena i lišća biljaka, korisni bakterijski sojevi efikasno naseljavaju korenov sistem i lisne površine, kao i njihov zemljišni sloj. Zauzvrat, bakterije štite biljku od biljnih patogena kroz tri glavna mehanizma: kompeticijom za ekološku nišu/supstrate, produkcijom inhibitornih antagonističkih supstanci i indukcijom sistemske rezistentosti biljke domaćina (Cawoy et al., 2011). Treba napomenuti još i da se nijedan od ovih mehanizama međusobno ne isključuje, jer često jedan biokontrolni agens može delovati preko nekoliko mehanizama.

#### **1.1.2.1 Kompeticija za nišu i nutrijente**

Kompeticija za resurse poput nutrijenata i kiseonika se dešava uglavnom u zemljištu između organizama koji u njemu žive. U biokontrolnom smislu, ovo se dešava kada je antagonista u direktnoj kompeticiji sa patogenima za ove resurse. Mikroorganizmi koji naseljavaju koren bore se za odgovarajuća mesta na površinama korena. Kompeticija za nutrijente, pogotovu za izvore ugljenika, je odgovorna za dobro poznati fenomen fungistazisa, karakterističnog za inhibiciju klijanja spora gljiva u zemljištu (Alabouvette et al., 2006). Imajući u vidu relativno nizak nivo supstrata u rizosferi, efikasnost unošenja hranljivih materija i katabolizam bakterija su ključni faktori konkurentnosti (Cawoy et al., 2011). Kompeticija za mikroelemente, kao što su gvožđe, bakar, cink, mangan i drugi, takođe se javlja u zemljištu. Na primer, gvožđe je suštinski element za rast svih živih organizama, a nedostatak njegovog biodostupnog oblika u zemljištu dovodi do žestoke konkurencije (Loper and Henkels, 1997). Siderofore, jedinjenja niske molarne mase sa visokim afinitetom za gvožđe, proizvode se od strane nekih mikroorganizama (kao i kod velikog broja biokontrolnih bakterija) u cilju rastvaranja i kompetitivnog usvajanja jona gvožđa u ograničavajućim uslovima, čime se onemogućava dostupnost gvožđa drugim zemljišnim mikroorganizmima koji ne mogu da rastu u njegovom odsustvu (Haas and Défago, 2005). Takođe, antagonizmom, kao jednim od mehanizama, se može ostvariti kompeticija za niše i hranjive sastojke sa

ostalim hemoheterotrofima u fitosferi (Mc Spadden Gardener, 2004). Pokretan i hemotaksičan soj *B. megaterium* je pokazao da bolje kolonizuje koren i suprimira rast *Rhizoctonia solani* u poređenju sa nepokretnim mikroorganizmima (Zheng and Sinclair, 2000). Kod pojedinih izolata *B. subtilis*, *B. cereus* i *B. thuringiensis* je primećeno da mogu stimulisati simbiozu između *Bradyrhizobium japonicum* i soje, kroz takve sinergističke interakcije koje nisu konstantno izražene u spoljašnjoj sredini (Bullied et al., 2002; Estevez de Jensen et al., 2002; Bai et al., 2003) i tako pospešiti kompeticiju za hranljive sastojke. Pored toga, takva stimulacija *Bacillus* sojevima je verovatno ograničena genetičkim varijacijama azotofiksatorskih simbionata i biljke domaćina (Camacho et al., 2001; Vessey and Buss, 2002). Kod fosfomineralizatornih sojeva *B. subtilis* primećeno je još i da sinergistički povećavaju nivo azota i akumulaciju fosfata kada su koinokulisani zajedno sa *Glomus intraradices* (Toro et al., 1997).

#### 1.1.2.2 Direktna inhibicija fitopatogena produkcijom antimikrobnih jedinjenja

Antagonizam bakterija iz roda *Bacillus* protiv mnogih štetočina i patogenih populacija ispoljava mnoge forme delovanja. Većina predstavnika roda *Bacillus*, poput *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycooides* i *B. pumilus* su poznati kao visoko efikasni proizvođači ribozomalno i neribozomalno sintetisanih bioaktivnih prirodnih produkata. Poslednjih godina istraživanja su usmerena ka objašnjavanju molekulskih struktura neribozomalno sintetisanih peptida izolovanih iz *Bacillus* vrsta u cilju otkrivanja mehanizama uključenih u biosintezu, kao i dešifrovanju gena uključenih u njihovu regulaciju. Iako je potvrđen veliki broj bioaktivnih peptida iz roda *Bacillus*, danas znamo da, u principu, konvencionalni programi izolacije prirodnih proizvoda znatno potcenjuju biosintetičku sposobnost, u mnogim slučajevima sa više od 80-90% (Nett et al., 2009). Na primer, *B. subtilis* ima u proseku 4-5% svog genoma koji je posvećen sintezi antibiotika i ima potencijal da proizvede više od dvadeset četiri strukturno različita antimikrobna jedinjenja (Stein, 2005). Kod soja FZB42, koji je predložen kao ugledni primer soja *B. amyloliquefaciens* asociiranog sa biljkama, kao i kod nekih drugih sojeva, još veći deo genoma (~ 8%) je uključen na neki način u sintezu ovih jedinjenja (Arguelles-Arias et al., 2009; Chen et al., 2009a; Rückert et al., 2011). Za neke, od čitavog niza biološki aktivnih molekula sintetisanih od strane predstavnika roda *Bacillus*, potvrđena je

inhibitorna aktivnost protiv biljnih patogena i ova antagonistička aktivnost ili antibioza je verovatno najpoznatiji i najvažniji mehanizam, koji se koristi za ograničavanje invazije patogena u tkiva biljaka domaćina.

Peptidna jedinjenja predstavljaju najdominantniju klasu antibiotika u rodu *Bacillus*, mogu biti različitih veličina, izgrađena kompletno od aminokiselina, dok neka mogu posedovati i druge rezidue. Često se javljaju linearni ili ciklični oligopeptidi i aminoglikozidni antibiotici (Stein, 2005). Mala molekulska masa, hidrofobne i ciklične strukture, sa neobičnim konstituentima poput D-aminokiselina, su često uobičajene karakteristike peptidnih antibiotika koje sintetišu ove bakterije. Povrh toga, generalno su rezistentni na hidrolizu peptidazama i proteazama životinjskog i biljnog porekla (Cawoy et al., 2011). Druga grupa peptidnih antibiotika, najčešće produkovana od strane *B. subtilis*, jesu lantibiotici (Stein, 2005). Ova jedinjenja pokazuju jake antibakterijske osobine protiv gram-pozitivnih bakterija, ali njihova uloga u biokontrolnoj aktivnosti izolata *Bacillus* vezanoj za biljke, još uvek nije razjašnjena. Mnogo jednostavniji molekuli, poput dipeptidnog bacilizina (L-Ala je vezan za neproteinsku aminokiselinu L-antikapsin) takođe imaju baktericidni efekat i čini se da su uključeni u kontrolu nekih biljnih patogena (Chen et al., 2009b).

Veliku klasu peptidnih antibiotika vrsta roda *Bacillus* čine ciklični lipopeptidi (cLP) koji mogu varirati po tipu i sekvenci aminokiselinskih ostataka, prirodi peptidne ciklizacije, kao i po prirodi, dužini i načinu grananja lanaca masnih kiselina (Ongena and Jacques, 2008; Roongsawang et al., 2010; Hamdache et al., 2013). Kod mnogih vrsta roda *Bacillus* potvrđeno je prisustvo tri glavne familije lipopeptida: surfaktina, iturina i fengicina, koje obuhvataju strukturalne varijante u zavisnosti od genetičke pozadine određenih sojeva. Pored ove tri velike familije, takođe je identifikovana i klasa bioaktivnih kurstakinskih lipopeptida (Hathout et al., 2000). Svaka familija ovih cLP jedinjenja pokazuje specifične antibiotske aktivnosti i stoga svaka od njih može biti uključena u antagonizam različitih biljnih patogena. Na primer, iturin A produkovan od strane *B. subtilis* RB14 soja učestvuje u kontroli bolesti semena paradajza (bolest semena) uzrokovane patogenom *R. solani* (Asaka and Shoda, 1996). Takođe, prekomerna ekspresija mikosubtilina kod soja *B. subtilis* ATCC 6633 je vodila do značajne redukcije infekcije klijanaca paradajza uzrokovane *Pythium aphanidermatum*

(Leclère et al., 2005). Kao primer kontrole filozofskih bolesti, doprinos iturina i fengicina je pokazan u antagonizmu *B. subtilis* soja nad *Podosphaera fusca* koja inficira listove dinje (Romero et al., 2007). Ovo je naročito pokazano ispoljavanjem jakog inhibitornog efekta cLP na klijanje konidija *P. fusca*, detekcijom cLP iz listova tretiranih bakterijama i korišćenjem cLP-deficijentnih mutanata koji nisu pokazali antagonistički efekat. U cilju zaštite od post-žetvenih bolesti, *B. subtilis* GA1 soj koji efikasno proizvodi cLP iz tri različite familije lipopeptida, a naročito širok spektar fengicina, je upotrebljen u kontroli rana na plodovima jabuka protiv bolesti sive plesni uzrokovane *Botrytis cinerea*. Fengicini su se pokazali veoma efikasnim u kontroli bolesti plodova voća, izazvanim post-žetvenim patogenima *in situ* (Touré et al., 2004). Za fengicin je takođe zabeležena antagonistička aktivnost protiv *Fusarium graminearum* (Wang et al., 2007), dok je za iturin uočena inhibitorna aktivnost prema izazivaču antraknoze *Colletotrichum dematium* (Hiradate et al., 2002), *Penicillium roqueforti* (Chitarra et al., 2003), *Aspergillus flavus* (Moyne et al., 2001), *R. solani* (Yu et al., 2002), prema gljivama koje boje drvo (Velmurugan et al., 2009) i prema nematofagnim gljivama (Li et al., 2007). U nekim slučajevima, fungitoksična aktivnost je jasno povezana sa permeabilizacijom spora/konidija koja dovodi do inhibicije klijanja ili alternativno do poremećaja ćelija hifa. Kao što je i otkriveno transmisionim elektronskim mikroskopskim tehnikama, oba fenomena najverovatnije rezultiraju oštećenjem membrane fungalne ćelije cLP (Chitarra et al., 2003; Romero et al., 2007; Etchegaray et al., 2008). Nekoliko studija je čak pokazalo i insekticidnu aktivnost pojedinih cLP izolovanih iz *B. subtilis*. Surfaktini i iturini su opisani i u smislu njihove antagonističke aktivnosti protiv voćne mušice *Drosophila melanogaster* (Assie et al., 2001), kao i u slučaju ekstrakta bogatog cLP koji je ispoljio efekat u inhibiciji razvoja larvi komaraca *Culex quinquefasciatus* (Das and Mukherjee, 2006).

Silo-Suh et al. (1994) su pokazali da *B. cereus* UW85 proizvodi dva fungistatička antibiotika cvitermicin A i kanozamin, koji doprinose supresiji bolesti lucerke u vlažnim uslovima, uzrokovane *Phytophthora medicaginis*. Cvitermicin A takođe može kontrolisati truljenje plodova krastavca (Smith et al., 1993) i sprečiti razvoj drugih biljnih bolesti (Silo-Suh et al., 1998). Bacilen, dificidin i makrolaktin su poliketidi koji pokazuju širok spektar antibakterijskih aktivnosti koji mogu biti uključeni u biokontrolnu aktivnost produkujućih sojeva, u slučaju plamenjače, ozbiljnog

oboljenja drveća voćaka uzrokovano *Erwinia amylovora* (Chen et al., 2009b). Fosfori oligopeptid rizoktacin soja *B. subtilis* takođe pokazuje antifungalnu i antinematodnu aktivnost, ali ne i baktericidna svojstva (Borisova et al., 2010).

Za razliku od antibioze koja uključuje jedinjenja male molekulske mase i ne zahteva fizički kontakt, predatorstvo/parazitizam je takođe jedan od bitnih mehanizama pojedinih biokontrolnih mikroorganizama. Mogućnost bakterija da parazitiraju i razgrađuju spore ili hife patogena kroz produkciju različitih enzima koji razgrađuju ćelijski zid, je takođe utvrđena (Whipps, 2001). Tako je pokazano da izolati vrste *B. ehimensis* (Hoster et al., 2005) proizvode enzime koji degraduju hitin, dok *B. subtilis* AF1 pokazuje fungitoksičnost kroz sekreciju *N*-acetil glikozaminidaze i glukanaze (Manjula and Podile, 2005). Takođe, za neke biokontrolne sojeve koji su specifični za određeni patogen, je pokazano da njihove interakcije dovode do ograničavanja aktivnosti patogena formiranjem biofilma i inaktivacijom i degradacijom faktora patogenosti kao što su toksini (Bais et al., 2004).

### 1.1.2.3 Indukcija sistemske rezistentnosti biljke domaćina

Izolacija nekih rizosfernih bakterija koje pospešuju rast biljaka i efikasne su u biokontroli, sa istovremenom nemogućnošću vršenja antagonističke aktivnosti prema patogenima, baca novo svetlo na različitost njihovih načina delovanja. Često je navođeno da takvi sojevi mogu aktivirati odbrambene sisteme biljke domaćina. Ova stimulacija biljnog imunskog sistema predstavlja jedan od najvažnijih aspekata novootkrivenih interakcija između biljaka i mikroorganizama (Bakker et al., 2007). Neki izolati su zaista u stanju da smanje incidencu bolesti kroz stimulaciju odbrambenog odgovora biljke usled napada patogena, što dovodi do povećane otpornosti biljke domaćina (Conrath et al., 2006).

Ubedljiv dokaz za ulogu indukovane sistemske rezistencije (ISR) u smanjenju bolesti datom bakterijom, testiranom na određenom patogenom sistemu, može se dobiti prostornim razdvajanjem patogena i agenasa izazivača sistemske rezistencije u cilju isključivanja svake direktne antagonističke interakcije. ISR se može posmatrati kao proces koji se odvija u tri koraka uključujući: I) percepciju biljnih ćelija na elicitore koje proizvode agensi koji pobuđuju ovaj fenomen, II) transdukciju signala koja je potrebna

da se proširi indukovano stanje sistemski kroz čitavu biljku i III) ekspresiju odbrambenih mehanizama *sensu stricto* koja ne ograničava niti sprečava prodor patogena u tkiva domaćina (Van Loon, 2007). ISR domaćina, lokalno i sistemski, je pokazana za neke od izolata poput *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pumilus*, *B. sphaericus* i *B. subtilis* (Kloepper et al., 2004; Mc Spadden Gardener, 2004; Bent, 2006). Indukovana rezistencija na virusne, bakterijske, oomicetne, fungalne i nematodne patogene, kao i neke insekatske štetočine se može steći u različitom stepenu u zavisnosti od raznolikosti biotičkih i abiotičkih faktora. Na biljku domaćina takođe mogu uticati jedinjenja slična hormonima biljaka, koja proizvode razni mikroorganizmi, kao na primer *B. subtilis* (Priest, 1993). Ovakva jedinjenja (slična auksinima, gibberelinima i citokininima) posreduju u procesima poput uvećanja ćelijske mase, deobe i ekstenzije simbiotskih i nesimbiotskih korena. Neke studije pokazuju da određeni sojevi *Bacillus* mogu efikasno uticati na poboljšavanje endo- i ektomikorize fungalnih sojeva i korena biljaka, ali i da ovakve sinergije ne pospešuju uvek rast biljke (Medina et al., 2003). Isparljiva jedinjenja, poput 2,3-butandiola, nekih sojeva *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens* (Ryu et al., 2004), kao i lipopeptidna jedinjenja *Bacillus* su identifikovana kao elicitorska u ISR i mogu da stimulišu rast tkiva biljaka (Cawoy et al., 2011). Potencijal *Bacillus* cLP kao biljnih induktora rezistencije je dokazan testiranjem prečišćenih surfaktina i fengicina koji su obezbedili značajan indukovani zaštitni efekat sličan onom izazvanom živim ćelijama soja *B. amyloliquefaciens* S499. U komplementarnom pristupu, eksperimenti sprovedeni na pasulju i paradajzu su pokazali da je prekomerna ekspresija oba biosintetska gena za surfaktin i fengicin, prirodno siromašnog proizvođača *B. subtilis* 168, bila povezana sa značajnim podsticanjem rezistencije. Štaviše, makroskopsko smanjenje bolesti indukovane prekomernom produkcijom surfaktina je povezano sa odbrambeno-metaboličkim promenama u tkivima biljke domaćina (Ongena et al, 2007).

## 1.2 PRODUKCIJA ANTIMIKROBNIH SUPSTANCI

*Bacillus* vrste predstavljaju važan izvor korisnih bioloških jedinjenja, enzima, antibiotika i insekticida. Zapravo, dve trećine dostupnih enzima (proteaze, amilaze, endonukleaze, glukoza-dehidrogenaze i pululanaze) koji se koriste u industriji dobijeno je fermentacijom iz *Bacillus* vrsta (Baruzzi et al., 2011). Do sada je okarakterisano i



opisano preko 500 antimikrobnih jedinjenja među biokonzervansima. Kod roda *Bacillus* je opisano najmanje 45 različitih antimikrobnih molekula koji imaju ulogu u kontroli mikroorganizama, patogenih hrane i u kontroli biljnih bolesti (Urdaci and Pinchuk, 2004; Stein, 2005). Pored klasične uloge u antagonizmu, prema trenutnim istraživanjima, različiti antibiotici poput neribozomalno sintetisanih lipopeptida pokazuju i značajnu ulogu u formiranju biofilma i razvoju rojenja, dok lantibiotici funkcionišu kao feromoni u fenomenu "quorum sensing", ili poput "killing", faktora utičući na programiranu ćelijsku smrt u sestrinskim ćelijama. U svakom slučaju peptidni antibiotici predstavljaju dominantnu klasu antimikrobnih jedinjenja sa svojim rigidnim, hidrofobnim i/ili cikličnim strukturama i sa neobičnim konstituentima poput D-aminokiselina i generalno su rezistentni na hidrolizu peptidazama i proteazama (Katz and Demain, 1977; Stein 2005). Osim toga, njihovi cisteinski ostaci se ili oksiduju do disulfida i/ili modifikuju karakterističnim intramolekulskim C-S (tioetarskim) vezama, čime peptidni antibiotici postaju neosetljivi na oksidaciju. U principu, dva različita puta biosinteze peptida omogućavaju inkorporaciju takvih neobičnih (neproteinskih) sastojaka: (I) neribozomalna sinteza peptida velikim mega enzimima, neribozomalnim peptid sintetazama (NRPS) i (II) ribozomalna sinteza linearnih prekursora peptida koji su izloženi post-translacionim modifikacijama i proteolitičkoj obradi (Stein, 2005). Dakle, zahvaljujući njihovim biosintetskim putevima ovakvi metaboliti se mogu grupisati u dve različite klase: ribozomalno sintetisane peptide, uključujući prave bakteriocine i bakteriocinima-slične peptide, za razliku od druge klase neribozomalno sintetisanih lipopeptidnih i drugih molekula.

### **1.2.1 BAKTERIOCINI I BAKTERIOCINIMA-SLIČNE INHIBITORNE SUPSTANCE**

Kapacitet za proizvodnju antimikrobnih peptida je široko rasprostranjen među gram-pozitivnim bakterijama. Aktivnost ovih supstanci je usmerena protiv konkurentskih mikroorganizama, što doprinosi selektivnoj prednosti samih proizvođača. Bakterijski antimikrobni peptidi proizvedeni ribozomalnom sintezom se obično nazivaju bakteriocinima i predstavljaju veoma heterogenu grupu koju proizvode bakterije rodova *Lactobacillus* i *Bacillus* (Riley and Wertz, 2002a, b). Oni ispoljavaju visok stepen ciljne specifičnosti protiv srodnih bakterija, iako mnogi od njih imaju širok spektar aktivnosti.

Mnogi bakteriocini koje proizvode gram-pozitivne bakterije inhibiraju i vrste koje nisu iz iste ekološke niše (Jack et al., 1995). Prvi opisan bakteriocin je bio kolicin proizveden od strane *Escherichia coli* (Cascales et al., 2007). Kasnije, kada je otkriveno da antimikrobne supstance tipa kolicina mogu da proizvode i nekolidiformne bakterije, kao i gram-pozitivne bakterije, definisan je opštiji termin „bakteriocini“ (Jacob et al., 1953).

Sojevi roda *Bacillus* proizvode raznovrsan spektar antimikrobnih peptida, sa nekoliko različitih osnovnih hemijskih struktura (Gebhardt et al., 2002; Stein, 2005). Trenutno su najizučavaniji bakteriocini koje proizvode bakterije mlečne kiseline (BMK), zbog njihovog potencijala kao biokonzervansa u prehrambenoj industriji, sa obzirom na „opšte priznat kao siguran“ (Generally Regarded As Safe - GRAS) status mnogih sojeva (O'Sullivan, 2002), uključujući i proizvode industrijski važnih *Bacillus* vrsta koje se već bezbedno upotrebljavaju u hrani i industriji (Pedersen et al., 2002). Mnoge druge antimikrobne supstance koje nisu dobro okarakterisane do sada su poznate kao bakteriocinima-slične inhibitorne supstance (BLIS). Ovaj termin se često koristi kada nije potvrđena peptidna priroda antimikrobnih jedinjenja (Abriouel et al., 2011). Bakteriocini i BLIS koje proizvode vrste roda *Bacillus sensu lato* se mogu smatrati kao druge po važnosti, posle bakteriocina koje proizvode BMK.

#### 1.2.1.1 Klasifikacija bakteriocina roda *Bacillus*

Glavna klasifikaciona šema antimikrobnih ribozomalno sintetisanih peptida je trenutno dostupna za bakteriocine BMK. Klasifikaciju bakteriocina BMK je ustanovio Klaenhammer (1993), a kasnije su izvršene razne adaptacije i reklasifikacije u raznim studijama (van Belkum and Stiles, 2000; Cotter et al., 2005; Heng and Tagg, 2006; Nes et al., 2007; Abriouel et al., 2011). Pojedini bakteriocini roda *Bacillus* pripadaju grupi lantibiotika (Willey and van der Donk, 2007; Asaduzzaman and Sonomoto, 2009; Bierbaum and Sahl, 2009). Sa povećanjem broja lantibiotika opisanih kod različitih bakterijskih grupa, iz dana u dan je sve teže uspostaviti univerzalnu klasifikacionu šemu, poput nekoliko već predloženih (Heng and Tagg, 2006; Nes et al., 2007). Iz tog razloga je potrebno da sistem klasifikacije bakteriocina roda *Bacillus* bude različit od klasifikacije bakteriocina BMK, iako pojedina jedinjenja i kod jednih i drugih poseduju veoma slične karakteristike. Pojednostavljena klasifikaciona šema predložena od strane Abriouel et al. (2011), prikazana je u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Predložena klasifikacija bakteriocina *Bacillus* vrsta i komparacija sa bakteriocinima BMK (Preuzeto iz Abriouel et al., 2011).

Bakteriocini <i>Bacillus</i> vrsta Predložena klasifikacija	Primeri	Bakteriocini BMK (Nes et al., 2007)
<b>Klasa I</b> Post-translatorno modifikovani peptidi		Klasa I Lantibiotici
Podklasa I-1 Pojedinačni peptidi, izduženi lantibiotici	Subtilin, ericin S, ericin A	
Podklasa I-2 Ostali pojedinačni peptidi lantibiotika	Sublancin 168, mersacidin, penbacilin	
Podklasa I-3 Dvopeptidni lantibiotici	Haloduracin, lichenicidin	
Podklasa I-4 Ostali post-translatorno modifikovani	Subtilozin A	
<b>Klasa II</b> Nemodifikovani peptidi		Klasa II Mali linearni peptidi
Podklasa II-1 Pediocinu-slični peptidi	Koagulin, SRCAM 37, SRCAM 602, SRCAM 1580	Klasa IIa
Podklasa II-2 Turicinu-slični peptidi	Turincin H, turicin S, turicin 17, bakturicin F4, cerein MRX1	
Podklasa II-3 Ostali linearni peptidi	Cerein 7A, cerein 7B, lichenin, turicin 439	
<b>Klasa III</b> Veliki proteini	Megacin A-216, megacin A-19213	Klasa III Veliki termo-labilni bakteriocini

**Klasa I** uključuje antimikrobne peptide koji podležu na različite načine post-translatornim modifikacijama. Ova klasa je izuzetno raznovrsna i zahvaljujući analizi konzerviranih kratkih aminokiselinskih motiva uočenih u okviru klase I bakteriocina vrsta roda *Bacillus*, izvršena je podela na četiri podklase (Slika 1).



**Slika 1.** Dendrogram odnosa bakteriocina iz roda *Bacillus* prema homologiji primarne aminokiselinske sekvence. Osenčeni karakteri ukazuju na identične aminokiseline u primarnoj strukturi bakteriocina. (Preuzeto iz Abriouel et al., 2011).

**Klasa II** bakteriocina uključuje male (0.77 - 10 kDa) ribozomalno sintetisane, nemodifikovane i linearne peptide, koji su termo- i pH stabilni molekuli. Ova klasa se može podeliti na tri podklase.

**Klasa III** uključuje velike proteine (> 30 kDa) sa fosfolipaznom aktivnošću.

Mnogi drugi antimikrobni polipeptidi intermedijarne mase (10-30 kDa), kao i ostali veliki antimikrobni proteini produkovani od strane roda *Bacillus* nisu obuhvaćeni ovakvom klasifikacijom zbog nedostataka podataka o samom proteinu ili genskim sekvencama i mogu se za sada svrstati u klasu bakteriocinima-sličnim inhibitornim supstancama.

## 1.2.2 RAZNOVRSNOST NERIBOZOMALNO SINTETISANIH BIOAKTIVNIH PEPTIDA

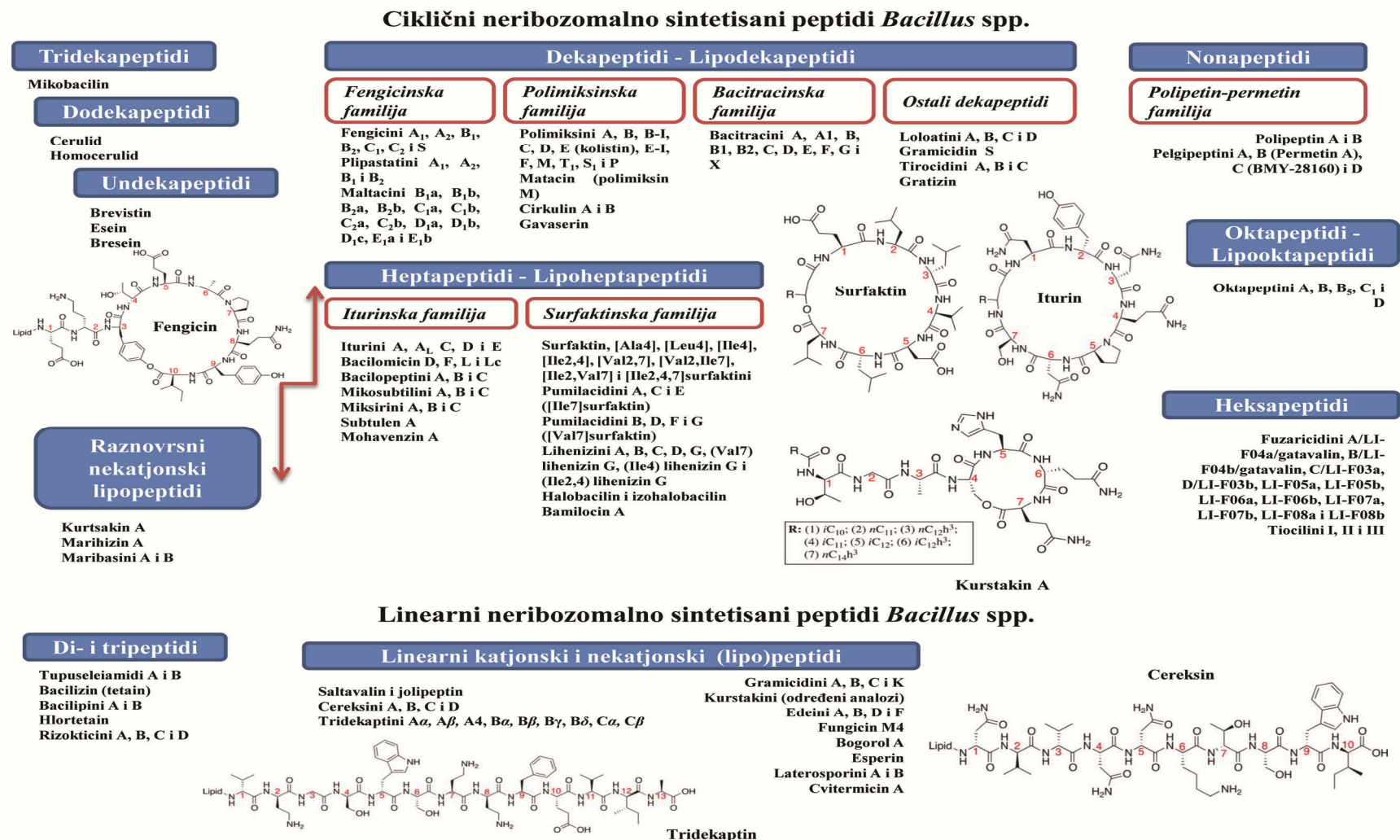
Neribozomalno sintetisani peptidi su klasa peptida sa različitim funkcijama, poput citostatičke, imunosupresivne, antifungalne, antibakterijske i antikancerogene. Ovi sekundarni metaboliti se razlikuju od ribozomalno sintetisanih peptida na nekoliko načina. Njihova dužina je oko 20 gradivnih blokova i uglavnom imaju cirkularnu ili razgranato-cirkularnu strukturu. Takođe, velika raznolikost hemijskih grupa je zastupljena u ovim jedinjenjima poput: D-aminokiselina,  $\beta$ -aminokiselina, masnih kiselina, metilovanih, oksidovanih, halogenizovanih i glikozilovanih gradivnih blokova. Za ovakve funkcionalne i strukturne karakteristike je poznato da su veoma važne za bioaktivnost (Schoenafinger and Marahiel, 2009). Produkcija efektivnih lipopeptidnih biosurfaktanata je prvi put pokazana kod *B. subtilis* IAM1213 (Arima et al., 1968). Od tada, različiti tipovi ovih jedinjenja su pronađeni i izolovani iz drugih vrsta roda *Bacillus* sa značajnim diverzitetom u dužini i prirodi lipidnih ostataka, različitim brojem, tipom i konfiguracijama aminokiselinskih ostataka, kao i sa različitim antimikrobnim efektima (Stein, 2005; Ongena and Jacques, 2008; Hamdache et al., 2013). Stukturni diverzitet i rastući broj otkrivenih neribozomalnih peptida poslednjih godina, doveli su do nejasne klasifikacione šeme ove klase peptida roda *Bacillus*. Sa gledišta molekularne strukture i osnova peptida/aminokiselinskih sekvenci, Hamdache et al. (2013) su predložili klasifikaciju na dve velike grupe, ciklične i linearne peptide u okviru kojih je izvršena dalja podela prema broju aminokiselinskih ostataka koje ih grade (Slika 2). Svakako najreprezentativniji i kod većine autora opisani, u kontekstu biokontrolnih agenasa u borbi protiv biljnih patogena, su lipopeptidi iz familija fengicina, iturina i surfaktina (Maget-Dana and Peypoux, 1994; Stein, 2005; Romero et al., 2007; Ongena and Jacques, 2008; Raaijmakers et al., 2010; Roongsawang et al., 2010; Romano et al., 2011; Stanković et al., 2012). Sve ove lipopeptide sa značajnim

biokontrolnim aktivnostima, karakteriše lipofilni lanac masne kiseline i hidrofilni peptidni prsten (Touré et al., 2004). Oni su amfifilni ciklični peptidi sastavljeni od 7  $\alpha$ -aminokiselina (surfaktini i iturini) ili 10  $\alpha$ -aminokiselina (fengicini) povezani jednom jedinstvenom  $\beta$ -amino masnom kiselinom (iturini) ili  $\beta$ -hidroksi masnom kiselinom (surfaktini i fengicini). Dužina lanaca masnih kiselina varira od C<sub>13</sub> do C<sub>16</sub> u slučaju surfaktina i od C<sub>14</sub> do C<sub>17</sub> u slučaju iturina.

**Fengicinska familija** je familija cikličnih lipodekapeptida koji sadrže  $\beta$ -hidroksi masnu kiselinu sa dužinom bočnog lanca između 14-19 atoma ugljenika, koja može biti u linearnoj, izo- i anteizo- formi i može biti zasićena ili nezasićena (Raaijmakers et al., 2010).

**Fengicini A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> i S** su opisani i okarakterisani do sada. Fengicini imaju strukturu makrolaktonskog prstena, koji nastaje pomoću fengicin ciklaze koja koristi Tyr mesto na bočnom lancu na poziciji 3 u peptidnoj sekvenci za formiranje estarske veze sa C-terminalnim ostacima, čime se formira unutrašnji prsten. Četiri D-aminokiseline i ornitin su pronađeni u sastavu peptidnog dela fengicina (Nishikiori et al., 1986a).

Poslednjih godina okarakterisani su i novi fengicini označeni kao C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub> (prema Cochrane and Vederas, 2014) izolovani iz *B. subtilis* sojeva sa različitim brojem ugljenikovih atoma u lipidnom repu (Pathak et al., 2012; Villegas-Escobar et al., 2013), kao i fengicin S izolovan iz *B. amyloliquefaciens* LSC04 koji u svom aminokiselinskom delu poseduje D-Ser što nije slučaj kod ostalih tipova fengicina i sadrži C<sub>17</sub> atoma u lipidnom repu (Sang-Cheol et al., 2010). Fengicin je lipopeptidni biosurfaktant (Vater et al., 2002) koga proizvode nekoliko *Bacillus* vrsta. On može funkcionisati kao biokontrolni agens i ostvaruje fungicidnu, baktericidnu i insekticidnu aktivnost (Vanittanakom et al., 1986). Poznato je da ima antifungalnu aktivnost protiv fitopatogenih gljiva, naročito protiv filamentoznih, kao i da poseduje hemolitičku aktivnost. Kao i većina prirodnih antimikrobnih peptida, fengicin najverovatnije deluje povećavanjem permeabilnosti ćelijske membrane (Deleu et al., 2008). Inhibicija rasta micelija je antagonizovana pomoću sterola, fosfolipida i oleinske kiseline, a nezasićene masne kiseline dodatno povećavaju antifungalni efekat (Vater et al., 2002).



Slika 2. Klasifikacija neribozomalno sintetisanih peptidnih jedinjenja roda *Bacillus* prema Hamdache et al. (2013) i Cochrane and Vederas (2014).

**Plipastatini** izolovani iz *B. subtilis* (Tsuge et al., 1996, 1999) i *B. cereus* (Nishikiori et al., 1986a) su veoma slični fengicinima i spadaju u fengicinsku familiju. Razlikuju se jedino u stereochemiji ostataka Tyr na poziciji 9 bočnog lanca (L u D diastereoizomere) (Volpon et al., 2000). Antimikrobni spektar plipastatina je još uvek nerazjašnjen, ali pokazano je da mogu inhibirati fosfolipazu A<sub>2</sub> (Umezawa et al., 1986), enzim koji je uključen u mnoge fiziološki važne ćelijske procese poput inflamacije, akutne hipersenzitivnosti i agregacije krvnih trombocita (Hirata and Axelrod, 1980). Kao i u slučaju ostalih lipopeptida produkovanih kod *B. subtilis*, plipastatini su biosintetisani kao mešavina izoformi, okarakterisanih varijacijama u strukturi hidrofobnog repa i u aminokiselinskom sastavu (Nishikiori et al., 1986b). Hidrofobni rep je 3(*R*)-hidroksi heksadekanoična kiselina (plipastatini A<sub>1</sub> i B<sub>1</sub>) ili 14(*S*)-metil-3(*R*)-hidroksi heksadekanoična kiselina (plipastatini A<sub>2</sub> i B<sub>2</sub>), a aminokiselinski sastav je različit na poziciji 6, tj., D-Ala (plipastatini A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>) je supstituisana D-Val (plipastatini B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>) (Volpon et al., 2000).

**Maltacini** se sastoje od familije peptidnih laktonskih antibiotika srodnih fengicinima, produkovanih od strane *B. subtilis*, od kojih je do sada okarakterisano 13 jedinjenja: B1a, B1b, B2a, B2b (Hagelin, 2005a), C1a, C1b, C2a, C2b (Hagelin, 2005b), D1a, D1b, D1c (Hagelin, 2005c), E1a i E1b (Hagelin, 2005d). Pozicija 4 kod svih članova u predloženoj ciklo-4,12 peptid-laktonskoj konfiguraciji je zauzeta hidroksiaminokiselinom kao delom laktonskog prstena (Hagelin et al., 2007). Maltacini pokazuju aktivnost protiv gram-pozitivnih bakterija poput *S. aureus*, nekih gram-negativnih bakterija i oportunističkih gljiva *C. albicans*, *Tricophyton mentagrophytes* i *A. fumigatus* (Hagelin, 2005d).

**Iturinska familija** je od veoma važnog biotehnološkog i farmaceutskog interesa. Brojna farmakološka svojstva su zabeležena za različite iturine, uključujući veoma potentne antifungalne, antibiotske i antitumorske aktivnosti (Trischman et al., 1994). To su polarni ciklični heptapeptidi izolovani iz različitih *Bacillus* spp. sojeva. Ova jedinjenja sadrže jednu β-amino masnu kiselinu i sedam α-amino kiselina sa D-Tyr kao drugom aminokiselinom i dve dodatne D-aminokiseline na pozicijama 3 i 6 (Chen et al., 2009a). Iturinska grupa sadrži iturine A, C, D i E, bacilomicine D, F i L, bacilopeptin i mikosubtilin (Moyne et al., 2004), kao i neke novije okarakterisane lipopeptide ove

klase poput miksirina (Zhang et al., 2004), subtulena A (Thasana et al., 2010) i mohavenzina A (Ma et al., 2012).

**Iturin A** je ciklični lipopeptid neribozomalno sintetisan od strane nekoliko *Bacillus* sojeva sa alifatičnim lancem  $\beta$ -amino masne kiseline sa 14 ili 15 ugljenikovih atoma i u prirodi se produkuje kao mešavina do osam izomera označenih kao A<sub>1</sub>-A<sub>8</sub> (Peypoux et al., 1978a). Iturin A je efektivan protiv gljiva i kvasaca, prolazi kroz ćelijski zid i narušava ćelijsku membranu formirajući male vezikule i agregacije pomoću intramembranskih partikula (Thimon et al., 1995), a pokazuje i antibakterijski efekat na *Micrococcus luteus* (Maget-Dana and Peypoux, 1994). Skorije je pokazano da je iturin A zaslužan za biokontrolnu aktivnost soja *B. amyloliquefaciens* PPCB004 protiv post-žetvenih patogenih gljiva (Arebola et al., 2010). Pokazano je da iturin A uzrokuje promene u propustljivosti membrane dovodeći do propuštanja jona K<sup>+</sup> iz intracelularnog medijuma (Harnois et al., 1989).

**Iturin C** se normalno nalazi zajedno sa iturinom A, a razlikuje se od njega po prisustvu ostatka L-Asp vezanog za karboksilnu grupu  $\beta$ -aminokiseline, za razliku od ostatka L-Asn kod iturina A (Peypoux et al., 1978b).

**Iturini D i E** izolovani iz soja *B. subtilis*, koji produkuje iturin A, razlikuju se od njega prisustvom slobodne karboksilne grupe u slučaju iturina D i karboksimetil grupe kod iturina E (Besson and Michel, 1987).

**Bacilomicin D** je smeša dva homologa lipopeptida: lipidni deo se sastoji od 3-amino-12-metiltridekanoične ili 3-amino-12-metiltetradekanoične kiseline; peptidni deo sadrži po jednu od svake od sledeće navedenih 7 aminokiselina: D-Asn, L-Asp, L-Glu, L-Pro, D-Ser, L-Thr i D-Tyr (Peypoux et al., 1981). Bacilomicin D, izolovan iz endofitskog *Bacillus vallismortis* ZZ185, pokazuje jaku antifungalnu aktivnost protiv nekoliko fitopatogenih gljiva uključujući *F. graminearum*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora capsici* i *R. solani* (Zhao et al., 2010).

**Bacilomicin F** je ciklični lipopeptid izolovan iz *B. subtilis*. Ovaj antibiotik je srodan iturinu A i poseduje iste peptidne sekvence osim prisustva L-Thr umesto L-Ser ostatka, pomoću koga je vezan za  $\beta$ -aminokiselinu (Peypoux et al., 1985). Lipidni deo je sastavljen od mešavine C<sub>16</sub> i C<sub>17</sub>  $\beta$ -aminokiselina.



**Bacilomicin L** je kao potentni antifungalni agens (Volpon et al., 1999), izolovan takođe iz soja *B. subtilis*. Peptidni deo sačinjavaju D-Asp, L-Asp, L-Gln, L-Ser, D-Ser, L-Thr i D-Tyr, dok je lipidni deo mešavina kiselina 3-amino-12-metiltridekanoične (46%), 3-amino-12-metiltetradekanoične (38%), 3-amino-12-metilpentadekanoične (11%), kao i dva manja homologa (Besson et al., 1977).

**Bacilomicin Lc** je novookarakterisani antifungalni antibiotik iz klase iturina, kao skup od pet srodnih jedinjenja. Razlikuje se po strukturi od bacilomicina L u promenama sekvence i to Asp-1 u Asn-1 i Gln-5 u Glu-5. Pet srodnih jedinjenja se razlikuju međusobno jedino po strukturi alifatičnog bočnog lanca (Eshita et al., 1995).

**Bacilopeptini A, B i C** su identifikovani kao iturinu slični antifungalni antibiotici izolovani iz *B. subtilis* FR-2 (Kajimura et al., 1995). Njihove strukture su analogne bacilomicinu L, sadrže dugi lanac  $\beta$ -aminokiseline i L-Asn i L-Glu umesto L-Asp i L-Gln ostataka koji se nalaze u bacilomicinu L.

**Mikosubtilin** izolovan iz *B. subtilis* je ciklično jedinjenje slične građe kao i ostali pripadnici iturinske grupe (Peypoux et al., 1986). **Mikosubtilini B i C** razlikuju se po prisustvu karboksilne i karboksimetil grupe, respektivno u odnosu na karboksiamidnu grupu prvoizolovanog mikosubtilina (Besson and Michel, 1989).

**Miksirini A, B i C** izolovani iz marinskih sojeva *Bacillus* sp. blizu Arktičkog pola, pokazuju antikancerogena svojstva, inhibirajući rast humanih ćelija kancera debelog creva sa vrednostima  $IC_{50}$  od 0,68, 1,6 i 1,3  $\mu\text{g/ml}$ , respektivno (Zhang et al., 2004). **Subtulen A** izolovan iz *B. subtilis* SSE4 soja pokazuje i antifungalnu i antibakterijsku aktivnost (Thasana et al., 2010). **Mohavenzin A**, najnoviji pripadnik iturinske familije koji je izolovan iz marinskog soja *Bacillus mojavensis* B0621A, pokazuje antifungalnu aktivnost protiv širokog spektra fitopatogenih gljiva i slabiju aktivnost protiv bakterije *S. aureus*, a citotoksičan je za humane leukemijske ćelijske linije (Ma et al., 2012).

**Surfaktinska familija** sastoji se od moćnih amfifilnih membransko-aktivnih biosurfaktantskih lipoheptapeptida sa strukturom sličnom iturinima, ali bez značajnog pojedinačnog fungitoksičnog efekta kako je ranije smatrano, pri čemu je pokazano da

poseduju sinergistički efekat sa iturinom A u antifungalnom delovanju (Maget-Dana et al., 1992).

**Surfaktin** produkovan od *Bacillus* vrsta poput *B. subtilis* (Rahman et al., 2006), *B. amyloliquefaciens* (Sun et al., 2006), *B. licheniformis* (Tendulkar et al., 2007) i *Bacillus natto* (Kameda et al., 1974) je heptapeptid sa hiralnom sekvencom LLDLLDL povezan  $\beta$ -hidroksi masnom kiselinom sastavljenom od 13-15 ugljenikovih atoma i formira cikličnu laktonsku strukturu (Chen et al., 2009a). Surfaktin izolovan iz *B. licheniformis* BC98 pokazuje značajnu antifungalnu aktivnost protiv različitih fitopatogenih gljiva uključujući *Magnaporthe grisea*, izazivača pirinčane truleži (Tendulkar et al., 2007). Pojedini surfaktini takođe ispoljavaju antimikrobnu (Vater, 1986), antitumorsku (Kameda et al., 1974), hemolitičku (Kikuchi and Hasumi, 2002), antikoagulantnu i fibrinolitičku (Kim et al., 2006) aktivnost. Kao jedan od najjačih biosurfaktanata (Nikolas, 2003) surfaktin ima brojne aplikacije u životnoj sredini i biotehnologiji (Solaiman, 2005). Učestvuje u remedijaciji zemljišta kontaminiranog teškim metalima (Mulligan, 2005) i u biokontroli fitopatogena (Bais et al., 2004) i insekata (Assie et al., 2001). Veruje se da je biološka uloga surfaktina da podrži kolonizaciju površina i snabdevanje hranljivim materijama kroz površinsko vlaženje, kao i u deterdžentskim svojstvima. Pri visokim koncentracijama surfaktini reaguju kao klasični deterdženti, a u slučaju manje koncentracije funkcionišu u smislu formiranja jono-zavisnih pora u ćelijskoj membrani (Heerklotz and Seelig, 2007). Surfaktin sintetisan od strane *B. amyloliquefaciens* FZB42 omogućava formiranje biofilma i na taj način oprema bakteriju moćnim antagonističkim prednostima tokom kolonizacije površina korena i listova biljaka (Chen et al., 2009a).

**Lihenizini** su lipopeptidni biosurfaktanti koje produkuju različiti sojevi *B. licheniformis* (Jenny et al., 1993). Lihenizine produkuju i druge *Bacillus* vrste poput *B. megaterium* izolovanog iz zemljišta (Pueyo et al., 2009). Osnovna struktura im je slična surfaktinima, a glavna razlika je u ostatku na poziciji 1 (Gln) ili 5 (Asn) kod lihenizina za razliku od kiselinskog ostatka kod surfaktina (Grangemard et al., 1999). Osam tipova lihenizina je identifikovano do sada i to: lihenizin A, B, C, D, G, (Val7) lihenizin G, (Ile4) lihenizin G i (Ile2,4) lihenizin G (Yakimov et al., 1995; Konz et al., 1999). Razlike u lihenizinskim tipovima su posledica tipa i sekvenci aminokiselina u

laktoskom prstenu (Li et al., 2008). Pokazano je da je antibiotska aktivnost lihenizina slabija od surfaktina (Yakimov et al., 1995), ali su daleko potentniji surfaktanti od surfaktina, naglašavajući dominantnu ulogu karboksilne grupe u procesu agregacije (Grangemard et al., 1999).

**Halobacilin** je acilpeptid sličan surfaktinu koga proizvode vrste *Bacillus* izolovane iz dubinskog sedimenta mora. Pokazuje umerenu citotoksičnost na kancerogenim humanim ćelijama, ali za razliku od iturina, ne pokazuje antibiotsku ni antifungalnu aktivnost (Trischman et al., 1994). Kompleks metabolita koji se sastoji od dva izomerna ciklična acilpeptida, identifikovanih kao izomeri halobacilina, je izolovan iz kulture *Bacillus* sp. A1238. Kompleks je nazvan izohalobacilin i odgovoran je za inhibiciju Acil-CoA: holesterol acil-transferazne aktivnosti (Hasumi et al., 1995).

**Bamilocin A** je novi lipopeptid srodan surfaktinu iz *B. amyloliquefaciens* LP03 koji pokazuje antagonističku i emulgatorsku aktivnost. Izgrađen je od sedam aminokiselina i  $\beta$ -hidroksi-C13 masne kiseline (Lee et al., 2007).

**Pumilacidini A, B, C, D, E, F i G** izolovani iz soja *B. pumilis*, su ciklični acilheptapeptidi srodni surfaktinu, izgrađeni od  $\beta$ -hidroksi masne kiseline, dva L-Leu, dva D-Leu, L-Glu, L-Asp i L-Ile (Pumilacidini A, C i E) ili L-Val (Pumilacidini B, D, F i G). Jaka aktivnost protiv gljiva *R. solani*, *P. aphanidermatum* i *Sclerotium rolfsii* je pokazana za pumilacidine izolovane iz endofitskog soja *B. pumilus* MAIIM4 iz manioke u Brazilu (Melo et al., 2009), kao i aktivnost u inaktivaciji oksidativne fosforilacije u mitohondrijama usled destrukcije ćelijske membrane (From et al., 2007).

Nekoliko novih cikličnih nekatjonskih lipopeptida je okarakterisano u skorije vreme, poput marihizina A (Liu et al., 2010), maribasina A i B, izolovanih iz *Bacillus marinus* B-9987 (Zhang et al., 2010) i kurstakina A (Hathout et al., 2000; Béchet al., 2012), ali se još uvek ne mogu jasno klasifikovati. Poslednjih godina je uočena i produkcija novih lipopeptidnih jedinjenja izolovanih iz soja *B. thuringiensis* koji je do skoro preokupirao pažnju zbog svojih izraženih insekticidnih karakteristika.

**Kurstakini** predstavljaju novu familiju lipopeptida produkovanih iz *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, sastavljenu od nekoliko lineranih lipoheptapeptidnih jedinjenja sa istom aminokiselinskom sekvencom: Thr-Gly-Ala-Ser-His-Gln-Gln

(Hathout et al., 2000). U svom sastavu uključuju His ostatak koji je veoma redak u do sada okarakterisanim bakterijskim lipopeptidima. Prvi izolovani homolog kurstakina nije u svom sastavu sadržao  $\beta$ -hidroksi masnu kiselinu, te su ova jedinjenja svrstana u linearne molekule, ali je pokazano da se mogu naći i u formi parcijalno cikličnih jedinjenja (Hathout et al., 2000), kao i u cikličnim formacijama (Béchet al., 2012) što ih svrstava i u klasu ostalih cikličnih nekatjonskih lipopeptida (Cochrane and Vederas, 2014). Različiti lanci masnih kiselina (izoC11, nC12, izoC12 i izoC13) su vezani preko amidne veze za N-terminalnu aminokiselinu. Svaki lipopeptid ima laktonsku vezu između karboksi-terminalne aminokiseline i hidroksilne grupe Ser ostatka bočnog lanca. L i D izoforme aminokiseline nisu još uvek okarakterisane. Skorašnja identifikacija gena uključenih u biosintezu ovih ili sličnih jedinjenja ukazuje da bi aminokiseline na poziciji 1 i 6 mogle biti u D-formi (Bumpus et al., 2009; Abderrahmani et al., 2011). Uočeno je da ova jedinjenja pokazuju antifungalnu aktivnost protiv *Stachybotrys charatum* i uglavnom se adsorbuju na površinu spora (Hathout et al., 2000). Nekoliko produkcijskih sojeva kurstakina pokazuje inhibitorni efekat na *Pseudomonas aeruginosa*, *M. luteus* i brojne gljive, međutim bez detaljnih testova prečišćenih jedinjenja, ne može se zasigurno reći da li je to samo zasluga kurstakina A.

### 1.2.3 BIOSINTEZA LIPOPEPTIDA

Gevers et al. su 1968. godine prvi put demonstrirali, korišćenjem ćelijskog ekstrakta producentnog soja, da se može biosintetisati peptidni antibiotik (gramicidin) u prisustvu RNaza ili inhibitora ribozomalne mašinerije. Bio je to ključni eksperiment koji je pokazao da postoje drugi biosintetski putevi za sintezu peptida, koji ne uključuju ribozomsku mašineriju. Od tada je urađeno mnogo radova na opisivanju detalja neribozomalne peptidne sinteze (Finking and Marahiel, 2004), koja je odgovorna za sintezu više od hiljadu aktivnih biomolekula koji se mogu klasifikovati u oko 200 familija.

Neribozomalna peptidna sinteza uključuje velike multidomenske enzime nazvane neribozomalne peptidne sintetaze (NRPS) koje su organizovane u module (Sieber and Marahiel, 2005). Svaki modul je odgovoran za ugrađivanje jednog gradivnog bloka u okviru rastućeg polipeptidnog lanca i može biti podeljen na definisan odeljak proteina nazvan domenom koji je uključen u specifičnu enzimsku aktivnost.

Četiri glavna katalitička domena je prisutno u većini NRPS: adenilatni (A), tiolatni (T), kondenzacioni (C) i tioesterazni (TE) domen. Adenilatni domen selektuje odgovarajuću aminokiselinu i aktivira je kao amino-acil adenilat. Aktivirana aminokiselina se onda prebacuje na T-domen, takođe nazvan i "Peptidyl-Carrier-Protein", odnosno PCP-domen, koji predstavlja transportnu jedinicu. U ovom domenu aktivirani aminokiselinski ostatak je kovalentno vezan za 4'-fosfopanteteinski (4'-PP) kofaktor kao tioestar. Ovaj kofaktor se post-translaciono prebacuje na Ser ostatak PCP domena. Ova reakcija se katalizuje posredstvom enzima fosfopanteteinil transferaze (kodiranom kod *B. subtilis sfp* genom), koja je esencijalna u transformisanju apoforme NRPS u haloformu (Mofid et al., 2004). 4'-PP kofaktor deluje kao fleksibilna ruka u formiranju veze amino-acil i peptidil supstrata u transportu između različitih katalitičkih centara. C-domen katalizuje formiranje peptidne veze između amino-acil supstrata vezanog preko PCP susednih modula. Terminacija sinteze je katalizovana terminalnim enzimom poslednjeg modula. U većini slučajeva lipopeptidne sinteze, ova reakcija je posredovana tioesteraznim domenom. On omogućava oslobađanje peptida i često je uključen u formiranje makrocikličnih produkata (laktona i laktama) ili u oligomerizaciju peptidnih jedinica (Kopp and Marahiel, 2007).

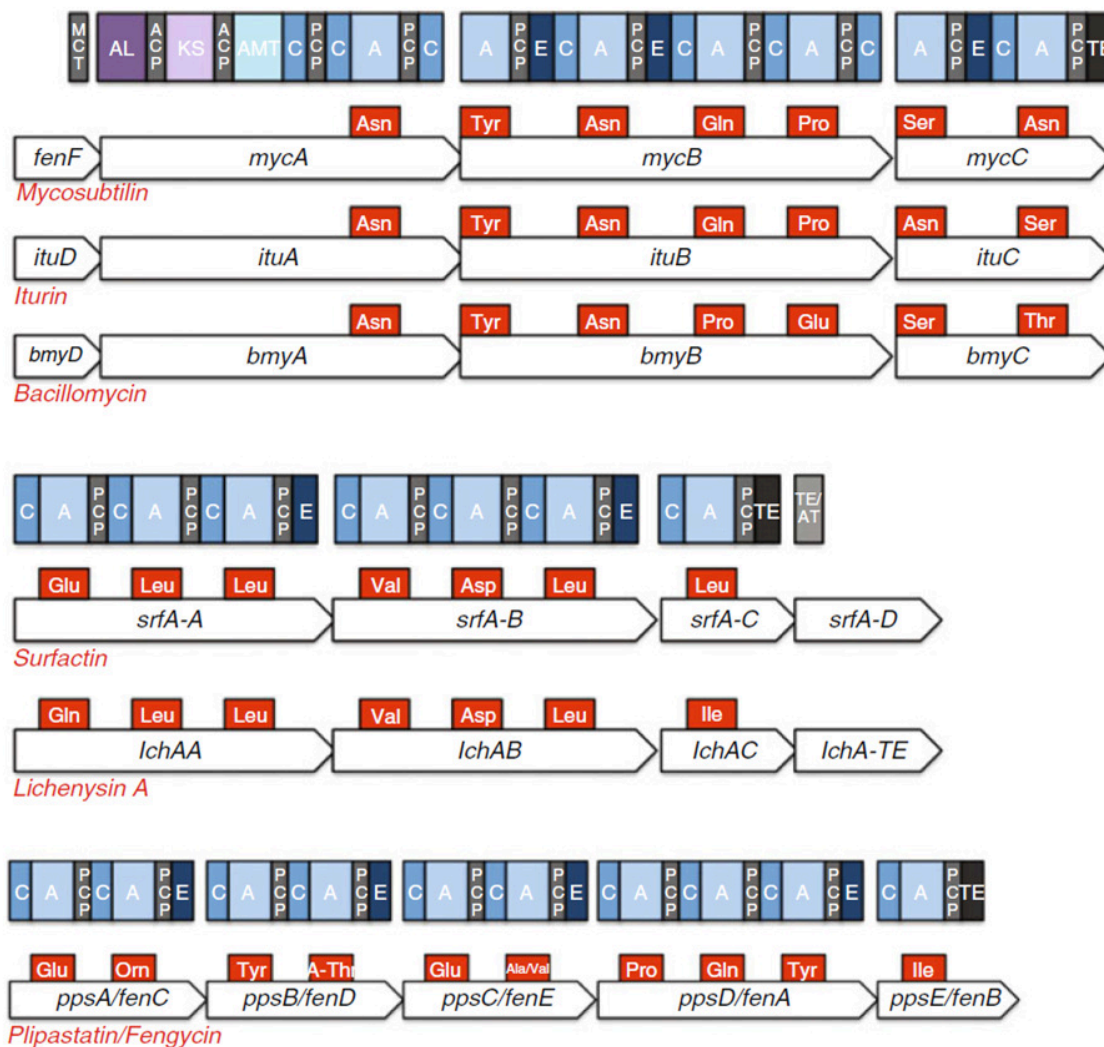
Često dodatni enzimi mogu biti uključeni u biosintezu peptida kako bi modifikovali samu strukturu monomera, uključenih u primarnu strukturu ili zarad dodavanja nekih eksternih jedinjenja peptidu. Među „krojačkim“ domenima koji uključuju ciklizaciju (Cy), metilaciju (Me), oksidaciju (Ox), glikozilaciju, epimerizaciju (E) i dodavanje lanca masne kiseline, poslednja dva navedena domena su uključena u biosintezu lipopeptida kod *Bacillus* sp. (Jacques, 2011). E-domen katalizuje epimerizaciju PCP-veze L-aminokiseline rastućeg polipeptidnog lanca. Dodavanje lanca masne kiseline prvoj aminokiselini peptidnog dela katalizovano je prvim specifičnim kondezacionim domenom, takođe nazvanim starter kondenzacioni domen. Dodati lanac masne kiseline može biti delimično sintetisan od strane druge glavne grupe modularnih enzima, poliketid sintaza (PKS). U poslednjem navedenom slučaju hibridni kompleks PKS/NRPS je potreban za sintezu ovakvih biomolekula (Du et al., 2001). Na kraju u mnogim multienzimskim kompleksima, nekoliko proteina je uključeno u završetak procesa montažnih linija. Biosinteza pravog neribozomalno sintetisanog peptida, zahteva pravilnu protein-protein interakciju između partnerskih enzima i istovremenu

neželjenu reakciju između nepartnerskih enzima. Kratke terminalne strukture, nazvane NRPS komunikacijsko-posredujućim domenima (COM), su odgovorne bar za najveći deo pravilno kanalisanih reakcija intermedijera duž montažne linije (Hahn and Stachelhaus, 2004).

Tri velika otvorena okvira čitanja (ORF) koji kodiraju surfaktin sintetazu su označeni kao *srfA-A*, *srfA-B* i *srfA-C* (Galli et al., 1994). Oni predstavljaju linearni niz od sedam modula (Slika 3). Po tri modula su prisutna u proizvodnji *srfA-A* i *srfA-B*, a poslednji u proizvodnji *srfA-C*. Moduli 3 i 6 zadrže E-domen koji transformiše ugrađeni L-Leu ostatak u D-Leu. Lanac  $\beta$ -hidroksilovane masne kiseline se dodaje aminokiselini aktiviranoj u prvom modulu od strane starter kondezacionog domena. Ovaj enzim takođe katalizuje formaciju laktonske veze između karboksilne grupe poslednje aminokiseline i hidroksilne grupe lanca masne kiseline. Prva tioesteraza fuzionisana sa C-terminalnim krajem poslednjeg aktivacionog PCP domena je odgovorna za otpuštanje sintetisanog proizvoda sa enzimskog templeta. Druga tioesteraza/transferaza (Te/At-domen) koju kodira četvrti gen, *srfA-D* stimuliše inicijaciju biosinteze (Steller et al., 2004). Dva srodna para COM domena:  $\text{Com}^{\text{D}}_{\text{srfA-A}}/\text{COM}^{\text{A}}_{\text{srfA-B}}$  i  $\text{Com}^{\text{D}}_{\text{srfA-B}}/\text{COM}^{\text{A}}_{\text{srfA-C}}$  olakšavaju selektivnu interakciju između partnerskih enzima (Chiocchini et al., 2006). U slučaju lihenizinskog operona uočena je slična organizacija u vidu tri ORF-a (Konz et al., 1999). Male razlike su jedino primećene u primarnoj strukturi odgovarajuće sintetaze, gde u modulu 1 modifikacija aminokiseline Lys u Glu dovodi do ugrađivanja Gln umesto Glu na poziciji 1 lipopeptida, dok u modulu 7 zamena Ala sa Gly i Cys sa Val u aktivnom mestu adenilatnog domena dovodi do ugrađivanja Ile umesto Leu (Slika 3).

Fengicini ili plipastatini su sintetisani pomoću pet NRPS (Fen1 do Fen5) kodiranih operonom sa pet ORF-a *fenA-E* (ili *ppsA-E* u slučaju plipastatina) (Tosato et al., 1997; Steller et al., 1999; Koumoutsis et al., 2004). Prva tri enzima, Fen1, Fen2 i Fen3 sadrže dva modula, četvrti sadrži tri modula i poslednji enzim sadrži takođe jedan modul (Slika 3). Kao i u slučaju sinteze surfaktina, lanac  $\beta$ -hidroksi masne kiseline se dodaje aktiviranoj aminokiselini prvog modula od strane starter kondezacionog domena. Tioesteraza prisutna u poslednjem modulu katalizuje otpuštanje peptida i formiranje estarske veze između karboksilne grupe poslednje aminokiseline (Ile) i hidroksilne

grupe Tyr na poziciji 3. Epimerizacioni domeni su potvrđeni u modulima 2, 4, 6 i 9. D-forme odgovarajućih aminokiselinskih ostataka su detektovane u finalnom produktu.



**Slika 3.** Operoni odgovorni za biosintezu lipopeptida mikosubtilina, iturina, bacilomicina, surfaktina, lihenizina A i plipastatina/fengicina kod *Bacillus* spp. Funkcija enzimskih domena je objašnjena u tekstu. (Preuzeto iz Jacques, 2011).

Za razliku od surfaktina i fengicina, iturinski derivati se sintetišu uz pomoć PKS/NRPS hibridnog kompleksa. Operon se sastoji od četiri ORF-a označenih kao: *fenF*, *mycA*, *mycB* i *mycC* za mikosubtilizin (Duitman et al., 1999) ili *itud*, *ituA*, *ituB* i *ituC* za iturin (Tsuge et al., 2001) ili *bmyD*, *bmyA*, *bmyB* i *bmyC* za bacilomicin D (Hofemeister et al., 2004; Koumoutsi et al., 2004). Zadnja tri gena kodiraju za NRPS odgovorne za inkorporaciju prve rezidue (Asn za MycA, ItuA i BmyA), sledeće četiri

rezidue (Tyr, Asn, Gln, Pro za MycB i ItuB; Tyr, Asn, Pro, Glu za BmyB) i dve poslednje residue (Ser, Asn za MycC; Asn, Ser za ItuC i Ser, Thr za BmyC) (Slika 3).

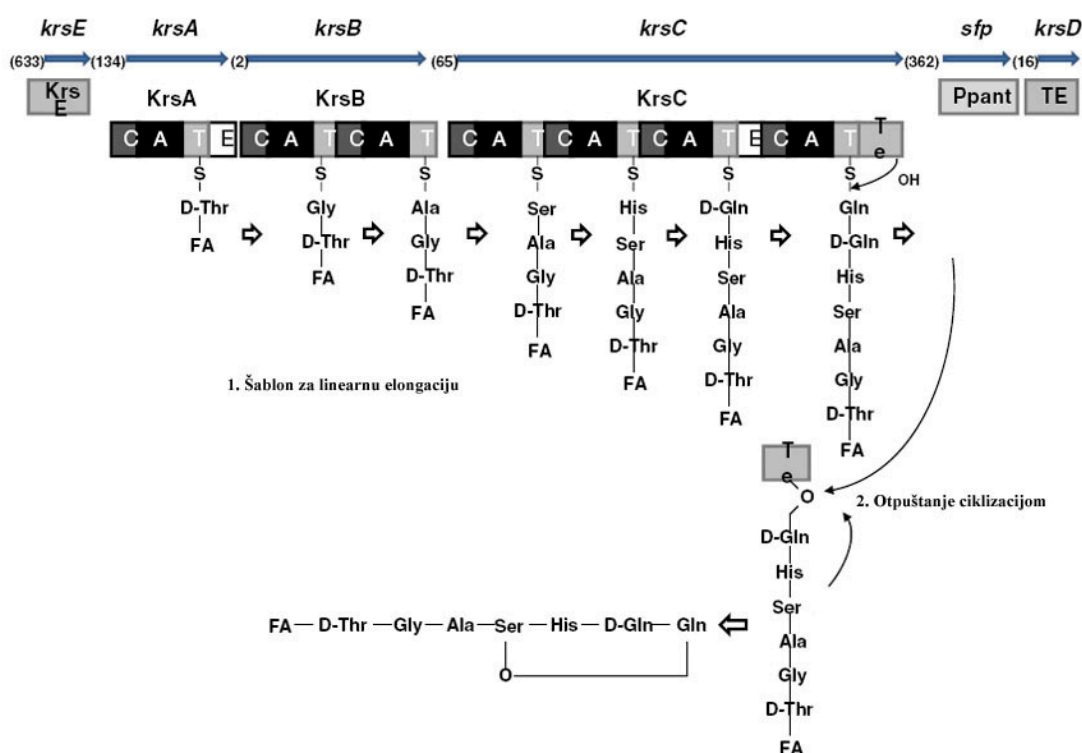
Tioesteraza prisutna u poslednjem modulu katalizuje otpuštanje peptida i formiranje peptidne veze između karboksilne grupe poslednje aminokiseline i amino grupe lanca masne kiseline. Epimerizacioni moduli su identifikovani u 2, 3 i 6 modulu. D-forme odgovarajućih aminokiselinskih ostataka su detektovane u finalnom produktu. Razlike između struktura iturina A i mikosubtilina (kod koga su zadnje dve aminokiseline invertovane) može se objasniti intergenskom promenom domena u *mycC* i *ituC*. Sintetaza bacilomicina D je slična kod iturina A, osim u slučaju aminokiselina aktiviranih modulima 4, 5 i 7. Gen *fenF* (*ituD*) kodira malonil-CoA transacilazu (MCT-domen), dok *mycA* takođe sadrži gene koji se odnose na poliketid sintazu. Ovi geni su odgovorni za poslednje korake biosinteze lanca masnih kiselina [poslednja elongacija i  $\beta$ -aminacija (Aron et al., 2005)], pre nego što se premeste na prvu aminokiselinu peptidnog dela [acil-CoA ligaza (AL-domen), acil protein nosilac (ACP-domen),  $\beta$ -keto acil sintetaza (KS-domen i amino transferaza (AMT-domen)] (Slika 3).

Dva pristupa za detekciju potencijalnih operona i novih kurstakin NRPS gena odgovornih za biosintezu kod *B. cereus* i *B. thuringiensis* su razvijena u skorašnje vreme. Prvi je baziran na prednosti veličine NRPS enzima i prisustvu jedinstvenih marker jona koji potiču sa fosfopanteteinil kofaktora, korišćenjem adaptirane masene spektrometrije (Bumpus et al., 2009), dok je drugi baziran na PCR pristupu korišćenjem degenerativnih prajmera (Abderrahmani et al., 2011). Iz ove dve studije je proisteklo predviđanje potencijalnog klastera kurstakina. Klaster kurstakina sadrži tri gena (*krsA*, *krsB* i *krsC*) koji kodiraju tri velika multifunkcionalna proteina (KrsA, KrsB i KrsC) koji izgrađuju kompletnu sintetazu (Slika 4).

Sintetaza je organizovana na sledeći način: KrsA se sastoji od jednog modula (m1), KrsB je sastavljen od dva modula (m2 i m3) i KrsC uključuje četiri modula (m4 do m7). Za svaki modul je pronađen kondenzacioni adenilatni-tiolatni motiv. Moduli m1 i m6 opremljeni su dodatnim epimerizacionim domenima. Modul 7 uključuje finalni tioesterazni domen (TE) koji omogućuje oslobađanje novog peptida sa NRPS, kao i moguću ciklizaciju. Gen za kodiranje fosfopanteteinil transferaze je identifikovan nizvodno od NRPS kompleksa. Na osnovu bioinformatičke analize koja je primenljivana



u ovim studijama može se naslutiti i postojanje druge tioesteraze (TEII) koja je kodirana sledećim genom (*krsD*). Pretpostavlja se da postojanje linearnih formi peptida kurstakina potiče upravo zbog prisustva ove tioesteraze ili nedovoljne ekspresije prve (Béchet et al., 2012). Takođe, šesti gen (*krsE*) je situiran uzvodno od *krsA-C* gena i pripada kurstakinskom klasteru i prvi put je detektovan kod *B. thuringiensis* Bt407. Pretpostavlja se da je produkt ovog gena (KrsE) odgovoran za sekreciju ovih lipopeptida (Dubois et al., 2012).



**Slika 4.** Hipotetička biosinteza kurstakina zasnovana na osnovu bioinformatičke analize. Brojevi u zagradama odgovaraju razmacima (u nukleotidima) između različitih otvorenih okvira čitanja kod soja *B. thuringiensis* ser. *ponicheriensis* BSCG 4BA1. C: kondezacioni domen; A: adenilatni domen; T: tiolatni domen; E: epimerizacioni domen; Te: tioesterazni domen; Ppant: fosfopanteteinil transferaza (*sfp*); TE: Tip II tioesteraza; FA: masna kiselina. (Preuzeto iz Béchet et al., 2012).

### 1.3 PERSPEKTIVE BIOKONTROLE

Mikrobiološki biopesticidi, a naročito proizvodi na bazi sojeva roda *Bacillus*, unapređuju i štite zdravlje biljaka kroz mnoge mehanizme i time skreću pažnju na sebe u smislu komercijalne aplikacije. Na žalost, ovi proizvodi često nude samo delimičnu zaštitu od napada patogenih mikroorganizama i štetočina. Još jedna slabost mikrobioloških biopesticida je i njihova nedoslednost u efikasnosti. Kako je aktivni sastojak živi organizam, njegova efikasnost umnogome zavisi od uslova primene u poređenju sa konvencionalnim pesticidima. Aktivnost korisnog organizma zavisi od njegove ukupne ekologije, tj. od interakcije između korisnog organizma, biljnog domaćina, patogena kao i biotičkih i abiotičkih parametara životne sredine (Butt et al., 1999; Fuentes-Ramirez and Caballero-Mellado, 2006).

Činjenica je da mnogi sojevi roda *Bacillus* proizvode više od jedne familije lipopeptida i može se pretpostaviti da postoje ekološke prednosti za same biljke, usled sinergističke interakcije između različitih jedinjenja. Naime, mnogobrojne studije svedoče o ulozi upravo lipopeptidnih jedinjenja u direktnom efektu na biljne patogene (Asaka and Shoda, 1996; Toure et al., 2004; Cao et al. 2012), a njihovo korišćenje pokazuje izvesne prednosti u smislu niske toksičnosti, biorazgradivosti i ekološke prihvatljivosti u poređenju sa hemijskim pesticidima (Yang et al., 2006). Međutim, interakcije lipopeptidnih molekula su i dalje slabo razjašnjene, a dodatna istraživanja aditivnog, sinergističkog ili antagonističkog delovanja u smislu uzajamne inhibicije ili delotvornog dejstva različitih lipopeptidnih molekula je svakako potrebno dalje ispitivati. Takođe, do danas je pokazano da kombinacija komplementarnih bioloških pristupa sa aditivnim i/ili sinergističkim efektom može da obezbedi veću konzistenciju i efikasnost u biokontroli, pa u tom smislu postoji sve veće interesovanje i za etarskim uljima kao mogućoj zameni konvencionalnih sintetičkih fungicida u cilju zaštite kultivisanih biljaka od fitopatogenih gljiva (Abdel-Kader, 2011). Literaturni podaci sve više ukazuju na efikasnost primene etarskih ulja i izolata roda *Bacillus* u zaštiti povrtarskih biljaka od strane fitopatogenih gljiva, tretmanom zemljišta u kome će biljka rasti, prskanjem listova i plodova (Arrebola et al., 2010b; Abdel-Kader et al., 2011) ili tretmanom semena u prevenciji suzbijanja fungalnih infekcija (Kritzing et al., 2002).

U slučaju roda *Bacillus*, jedan od glavnih uzroka je često primećeni deficit u vezama između oglada u polju i više kontrolisanih laboratorijskih eksperimenata. Isto tako, čak i ako neki sojevi *B. subtilis* pokazuju dobar biosintetički kapacitet u smislu proizvodnje širokog spektra antibiotika, samo ograničeni deo ove genetičke osnove posvećene antibioticima može biti eksprimiran u zemljištu, odnosno samo deo tog arsenala može biti stvarno proizveden u prirodnim uslovima (Cawoy et al., 2011).

Razvoj biotehnologije i analitičke hemije otvara vrata novim pristupima u istraživanju *in situ* proizvodnje antibiotika za značajne sojeve u njihovim ekološkim nišama. Pored toga, prilikom implementacije biopesticida u integrisanom upravljanju štetočinama, biološki proizvod mora da bude kompatibilan sa konvencionalnim pesticidima. Ovaj parametar je od posebnog značaja prilikom primene bioloških i hemijskih sastojaka istovremeno, kao na primer u tretiranju semena ili kombinovanog folijarnog prskanja. Istovremena implementacija nekoliko aktivnih sastojaka u jednom komercijalnom proizvodu je svakako način da se garantuje globalna efikasnost pod različitim uslovima, što podrazumeva proširivanje spektra patogena mešanjem sojeva sa različitim mehanizmima delovanja ili različitim ekoloških kompetencija (Ramamoorthy et al., 2001). Štaviše, kombinacija sojeva može dovesti do sinergističkih efekata poboljšavajući na taj način biokontrolu.

Formulacija i aplikativni metodi su ključna pitanja koja se odnose na efikasnost komercijalnih produkata (Sorokulova et al., 2008). Istraživanja o ovim temama treba da budu usmerena na prevazilaženje ekoloških ograničenja, koji su glavni razlozi za neuspeh ili nedostatak efekata bioloških agenasa za kontrolu na terenu. Genetičko inženjerstvo može biti korisno sredstvo za poboljšanje performansi mikroorganizama i prevazilaženje aplikativnih problema. Na kraju, pošto su sekvence genoma za neke vrste *Bacillus* postale dostupne (Kunst et al., 1997; Chen et al., 2009a), to može stimulisati istraživače da istražuju nove proizvode za industrijsku upotrebu poput biosurfaktanata (Raaijmakers et al., 2010) i biljnih bioprotektanata (Romano et al., 2011) u cilju pospešivanja farmaceutskog i agrohemijskog razvoja (Seydlova and Svobodova, 2008). Sva ta istraživanja mogu dovesti do eksploatacije komercijalnih sojeva optimizovanih za biokontrolu patogena biljaka (Harwood and Cranenburgh, 2008; Jourdan et al., 2009) u cilju prevencije post-žetvenih gubitaka plodova voća i povrća (Hong et al., 2005), kao

i zbog produkcije drugih molekula od industrijskog interesa poput enzima (amilaza ili proteaza) i nativnih ili heterologih proteina (Ongena and Jacques, 2008). Navedenih primera potencijalnih upotreba je mnogo, pa se stoga u bliskoj budućnosti očekuje veoma značajna uloga ovih mikroorganizama u promovisanju zdravlja biljaka u poljoprivredi 21. veka.

## **2. CILJEVI RADA**

## 2 CILJEVI RADA

Na osnovu onoga što se do sada zna o diverzitetu antimikrobnih jedinjenja koja sintetišu bakterije iz roda *Bacillus*, kao i o njihovom potencijalu za korišćenje u biokontroli različitih fitopatogenih bakterija i gljiva, ciljevi ovog rada su bili:

1. Testiranje kolekcije *Bacillus* sp. izolata na prisustvo gena odgovornih za proizvodnju različitih klasa neribozomalno sintetisanih lipopeptida.
2. Određivanje antimikrobnog spektra izabranih izolata producenata lipopeptidnih jedinjenja i praćenje dinamike njihove sinteze.
3. Ispitivanje antimikrobnog efekta lipopeptidnih ekstrakata odabranih izolata *in vitro*.
4. Utvrđivanje tipa interakcija i minimalne inhibitorne koncentracije lipopeptidnih ekstrakata pojedinačno i u različitim kombinacijama *in vitro*, kao i tipa interakcija ekstrakta i etarskih ulja na klijavost i inficiranost semena nevena *in situ*.
5. Ispitivanje efekta lipopeptidnih ekstrakata odabranih izolata, na nekroze tkiva listova, izazvane bakterijama i nekroze plodova izazvane gljivama, *in planta*.
6. Izolovanje i prečišćavanje lipopeptidnih jedinjenja odabranih izolata i karakterizacija masenom spektrometrijom.
7. Karakterizacija aktivnih antimikrobnih supstanci lipopeptidnih jedinjenja odabranih izolata visokoefikasnom tankoslojnom hromatografijom praćenom indirektnom bioautografijom.

### **3. MATERIЈAL I METODE**

### 3 MATERIJAL I METODE

#### 3.1 MATERIJAL

##### 3.1.1 BAKTERIJSKI SOJEVI

U ovom radu korišćeno je 205 izolata bakterija roda *Bacillus* izolovanih iz uzoraka iz prirode iz različitih regiona Srbije (Slika 5). Izolati *Bacillus* sp. izolovani iz zemlje, sena, slame i stajskog đubriva su morfološki okarakterisani i potvrđeni bojenjem po Gramu i katalaza testom (Stanković, 2003).



Slika 5. Izolati *Bacillus* sp. iz različitih regiona Srbije.



Indikatorski sojevi, koji su korišćeni za testiranje antimikrobne aktivnosti izolata *Bacillus* sp. prikazani su u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Indikatorski sojevi bakterija korišćeni za testiranje antimikrobne aktivnosti izolata *Bacillus* sp.

Redni br.	Vrsta indikatorskog soja / broj izolata	Medijumi za rast	Temperatura gajenja	Izvor izolata
1.	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> CFBP2528	YDC/LA	30 °C	Referentni soj*
2.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 301	II	II	
3.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 303	II	II	
4.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 309	II	II	
5.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 310	II	II	
6.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 311	II	II	
7.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 313	II	II	
8.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 314	II	II	
9.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 316	II	II	
10.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 320	II	II	
11.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 321	II	II	
12.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 327	II	II	Orah*
13.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 343	II	II	
14.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 350	II	II	
15.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 357	II	II	
16.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 358	II	II	
17.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 359	II	II	
18.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 382	II	II	
19.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 401	II	II	
20.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 406	II	II	
21.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 418	II	II	
22.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 422	II	II	
23.	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 431	II	II	
24.	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	PSA	II	
25.	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	BHI	37 °C	Laboratorijska kolekcija**
26.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LA	30 °C	
27.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i> P12	LA	II	
28.	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> P16	II	II	
29.	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> P53	II	II	Šećerna repa*
30.	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> P95	II	II	
31.	<i>Pseudomonas poae</i> P64	II	II	
32.	<i>Pectobacterium carotovorum</i> K5	LA	II	Kupus*
33.	<i>P. carotovorum</i> K6	II	II	

\* Kolekcija sojeva Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu iz Beograda

\*\* Kolekcija sojeva Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

### 3.1.2 FUNGALNI PATOGENI I SAPROFITNI SOJEVI

Indikatorski fungalni patogeni i saprofitni sojevi, koji su korišćeni za testiranje antimikrobne aktivnosti izolata *Bacillus* sp. *in vitro* i *in situ*, prikazani su u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Indikatorski fungalni sojevi korišćeni za testiranje antimikrobne aktivnosti izolata *Bacillus* sp.

Vrsta fungalnih patogena	Medijumi za rast	Temperatura gajenja	Izvor izolata
<i>Alternaria alternata</i>	PDA/TSB	25 °C	
<i>Aspergillus flavus</i>			Jabuka*
<i>Botryosphaeria obtusa</i>			
<i>Mucor</i> sp.			
<i>Colletotrichum acutatum</i>			Kruška*
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>			Višnja*
<i>Fusarium oxysporum</i>			Paprika*
<i>Fusarium solani</i>			Krompir*
<i>Monilinia fructigena</i>			Kajsija*
<i>Penicillium expansum</i>			Limun*
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>			Zelena salata*
<i>Phomopsis juglandina</i>			Orah*
<i>Phomopsis</i> sp. KP1 - KP20**			Kupina*
<i>Aspergillus flavus</i>			
<i>Aspergillus niger</i>			
<i>Aspergillus ochraceus</i>			
<i>Alternaria alternata</i>			
<i>Penicillium</i> sp.			
<i>Fusarium semitectum</i>			Seme nevena (ovaj rad)
<i>Fusarium oxysporum</i>			
<i>Fusarium solani</i>			
<i>Fusarium proliferatum</i>			
<i>Fusarium nygamai</i>			
<i>Fusarium polyfalidicum</i>			

\* Kolekcija sojeva Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu iz Beograda

\*\* Kolekcija 20 determinisanih sojeva do nivoa roda, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu iz Beograda

### 3.1.3 MEDIJUMI ZA GAJENJE BAKTERIJA I GLJIVA

#### **LB Medijum**

Tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

#### **LA Medijum**

LB sa dodatkom 15 g agara na 1000 ml.

#### **Soft LA Medijum**

LB sa dodatkom 7 g agara na 1000 ml.

#### **PSB Medijum**

Bakto-pepton	10 g
Saharoza	10 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

#### **PSA Medijum**

PSB sa dodatkom 15 g agara na 1000 ml.

#### **Soft PSA Medijum**

PSB sa dodatkom 7 g agara na 1000 ml.

#### **Spizizen Minimalni Medijum (MM)**

10 x KS	10 ml
40% glukoza	2,5 ml (1% finalno)
10% casamino acids	10 ml (1% finalno)
Tiamin (stok 5 mg/ml)	0,2 ml
20% MgSO <sub>4</sub>	0,05 ml
dH <sub>2</sub> O	do 100 ml

#### **Schaeffer Sporulacioni Medijum (ŠFS)**

Bakto-hranljivi bujon	8 g
10% KCl	10 ml
1.2% MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	10 ml
1M NaOH	0,5 ml
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

Autoklavirati, rashladiti do 50 °C i dodati:

1 M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 ml
0.01 M MnCl <sub>2</sub>	1 ml
1 mM FeSO <sub>4</sub>	1 ml

Napomena: FeSO<sub>4</sub> rastvariti u 0,01M HCL

**BHI Medijum (Brain–Heart Infusion)**

BHI	37 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**BHA Medijum**

BHI sa dodatkom 15 g agara na 1000 ml.

**Soft BHA Medijum**

BHI sa dodatkom 7 g agara na 1000 ml.

**YDC Medijum (Yeast Extract Dextrose Calcium Carbonate Agar)**

CaCO <sub>3</sub>	20 g
Glukoza	20 g
Ekstrakt kvasca	10 g
Agar	15 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**PDA Medijum (Potato Dextrose Agar)**

PDA	39 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**TSB Medijum (Tryptic bile Soy Broth)**

Kazein	20 g
Žučne soli	1,5 g
X-B-D glukuronska kiselina	0,075 g
Dimetil sulfoksid	3 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

## 3.2 METODE

### 3.2.1 METODE RADA SA BAKTERIJAMA

#### 3.2.1.1 Određivanje antibakterijske aktivnosti *in vitro*

U primarnoj analizi, svi testirani izolati *Bacillus* sp. su gajeni u LB medijumu na 30 °C aeracijom na 200 rpm preko noći. Tečne kulture su zatim centrifugirane (13000 × g, 15 min) i supernatant oslobođen ćelija je testiran. Indikatorski sojevi bakterija su gajeni preko noći u skladu sa njihovim osobinama i zahtevima za rast (Tabela 2). Antimikrobna aktivnost izolata određivana je modifikovanim difuznim metodom u bunarićima (Harris et al., 1989). Petri šolje sa odgovarajućim čvrstim medijumom su prelivane sa 7 ml odgovarajućeg soft agara (Tabela 2), koji je inokulisan sa 70 µl ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) ćelija indikatorskog soja. U soft agaru su pravljene bunariće na taj način što su šire strane sterilnih žutih nastavaka postavljane na čvrsti medijum u petri šolji pre preliivanja inokulisanim soft agarom. Prečnik bunarića je iznosio oko 5 mm. U bunariće je nanošeno po 50 µl supernatanta i petri šolje su inkubirane na optimalnoj temperaturi za rast indikatorskog soja bakterija. Proizvodnja antimikrobne supstance je detektovana na osnovu pojave zone odsustva rasta (inhibicije) indikatorskog soja oko bunarića, čiji su poluprečnici mereni od ivice bunarića i izražavani u mm.

Ponovljena analiza, koja je rađena sa etil-acetatnim i metanolnim ekstraktima određenih izolata *Bacillus* sp. i većim brojem indikatorskih sojeva, se razlikovala od primarne u činjenici da su ekstrakti testirani i difuzionim metodom u bunarićima i disk difuzionom metodom (Rahman et al., 2010). Metoda se sastojala u nanošenju sterilnih, filter diskova prečnika 5 mm (Abtek, Engleska), prethodno impregniranih sa 5-10 µl određene koncentracije ekstrakata, na površinu zasejane petri šolje. Petri šolje sa odgovarajućim čvrstim medijumom su prelivane sa 5 ml odgovarajućeg soft agara (Tabela 2), koji je inokulisan sa 50 µl ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) ćelija indikatorskog soja.

#### 3.2.1.2 Određivanje krive rasta i produkcije antimikrobnih supstanci

Antimikrobna aktivnost izabranih izolata određivana je u toku rasta kulture na 30 °C u četiri različita medijuma: LB, ŠFS, BHI i MM medijumu. Jedna kolonija ili 100 µl prekonoćne kulture odgovarajućeg izolata je zasejavano u 200 ml odgovarajućeg

medijuma i određivana je brojnost bakterija (CFU/ml) i spora (CFU/ml), kao i zamućenost kulture spektrofotometrijski (O.D.<sub>600</sub> nm), na svaka dva sata zasejavanjem odgovarajućih razblaženja na petri šolje sa LA medijumom u triplicatu. Kod određivanja brojnosti spora prethodila je termalna inaktivacija uzetog alikvota na 80 °C u trajanju od 10 minuta. Pored toga, u istim vremenskim intervalima, uziman je i alikvot kultura kojima je testirana antimikrobna aktivnost protiv *X. arboricola* 301, *X. arboricola* 406 i *L. monocytogenes* sojeva difuzionim metodom u bunarićima na već opisani način. Praćenje krive rasta je vršeno u trajanju od 48 h i nastavljeno do 72 h, uzorkovanjem na dvanaest sati inkubacije, nakon 48 h.

### 3.2.1.3 Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija

Mikrodiluciona metoda je korišćena za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) testiranih ekstrakata *Bacillus* sp., pojedinačno i u određenim kombinacijama. Za određivanje MIC vrednosti ekstrakata korišćene su mikrotitracione ploče sa 96 mesta. Bakterijske suspenzije izolata sa  $1 \times 10^8$  ćelija/ml su pripremljene iz prekonocnih kultura testiranih indikatorskih sojeva. Vršeno je dvostruko serijsko razblaživanje uzoraka medijumom u skladu sa osobinama i zahtevima za rast indikatorskih sojeva. Pored bunara sa ispitivanim ekstraktima, postavljena je i negativna kontrola (kontrola rasta bakterija) i kontrola sterilnosti (blank). Uzorci ekstrakata su rastvarani u DMSO (dimetil sulfoksid) pa je rađena i kontrola rastvarača, po istom principu serijskog razblaživanja kao u slučaju testiranih ekstrakata. Kao pozitivna kontrola korišćeni su antibiotici: streptomycin, gentamicin, vankomicin, ampicilin i cefepim, finalne koncentracije 1 mg/ml, kao i standardna visoko prečišćena jedinjenja iturina A i surfaktina (Sigma-Aldrich, SAD) finalne koncentracije 0,5 mg/ml. Uzorci ekstrakata, kontrola rastvarača i antibiotska kontrola rađeni su u duplikatu. Nakon serijskih razblaženja i postizanja finalne zapremine od 200 µl, dodavano je 22 µl resazurina (0,675 mg/ml finalne koncentracije) (Resazurin Sodium Salt C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>NNaO<sub>4</sub>, TCI, Belgija). Mikrotitracione ploče su inkubirane 24 h na 30 °C. Nakon inkubacije praćena je promena boje, tzv. resazurinska reakcija. Indikator resazurin, koji je ljubičaste boje, redukuje se u prisustvu bakterija u rezorufin ružičaste boje. Najmanja koncentracija pri kojoj nije došlo do promene boje tumači se kao MIC vrednost. Iz svih bunara u kojima nije došlo do promene boje, vršeno je zasejavanje na petri šolje sa LA

medijumom. Nakon inkubacije od 24 h na 30 °C posmatran je rast bakterija. Ukoliko je rast uočen data koncentracija je proglašavana MIC vrednošću, a u suprotnom za minimalnu baktericidnu (MBC) vrednost.

#### 3.2.1.4 Određivanje tipa interakcija ekstrakata

Za ispitivanje interakcija pojedinih ekstrakata *Bacillus* sp. korišćene su mikrotitracione ploče sa 96 mesta korišćenjem prethodno opisane rasazurinske reakcije. Testirana koncentracija uniformisanih stokova etil-acetatnih ekstrakata rastvorenih u DMSO iznosila je 25 mg/ml u slučaju pojedinačnih ekstrakata, dok u slučaju pravljenja odgovarajućih smeša dva ili tri ekstrakta korišćena je 1/2 odnosno 1/3 koncentracija uniformisanih stokova lipopeptidnih ekstrakata, respektivno. Serijska dilucija je vršena medijumom u skladu sa osobinama i zahtevima za rast indikatorskih sojeva na prethodno opisani način (Tabela 2). Ploče su inkubirane 24 h na 30 °C.

Kako bi se definisao tip njihove interakcije izračunavani su frakcioni inhibicioni koeficijenti (eng. Fractional Inhibitory Concentration, FIC) i frakcioni inhibicioni koncentracioni indeks (FIC<sub>i</sub>).

Frakciona inhibiciona koncentracija je izračunavana na sledeći način:

$$FIC_{(A)} = \frac{MIC(A \text{ u prisustvu } B)}{MIC(A)}; \text{ FIC jedinjenja A}$$

$$FIC_{(B)} = \frac{MIC(B \text{ u prisustvu } A)}{MIC(B)}; \text{ FIC jedinjenja B}$$

Frakcioni inhibicioni koncentracioni indeks je sračunat prema formuli:

$$FIC_i = FIC_{(A)} + FIC_{(B)}$$

FIC<sub>i</sub> za veći broj uzoraka se računa na isti način. Sabiraju se pojedinačne FIC vrednosti za sva jedinjenja čija se kombinacija testira.

Na osnovu vrednosti FIC indeksa definiše se interakcija između supstanci. Prema EUCAST (2000), kada je FIC<sub>i</sub> ≤ 0,5 onda se interakcija definiše kao sinergizam; za FIC<sub>i</sub> između 0,5 i 1 je aditivni efekat; indiferentan efekat za FIC<sub>i</sub> između 1 i 2 i antagonizam za vrednosti veće od 2.

### 3.2.1.5 *In vitro* određivanje kinetike rasta patogenih bakterija u prisustvu ekstrakata

Testovi za utvrđivanje stope i praćenje kinetike rasta patogenih bakterija u prisustvu etil-acetatnih ekstrakta *Bacillus* sp. sprovedene su utvrđivanjem minimalne inhibitorne koncentracije metodom opisanom kod Schwalbe et al. (2007), kao i IC<sub>50</sub> vrednosti, koja po FDA (Agencija za hranu i lekove, SAD) predstavlja koncentraciju leka ili ispitivane supstance koja je potrebna za 50% inhibicije rasta mikroorganizama u *in vitro* testiranjima. Za određivanje pomenutih parametara etil-acetatnih ekstrakata korišćene su mikrotitracione ploče sa 96 mesta. Bakterijske suspenzije izolata dobijene su na prethodno opisani način. Vršeno je dvostruko serijsko razblaživanje testiranih ekstrakata LB medijumom. Testirana finalna koncentracija prvog bunarića je bila 1 mg/ml. Pored bunara sa ispitivanim ekstraktima, postavljena je i negativna kontrola (kontrola rasta bakterija) i kontrola sterilnosti (blank). Pored pojedinačnih testiranja, sprovedeno je i testiranje dobijenih ekstrakata kokultivisanjem tri soja odjednom, kao i smeše dobijene mešanjem uniformnih koncentracija pojedinačnih ekstrakata. Očitavanje optičke gustine (O.D.<sub>570</sub> nm) je vršeno na čitaču mikrotitracionih ploča (TECAN, Infinite M200 PRO, Švajcarska) svakih sat vremena u trajanju od 24 h na temperaturi inkubacije od 30 °C. Beleženje i obrada rezultata izvršena je pomoću softverskog paketa (Magellan™ - Data Analysis Software).

### 3.2.1.6 *In planta* određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata na model sistemima *Arabidopsis thaliana* L. i *Beta vulgaris* L.

Aktimikrobna aktivnost *in planta* ispitivana je na model biljci *A. thaliana* L. i listovima šećerne repe *B. vulgaris* L. Semena su sterilisana 10 min u 0.3% (v/v) natrijum hipohloritu, isprana četiri puta u sterilnoj destilovanoj vodi i ostavljena 48 h na 4 °C. Nakon isteka 48 h semena su posađena u plastične saksije veličine 10 cm i inkubirane u klima komori na 30 °C sa fotoperiodom 12 h svetlosti i 12 h mraka 4 nedelje pre inokulacije. Biljke stare 28 dana su simultano inokulisane indikatorskim sojem *X. arboricola* 358 i pojedinačnim metanolnim lipopeptidnim ekstraktima *Bacillus* sp. izolata u slučaju *A. thaliana*, dok je u slučaju testova na *B. vulgaris* korišćen *P. syringae* pv. *aptata* P53, prirodni patogen ove biljne vrste, sa pojedinačnim i u različitim kombinacijama mešanim etil-acetatnim ili metanolnim ekstraktima po metodi



koju su u svom radu opisali May et al. (1997). Finalne koncentracije od 2,5 mg/ml u 20% metanolnom rastvoru korišćene su za testiranje metanolnih rastvora, a u slučaju etil-acetatnih ekstrakata rastvorenih u 0.66% DMSO kao rastvaraču korišćene su finalne koncentracije uniformisanih stokova od 1 mg/ml. Prilikom pravljenja odgovarajućih smeša dva ili tri ekstrakta korišćena je 1/2, odnosno 1/3 finalnih koncentracija pojedinačnih lipopeptidnih ekstrakata. Bakterijska suspenzija indikatorskih sojeva sa oko  $10^7$  ćelija/ml je pripremljena iz prekonocne kulture. Biljke su inokulisane metodom uboda pomoću sterilne medicinske igle, smešom metanolnih ili etil-acetatnih ekstrakata *Bacillus* sp. izolata i odgovarajućeg indikatorskog soja u odnosu 4:1 (v/v). Takođe, biljke su inokulisane i pojedinačnim indikatorskim sojevima u vidu pozitivnih kontrola, zatim odgovarajućim rastvaračima, gore pomenute finalne procentne koncentracije u vidu negativnih kontrola, kao i samim pojedinačnim ili međusobno mešanim lipopeptidnim ekstraktima u vidu sekundarnih negativnih kontrola nekroze tkiva listova. Inokulacija listova je vršena u duplikatu sa više uboda po svakom listu. Na svaki ubod dodavano je po 10 µl smeše i biljke su ostavljane na inkubaciju 14 dana u vlažnu komoru na 30 °C sa fotoperiodom od 12 h svetlosti i 12 h mraka u slučaju *A. thaliana* i 7 dana pri istim parametrima fotoperioda i temperature u slučaju *P. syringae* pv. *aptata* P53. Nakon isteka perioda inkubacije, ocenjivan je razvoj nekrotičnih promena na inokulisanim listovima i opšte stanje biljaka.

### **3.2.1.7 Biohemijska identifikacija *Bacillus* sp.**

Biohemijska identifikacija *Bacillus* sp. izvršena je korišćenjem API 50 CHB i API 20 E kitova po protokolu proizvođača (BioMerieux, Francuska). Očitavanje rezultata je vršeno korišćenjem Apiweb<sup>TM</sup> softvera (BioMerieux, Francuska).

### 3.2.2 METODE RADA SA GLJIVAMA

#### 3.2.2.1 Identifikacija gljiva

Determinacija kolonija gljiva izolovanih sa semena nevena, formiranih na medijumu, vršena je na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika izolata. Makroskopske odlike podrazumevaju izgled i brzinu razvoja kolonija na PDA podlozi, pigmentaciju supstrata i izgled kolonije na pozadini. Mikroskopske odlike podrazumevaju prisustvo ili odsustvo mikrokonidija, oblik i način formiranja mikrokonidija i konidiogenih ćelija, izgled makrokonidija, prisustvo ili odsustvo hlamidospora, sklerocija, biometrijske vrednosti osobina reproduktivnih organa gljiva u kulturi i na domaćinu (Stević, 2013). Korišćeni su standardni determinatori: Booth (1971a i 1971b); Ainsworth et al. (1973); Pitt (1979); Gerlach and Nirenberg (1982), Brown (1987), Burgess et al. (1994); Elis and Elis, (1997), Kirk (2008). Pri identifikaciji najzastupljenijih *Fusarium* vrsta vođeno je računa o nekim opšte prihvaćenim principima (Nelson *et al.*, 1983).

#### 3.2.2.2 *In vitro* određivanje antifungalne aktivnosti

Antifungalni efekat izolata *Bacillus* sp. testiran je *in vitro*, primenom metode dvojne kultivacije u petri šoljama sa PDA medijumom (Fokkema, 1978). PDA podloga je korišćena za kultivaciju gljiva izolovanih sa različitih plodova voća i povrća, kao i semena nevena. Disk micelijuma (6 mm u prečniku) određene gljive uziman je sa periferije kulture stare 7 dana i aseptično prenesen na PDA podlogu, oko 25 mm od centra petri šolje. Ovako zasejana podloga inkubirana je na 25 °C tokom 24 h. Nakon 24 h u iste petri šolje, bakteriološkom ezom su naneti ispitivani antagonisti *Bacillus* sp. na udaljenosti od 30 mm od isečka (diska) testirane gljive. Kontrolu su predstavljale kulture ispitivanih patogena, bez prisustva *Bacillus* sp. izolata. Sve kombinacije zasejanih gljiva i izolata *Bacillus* sp., inkubirane su u termostatu 7 dana, na temperaturi od 25 °C. Eksperiment je rađen u triplicatu sa istom gljivom i jednim izolatom *Bacillus* sp. Pokazatelj stepena antagonističkog delovanja bila je razlika u porastu kolonija gljiva u odnosu na kontrolu. Procenat inhibicije rasta (percent growth inhibition, PGI) je izračunat pomoću sledeće formule (Korsten and De Jager, 1995):

$$PGI (\%) = KR - RI / KR \times 100,$$

gde je *KR* dužina micelije gljive (merena u mm) od mesta inokulacije do ivice (margine) kolonije u kontrolnoj petri šolji, a *RI* je dužina micelije od mesta inkulacije do margine kolonije u pravcu antagoniste tj. *Bacillus* izolata u test petrijevim šoljama.

### **3.2.2.3 *In vitro* određivanje antifungalne aktivnosti lipopeptidnih ekstrakata i potencijalnog sinergizma sa etarskim uljima**

Inhibitorni efekti etil-acetatnih ekstrakata *Bacillus* sp. na rast fungalnih izolata izolovanih sa plodova voća i povrća su procenjeni pomoću testa radialne inhibicije rasta micelija. Disk micelijuma (6 mm u prečniku) određene gljive uziman je sa periferije kulture stare 7 dana i aseptično prenesen na sredinu PDA podloge, na koju je utrljavanjem naneto 500 µl testiranog etil-acetatnog (vodenih) ekstrakta. PDA podloge inokulisane isključivo testiranim fungalnim izolatima služile su kao pozitivna kontrola rasta.

Za određivanje potencijalnog sinergizma korišćeni su etil-acetatni ekstrakt izolata *Bacillus* SS-12.6, kao i etarska ulja čubra (*Satureja hortensis* L.) P0118884 i timijana (*Thymus vulgaris* L.) P0123774 protiv fungalnih izolata sa semena nevena. Testirana etarska ulja su komercijalno nabavljena (Frey + Lau GmbH, Henstedt-Ulzburg, Nemačka). U radu je korišćena modifikovana metoda opisana kod Zambonelli et al. (1996). U testiranju inhibitornog efekta ekstrakta izolata SS-12.6 i etarskih ulja, u PDA medijum su dodavane testirane supstance pojedinačno, kao i u raznim kombinacijama. Korišćene su određene koncentracije etarskih ulja u vidu prosečnih minimalnih inhibitornih koncentracija za sve fungalne vrste prethodno određene kod Stević et al. (2014). Korišćene koncentracije u eksperimentu bile su 0,21 mg/ml za ulje čubra i 0,40 mg/ml za ulje timijana. U slučaju testiranja pojedinačnih ulja i ekstrakta korišćeno je: (i) 1/4 prosečnih datih MIC vrednosti za ulja i 100 µl ekstrakta, dok je u slučaju kombinacija između ekstrakta i pojedinačnih ulja korišćeno (ii) 1/8 prosečnih MIC vrednosti za ulja i 50 µl ekstrakta, za razliku od kombinacije ekstrakta sa mešavinom ulja gde je korišćeno (iii) 1/16 prosečnih MIC vrednosti za ulja i 25 µl ekstrakta. Nakon sterilizacije, u rashlađeni PDA medijum, dodate su odgovarajuće koncentracije etarskih ulja rastvorenih u Tween-u 80, kao i odgovarajuće zapremine ekstrakta. Testiranje je sprovedeno u pet ponavljanja za svaku kombinaciju. Fungalni rast na podlozi bez testiranih supstanci je korišćen kao kontrola. Procenat inhibicije

rasta gljiva u ovom, kao i u prethodno navedenom slučaju je izračunat već navedenom formulom, ali u ovom slučaju *KR* predstavlja fungalni rast kontrole, dok *RI* predstavlja rast testiranih gljiva u prisustvu inhibitornog agensa.

Limpelova formula, kao što je opisano kod Richer (1987), je primenjena u cilju određivanja sinergističke interakcije između etil-acetatnog ekstrakta izolata *Bacillus* SS-12.6 i etarskih ulja, kao i u slučaju kombinacija metanolnih ekstrakata. Limpelova formula glasi:

$$Ee = X + Y - (XY/100),$$

u kojoj *Ee* predstavlja očekivani efekat iz aditivnih odgovora dva tretmana, dok *X* i *Y* predstavljaju procenete inhibicije rasta micelija u slučaju testiranja pojedinačnih supstanci. Prema datoj formuli, sinergizam postoji ukoliko kombinacija dve supstance daje vrednosti veće od *Ee*.

#### **3.2.2.4 Pripremanje spora gljiva za mikrodilucionu metodu i biokontrolne testove**

Gljive su gajene na PDA podlozi u vidu kosog agara, u periodu od 10 do 21 dana, u zavisnosti od izolovane vrste gljive, na 25 °C (Booth, 1971b). Inokulum je pripremljen tako što su isprane spore sa površine kosih agara sterilnim rastvorom 0.85% NaCl-a i 0.1% Tween-a 80 (v/v) (3 ml za slabo sporulišuće vrste, i do 5 ml za dobro sporulišuće vrste gljiva). Sterilnim štapićem za bris pokupljene su zaostale spore sa kultura i procedene kroz duplu gazu u sterilnu epruvetu. Nanošeno je 50 µl inokuluma na hemocitometarsku pločicu sa 16 polja i vršeno je prebrojavanje spora u nekoliko polja, a zatim je izračunavana aritmetička sredina. Suspenzija spora je sterilnim fiziološkim rastvorom dovedena do konačne koncentracije od  $1 \times 10^5$  CFU/ml u slučaju izolata poreklom sa semena nevena i do koncentracije od  $1 \times 10^6$  CFU/ml kod izolata poreklom sa plodova voća i povrća. Tako pripremljen inokulum držan je na -20 °C do upotrebe. Radi provere validnosti inokuluma, kao i odsustva kontaminacije, vršena je inokulacija na PDA podlogu.

#### **3.2.2.5 *In vitro* određivanje minimalnih inhibitornih i fungicidnih koncentracija**

Mikrodilucionna metoda je korišćena za određivanje minimalne inhibitorne (MIC) i fungicidne koncentracije (MFC) testiranih metanolnih ekstrakata SS-10.7, SS-

12.6, SS-13.1, SS-27.2 i SS-38.4 *Bacillus* sp. izolata, pojedinačno i u određenim kombinacijama. Za određivanje pomenutih vrednosti ekstrakata korišćene su mikrotitracione ploče sa 96 mesta. Vršeno je dvostruko serijsko razblaživanje uzoraka TSB medijumom. Pored bunara sa ispitivanim ekstraktima, postavljena je i negativna kontrola (kontrola rasta gljiva) i kontrola sterilnosti (blank). Za svaki od testiranih ekstrakata rađeno je po dve kolone, u tri ponavljanja. Na kraju je dodavan određen volumen suspenzije sa inokulumom, za svaku gljivu drugačiji, tako da je finalna koncentracija bila  $1 \times 10^5$  CFU/ml medijuma. Mikrotitracione ploče inkubirane su na 28 °C u trajanju od 72 sata. Najmanja koncentracija na kojoj nije bilo rasta mikromiceta uzimana je za MIC. Minimalne fungicidne koncentracije (MFC) određivane su reinokulisanjem po 2 µl iz bunarića u kome je određen MIC u 100 µl tečnog medijuma i inkubirane sledećih 72 h na 28 °C. Ukoliko nije bilo rasta, te koncentracije uzimane su za MFC. Kao pozitivna kontrola je korišćen komercijalni mikotik flukonazol, finalne koncentracije 2 mg/ml.

#### **3.2.2.6 Određivanje tipa interakcija ekstrakata**

Za ispitivanje interakcija metanolnih lipopeptidnih ekstrakata *Bacillus* sp. izolata prema određenim fungalnim patogenima izolovanim sa semena, korišćena je prethodno opisana mikrodiluciona metoda u TSB medijumu i istim inokulumom sa svaku ispitivanu gljivu. Testirana koncentracija uniformisanih stokova ekstrakata iznosila je 14,25 mg/ml, dok je u slučaju pravljenja odgovarajućih smeša dva ili tri ekstrakta korišćena 1/2, odnosno 1/3 koncentracija uniformisanih stokova lipopeptidnih ekstrakata, respektivno. Ploče su inkubirane 72 h na 28 °C, nakon čega je izvršena provera rasta fungalnih kultura.

U cilju definisanja efekata interakcije lipopeptidnih ekstrakata sprovedena su izračunavanja FIC i FIC<sub>i</sub> koeficijenata, na prethodno opisani način u radu sa bakterijama.

#### **3.2.2.7 Određivanje uticaja etil-acetatnih ekstrakata na morfologiju hifa gljiva**

Testirane fitopatogene gljive su gajene na PDA šoljama sedam dana na 28 °C. Micelije gljiva su aseptično (inokulacionom iglom) prenesene na površinu mikroskopskih pločica prekrivenih tankim (5 mm) slojem PDA medijuma prethodno

inokulisanog sa 20% (v/v) etil-acetatnim ekstraktima izolata SS-12.6 i SS-13.1. Inokulisane pločice su inkubirane na 28 °C u mraku tri dana. Hife gljiva uočene na pločicama su obojene laktofenol pamuk plavom bojom, a naknadne promene u morfologiji mladih hifa u nastajanju registrovane su korišćenjem svetlosnog mikroskopa (600× i 1000× uvećanje).

### **3.2.2.8 Određivanje uticaja etil-acetatnog ekstrakata na redukciju nekroze ploda jabuke *in planta***

U ovom biokontrolnom testu, plodovi jabuka (sorte Zlatni Delišes) su isprani tekućom vodom, zatim potapani u etanolu (70%) u trajanju od 2 min, a potom ispirani dva puta sterilnom destilovanom vodom i osušeni na vazduhu. Površinski sterilisani plodovi su namerno povređivani (5 mm u prečniku i 5 mm dubinski) punktiranjem pomoću bušilice za čepiće. Volumen od 50 µl etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-12.6 je dodavan u prethodno napravljenu ranu na plodu. Nakon 1 h, rana je inokulisana istim volumenom (50 µl) konidijalne suspenzije svakog testiranog fungalnog izolata izolovanog sa plodova voća i povrća. Sva testiranja su urađena u triplikatu. Plodovi inokulisani isključivo konidijalnom suspenzijom određenog patogena su predstavljali pozitivnu kontrolu, dok su negativnu kontrolu predstavljali plodovi inokulisani sterilnom destilovanom vodom, budući da je korišćen vodeni ekstrakt antagoniste pomenutog načina ekstrakcije. Svi plodovi su smeštani u vlažnu komoru i inkubirani na 25 °C. Nakon 7 dana inkubacije meren je prečnik nekrotičnih lezija.

### **3.2.2.9 Određivanje uticaja etarskih ulja, supernatanta i ekstrakta na klijavost i inficiranost semena nevena *in situ***

Semena nevena (*Calendula officinalis* L.) su nabavljena od Instituta za proučavanje medicinskog bilja “Dr Josif Pančić” iz Beograda.

Antifungalni i sinergistički potencijal besćelijskog supernatanta (SN) i sirovog etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-12.6 (CLE, en. Crude Lipopeptide Extract), etarskih ulja čubra i timijana, na semenima nevena *in situ*, je testiran modifikovanim postupkom koga su prethodno opisali Kritzinger et al. (2002). Pored toga, ispitivan je i efekat na klijavost semena. Analiza fungalne infekcije i klijavosti semena nevena je sprovedena inkubacijom semena na vlažnom filter papiru i na PDA podlozi. Tri stotine semena za

svaki tretman (6 ponavljanja, svako sa po 50 semena) je sterilisano 1% NaClO tokom 3 minuta, a zatim su tri puta isprana sterilnom vodom i ostavljena da se suše na vazduhu. Po šest semena je prebačeno na PDA medijum, posle svakog tretmana pomenutim agensima. Nakon sedam dana inkubacije na 25 °C, delovi micelija uzetih iz dobro razvijenih kolonija prebačeni su na PDA radi dalje analize i identifikacije fungalnih izolata. Semena nevena su tretirana etarskim uljima, SN-om i CLE-om izolata SS-12.6 pojedinačno i u kombinacijama. Korišćene sračunate koncentracije u eksperimentu bile su 0,21 mg/ml za ulje čubra i 0,40 mg/ml za ulje timijana. Potrebna zapremina etarskih ulja rastvorenih u Tween 80 i CLE-a je dodata u 25 ml sterilne destilovane vode i semena su potopljena u serije različitih kombinacija i koncentracija. U slučaju pojedinačnog testiranja (i) korišćeno je za etarska ulja, 1/4 prosečne MIC vrednosti i 100% SN ili CLE-a; za kombinacije pojedinačnog ulja i CLE-a, (ii) korišćeno je 1/8 prosečne MIC vrednosti za ulja i 50% CLE-a; dok je u slučaju kombinacije oba ulja i CLE-a, (iii) primenjivana je 1/12 prosečne MIC vrednosti ulja i 33% CLE-a. Semena nevena bila su izložena tokom 6, 12 i 24 časa u različitim kombinacijama agenasa i prebačena na filter papir u sterilne plastične kutije (25 cm × 15 cm × 7cm). Semena natopljena destilovanom vodom, korišćena su kao pozitivna kontrola za testiranje efekata ispiranja. Parametri klijavosti i inficiranosti semena mereni su nakon četvrtog, sedmog i četrnaestog dana inkubacije na 25 °C.

### **3.2.3 METODE RADA SA DNK**

#### **3.2.3.1 Izolovanje ukupne DNK**

Genomska DNK iz *Bacillus* sp. je izolovana prema modifikovanoj metodi opisanoj kod Le Marrec et al. (2000). Nakon centrifugiranja bakterijskih prekonoćnih kultura 10 min na  $13000 \times g$  i dva ispiranja peleta u 500  $\mu$ l TEN pufera (50mM Tris, pH 8; 1mM EDTA, pH 8; 50mM NaCl), ćelije su resuspendovane u 500  $\mu$ l pufera za lizu (PP pufer, pH 8, 0.3%  $\text{NH}_4$ -acetat; 0.02% Mg-acetat; 20% saharoza) koji je sadržao 20  $\mu$ g/ml lizozima (Serva GMBH, Heidelberg, Germany) i inkubirane su 30 min na 37 °C. Reakcija je zatim zaustavljena dodavanjem 250  $\mu$ l 2% (w/v) SDS-a i 200  $\mu$ l donje faze neutralnog fenola. Nakon centrifugiranja na  $13000 \times g$  (10 min), gornja faza je sakupljena i prebačena u nove tube. Sledeći korak je uključivao dodavanje 1/10 volumena 3M Na-acetata (pH 4.8) i 1 volumena izopropanola i sve je centrifugirano na

13000 × g u trajanju od 20 min. DNK je precipitirana hladnim 70% etanolom i resuspendovana je u 50 µl TE pufera u koji je dodato 2 µl RNaze (10 mg/ml).

### 3.2.3.2 Umnožavanje fragmenata DNK metodom PCR

Za sekvenciranje 16S rRNK gena, umnožavanje željenog fragmenta je vršeno pomoću prajmera UN1<sub>16S</sub>F i UN1<sub>16S</sub>R (Tabela 4). Uzorci za PCR su pripremani tako da 25 µl reakcione smeše, koja sadrži 0,1-1 µg genomske DNK su dodavani 25 mM MgCl<sub>2</sub> u finalnoj koncentraciji 2.5 mM, dNTP smeša (svaki dNTP po 200 µmol/l), prajmeri (svaki po 1 µl) i 1 U DNK Taq polimeraza (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija). PCR reakcija je rađena po sledećem programu: inicijalna denaturacija na 94 °C u trajanju od 5 min praćena je sa 30 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacija 30 sec na 94 °C, vezivanje prajmera 1 min na 50 °C, polimerizacija 30 sec na 72 °C i poslednji ciklus polimerizacije na 72 °C u trajanju od 7 min. Ovako dobijeni PCR produkti su nakon prečišćavanja uz pomoć kita (QIAquick PCR Purification; QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) slati na sekvenciranje (sa oba prajmera) u centar za sekvenciranje (Macrogen's sequencing service, Koreja).

Za detekciju i umnožavanje dela gena iturinskog operona PCR reakciona smeša je pripremana na sledeći način: 1 µl totalne DNK, 2.5 U KAPA Long Range DNK polimeraze (Kapa Biosystems, Boston, SAD), 5 µl 5 × KAPA LR pufera (bez dodatog Mg<sup>2+</sup>), 1,75 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,75 µl rastvora dNTP (10mM svakog) i po 1 µl prajmera ITUP1-F i ITUP1-R (Tsuge et al., 2005) (Tabela 4). PCR je izvođen prema instrukcijama proizvođača KAPA Long Range polimeraze, koje preporučuju dodatni korak auto-ekstenzije i nižu temperaturu ekstenzije. Program se sastojao od: početne denaturacije 2 min na 94 °C, umnožavanja fragmenata DNK u 10 ciklusa: 15 sec na 94 °C, 15 sec na 45 °C za vezivanje prajmera i 3 min polimerizacije na 68 °C (korak auto-ekstenzije), a zatim i od 25 ciklusa: denaturacije 15 sec na 94 °C, vezivanja prajmera 15 sec na 45 °C, 3 min polimerizacije na 68 °C, kao i završne polimerizacije 10 min na 72 °C.

PCR uslovi za umnožavanje dela gena *sfp*, odnosno gena za 4'-fosfopanteteinil transferazu su bili isti kao i za umnožavanje dela iturinskog operona, s' tim što su korišćeni prajmeri P17 i P18 (Hsieh et al., 2004) (Tabela 4).



**Tabela 4.** Sekvence PCR prajmera korišćenih u ovom radu.

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera	Očekivana dužina proizvoda (bp)	Detekcija fragmenta
UN1 <sub>16S</sub> F	5'-GAGAGTTTGATCCTGGC-3'	1500	16S rDNK
UN1 <sub>16S</sub> R	5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3'		
ITUP1-F	5'-AGCTTAGGGAACAATTGTCATCGGGGCTTC-3'	2000	Delovi gena <i>ituA</i> i <i>ituB</i> sa intergenskim regionom
ITUP1-R	5'-TCAGATAGGCCGCCATATCGGAATGATTCG-3'		
P17	5'-ATGAAGATTTACGGAATTTA-3'	675	<i>sfp</i> gen surfaktin sintetaze
P18	5'-TTATAAAAGCTCTTCGTACG-3'		
BACC1-F	5'-GAAGGACACGGCAGAGAGTC-3'	875	<i>bamC</i> gen bacilomicin D sintetaze
BACC1-R	5'-CGCTGATGACTGTTCATGCT-3'		
FEND1-F	5'-TTTGGCAGCAGGAGAAAGTT-3'	964	<i>fenD</i> gen fengicin sintetaze
FEND1-R	5'-GCTGTCCGTTCTGCTTTTTC-3'		
AKS-F	5'-TCHACWGGRAATCCAAAGGG-3'	1125, 1152, 1161, 1167, 1173	<i>krsA</i> , <i>krsB</i> i <i>krsC</i> geni
TKS-R	5'-CCACCDKTCAAACAARKWATC-3'		

Za detekciju i umnožavanje fengicinskog i bacilomicin D sintetaznog biosintetskog klastera PCR reakciona smeša (25 µl) je sadržala 1 µl totalne DNK, 1.75 mM (u slučaju BACC1-F/BACC1-R prajmera - Tabela 4) i 2 mM (u slučaju FEND1-F/FEND1-R prajmera - Tabela 4) MgCl<sub>2</sub>, dNTP smešu (svaki dNTP po 200 µmol/l), prajmere (svaki po 1 µl) i 1 U DNK Taq polimeraza (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija) (Ramarathnam et al., 2007). PCR reakcija je rađena po sledećem programu: (a) BACC1-F/BACC1-R - inicijalna denaturacija na 94 °C u trajanju od 3 min praćena je sa 35 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacija 1 min na 94 °C, vezivanje prajmera 30 sec na 60 °C, polimerizacija 1 min i 45 sec na 72 °C i poslednji ciklus polimerizacije na 72 °C u trajanju od 6 min; (b) FEND1-F/FEND1-R - inicijalna denaturacija na 94 °C u trajanju od 1 min praćena je sa 45 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacija 1 min na 94 °C, vezivanje prajmera 1 min na 62 °C, polimerizacija 1 min i 45 sec na 72 °C i poslednji ciklus polimerizacije na 72 °C u trajanju od 6 min (Ramarathnam et al., 2007).

Umnožavanje željenih segmenata kurstakinskog operona vršeno je pomoću izrođenih prajmera AKS-F i TKS-R (Abderrahmani et al., 2011) (Tabela 4). Uzorci su pripremani tako da je 20 µl reakcione smeše sadržalo 1 µl genomske DNK, 0,5 µl dNTP smeše (200 µmol/l), prajmere (20 µM) (svaki po 1,5 µl), 2 µl pufera 10 × Kapa, 0,1 µl

DNK Taq polimeraza (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija) i H<sub>2</sub>O 13,4 µl. PCR reakcija je rađena po sledećem programu: inicijalna denaturacija na 94 °C u trajanju od 3 min praćena je sa 30 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacije 1 min na 94 °C, vezivanja prajmera 40 sec na 44.4 °C, polimerizacije 2 min na 72 °C i poslednjeg ciklusa polimerizacije na 72 °C u trajanju od 10 min (Abderrahmani et al., 2011).

### **3.2.3.3 Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu**

Elektroforeza totalne DNK i fragmenta DNK umnoženih PCR metodom je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u 1xTAE puferu (40 mM Tris-acetat, 1M EDTA, pH 8) uz dodavanje etidijum bromida (0,5 µg/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je 1xTAE pufer. Ispitivani uzorci (5 µl) su mešani sa 2 µl boje (50% glicerol, 1x TAE, 0.3% orange G) i nanošeni na gel. Korišćeni su 1% agarozni gelovi, a elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 7 V/cm gela u trajanju od 1 h.

Velićine linearnih DNK fragmenata dobijenih posle umnožavanja DNK određivane su upoređivanjem dućine pređenog puta DNK analiziranih fragmenata u odnosu na dućinu puta DNK fragmenata poznate velićine (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder 100-3000 bp) (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija). Gelovi su fotografisani pod UV osvetljenjem (Biometre, Gotingen, Nemaćka). Određeni PCR fragmenti oćekivane dućine su prećišćeni i sekvencirani (Macrogen sequencing service, Amsterdam, Holandija).

### **3.2.3.4 Prećišćavanje DNK fragmenata**

Elucija DNK fragmenata dobijenih PCR metodom vršena je korišćenjem "QIAquick Gel extraction kit" po protokolu proizvođaća (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemaćka).

### **3.2.3.5 Filogenetske analize**

U cilju identifikacije bakterijskih antagonistićkih sojeva, 16S rRNK sekvence gena su upoređivane sa objavljenim sekvencama u NCBI GenBank bazi podataka (National Center for Biotechnology Information) korišćenjem BLAST<sub>n</sub> programa (Altschul et al., 1997) pri ćemu je pozicija nukleotida proveravana manuelno. Kako bi

se obezbedila taksonomska relevantnost, korišćene su sekvence najrodnijih sojeva za filogenetske analize. Sve sekvence su poravnane pomoću CLUSTAL W moda (Thompson et al., 1997) implementiranog u BioEdit 7.1.3 programu (Hall, 1999). Filogenetska stabla su konstruisana u MEGA 5 programu (Tamura et al., 2011) pomoću "Neighbor-joining" metoda zasnovanog na poravnavanju parova matrice sa Kimura dvoparametarskim modelom supstitucije nukleotida. Topologija stabala je ocenjena pomoću "bootstrap" metode naknadne obrade sa 1000 ponavljanja.

### **3.2.4 METODE IZOLACIJE, PREČIŠĆAVANJA I DETEKCIJE ANTIMIKROBNIH SUPSTANCI**

#### **3.2.4.1 Izolacija lipopeptidnih jedinjenja etil-acetatnom ekstrakcijom**

Prekonoćna kultura bakterija gajena na 37 °C je oslobođena ćelija centrifugiranjem 20 min na 5000 rpm na 4 °C i 1000 ml tako pripremljenog supernatanta je korišćeno za ekstrakciju lipopeptida etil-acetatom, u odnosu 1:1.1 (v/v). Nakon 2 sata mešanja (na magnetnoj mešalici) supernatanta i etil-acetata ili preko noći uz dodatak NaCl (30 g/L), smeša je ostavljena da miruje u levku za separaciju kako bi se razdvojile faze. Prikupljena je etil-acetatna (gornja) faza koja je zatim uparavana do suvog na sobnoj temperaturi. Precipitat je rastvaran u različitim polarnim rastvaračima poput dejonizove vode, metanola ili DMSO-a u zavisnosti od vrste eksperimenata i testiranja rastvorljivosti. Dobijeni ekstrakti su sterilisani filtriranjem kroz 0,45 µm Durapore™ filtere (Milipore, Billerica, SAD).

#### **3.2.4.2 Izolacija lipopeptidnih jedinjenja kombinacijom kiselinske precipitacije i ekstrakcije metanolom**

Kombinovana kiselinska precipitacija i ekstrakcija rastvaračem prethodno je opisana kod Vater et al. (2002). Prekonoćna kultura bakterija gajena na 37 °C je oslobođena ćelija centrifugiranjem 20 min na 5000 rpm na 4 °C i 1000 ml tako pripremljenog supernatanta je raspoređeno u nekoliko manjih sudova iste zapremine i vršeno je zakišeljavanje koncentrovanom HCl do pH 2 vrednosti rastvora. Dozvoljena je precipitacija preko noći na 4 °C. Nakon ponovnog centrifugiranja pod istim uslovima, dobijeni pelet je ekstrahovan metanolom uz stalno mešanje na magnetnoj mešalici u trajanju od 2 sata. Dobijeni ekstrakti su sterilisani filtriranjem kroz 0,45 µm Durapore™

filtere i uparavani do suvog korišćenjem rotacionog uparivača (Büchi Rotavapor R-215, Švajcarska).

#### 3.2.4.3 Reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

Purifikacija lipopeptida je urađena prema metodi koju su opisali Rao et al. (2008). Etil-acetatna frakcija lipopeptida, koja je pokazala antimikrobno dejstvo je razdvojena na reverzno faznoj HPLC ZORBAX Eclipse Plus C18 koloni (Agilent Technologies, Santa Klara, SAD). Korišćen je protokol sa izokratskom mobilnom fazom koja se sastojala od acetonitrila (J. T. Baker, Centralna Dolina, SAD) i 10 mM amonijum acetata (40:60, v/v), (Sigma Aldrich, Taufkirhen, Nemačka). Protok je bio 1 ml/min i elucija je trajala 40 min. Tokom elucije merena je apsorbanca na talasnoj dužini od 260 nm. Sve frakcije u zapremini od 750 µl su sakupljene u frakcionom kolektoru (Agilent Technologies 1260 Infinity LC system, Santa Klara, SAD) i dalje analizirani masenom spektrometrijom.

#### 3.2.4.4 Analize masene spektrometrije (MS)

Etil-acetatne frakcije lipopeptida određenih izolata prečišćene HPLC sistemom analizirane su na Orbitrap hibridnom masenom spektrometru (Linear Trap Quadrupole (LTQ) Orbitrap XL) opremljenom grejnim elektrosprej jonizatorom (HESI-II; Thermo Fisher Scientific, SAD). Maseni spektrometar je radio u pozitivnom modu, a uzorci su direktno injektirani pri protoku od 15 µl/min. Vrednosti parametra jonskog izvora su bili sledeći: izvor napona 4 kV, temperatura sonde 55 °C, temperatura kapilare 120 °C, protok gasa (He) 10 arbitrarnih jedinica, dok je protok pomoćnog gasa (N<sub>2</sub>) iznosio 3 jedinice. Maseni spektar je sniman u opsegu odnosa  $m/z$  750-1500. Za studije fragmentacije podaci koji zavise od snimanja su ostvareni kolizionom indukovanom disocijacijom (CID).

Analizirani su etil-acetatni, metanolni i vodeni ekstrakti dobijeni iz supernatanta prekonoćnih kultura određenih izolata *Bacillus* sp. MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) analizom. Ovi eksperimenti su izvedeni na Voyager-DE PRO Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, Foster, CA, SAD) TOF masenom spektrometru opremljenim sa 337 nm pulsniim azotnim laserom, prema uputstvima opisanim ranije

(Athukorala et al., 2009; Abderrahmani et al., 2011). Svi testirani uzorci su pomešani sa jednakom zapreminom zasićenog rastvora 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline (DHB) (50 mg u 1 ml 70% acetonitrila/0.1% trifluorosirćetne kiseline). 1-2  $\mu$ l alikvota ovakve mešavine je nanošeno na pločice i ostavljene su da se osuše na vazduhu. U radu je korišćena pozitivna jonska detekcija i reflektorski mod operacije. Potencijal ubrzanja je održavan konstantnim na 20 kV tokom svih merenja. Maseni spektar je sniman u opsegu odnosa  $m/z$  800-1700. Broj hitaca laserom je bio 400/spektru po svakom testiranom uzorku.

Masa identifikovanih molekula dobijena na osnovu HPLC-LTQ Orbitrap MS i MALDI-TOF MS je upoređivana sa tačnom masom izračunatom primenom ChemSpider softvera ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)) kao referentne biblioteke identifikovanih jedinjenja. Za detektovana jedinjenja za koja ne postoje standardi, mase su proveravane sa ranije objavljenim literaturnim podacima.

#### **3.2.4.5 Visokoefikasna tankoslojna hromatografija lipopeptidnih ekstrakata sa indirektnom bioautografskom metodom**

Tankoslojna hromatografija je vrsta hromatografske tehnike i sastoji se od sistema stacionarne i mobilne faze. Stacionarna (nepokretna) faza ima svojstvo da vezuje molekule ispitivanih supstanci na osnovu različitih mehanizama, među kojima su dominantni adsorpcija i raspodela (particija). Mobilna (pokretna) faza ili eluent, prolazi kroz stacionarnu fazu noseći sa sobom molekule ispitivanih supstanci različitom brzinom u zavisnosti od hemijskih i fizičkih svojstava analita (Miller, 2005). Postupak razdvajanja se može posmatrati kao sekvencijalni proces u kojem se migracija ispitivane supstance ponavlja kroz čitavu stacionarnu fazu sve dok rastvarač ne dostigne određeni nivo na HPTLC ploči. Zadržavanje, odnosno retencija jedinjenja u ovom hromatografskom sistemu se izražava kao retardacioni (retencioni) faktor:

$$R_F = a/b$$

gde je  $a$  dužina puta koji je prešla analizirana supstanca i  $b$  dužina puta rastvarača. Na osnovu  $R_F$  vrednosti, mogu se dobiti informacije o polarnosti, spektralnim svojstvima (apsorbancija, fluorescencija), veličini molekula ispitivanog analita (Morlock and

Schwack, 2010), kao i vrednosti pređenog puta antimikrobnih supstanci roda *Bacillus* u bioautografiji (Kumar et al., 2009).

Tankoslojna hromatografija kombinuje biološki i hemijski metod detekcije aktivnih jedinjenja. Kada se se kombinuje sa biološkim metodama, poznata je kao TLC bioautografija (Marston, 2011). Ovakvi testovi se često koriste u cilju dokazivanja aktivnosti ekstrakta ili pojedinih čistih supstanci dobijenih iz živih mikroorganizama ili drugih organizama. Bioautografija podrazumeva gajenje ćelija (mikroorganizama, na primer) na HPTLC pločici, dok je autografija primena hemijske metode za detekciju biološkog efekta ili procesa. Postoje tri različite bioautografske metode: direktna bioautografija, kontaktna bioautografija (agar difuzionna) i imerzionna (agar „overlay“) bioautografija (Choma and Grzelak, 2011). Poslednje dve pripadaju indirektnim metodama. Procedura u indirektnoj bioautografiji je slična onoj u agar difuzionim metodama sa tom razlikom što testirana jedinjenja difunduju u inokulisani agar sa hromatografskog sloja koji je adsorbent (silika gel) ili papir (Puupponen-Pimiä et al., 2001).

Za hromatografska ispitivanja primenjena je tehnika horizontalne visokoefikasne tankoslojne hromatografije (HPTLC) opisana ranije (Das et al., 2008). Hromatografski sistem korišćen za analizu lipopeptidnih ekstrakata se sastojao od silika gel 60 HPTLC aluminijumskih ploča (Art. HX384162, MERCK, KGaA, Darmstadt, Nemačka) kao stacionarne i rastvora hloroform : metanol : voda (65:25:4, v/v/v) kao mobilne faze.

Zapremine od 10 µl lipopeptidnih ekstrakata (koncentracije stoka 14,25 mg/ml) i 5 µl standardnih jedinjenja iturina A i surfaktina (koncentracije stoka 10 mg/ml) su nanošene na ploče dimenzija (10 × 10 cm i 20 × 10 cm) u obliku traka dužine 8 mm koristeći TLC CAMAG Linomat 4 aparata za automatsko nanošenje uzorka (CAMAG, Muttenz, Švajcarska). Vreme zasićenja kade parama rastvarača iznosilo je 20 min. Front rastvarača je bio 70 mm, a vreme sušenja nakon razvijanja hromatograma 5 min. Vizualizacija dobijenih profila traka je izvedena pod UV svetlošću na 254 i 366 nm talasne dužine. Za dokazivanje prisustva lipopeptidnih komponenata ploče su derivatizovane potapanjem (5 sec) u 0.2% rastvor ninhidrina u metanolu i zagrevane do 100 °C.

Fotografije su obrađene u ImageJ softveru za obradu slike hromatograma. Ispitivani ekstrakti na ploči su označeni duž cele ploče, sa jedne strane i od startne mrlje do fronta rastvarača, sa druge strane. Crtanje profila izvođeno je za svaki uzorak ponaosob i isti su predstavljali grafički prikaz zavisnosti intenziteta zona (izražen u pikselima) u funkciji rastojanja.

Indirektna agar „overlay“ varijanta bioautografske metode na prethodno razvijenim HPTLC pločama sa testiranim lipopeptidnim jedinjenjima je izvedena prema modifikovanoj metodi opisanoj kod Valgas et al., 2007. Na pločice dimenzija 5 × 5 cm naneti su standardi iturina A i surfaktina u vidu spotova različitih koncentracija i prenete su na prethodno razlivene petri šolje sa LA podlogom. Tako pripremljene pločice prekrivene su slojem LA soft medijuma (5 ml) prethodno inokulisanog sa 0,5 ml bakterija ( $1 \times 10^8$  CFU/ml). Na pločice dimenzija 10 × 10 cm, sa prethodno razvijenim uzorcima lipopeptidnih ekstrakata nanet je sloj LA soft medijuma (7 ml) prethodno inokulisanog sa 0,7 ml bakterija, dok je ploča dimenzija 20 × 10 cm prekrivena sa 14 ml istog medijuma inokulisanog sa 1,4 ml bakterija. HPTLC pločice su postavljene u sterilne plastične kutije (25 cm × 15 cm × 7cm) sa vlažnom atmosferom i ostavljane na 4 °C minimum dva sata, zbog boljeg difundovanja antimikrobnih supstanci u sloj agara, a zatim inkubirane preko noći na 30 °C. Nakon inkubacije ploče su poprskane rastvorom 0.2% MTT-a (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich, SAD) i 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, SAD) radi vizualizacije zona inhibicije rasta tj. aktivnih supstanci. MTT je indikator rasta koji se u prisustvu živih ćelija mikroorganizama konvertuje u nerastvorljiv formazan ljubičaste boje usled raskidanja tetrazolijumskog prstena pomoću enzima dehidrogenaze. Ploče se vraćaju na doinkubaciju u trajanju od 1-2 h, odnosno do pojave zona inhibicije.

### **3.2.5 STATISTIČKE ANALIZE**

Dobijeni rezultati su nakon provere normalnosti Kolmogorov-Smirnovim testom, podvrgnuti analizi standardne varijanse (One and Two-way ANOVA testovi). Srednje vrednosti procenata inhibicije micelijskog rasta u *in vitro* uslovima i procenti redukcije nekroze na plodovima jabuka *in planta* u slučaju patogena poreklom sa plodova voća i povrća delovanjem testiranih ekstrakata, su dobijeni korišćenjem Dankanovog testa višestrukog opsega. Takođe, isti test je primenjen i u slučaju

dobijanja srednjih vrednosti procenata inhibicije rasta micelije fungalnih patogena poreklom sa semena nevena u *in vitro* uslovima prilikom testiranja sinergističkog delovanja ekstrakta i etarskih ulja, kao i tokom praćenja klijavosti i ukupne fungalne infekcije semena nevena *in situ* delovanjem istim agensima. Statistička značajnost primenjena u svim testovima je bila  $P < 0.05$ . Statistička analiza je izvršena primenom softverskih programa STATISTICA v.7 (StatSoft, Inc.) i IBM SPSS Statistics v.20 (SPSS, Inc.).



#### **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

## 4 REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 IZOLOVANJE I PRELIMINARNA DETERMINACIJA *Bacillus* sp.

Koristeći osobinu bakterija roda *Bacillus* da mogu formirati endospore u nepovoljnim uslovima, u prethodnim istraživanjima izolovano je i delimično okarakterisano 205 izolata sa različitih lokaliteta i iz tri različite ekološke niše sa područja Srbije (Slika 5). Nakon termalne inaktivacije uzoraka (80 °C u trajanju od 10 minuta), čiste kulture bakterija su testirane katalaza testom, a nakon toga su obojene metodama po Gramu i Šefer-Fulton. Pokazalo se da su svi izolati gram- i katalaza-pozitivni bacili koji produkuju endospore. Na ovaj način je izolovano i u ovom radu korišćeno 23 izolata iz sena i slame, 61 izolat iz stajskog đubriva i 121 izolat iz zemljišta (Stanković, 2003; Berić, 2010).

### 4.2 IZOLOVANJE I DETERMINACIJA GLJIVA

Imajući u vidu prethodno istraživanje mikrobiološkog kvaliteta biljnih droga i najvećeg problema u smislu kontaminacije gljivama (Stević, 2013), jedan od ciljeva ovog rada je bio i izolacija i determinacija fungalnih vrsta sa semena nevena. Neven je izabran kao veoma važna biljka u proizvodnji različitih biljnih preparata u industriji fitomedicine. Korišćenjem standardnih determinatora na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika izvršena je ukupna determinacija 11 vrsta gljiva: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Alternaria alternata*, *Penicillium* sp., *Fusarium semitectum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. nygamai* i *F. polyphialidicum*.

### 4.3 PROIZVODNJA I DETEKCIJA ANTIMIKROBNIH SUPSTANCI

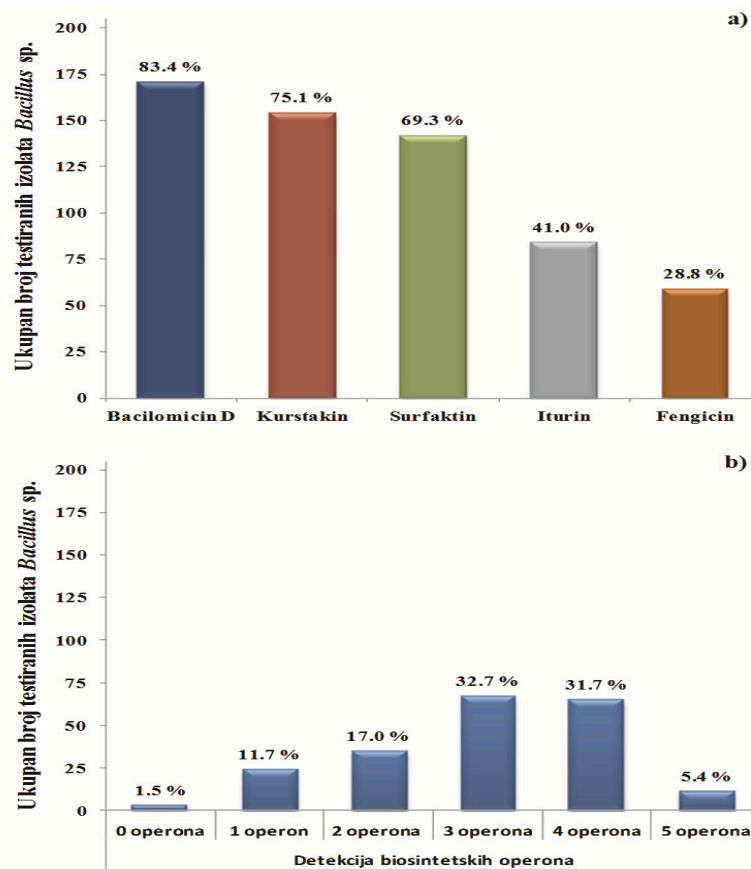
Kod mnogih vrsta roda *Bacillus* potvrđeno je prisustvo tri glavne familije lipopeptida: surfaktina, iturina i fengicina, koje obuhvataju različite strukturalne varijante u zavisnosti od genetičke pozadine određenih sojeva. Pored ove tri velike familije, takođe su identifikovane i ostale klase bioktivnih lipopeptida sintetisanih od strane *Bacillus* vrsta (Lee et al., 2007; Hamdache et al., 2013), uključujući i kurstakinsku familiju lipopeptida (Hathout et al., 2000). Svaka familija ovih jedinjenja

pokazuje specifične antibiotske aktivnosti i stoga svako od njih može biti uključeno u antagonizam različitih biljnih patogena. Mnogobrojni literaturni podaci sugeriraju ulogu lipopeptidnih jedinjenja, koje proizvode bakterije iz roda *Bacillus*, u direktnom antagonizmu zasnovanom uglavnom na *in vitro* antimikrobnim ispitivanjima aktivnosti. Kombinacije nekoliko različitih pristupa su uključivale: detekciju biosintetskih operona, ispitivanje i dokazivanje antagonističke aktivnosti izolata i njihovih lipopeptidnih ekstrakata *in vitro*, *in situ* i *in planta*, kako na bakterijskim tako i na fungalnim fitopatogenima, otkrivanje potencijalnih sinergističkih efekata izolata *Bacillus* sp. i drugih prirodnih produkata, kao i kvantifikaciju lipopeptidnih jedinjenja različitim pristupima detekcije.

#### 4.3.1 BIOSINTETSKI OPERONI

U kontekstu biokontrole biljnih bolesti, *Bacillus* vrste su već duži niz godina u fokusu istraživanja zbog produkcije širokog spektra sekundarnih metabolita, a naročito onih sintetisanih na neribozomalan način. Jedan od ciljeva ovog rada bavio se i uvidom u prisustvo biosintetskih gena u kolekciji od 205 *Bacillus* sp. prirodnih izolata, PCR detekcijom i umnožavanjem potencijalnih biosintetskih operona ili nekih njegovih delova sa ukupno pet različitih setova prajmera. Za detekciju bacilomicina D i fengicinskog sintetaznog klastera korišćeni su prajmeri BACC1-F/BACC1-R i FEND1-F/FEND1-R (Ramarathnam et al., 2007), koji u PCR reakciji generišu fragmente od 875 bp koji sadrže *bamC* gen bacilomicin D sintetaze C, odnosno fragmente dužine 964 bp *fenD* gena fengicin sintetaze u slučaju fengicinskog operona. Za detekciju prisustva iturinskog operona korišćeni su prajmeri ITUP1 i ITUP2 (Tsuge et al., 2005), koji u PCR reakciji generišu fragment od 2 kb koji sadrži delove gena *ituA* i *ituB*, kao i intergenske sekvence između ova dva gena. U cilju detekcije *sfp* gena tj. surfatinskog operona korišćeni su prajmeri P17 i P18 (Hsieh et al., 2004) koji umnožavaju fragment gena za 4'-fosfopanteteinil transferazu u dužini od 675 bp. Za umnožavanje kurstakinskog operona korišćeni su degenerativni prajmeri AKS-F/TKS-R (Abderrahmani et al., 2011) dobijeni na osnovu konzerviranih motiva nakon poravnavanja sekvenci koje odgovaraju adenilatnom (A) ili tiolatnom (T) domenu *krsA*, *krsB* i *krsC* gena kurstakinskog operona. Zbog toga se u pozitivnoj PCR reakciji generišu različiti fragmenti dužina od 1125, 1152, 1161, 1167 i 1173 bp. Analizirajući

dobijene rezultate na nivou kompletne kolekcije testiranih izolata, najveći broj (171 izolat) daje očekivani DNK fragment koji odgovara bacilomicin D sintetazi (Prilog 4). U približno istom opsegu su dobijene i očekivane veličine fragmenata u slučaju kurstakinskog (154 izolata) (Prilog 8) i surfaktinskog operona (142 izolata) (Prilog 7), dok je prisustvo fragmenata iturinskog operona potvrdilo svega 84 izolata (Prilog 6). Najmanja učestalost u kolekciji je detektovana za fengicin sintetazu kod 59 izolata (Prilog 5) koji su dali fragment očekivane dužine od 675 bp (Slika 6a).



**Slika 6.** Detekcija biosintetskih operona (a) i učestalost distribucije prisutnih operona (b) u kolekciji od 205 *Bacillus* sp. izolata.

Analiza učestalosti distribucije prisutnih biosintetskih operona pokazuje skoro podjednak odnos izolata sa tri (67 izolata) i četiri (65 izolata) operona u različitim kombinacijama, dok je prisustvo svih pet operona pokazalo 11 izolata. Takođe, 3 izolata nisu dala u ovom istraživanju nikakav pozitivan fragment ni u jednom testiranom slučaju. Prisustvo 1 operona zabeleženo je kod 24, a prisustvo 2 operona kod 35 izolata. Dobijeni rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjem gde je testiran 51 izolat iste

kolekcije na prisustvo iturinskog i surfaktinskog operona, s'tim da je 33 izolata dalo pozitivan fragment u slučaju iturinskog operona i samo 6 izolata u slučaju surfaktinskog, koliko je bilo zabeleženo i u slučaju prisustva oba gena (Berić et al., 2012). Ovakav podatak ne iznenađuje zato što je poznato iz drugih studija da nekoliko *Bacillus* sojeva poseduje mogućnost produkcije više familija lipopeptida istovremeno (Roongsawang et al., 2002; Koumoutsi et al., 2004; Romero et al., 2007; Kim et al., 2010). Takođe, Arguelles-Arias et al. (2009) su pokazali istovremeno prisustvo osam biosintetskih operona kod *B. amyloliquefaciens* GA1 soja, od kojih je aktivno samo pet kako se kasnije ispostavilo.

Distribucija biosintetskih operona kod izolata u odnosu na ekološku nišu iz koje su izolovani je prikazana u Tabeli 5.

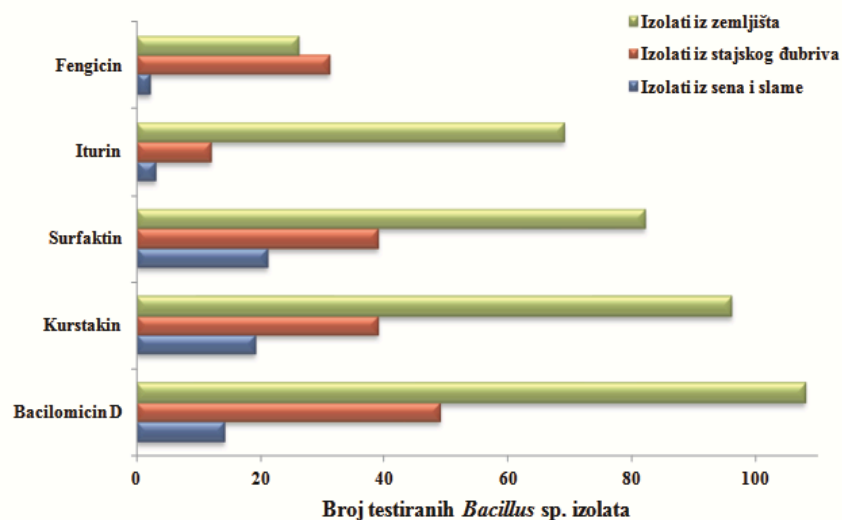
**Tabela 5.** Prisustvo i distribucija biosintetskih izolata izolovanih iz tri različite ekološke niše.

Poreklo i broj uzoraka	Detekcija biosintetskih operona					
	0 operona	1 operon	2 operona	3 operona	4 operona	5 operona
Seno i slama (23)	-	4	5	11	3	-
% zastupljenost	-	17,4	21,7	47,8	13,1	-
Đubrivo (61)	2	8	11	22	16	2
% zastupljenost	3,3	13,1	18	36,1	26,2	3,3
Zemljište (121)	1	12	19	34	46	9
% zastupljenost	0,8	9,9	15,7	28,1	38,1	7,4

Iako brojnost izolata iz različitih ekoloških niša nije bila ista, ipak je moguće uvideti određene korelacije u distribuciji operona. Kao što se može videti iz dobijenih rezultata prisutnost četiri biosintetska operona je donekle slična, uprkos različitom broju testiranih izolata iz ispitivanih niša, dok je prisustvo 3 gena u različitim kombinacijama bilo detektovano skoro kod polovine testiranih uzoraka izolovanih iz sena i slame. Ono što je takođe zanimljivo istaći jeste i činjenica da je samo kod 2, odnosno 3 izolata iz pomenute ekološke niše detektovan pozitivan rezultat u slučaju fengicinskog i iturinskog operona, respektivno (Tabela 5). Distribucija preostala tri operona je bila

skoro ujednačena i zastupljena kod nešto manje od 50% testiranih izolata (Slika 7; Prilog 1).

U slučaju izolata izolovanih iz stajskog đubriva 2 izolata (SS-27.2 i SS-29.1) su pokazala prisustvo svih pet testiranih biosintetskih operona, dok se odnos prisustva tri i četiri operona razlikovao za oko 10% u korist izolata sa manjim brojem biosintetskih gena. Zastupljenost fengicinskog operona, u ovoj ekološkoj niši, je zabeležena kod više od 50% testiranih izolata, sa dvostruko većom distribucijom istog nego u ostalim nišama u odnosu na broj izolata (Tabela 5).



**Slika 7.** Distribucija biosintetskih operona u zavisnosti od ekoloških niša *Bacillus* sp. izolata.

Za razliku od fengicinskog, iturinski operon je detektovan kod manje od 20% uzoraka tj. kod 20 izolata iz stajskog đubriva, dok je distribucija preostala tri operona bila skoro ujednačena, sa nešto većim prisustvom bacilomicinskog operona (Slika 7; Prilog 2).

Iako je najveći broj testiranih izolata poticao iz zemljišta kao ekološke niše, distribucija fengicinskog operona je bila detektovana u 22% populacije sa 26 izolata pozitivnih na prisustvo gena koji učestvuju u sintezi fengicina. U suprotnosti sa prethodne dve ekološke niše, prisustvo iturinskog operona je zabeleženo kod 69 izolata što predstavlja više od 57% populacije ove niše, a njegova zastupljenost u poređenu sa čitavom kolekcijom je više od 80% (Tabela 5). Ta činjenica ukazuje na veliku različitost prisustva dva poređena operona, fengicinskog i iturinskog u pogledu ekoloških niša

ovih izolata. Za razliku od prethodne dve ispitivane niše, kod izolata poreklom iz zemljišta, zastupljenost sva četiri operona u različitim kombinacijama je zabeležena u većem procentu, shodno proporcionalno većem broju uzoraka, dok je kod 9 izolata (SS-6.2; SS-21.7; SS-35.4; SS-38.2; SS-38.3; SS-38.4; SS-39.1; SS-39.3 i SS-40.2) potvrđeno prisustvo svih pet ispitivanih biosintetskih operona. Kao i u slučaju prethodne dve niše, distribucija bacilomicinskog, surfaktinskog i kurstakinskog operona je bila ujednačenija sa dominacijom izolata pozitivnih na bacilomicin D, a jedan izolat nije dao pozitivan signal ni u jednom testiranju (Slika 7; Prilog 3).

Kao što se može videti iz tabela (Prilozi 1-3) polovina testiranih izolata u slučaju pozitivnih rezultata daje jednu specifičnu traku, dok druga polovina pored fragmenta očekivane dužine poseduje jednu ili više nespecifičnih traka na gelu za sve testirane operone, izuzev iturinskog kod koga nije detektovana nijedna nespecifična traka kod ispitivanih izolata (Prilozi 4-8). Da bi se potvrdilo da je umnožen specifičan region bacilomicinskog i fengicinskog operona, urađeno je sekvenciranje određenog broja dobijenih PCR produkata. U ranijim istraživanjima izvršeno je sekvenciranje nekoliko PCR produkata iste kolekcije izolata za iturinski i surfaktinski operon i pokazan je visok stepen homologije (97-100%) u oba slučaja sa iturinskim operonom i 4'-fosfopanteteinil transferazom *B. subtilis* (Berić et al., 2012). Dobijene sekvence su zatim upoređene sa deponovanim sekvencama u GenBank koristeći BLAST analizu i rezultati su prikazani u Tabeli 6.

DNK sekvence koje su dobijene iz uzoraka koji su davali jednu traku očekivane dužine od 875 bp su pokazale 97-99% identičnosti sa već poznatim sekvencama bacilomicinskog operona *B. subtilis*, osim izolata SS-10.7 koji je pokazao nešto niži stepen homologije od 95% u slučaju *bamC* gena. DNK sekvence koje su dobijene iz uzoraka koji su davali jednu traku dužine 964 bp su pokazale 95-98% identičnosti sa već poznatim sekvencama fengicinskog operona. Dobijeni rezultati pokazuju zadovoljavajući stepen homologije umnoženih i objavljenih sekvenci, pa se za pouzdanošću može reći da sojevi poseduju genetički potencijal za produkciju ovih lipopeptidnih jedinjenja.

**Tabela 6.** Rezultati sekvenciranja pozitivnih traka dobijenih korišćenjem prajmera BACC1-F/BACC1-R i FEND1-F/FEND1-R.

Naziv deponovanog izolata i pristupni broj u NCBI bazi	Sekvencirani PCR produkti izolata <i>Bacillus</i> sp.						
	Identičnost (%)						
	SS-10.7	SS-19.3	SS-19.4	SS-26.1	SS-21.7	SS-28.1	SS-29.4
<i>B. subtilis</i> BS2 bacilomicin D sintetaza C ( <i>bamC</i> gen) (JN801140.1)	95	×	99	×	97	99	97
<i>B. subtilis</i> bacilomicin D operon, kompletna sekvenca (AY137375.1)	97	×	98	×	97	98	97
<i>B. subtilis</i> <i>fenD</i> gen (AJ011849.1)	95	95	93	97	94	×	×
<i>B. subtilis</i> BS2 fengicin sintetaza ( <i>fenD</i> gen) (JN801142.1)	96	95	93	98	96	×	×

Taksonomski različite *Bacillus* vrste, pokazuju ogromnu metaboličku moć i svestranost kroz produkciju strukturno različitih bioaktivnih molekula, a naročito neribozomalno sintetisanih lipopeptida. Da je proizvodnja sekundarnih metabolita suštinska odlika ovih vrsta govori i činjenica da je čak 4-5% ukupnog genoma *B. subtilis* namenjeno upravo ovoj funkciji, koji pokazuje potencijal proizvodnje više od dvadeset četiri strukturalno različita antimikrobna jedinjenja (Stein, 2005). Kod soja *B. amyloliquefaciens* kao i u slučajevima nekih drugih sojeva, čini se da je još veći deo genoma (~ 8%) uključen u sintezu ovih molekula (Arguelles-Arias et al., 2009; Chen et al., 2009a; Ruckert et al., 2011). Lipopeptidi se sintetišu neribozomalno pomoću velikih multi-enzimskih kompleksa (NRPS) i takav biosintetski sistem vodi do veoma značajne heterogenosti među ovim produktima u smislu prirode ciklizacije, dužine načina grananja lanaca masnih kiselina i do različitog tipa i sekvence aminokiselinskih ostataka (Stein, 2005). Tri glavne familije lipopeptida roda *Bacillus*, surfaktini, iturini i fengicini, a u skorije vreme i predstavnici familije kurstakina (Béchet al., 2012), su uglavnom proučavani u smislu njihove antagonističke aktivnosti protiv širokog spektra potencijalnih fitopatogena, uključujući bakterije, gljive i oomicete (Ongena and Jacques, 2008). Antifungalna aktivnost fengicina (Ongena et al., 2005) i bacilomicina D (Moyné



et al., 2001), antiviralna i antimikrobna aktivnost surfaktina (Peypoux et al., 1999), snažna antifungalna, hemolitička i ograničena antibakterijska aktivnost iturina (Maget-Dana and Peypoux, 1994; Asaka and Shoda, 1996; Romero et al., 2007), kao i antifungalna i ograničena antibakterijska aktivnost kurstakina (Hathout et al., 2000) su samo neki od primera. Prirodni pul ovih lipopeptida se može proširiti na direktan način biokombinatorijski, uključujući rekombinantne peptidne sintetaze koje učestvuju u neribozomalnoj sintezi ovih lipopeptida (Vater et al., 2003). Rekombinantne peptidne sintetaze se mogu dobiti zamenama njihovih modula i domena, kao i mesto specifičnom mutagenom aminokiselinskih ostataka uključenih u intermedijarne korake peptidne sinteze (Ramarathnam et al., 2007). Na taj način *Bacillus* izolati, producenti ovakvih lipopeptida mogu poslužiti kao genetički izvor prilikom konstruisanja velikih biokombinatorijskih biblioteka, genetički projektovanih peptidnih sintetaza u cilju dobijanja novih i aktivnijih molekula.

#### **4.3.2 IN VITRO ANTIMIKROBNI SPEKTAR IZOLATA**

Antibioza je samo jedan od mehanizama biokontrole koja je veoma dobro okarakterisana genetički i biohemijski kod *Bacillus* vrsta (Asaka and Shoda, 1996; Koumoutsi et al., 2004). Kako se poslednjih godina sprovode intenzivna istraživanja antimikrobnih jedinjenja ovog roda u cilju otkrivanja agenasa za biokontrolu, naročito protiv fungalnih patogena, u ovom radu je pored toga ispitan i antibakterijski potencijal odabranih izolata kolekcije u *in vitro* uslovima. Naime, u prethodnom istraživanju kolekcije izolata, vršeno je testiranje supernatanata svih izolata na antagonizam protiv 5 fitopatogenih gram-negativnih bakterija (Berić, 2010). U tom istraživanju 127 izolata je pokazalo aktivnost protiv bar jedne indikatorske bakterije, a od toga je 104 inhibiralo rast *X. oryzae* pv. *oryzae*, izazivača najdestruktivnije bakterijske bolesti pirinča. Pored visoke efikasnosti protiv *X. oryzae*, izolati su pokazali i značajan potencijal u antagonizmu protiv svih indikatorskih fitopatogena kakav je bio slučaj sa izolatima SS-9.2, SS-12.9 i SS-29.4. Takođe, u jednom od prethodnih istraživanja dokazan je i veoma jak antifungalni efekat 14 izolata (SS-6.2, SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1, SS-21.7, SS-27.2, SS-35.4, SS-38.2, SS-38.3, SS-38.4, SS-39.1, SS-39.3, SS-40.2 i SS-40.6) na gljive izolovane sa biljnih droga (Stević, 2013).

Imajući u vidu rezultate prethodnih istraživanja, polazna analiza sposobnosti sinteze antimikrobnih supstanci, pored već dokazanog genetičkog prisustva biosintetskih gena, uključivala je pet selektivno odabranih izolata kolekcije. Izabrana su 4 izolata poreklom iz zemljišta, SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1 i SS-38.4, i jedan izolat, SS-27.2, iz stajskog đubriva. Vodeći se logikom prethodnog istraživanja u kome su tri izolata prema analizi prisustva biosintetskih gena sadržala sve prisutne gene sem fengicinskog operona (Berić, 2010), odabrana su dva izolata (SS-12.6 i SS-13.1) sa prisustvom istih biosintetskih gena, dok su SS-27.2 i SS-38.4 pokazala prisustvo svih pet testiranih operona, za razliku od izolata SS-10.7 kome su nedostajali geni kurstakinskog operona. Analiza sposobnosti sinteze antimikrobnih supstanci urađena je na 17 indikatorskih sojeva fitopatogenih bakterija *X. arboricola* pv. *juglandis* koristeći modifikovani difuzioni metod u bunarićima (Harris et al., 1989). Kao bakterijski soj koji je predstavljao svojevrsnu pozitivnu kontrolu u smislu najsenzitivnijeg soja ovog rada, testirana je i aktivnost na *L. monocytogenes* (Tabela 7).

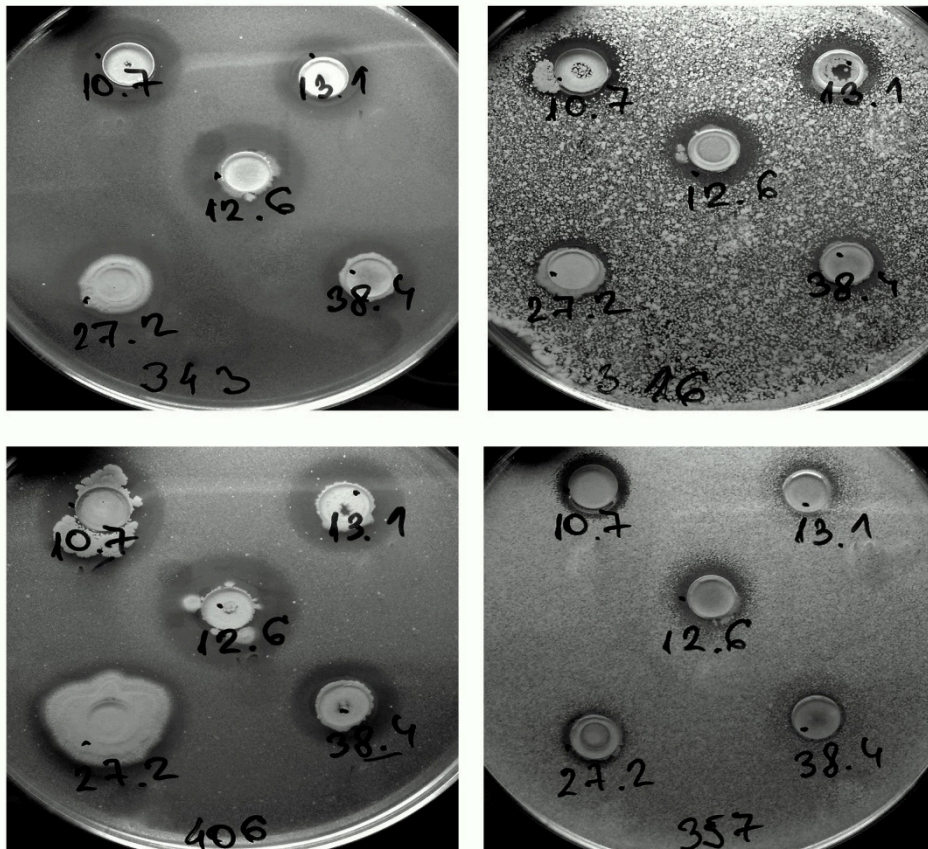
**Tabela 7.** Antimikrobna aktivnost supernatanta odabranih izolata *Bacillus* sp.

Indikatorski soj	SS-10.7	SS-12.6	SS-13.1	SS-27.2	SS-38.4
<i>X. arboricola</i> 301	12	16	14	17	13
<i>X. arboricola</i> 314	14	16	14	16	13
<i>X. arboricola</i> 316	12	13	12	12	11
<i>X. arboricola</i> 327	16	15	14	†	13
<i>X. arboricola</i> 343	14	16	13	15	13
<i>X. arboricola</i> 350	14	15	14	12	13
<i>X. arboricola</i> 357	12	11	10,5	11	10
<i>X. arboricola</i> 358	14	14	12	16	13
<i>X. arboricola</i> 359	13	15	13	14	14
<i>X. arboricola</i> 382	14	16	14	13	14
<i>X. arboricola</i> 401	10,5	12	10,5	12	11
<i>X. arboricola</i> 406	15	18	14	†	15
<i>X. arboricola</i> 418	†	16	13	†	14
<i>X. arboricola</i> 422	†	16	13	†	13
<i>X. arboricola</i> 431	14	16	13	17	11,5
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19111	13	15	14	20	17
<i>P. carotovorum</i> K5	-	-	-	-	-
<i>P. carotovorum</i> K6	-	-	-	-	-

Prečnici zona inhibicije rasta predstavljeni su u mm.

† - prerastanje soja i nemogućnost očitavanja zone inhibicije

Svi izolati *Bacillus* sp. su ispoljili veoma jaku antimikrobnu aktivnost protiv svih testiranih indikatorskih sojeva *X. arboricola*, a izdvojio se izolat SS-12.6, koji je dao veće zone inhibicije od ostalih (Slika 8). Svi testirani izolati nisu imali nikakvog efekta protiv sojeva *P. carotovorum*. *L. monocytogenes* je pokazala osetljivost prema svim testiranim izolatima sa najvećim zonama inhibicije sa SS-27.2 i SS-38.4. Prema našim saznanjima ovo je prvi rezultat ovog tipa u delovanju na sojeve *X. arboricola*, visoke patogenosti (Ivanović et al., 2014), kao ekonomski značajnog patogena oraha širom sveta (Adaskaveg et al., 2011), što doprinosi razumevanju i suzbijanju bolesti izazvanim patovarom *juglandis*.



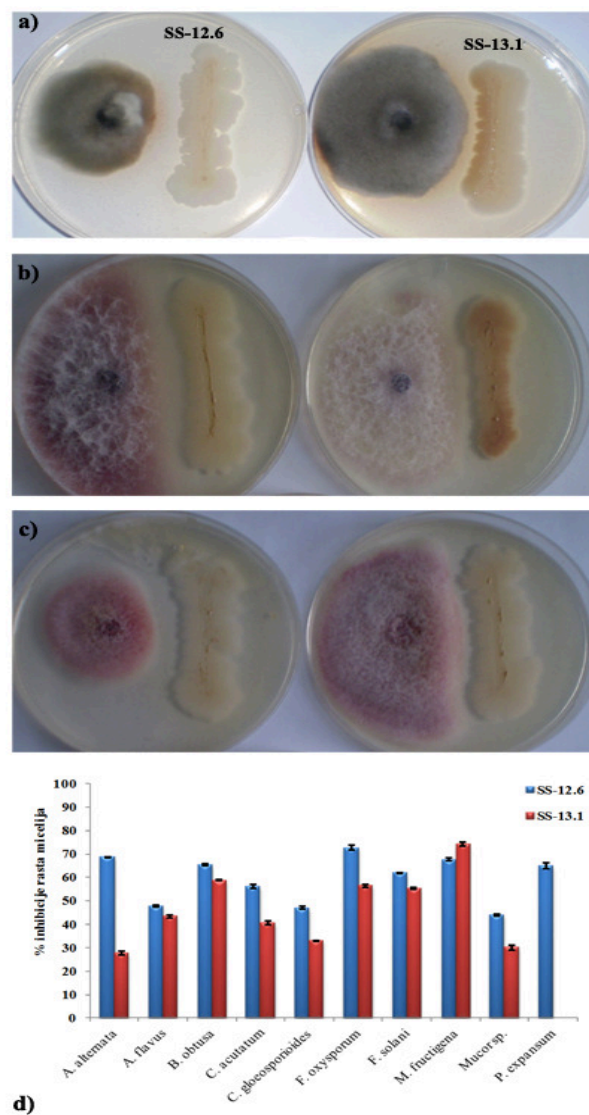
**Slika 8.** Antibakterijska aktivnost *Bacillus* sp. izolata protiv sojeva *X. arboricola* pv. *juglandis*.

Nekoliko različitih sojeva roda *Bacillus* je analizirano u dosadašnjim radovima u smislu biokontrolnih antifungalnih agenasa. Recimo, *B. subtilis* izolovan sa površine agruma je bio efikasan u kontroli zelene i plave plesni citrusa izazvane *Penicillium digitatum* i *P. italicum*, respektivno (Obagwu and Korsten, 2003), kao i *B. licheniformis* u borbi protiv sive plesni paradajza izazvanom fungalnim patogenom *Botrytis cinerea*

(Lee et al., 2006). *B. amyloliquefaciens* je takođe poslužio kao višestruki biokontrolni agens protiv različitih fungalnih bolesti biljaka (Yoshida et al., 2002), a ekstracelularni antifungalni metaboliti proizvedeni od strane *B. pumilus* pokazali su sposobnost inhibiranja rasta micelije mnogih vrsta iz roda *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Munimbazi and Bullerman, 1998). Takođe, prethodna istraživanja bila su usmerena na *in vitro* ispitivanja antagonističkog potencijala 14 različitih izolata *Bacillus* sp. kolekcije, prema fungalnim patogenima poreklom sa biljnih droga (Stević, 2013). Na osnovu dobijenih rezultata tog istraživanja, uočeno je da su najbolji antagonistički potencijal na većinu testiranih gljiva ispoljili izolati *Bacillus* sp. SS-12.6, SS-13.1, a zatim i SS-38.3 i SS-38.4, SS-40.2, SS-27.2, SS-10.7, SS-21.7, SS-35.4, SS-38.2 i SS-6.2.

Inhibitorno delovanje različitih izolata *Bacillus* sp. ispitivano je testovima dvojne kultivacije gajenjem 10 vrsta fitopatogenih gljiva izolovanih sa plodova voća i povrća u kombinaciji sa odgovarajućim antagonistom na istoj petri šolji. Na osnovu preliminarnog testa uočeno je da su sve testirane gljive u određenoj meri osetljive na antagonističko delovanje dva odabrana *Bacillus* izolata SS-12.6 i SS-13.1 (Slika 9). Potpuno odsustvo inhibicije je pokazao izolat SS-13.1 protiv *P. expansum* izolovanog sa limuna. Umerenu aktivnost protiv *C. gloesporioides* poreklom sa višnje i *C. acutatum* poreklom sa kruške, kao i protiv *A. flavus* i *Mucor* sp. poreklom sa plodova jabuke su dala oba izolata *Bacillus*. Najveću osjetljivost na delovanje izolata SS-12.6 su pokazali sojevi *F. oxysporum*, *A. alternata* i *M. fructigena*, različitog porekla, sa oko 70% inhibicije u proseku, dok su fungalni patogeni *B. obtusa*, *F. solani* i *P. expansum*, pokazali nešto manju osjetljivost, ali nikada nižu od 60% inhibicije (Slika 9d).

Izolat SS-13.1 je pokazao manji potencijal za inhibiciju testiranih patogena u odnosu na SS-12.6, a najjača aktivnost je zabeležena u slučaju *M. fructigena* sa inhibicijom rasta preko 74%. Dobijeni rezultati pokazuju izvesno odstupanje od prethodnog istraživanja sa razlikom u delovanju ova dva izolata na iste vrste fungalnih patogena različitog porekla (Stević, 2013).



**Slika 9.** Antifungalni efekat izolata SS-12.6 (levo) i SS-13.1 (desno) prema: (a) *A. alternata*, (b) *F. solani* i (c) *C. acutatum*. (d) procenti inhibicije rasta micelija testiranih patogena.

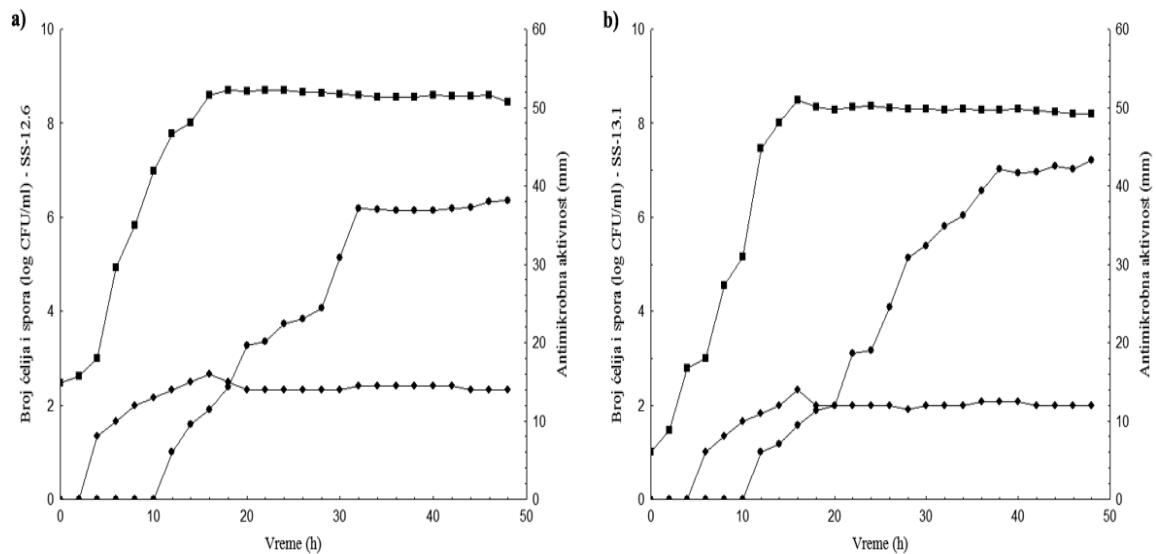
Naime, *A. flavus* izolovan sa biljnih droga pokazao je veću osetljivost na delovanje odabranih *Bacillus* izolata sa procentom inhibicije oko 60%, dok je u našem slučaju taj procenat iznosio 45% za oba izolata, sa nešto jačim efektom SS-12.6, kao i u pomenutom istraživanju. Približno slična vrednost je dobijena za *A. alternata* u slučaju izolata SS-12.6, ali ne i za drugi izolat kod koga je zabeležena znatno slabija aktivnost protiv ovog patogena u našem radu. Takođe, oba izolata su značajnije inhibirala rast *F. solani* i *F. oxysporum*, u odnosu na iste patogene izolovanih sa biljnih droga. Ovakvi rezultati ne iznenađuju, pogotovu jer je i u prethodnim istraživanjima (Stević, 2013)

pokazano da ista fitopatogena gljiva, *F. oxysporum*, izolovana iz različitih biljnih droga, nevena i kukuruzne svile, ispoljava različit stepen osetljivosti na *Bacillus* sp. izolate, SS-12.6 i SS-13.1. Na osnovu ovakvih rezultata može se pretpostaviti da testirani izolati ispoljavaju svoj antagonizam prema odabranim gljivama produkcijom antimikrobnih supstanci, ali se ne mogu isključiti ni ostali mehanizmi antagonizma kao što su: kompeticija za nutrijente i produkcija litičkih enzima.

### **4.3.3 DINAMIKA SINTEZE ANTIMIKROBNIH SUPSTANCI ODABRANIH IZOLATA**

U cilju potvrđivanja antibioze kao mehanizma antagonizma, istraživana je dinamika produkcije antimikrobnih supstanci izolata *Bacillus* sp. SS-12.1 i SS-13.1. Supernatanti oslobođeni ćelija su uzorkovani na svaka dva sata tokom aerobnog rasta u LB medijumu i istovremeno je testirana njihova aktivnost protiv *X. arboricola* 301 (Slika 10). Dostizanje stacionarne faze je uočeno nakon 16 h rasta, a lag faza je skoro izostala u oba slučaja. Pojava prvih spora je detektovana nakon 12 h inkubacije za oba soja i njihov broj eksponencijalno se povećao do 32. odnosno do 38. sata u slučaju SS-12.6 i SS-13.1, respektivno, dostižući plato u tim satima. Kinetika proizvodnje antimikrobnih supstanci za oba izolata SS-12.6 i SS-13.1 je pokazala da sinteza i/ili sekrecija počinje na samom početku eksponencijalne faze rasta (posle četvrtog sata rasta za SS-12.6 i posle šestog sata u slučaju SS-13.1), nezavisno od sporulacije. Maksimalna antimikrobna aktivnosti je postignuta na početku stacionarne faze rasta (nakon 16 h inkubacije za oba soja) i održavana je na tom nivou do isteka praćenog vremena.

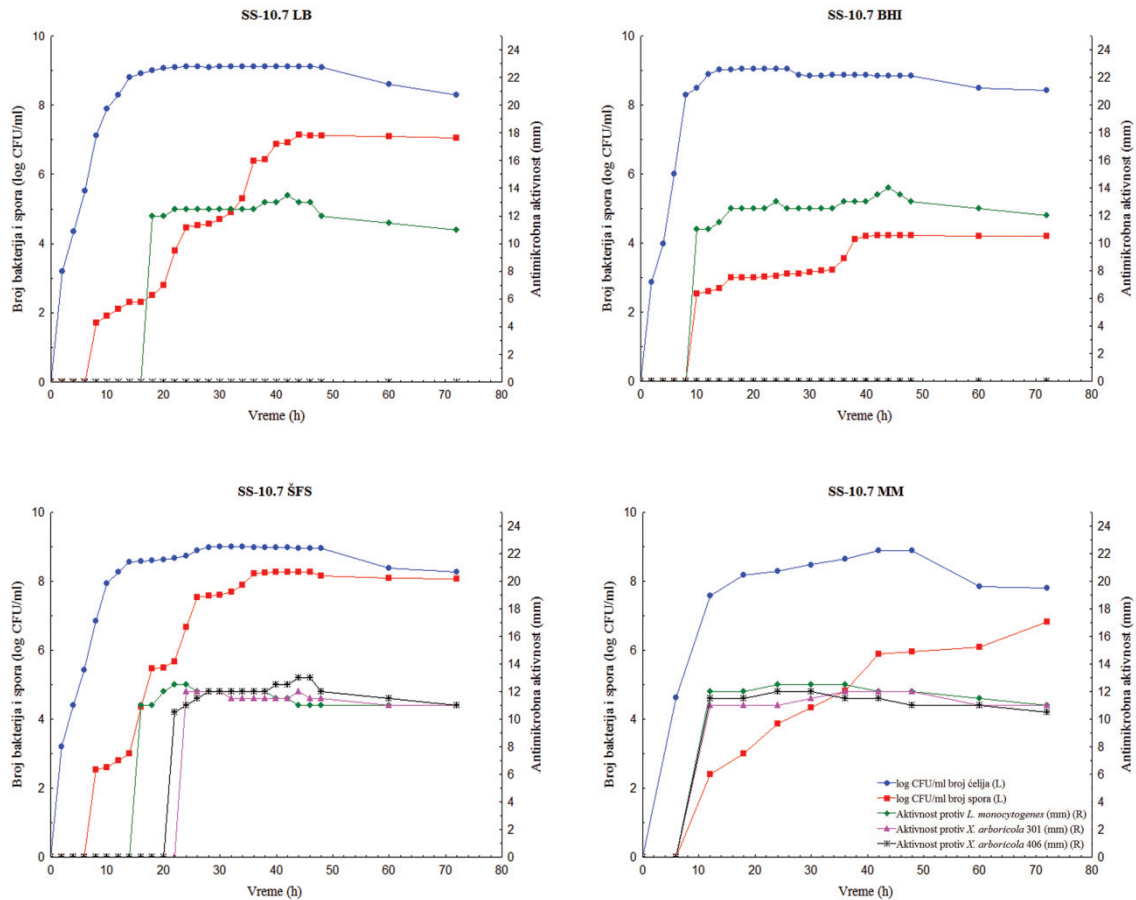
Ovakvi rezultati su bili u skladu sa dobijenim u istraživanju Berić et al. (2012), gde je za izolat SS-12.9 takođe pokazano da je početak sinteze antimikrobnih supstanci nezavisan od sporulacije ili barem samog njenog početka. Takođe, dostizanje maksimalne aktivnosti je bilo određeno sličnim vremenima uzorkovanja i trend zadržavanja aktivnosti do kraja praćenog vremena uzorkovanja samo potvrđuje stabilnost aktivnih jedinjenja.



**Slika 10.** Proizvodnja antimikrobnih supstanci tokom rasta u LB medijumu izolata SS-12.6 (a) i SS-13.1 (b). (■) Broj bakterija (log CFU/ml), (●) broj spora (log CFU/ml) i (♦) antimikrobna aktivnost protiv *X. arboricola* 301 (mm).

Jedna od najvažnijih karakteristika vrsta roda *Bacillus*, naročito sa biotehnoške tačke gledišta, je njihova sposobnost produkcije različitih antibiotskih supstanci i sagledavanje uslova za što bolju produkciju. U tom smislu naša dalja istraživanja su bila okrenuta ka odabiru pravog medijuma za rast. Uslovi uzorkovanja i praćenja dinamike sinteze su bili isti kao i u prethodnom slučaju, samo je spektar proširen na pet izolata SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 i SS-38.4. Praćenje je vršeno u LB, ŠFS, BHI i MM medijumima, a antimikrobna aktivnost ispitivana je na sojevima *X. arboricola* 301 i 406, kao i na *L. monocytogenes*. Testiranje supernatanta svih pet izolata je pokazalo visok antagonistički potencijal, ali njihova aktivnost se razlikovala od uslova u kojima su gajeni, tj. od medijuma u kojima su rasli i od potencijala svakog izolata pojedinačno.

Dostizanje stacionarne faze izolata SS-10.7 je uočeno nakon 16 h rasta u LB i MM medijumima i nešto ranije u slučaju BHI i ŠFS medijuma tj. u 12. i 14. satu, respektivno, a lag faza je skoro izostala u svim medijumima. Pojava prvih spora je detektovana nakon samo 8 h inkubacije u LB i ŠFS medijumima i nešto kasnije u BHI (10 h) i MM medijumu (12 h) i njihov broj se eksponencijalno povećao sve do isteka merenja. Izolat SS-10.7 gajen u LB i BHI medijumima pokazao je antagonističku aktivnost samo protiv *L. monocytogenes*, dok je aktivnost u slučaju oba soja *X. arboricola* 301 i 406 izostala (Slika 11).



**Slika 11.** Proizvodnja antimikrobnih supstanci tokom rasta u LB, BHI, ŠFS i MM medijumima izolata SS-10.7.

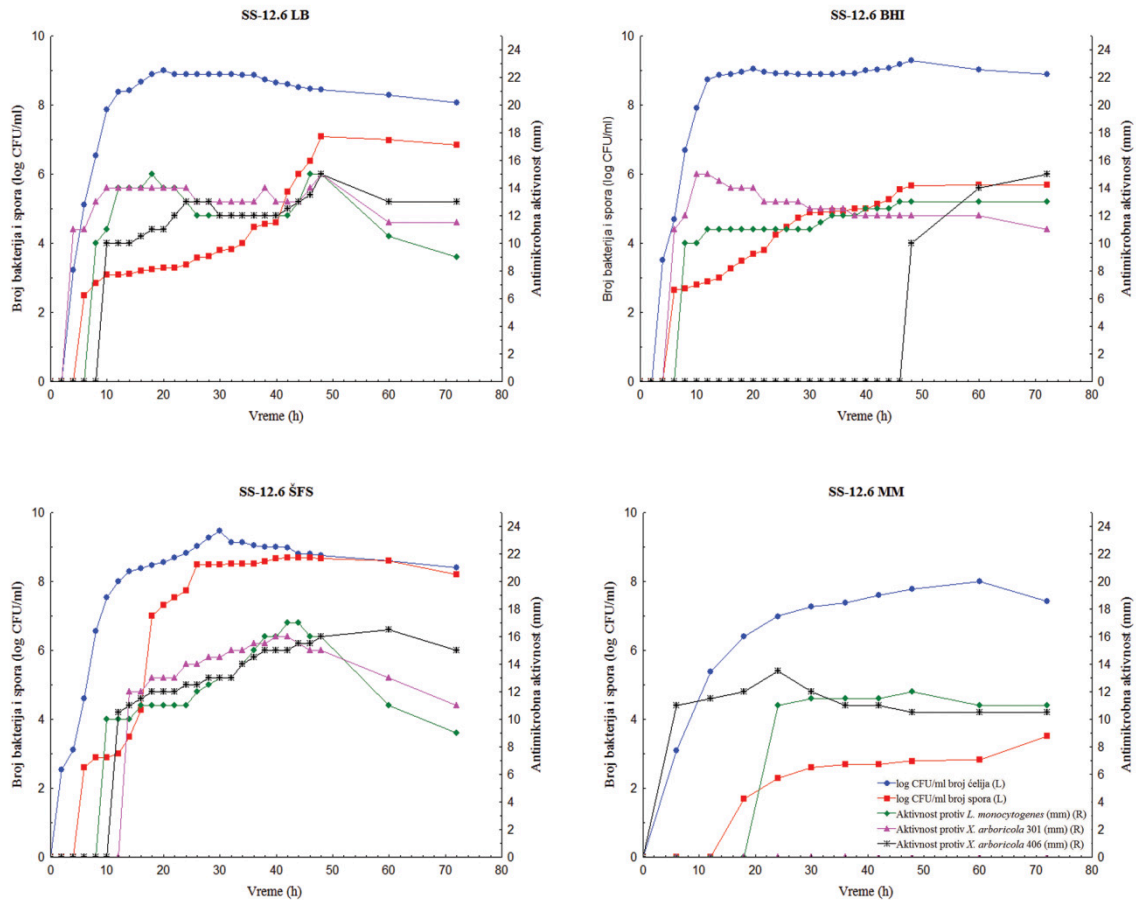
Antagonistička aktivnost protiv *L. monocytogenes* uočena je posle 16 h rasta sa laganim porastom do 24. sata sa konstantnim održavanjem aktivnosti na tom nivou sve do 42. sata kad je dostignut maksimum. Nakon 44. sata antimikrobna aktivnost se neprimetno smanjuje i na tom nivou ostaje sve do isteka praćenog vremena. Vreme početka sinteze antimikrobnih supstanci u ovom medijumu je bilo na prelazu iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta i nije se poklopilo sa početkom sporulacije čiji je početak zabeležen znatno ranije. Antimikrobna aktivnost u slučaju izolata gajenog u BHI medijumu se javlja ranije, već u 8. satu rasta, kad i započinje blagi rast sve do 44. sata, gde je zabeležen maksimum aktivnosti, nakon koga je primećen neznatni pad aktivnosti koji se održava do kraja merenja. Sporulacija je započela istovremeno sa sintezom antimikrobnih supstanci, ali je bila slabijeg inteziteta u poređenju sa LB medijumom. Za razliku od prethodna dva slučaja, proizvodnja antimikrobnih supstanci u ŠFS i MM medijumima je potvrđena protiv sva tri indikatorska soja. Antagonistička



aktivnost u ŠFS medijumu protiv *L. monocytogenes* je zabeležena u 14. satu rasta sa maksimalnim vrednostima u 22. i 24. satu, nakon čega je aktivnost malo opala i zadržala se na tom nivou sve do kraja praćenja. Antagonistička aktivnost protiv *X. arboricola* 406 javila se tek u 20. satu rasta, sa maksimumom dostignute aktivnosti u 44. satu, dok se protiv *X. arboricola* 301 zona inhibicije pojavila dva sata kasnije (22 h) kad je istovremeno dostignut i maksimum aktivnosti koji se održavao na tom nivou sve do isteka praćenja. Međutim, izmerene zone inhibicije su bile manje nego u slučaju *X. arboricola* 406. Antagonistička aktivnost postignuta u MM medijumu pokazuje sličnost sa rezultatima u ostalim medijumima, jer je sinteza antimikrobnih jedinjenja zabeležena u 12. satu inkubacije, kad je otprilike i dostignut maksimum aktivnosti koji se na tom nivou i održavao do kraja. Početak sinteze antimikrobnih jedinjenja je bio u ekspanzionalnoj fazi rasta istovremeno sa samim početkom sporulacije.

Kada se pogledaju sve krive rasta u smislu antagonističkog potencijala, početak sinteze antimikrobnih supstanci dešava se na prelazu između ekspanzionalne i stacionarne faze i jednom postignut nivo aktivnosti veoma malo fluktuirao do kraja merenja. Aktivnost protiv sve tri indikatorske bakterije gajene u ŠFS i MM medijumima, možda je moguće objasniti povećanom sporulacijom izazvanom ovim siromašnim medijumima, a izostanak aktivnosti u preostala dva njihovim bogatim sastavom. Takođe, može su uočiti i mali pad aktivnosti pred sam kraj praćenja, ali se to može objasniti ulaskom u fazu odumiranja bakterija i trošenjem hranljivih supstanci iz podloge. Slični rezultati dobijeni su kod izolata *Bacillus* sp. SS-12.9, gde je sinteza veoma stabilna u kulturi i nakon nekoliko dana inkubacije (Berić et al., 2012).

Izolat SS-12.6 je takođe pokazao svoje različitosti u rastu i sintezi antimikrobnih jedinjenja u zavisnosti od medijuma gajenja. Dostizanje stacionarne faze je uočeno nakon 16 h rasta u LB i ŠFS medijumima i nešto ranije u slučaju BHI medijuma (12 h), za razliku od MM medijuma gde je početak aktivnosti zabeležen nakon 24. sata. Pojava prvih spora je detektovana nakon samo 6 h inkubacije u BHI i ŠFS medijumima i nešto kasnije u LB medijumu (8 h), za razliku od MM medijuma gde je sporulacija detektovana tek u 18. satu. Antagonistička aktivnost zabeležena je protiv sva tri indikatorska soja, sem protiv *X. arboricola* 301 u slučaju gajenja ovog izolata u MM medijumu (Slika 12).

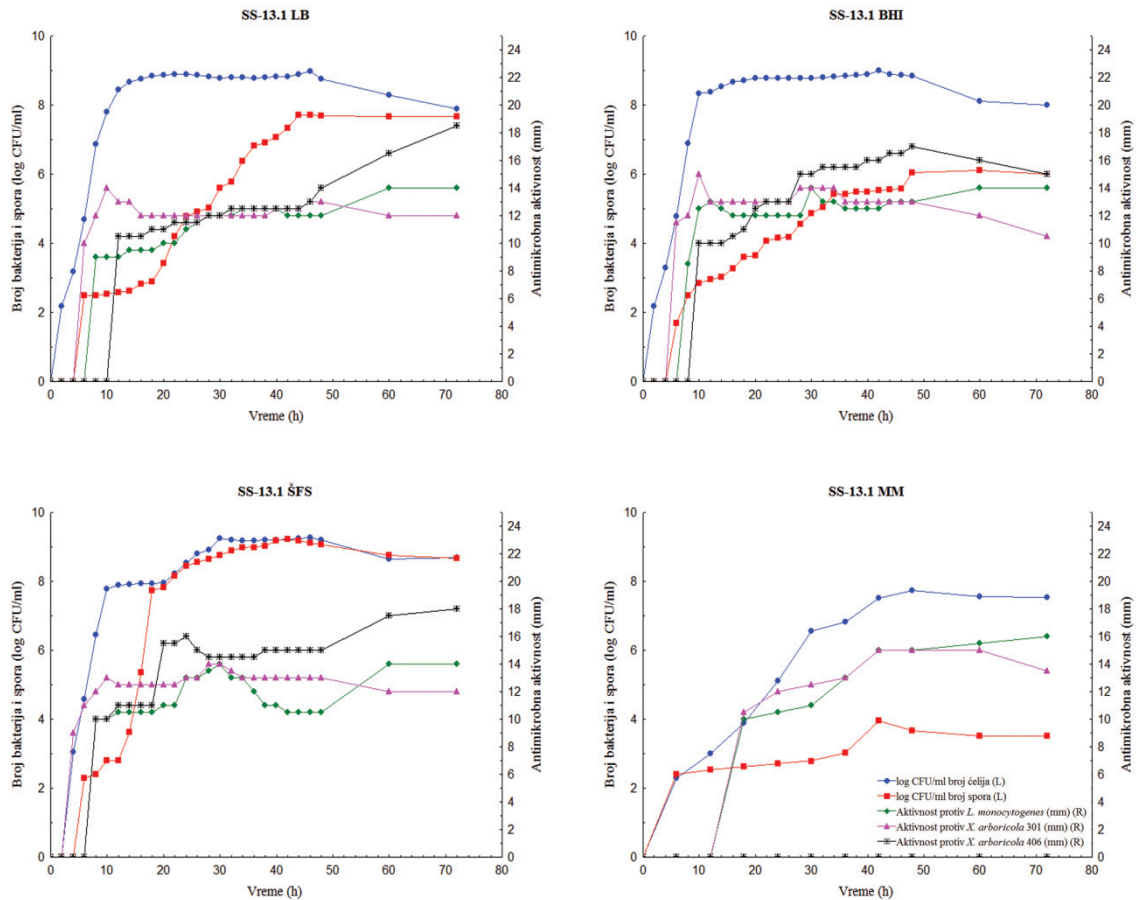


**Slika 12.** Proizvodnja antimikrobnih supstanci tokom rasta u LB, BHI, ŠFS i MM medijumima izolata SS-12.6.

Najizraženija aktivnost antimikrobnih jedinjenja ovog izolata gajenog u LB medijumu je zabeležena protiv *X. arboricola* 301, veoma rano dostižući plato aktivnosti slično kao i u prethodno zabeleženoj studiji na početku ovog istraživanja, do dostizanja maksimuma aktivnosti zabeležene u 48. satu, nakon čega je primećeno neznatno smanjenje. Aktivnost SS-12.6 protiv *L. monocytogenes* i *X. arboricola* 406 je bila nešto niža sa sličnim maksimumima aktivnosti. Antimikrobna aktivnost se možda može dovesti u vezu sa nastavkom sporulacije, a ne i sa njenim početkom kao i u prethodnom slučaju, jer je uočen njen rast sve do časa zabeleženog maksimuma gde je i dostignut plato aktivnosti. U slučaju soja *L. monocytogenes* primećen je još jedan raniji maksimum aktivnosti u 18. satu rasta što bi moglo da se objasni sintezom dva različita tipa lipopeptidnih jedinjenja koja imaju vrhunac aktivnosti u različitim periodima. Kod ŠFS medijuma uočena je maksimalna aktivnost u kasnijim satima za sve indikatorske sojeve (42-44 h), kad su i zabeleženi maksimumi, nakon čega je došlo do blagog

opadanja. Maksimumi aktivnosti se takođe mogu dovesti u vezu sa nastavkom sporulacije koja je dostigla svoj maksimum u 40. satu, pri konstantnom broju ćelija u kulturi. Antagonistička aktivnost praćena u BHI medijumu je pokazala drugačije delovanje. Naime, sinteza antimikrobnih supstanci protiv *X. arboricola* 301 počinje najranije, u 4. satu rasta i svoj maksimum dostiže već u 10. satu eksponencijalnog rasta, nakon čega je uočeno lagano opadanje aktivnosti. Aktivnost protiv *L. monocytogenes* javlja se u 8. satu sve do maksimuma u 46. satu rasta kulture. Zone inhibicije zabeležene kod *L. monocytogenes* su male na početku praćenja, čak manje od *X. arboricola* 301. Interesantan je izostanak aktivnosti ovog izolata prema *X. arboricola* 406 sve do 48. sata rasta, sa zabeleženim maksimumom aktivnosti pred sam kraj praćenja kada bakterijska kultura polako odumire, u 60. i 72. satu. Primećeno je i da je sporulacija slabija u poređenju sa ŠFS medijumom, ali sa tendencijom stalnog porasta sve do kraja praćenja. U uslovima gajenja u MM medijumu SS-12.6 pokazuje najslabiju antagonističku aktivnost i najmanje zone inhibicije, pa čak i odsustvo aktivnosti protiv *X. arboricola* 301, za razliku protiv *X. arboricola* 406 gde je aktivnost zabeležena u 6., a najintenzivnija u 24. satu rasta. Dobijeni rezultati ne pokazuju povezanost sa sporulacijom i poklapaju se sa standardnom teorijom proizvodnje antimikrobnih supstanci na prelazu iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta (Slepecky and Hemphill, 2006). Aktivnost protiv *L. monocytogenes* javlja se tek u 24. satu i na sličnom nivou se održava sve do kraja praćenja. Sporulacija bakterija u ovom medijumu je takođe, na niskom nivou i prilično konstantna od pojave spora u 18. satu.

Dostizanje stacionarne faze u slučaju izolata SS-13.1 je uočeno nakon 16 h rasta u LB i BHI medijumima i dosta kasnije u slučaju ŠFS medijuma (30 h) i MM medijuma, gde je početak zabeležen tek u 42. satu merenja. Pojava prvih spora je detektovana nakon samo 6 h inkubacije u LB, ŠFS i MM medijumima i nešto kasnije u BHI medijumu (8 h), sa tendencijom stalnog rasta do kraja isteka praćenja. Antagonistička aktivnost zabeležena je protiv sva tri indikatorska soja, sem protiv *X. arboricola* 406 u slučaju gajenja ovog izolata u MM medijumu (Slika 13).



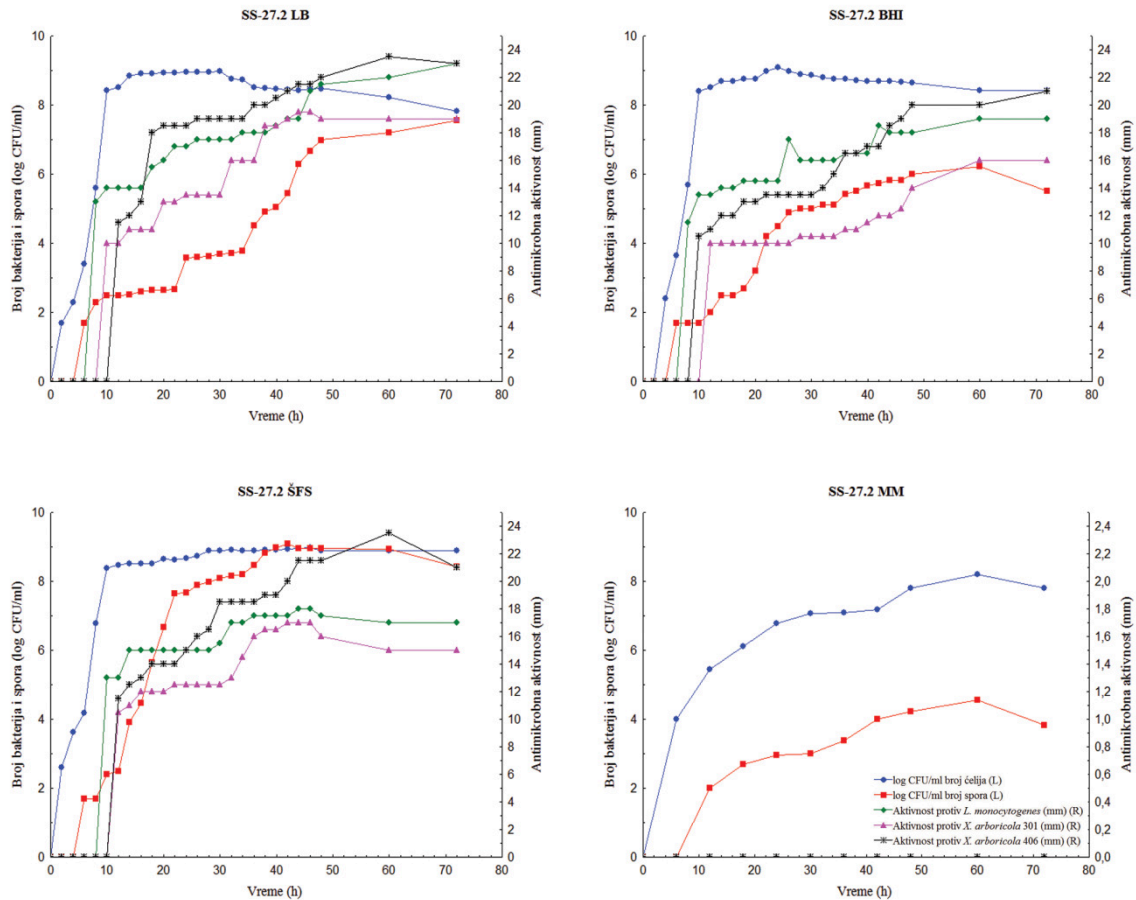
**Slika 13.** Proizvodnja antimikrobnih supstanci tokom rasta u LB, BHI, ŠFS i MM medijumima izolata SS-13.1.

Antagonistička aktivnost izolata SS-13.1 gajenog u LB medijumu protiv *X. arboricola* 301 uočena je već posle 6. sata rasta, u eksponencijalnoj fazi, identično kao i u prethodno zabeleženoj studiji na početku ovog istraživanja i poklapa se sa pojavom prvih spora, dostižući svoj maksimum posle 10. sata rasta kulture, nešto ranije u odnosu na prethodna istraživanja. Ovo bi se moglo protumačiti jer se u ovom delu ispitivanja krenulo iz prekonocne tečne kulture, a ne iz kolonije. Postignuti nivo antimikrobne aktivnosti se nakon neznatnog pada održavao na konstantnom nivou sve do isteka praćenog vremena. Aktivnost protiv *L. monocytogenes* je primećena u 8. satu rasta sa maksimalnom osetljivošću u 60. satu sa istovremenim najvećim nivoom sporulacije. Antagonistička aktivnost protiv *X. arboricola* 406 javila se najkasnije, u 10. satu inkubacije, ali sa najvećim zonama inhibicije i maksimumom u 72. satu. Ovakva aktivnost se kao i u slučaju izolata SS-12.6 možda može dovesti u vezu sa nastavkom sporulacije, a ne i sa njenim početkom kao u početnoj studiji. Izolat SS-13.1 gajen u

ŠFS medijumu pokazao je najveći intenzitet sporulacije, poput ostalih izolata u ovom medijumu, koja kreće rano i beleži značajan porast u 18. satu, sa dostizanjem maksimuma u 44. satu. Pokazana je antagonistička aktivnost protiv sva tri indikatorska soja, ali je antagonizam najizraženiji protiv *X. arboricola* 406, sa najvećim zonama inhibicije u 24. i 72. satu merenja. Aktivnost protiv *X. arboricola* 301 je zabeležena najranije, u 4. satu rasta i sa maksimumom u 30., na prelazu iz eksponencijalne u stacionarnu fazu. Na tom nivou se održavala i nadalje. Proizvodnja antimikrobnih jedinjenja koja deluju antagonistički protiv *L. monocytogenes* detektovana je nakon 6 h rasta, sa maksimumima aktivnosti u 30. i 60. satu inkubacije. Takođe, u slučaju BHI medijuma zabeležena je vrlo rana produkcija ovih jedinjenja i njihova aktivnost na svim indikatorskim bakterijama. Najranija aktivnost javlja se protiv *X. arboricola* 301, sa maksimumom u 10. satu, pri kraju eksponencijalne faze nakon čega opada na malo niži nivo i tako se održava sve do ponovnog pada u 60. satu. Delovanje protiv *L. monocytogenes* i *X. arboricola* 406, javlja se u 8., a najviši intenzitet pokazuje u 30. satu rasta bez daljih varijacija, sa istrajnom aktivnošću do 72. sata merenja u slučaju prvog patogena i sa dostizanjem maksimuma u 48. satu u slučaju drugog, sa tendencijom opadanja. Izolat gajen u MM medijumu pokazuje jako spor rast, sa početkom sporulacije u 6. satu inkubacije i tendencijom laganog porasta. Aktivnost protiv *X. arboricola* 406 u potpunosti izostaje, dok antagonistička aktivnost protiv *L. monocytogenes* i *X. arboricola* 301 se javlja tek u 18. satu merenja. Maksimum aktivnosti protiv *L. monocytogenes* je dostignut u 72., a u slučaju *X. arboricola* 301 u 42. satu. Antimikrobna aktivnost protiv oba patogena javlja se u eksponencijalnoj fazi, a maksimum aktivnosti se dostiže u stacionarnoj fazi. Nameće se zaključak da ovaj izolat počinje antimikrobnu proizvodnju relativno rano u svim medijumima, a najveće zone inhibicije daje protiv *X. arboricola* 406.

Izolat SS-27.2 je takođe pokazao varijabilnost u rastu i sintezi antimikrobnih jedinjenja u zavisnosti od medijuma gajenja. Dostizanje stacionarne faze je uočeno nakon samo 10 h rasta u BHI i ŠFS medijumima i nešto kasnije u slučaju LB medijuma (12 h), za razliku od MM medijuma gde nije ni dostignuta do kraja merenja. Pojava prvih spora je detektovana nakon samo 6 h inkubacije u sva tri medijuma, za razliku od MM medijuma gde je sporulacija detektovana tek u 12. satu. Antagonistička aktivnost zabeležena je protiv sva tri indikatorska soja, sem u slučaju gajenja ovog izolata u MM

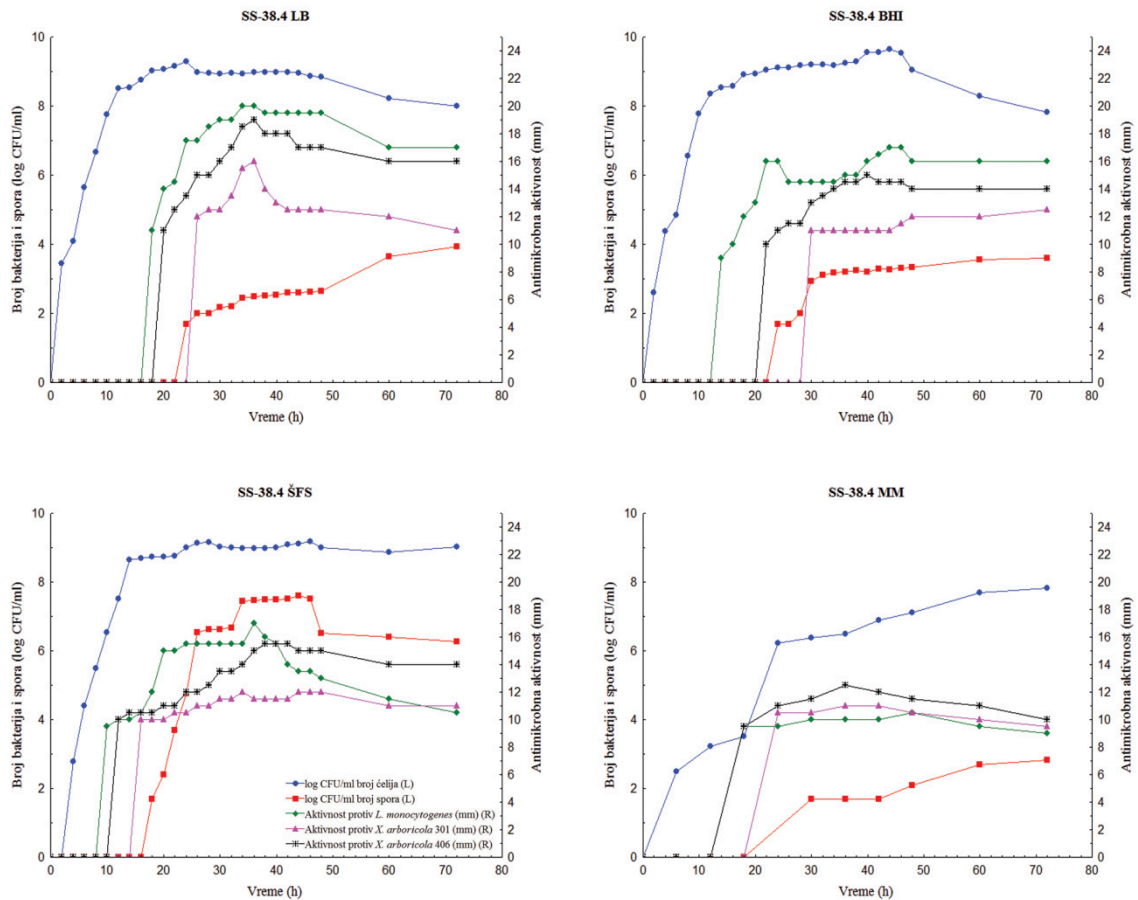
medijumu (Slika 14). Ovaj izolat u LB medijumu pokazuje jaku antagonističku aktivnost na sve indikatorske sojeve. Maksimum aktivnosti protiv svih sojeva dostiže se uglavnom u kasnoj stacionarnoj fazi, nakon 48 h rasta, sa ranim početkom aktivnost već od 6. sata i stalnim porastom. Najjači antagonizam je primećen prema *X. arboricola* 406 sa zonama inhibicije i do 23,5 mm u prečniku. U ovom primeru se jasno uočava povećanje antimikrobne aktivnosti protiv patogena usled povećanja produkcije spora, iako sporulacija nije izrazito progresivna kao u ŠFS medijumu, koji je pokazao slično delovanje u smislu produkcije antimikrobnih jedinjenja sa zabeleženim manjim zonama inhibicije i početkom detektovane aktivnosti na prelazu iz logaritamske u stacionarnu fazu rasta. Ono što se nedvosmisleno zaključuje iz ovih primera je da kontinuirani rast sporulacije u svim testiranim medijumima, sem u minimalnom, dovodi do pojave maksimuma aktivnosti, ukazavši na tesnu povezanost sporulacije, odnosno uslova koji dovode do sporulacije i produkcije antimikrobnih jedinjenja. Kao i kod prethodnih izolata gajenih u ovom medijumu, sporulacija počinje rano i veoma je intenzivna sa dostignutim maksimumom u 60. satu praćenja. Detektovana antagonistička aktivnost ka *X. arboricola* 406 je najizraženija i daje najveće zone inhibicije, ali za njom ne zaostaju ni aktivnosti protiv *L. monocytogenes* i *X. arboricola* (301) i sve dostižu najviši nivo pred kraj praćenja rasta. Izolat SS-27.2 praćen u BHI medijumu pokazuje malo slabiju antagonističku aktivnost u poređenju sa prethodnim medijumima, ali istovremeno pokazuje i najveću zabeleženu aktivnost uopšte. Aktivnost protiv *L. monocytogenes* javlja se u 8. satu rasta, sa značajnim povećanjem nakon 24 h i maksimumom u 60. satu rasta. Jaka antagonistička aktivnost je primećena na *X. arboricola* 406 nakon 10 h rasta, dok se aktivnost protiv *X. arboricola* 301 javlja nešto kasnije (12 h). Aktivnosti su podjednako jake i izražene pred sam kraj praćenja uz povećani nivo sporulacije (Slika 14). Izolat gajen u MM medijumu ne pokazuje nikakvu antagonističku aktivnost što se generalno može pripisati sastavu ovog medijuma, koji dovodi do izostanka ili niskog nivoa produkcije usled malog broja ćelija, što je primećeno i kod drugih praćenih izolata gde su zone inhibicije bile daleko najmanje u odnosu na ostale testirane medijume. Izolat SS-27.2 je pokazao najveću zabeleženu aktivnost protiv svih patogena, naročito u uslovima gajenja u LB medijumu i najizraženiju aktivnosti protiv *X. arboricola* 406 bez obzira na medijum gajenja sa maksimumom dostignute aktivnosti pri kraju stacionarne faze uz najviši nivo sporulacije.



**Slika 14.** Proizvodnja antimikrobnih supstanci tokom rasta u LB, BHI, ŠFS i MM medijumima izolata SS-27.2.

Dostizanje stacionarne faze u slučaju izolata SS-38.4 je uočeno nakon 16 i 18 h rasta u BHI i LB medijumima, nešto ranije u slučaju ŠFS medijuma (12 h) i znatno kasnije u slučaju MM medijuma gde je početak zabeležen tek u 24. satu merenja. Pojava prvih spora je detektovana u ovom slučaju kasnije u poređenju sa prethodnim izolatima, od 16. do 22. sata, sa tendencijom stalnog rasta do kraja praćenja, izuzev u slučaju ŠFS medijuma gde je uočen pad u poslednjim satima uzorkovanja. Jaka antagonistička aktivnost zabeležena je protiv sva tri indikatorska soja, u svim testiranim medijumima (Slika 15). Proizvodnja antimikrobnih supstanci ovog izolata gajenog u LB medijumu pokazala je vrlo usklađenu antagonističku aktivnost. U slučaju *L. monocytogenes* aktivnost se javila nakon 16 h rasta sa maksimumom u 34. satu, dok se aktivnost ka *X. arboricola* 406 se javila tek nakon 18 h rasta, za razliku od zakasnele aktivnosti ka *X. arboricola* 301 u 24. satu, ali u oba slučaja su zabeleženi maksimumi aktivnosti u 36. satu praćenja, nakon čega je zabeležen konstantan pad do kraja praćenja rasta na sve tri

testirane bakterije. U ovom medijumu sporulacija je zabeležena tek u 22. satu sa stalnim rastom.



**Slika 15.** Proizvodnja antimikrobnih supstanci tokom rasta u LB, BHI, ŠFS i MM medijumima izolata SS-38.4.

SS-38.4 iz ŠFS medijuma pokazuje intenzivniju sporulaciju koja se takođe javila kasnije u odnosu na druge izolate iz ŠFS medijuma, u 18. satu inkubacije, a nakon 48 h počinje da opada. Antimikrobna aktivnost se najpre javila protiv *L. monocytogenes* sa najjačim intezitetom u 36. satu rasta, a potom i na *X. arboricola* 406 sa malo kasnijim početkom i maksimumom aktivnosti u 38. satu. Izolat SS-38.4 dao je najmanje zone inhibicije rasta *X. arboricola* 301, kada je gajen u ovom medijumu, sa najkasnije zabeleženim početkom aktivnosti, u 14. i maksimumom u 44. satu rasta. U slučaju rasta u BHI medijumu dobijen je najveći nivo antimikrobne aktivnosti protiv *L. monocytogenes* sa početkom u 12. satu kroz vidljivo povećanje aktivnosti do prvog maksimuma u 22. i drugog zabeleženog u 44. satu rasta. Antagonistička aktivnost



usmerena ka *X. arboricola* 406 počinje u 20. i raste do svog maksimuma u 38. satu praćenja, dok je u slučaju *X. arboricola* 301 primećena kasnija aktivnost sa početkom u 28. satu sa najmanjim zonama inhibicije i maksimumom u 48. satu. Sporulacija se održavala na niskom nivou slično kao i u slučaju LB medijuma. Kod MM medijuma pokazana je manja aktivnost izolata SS-38.4 naspram ostalih testiranih medijuma. Aktivnost protiv *L. monocytogenes* je zabeležena tek nakon 18 h rasta, sa maksimumom u 48. satu praćenja rasta i manjim zonama inhibicije u poređenju sa delovanjem na *X. arboricola* 301 i 406 kod kojih je aktivnost najintenzivnija u 36. satu, nakon kog neznatno opada i održava se na tom nivou do kraja praćenja. Ovaj izolat pokazao je drugačiju dinamiku proizvodnje u odnosu na ostale testirane izolate. Sam početak antagonističke aktivnosti se javlja kasnije, verovatno u skladu sa zakasnelom stacionarnom fazom i nezavisno od početka kasnije sporulacije, a zabeleženi maksimumi aktivnosti protiv svih patogena se dostižu ranije nego kod ostalih praćenih izolata.

U smislu svega izrečenog nameće se zaključak da *in vitro* testiranje aktivnosti ćelijskih supernatanta izolata SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 i SS-38.4 protiv indikatorskih sojeva pokazuje veoma jaku inhibiciju rasta indikatorskih sojeva, za razliku od SS-10.7. Sojevi gajeni u LB medijumu daju najveće zone inhibicije u stacionarnoj fazi, u poređenju sa ostalim medijumima za gajenje, što takođe pokazuje da kvalitet medijuma može da značajno utiče na aktivnost (Gordillo et al., 2009). Izolati gajeni u MM medijumu su pokazali značajno nižu aktivnosti na testirane patogene, verovatno iz razloga što je nedostatak određenih nutrijenata esencijalan za početak sinteze odgovarajućih antimikrobnih supstanci, ili su proizvedene u znatno nižim koncentracijama od potrebnih koje dovode do inhibicije rasta. Pojava antimikrobne aktivnosti je u većini slučajeva zabeležena u eksponencijalnoj ili na prelazu u stacionarnu fazu rasta, što generalno podržava teoriju produkcije antibiotika u kasnoj logaritamskoj ili ranoj stacionarnoj fazi (Slepecky i Hemphill, 2006). Međutim, u određenim slučajevima primećena pojava dva maksimuma aktivnosti se može objasniti produkcijom različitih vrsta antimikrobnih supstanci. Naime, u istraživanju Cosby et al. (1998) utvrđeno je da se surfaktini prvi sintetišu, a metaboliti poput iturina A na prelazu dve faze rasta, logaritamske i stacionarne, usled iscrpljivanja jednog ili više hranljivih sastojaka podloge (Mizumoto et al., 2006) ili čak u nekim slučajevima kako je pokazano

u istraživanju Yoshida et al. (2001), da *B. amyloliquefaciens* RC-2 proizvodi iturin A u ranoj logaritamskoj fazi i da što soj brže dostigne stacionarnu fazu, brže se maksimizuje njegova antifungalna aktivnost. Istovremena ekskrecija surfaktina i ostalih lipopeptida je takođe zabeležena i česta pojava *Bacillus* sp. izolata (Souto et al., 2004). Takođe, primećen je i momenat između dve pomenute faze kad se dešava maksimalna produkcija mikosubtilina (Toure et al., 2004). Zabeležena sporulacija se kod većine izolata javila veoma rano bez obzira na testirani medijum, a medijum koji je najviše pogodovao sporulaciji je ŠFS, u kome je kod većine izolata sa povećanjem broja spora rasla i aktivnost. Proizvodnja antimikrobnih supstanci u toku sporulacije može se smatrati nekom vrstom prednosti za preživljavanje u nepovoljnim uslovima, tj. može imati ulogu u kompeticiji sa drugim mikroorganizmima u toku sazrevanja spora (Nissen-Meyer and Nes, 1997), a na to ukazuju i tesno povezani sekundarni maksimumi aktivnosti i sporulacije većine izolata gajenih u različitim medijumima. Uzimajući u obzir činjenicu da *Bacillus* izolati poseduju mogućnost istovremene produkcije pojedinih antimikrobnih supstanci (Nagorska et al., 2007) i analizirajući dobijene rezultate skrininga biosintetskih operona ove studije, postaje jasno na koji način i u kojoj meri testirani izolati ostvaruju potencijal kao potentni biokontrolni agensi.

#### **4.3.4 IN VITRO ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG EFEKTA LIPOPEPTIDNIH EKSTRAKATA ODABRANIH IZOLATA**

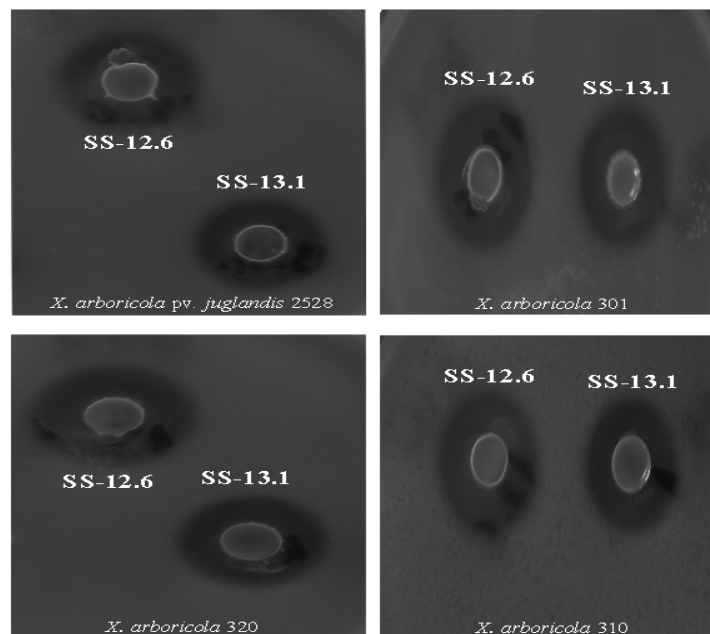
U cilju potvrde hipoteze da su lipopeptidna jedinjenja zaista odgovorna za dobru antimikrobnu aktivnost izolata *Bacillus* sp., kao i eliminisanja ostalih potencijalnih mehanizma antagonizma, dalja istraživanja ovog rada su se odnosila upravo na ispitivanje lipopeptidnih ekstrakata dobijenih iz pet odabranih izolata kolekcije, sa naglaskom na aktivnosti izolata SS-12.6 i SS-13.1. Potencijalna antimikrobna aktivnost, etil-acetatnih ekstrakata, testirana je protiv 12 bakterijskih izolata, 10 fungalnih patogena izolovanih sa plodova voća i povrća, kao i 20 neidentifikovanih gljiva, potencijalnih patogena, sa plodova kupine. Takođe, vršeno je i mikroskopsko ispitivanje efekta lipopeptidnih ekstrakata na morfologiju hifa odabranih gljiva.

Rezultati ispitivanja antibakterijskog efekta lipopeptidnih ekstrakata izolata SS-12.6 i SS-13.1 na testiranim bakterijskim patogenima prikazani su u Tabeli 8.

**Tabela 8.** Antibakterijska aktivnost etil-acetatnih ekstrakata izolata SS-12.6 i SS-13.1.

Vrsta indikatorskog soja / broj izolata	Aktivnost (mm)	
	SS-12.6	SS-13.1
<i>Xanthomonas arboricola</i> CFBP 2528	15	13
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 301	15	13
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 303	15	13
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 310	17	15
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 313	17	15
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 314	15	13
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 316	17	15
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 320	15	13
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 321	17	15
<i>Pectobacterium carotovorum</i> K5	9	0
<i>P. carotovorum</i> K6	9	7
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	14	5

Protiv svih 9 izolata *X. arboricola* i *L. monocytogenes* su dobijene zone inhibicije rasta veće nego kada je testiran supernatant SS-12.6 i SS-13.1 na istim izolatima, na početku ovog rada (Slika 16). Takođe, primećena je i razlika u delovanju oba izolata što se poklapa sa već zabeleženom jačom aktivnošću izolata SS-12.6 protiv nekih patogenata, kao i tokom praćenja dinamike sinteze antimikrobnih supstanci.

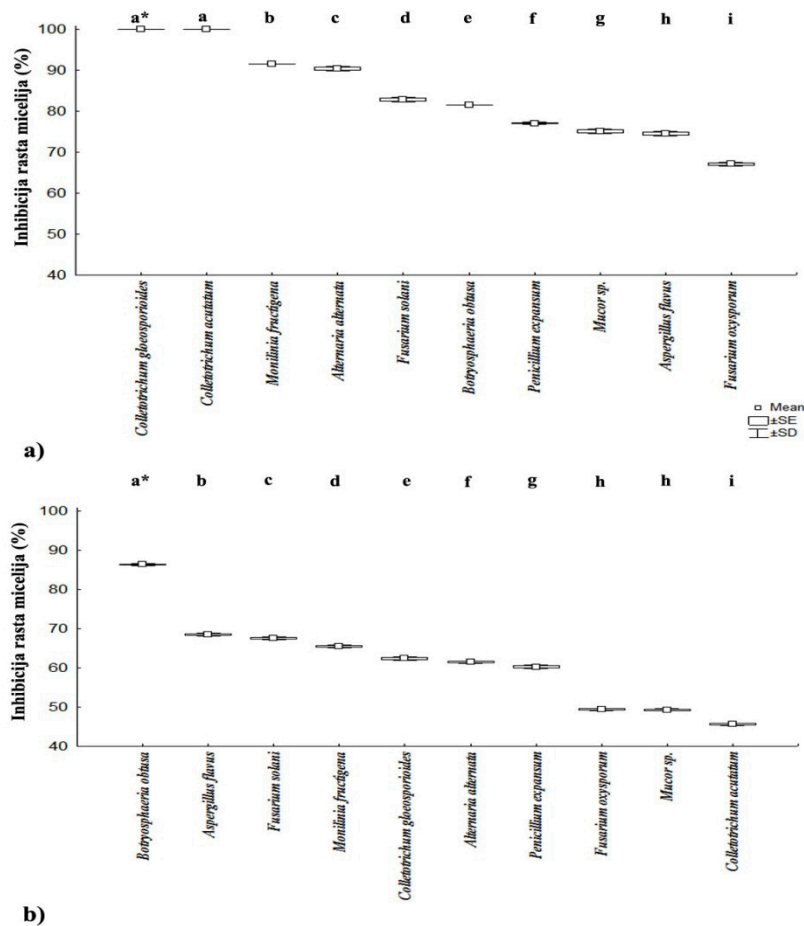
**Slika 16.** Antibakterijska aktivnost etil-acetatnih ekstrakata izolata SS-12.6 i SS-13.1 protiv izabranih *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*.

Što se tiče *P. carotovorum* sojeva, koji nisu pokazali osetljivost na supernatante izolata SS-12.6 i SS-13.1, u ovom delu istraživanja zabeležena je mala zona inhibicije rasta soja K6 lipopeptidnim ekstraktima oba izolata i soja K5 samo ekstraktom iz SS-12.6.

U kontekstu biokontrole biljnih bolesti lipopeptidima roda *Bacillus*, objavljenih rezultata o efektu ovih jedinjenja na fitopatogene bakterije ima relativno malo. U prethodnoj studiji određenih izolata kolekcije, došlo se do potvrde veoma jakog antibakterijskog efekta lipopeptidnih ekstrakata protiv *X. oryzae* (Berić et al., 2012). Antibakterijska aktivnost surfaktina je bila pokazana pri visokim koncentracijama (Vollenbroich et al. 1997; Huang et al. 2008), kao i sposobnost vezivanja za lipopolisaharide zida gram-negativnih bakterija i formiranje pora u membrani što dovodi do njene nagle propustljivosti (Hwang et al., 2007). Takođe, u radu Etchegaray et al. (2008), pokazano je da mešavina iturina i surfaktina pri visokoj koncentraciji može modifikovati površinu ćelijskog zida *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* usled formiranja mešovityh agregata iturina sa drugim lipopeptidima prisutnim u ekstraktu, uključujući surfaktin. U pomenutom radu se navodi još da ove organizovane strukture mogu ukloniti katjone poput kalcijuma i/ili magnezijuma, koji se mogu naći na negativno naelektrisanom ćelijskom zidu, što dovodi do njegovog kolapsa, doprinoseći integraciji lipopeptida u membranu i time do formiranje pora u njoj. Kako radova o ovim efektima nema u slučaju *X. arboricola*, može se zaključiti da su ovakvi mehanizmi delovanja verovatno prisutni i u slučaju delovanja ekstrakata testiranih u ovom radu.

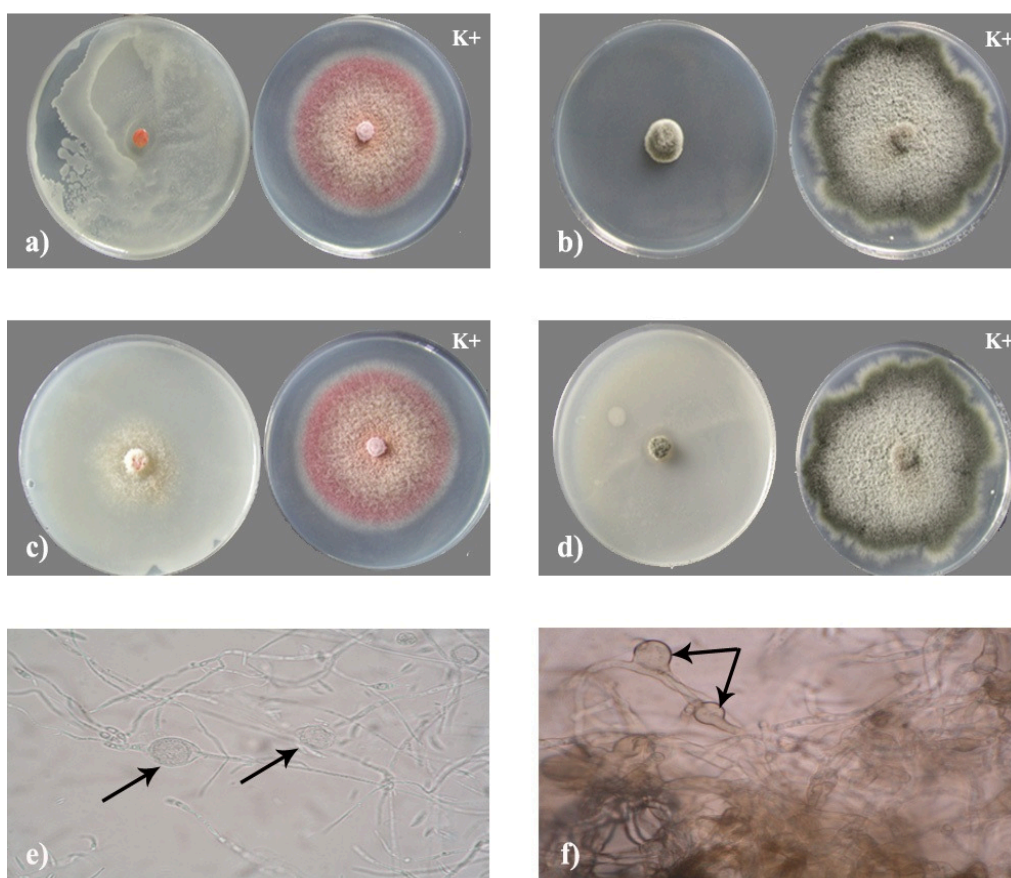
U cilju dalje potvrde da su lipopeptidni antibiotici odgovorni za snažnu antifungalnu aktivnost izolata *Bacillus* sp., testiranja su sprovedena i na patogenim i saprofitnim sojevima gljiva izolovanih sa plodova voća i povrća. Kapaciteti *Bacillus* sp. izolata da aktivno rastu na podlozi koja sadrži hitin ili fungalnu biomasu ukazuje na mikolitički potencijal ovih sojeva, koji može biti izvor antagonističke aktivnosti protiv fitopatogenih gljiva (Bressan and Figueiredo, 2010). Da bismo isključili potencijalnu umešanost hitinaze i kompeticiju za hranljive sastojke u smislu mehanizama antifungalnog delovanja, fokusirali smo se na delovanje lipopeptidnih jedinjenja iz izolata SS-12.6 i SS-13.1. Rezultati inhibicije rasta micelija odabranim lipopeptidnim ekstraktima prikazani su na Slici 17.

Etil-acetatni ekstrakt SS-12.6 je veoma snažno inhibirao rast izolata *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* sa plodova krušaka i višanja, sa čak 100%, a izolate *A. alternata* sa plodova jabuke i *M. fructigena* sa kajsija sa 90%. Zatim, *F. solani* (poreklom sa krompira) i *B. obtusa* (poreklom sa jabuka) sa preko 80%, dok je najmanju zabeleženu aktivnost (67%) pokazao protiv *F. oxysporum* izolovanog sa ploda paprike (Slika 17a). Zabeležena dobra antifungalna aktivnost protiv *A. flavus* (75% inhibicije rasta) je veoma značajan rezultat zato što je ova gljiva glavni proizvođač aflatoksina (B1, B2, G1 i G2), koje je Međunarodna agencija za istraživanje kancera (IARC, 1993), klasifikovala u Grupu 1 humanih karcinogena i proglasila ih najjačim poznatim karcinogenima prirodnog porekla.



**Slika 17.** Inhibicija rasta micelija etil-acetatnim lipopeptidnim ekstraktima izolata SS-12.6 (a) i SS-13.1 (b). Srednja vrednost (eng. Mean) procenata inhibicije rasta micelije, standardna greška (SE) i devijacija (SD) su prikazane. \*Vrednosti praćene istim slovom nisu statistički značajne ( $P < 0.05$ ), prema Dankanovom testu višestrukog opsega.

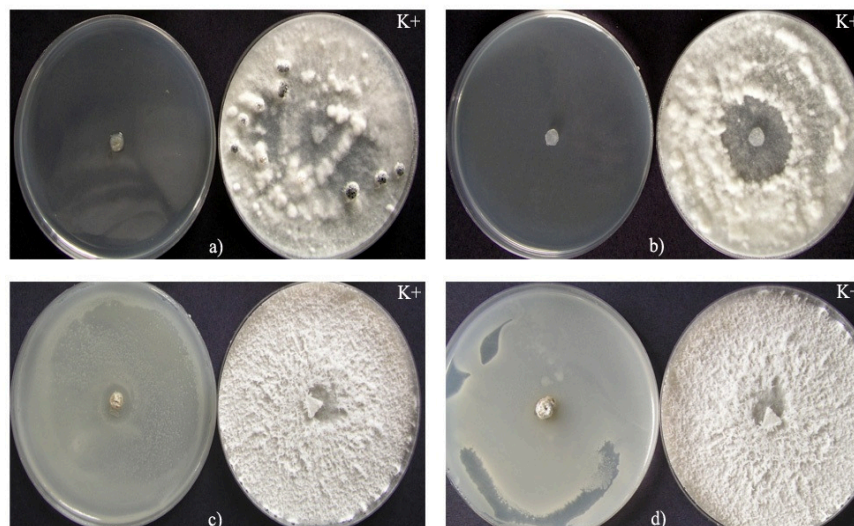
Etil-acetatni ekstrakt izolata SS-13.1 pokazao je značajniju inhibiciju rasta *B. obtusa* od 90% u poređenju sa ekstraktom SS-12.6, dok je u slučaju ostalih gljiva zabeležena inhibicija rasta ispod 70% (Slika 17b). Rezultati analize varijanse delovanja dva ispitivana ekstrakta su potvrdili statističku značajnost inhibicije rasta micelija za sve post-žetvene gljive, u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Dankanov test višestrukog opsega pokazao je za oba testirana *Bacillus* izolata da su međusobno drugačiji u smislu inhibicije rasta micelija svih 10 gljiva. Efekti delovanja etil-acetatnih ekstrakata izolata SS-12.6 i SS-13.1 na inhibiciju rasta micelija i morfologiju hifa su prikazani na Slici 18.



**Slika 18.** *In vitro* efekat etil-acetatnih ekstrakata: (a i b) SS-12.6 i (c i d) SS-13.1 na rast micelija *C. acutatum* (a i c) i *B. obtusa* (b i d), respektivno. Indukovana vakuolarna pojava micelija *C. acutatum* izolatom SS-12.6 (e) i *B. obtusa* izolatom SS-13.1 (f) je zabeležena korišćenjem svetlosnog mikroskopa (1000 ×), (K+) kontrola bez etil-acetatnih ekstrakata.

Mikroskopsko ispitivanje morfologije hifa pod uticajem etil-acetatnih ekstrakata oba izolata pokazalo je izvesnu alternaciju na micelijumima određenih gljiva. Naime, mogle su se zapaziti promene u morfologiji hifa poput deformiteta, vrlo razgranatih krajeva hifa, otečenih hifa, distorzije i agregacije citoplazme, kao i pojava vakuolarnih proširenja micelijuma (Slika 18e i f). Zapravo, ovakvi efekti se mogu pripisati delovanju lipopeptida na integritet i propustljivost ćelijske membrane (Ongena i Jacques, 2008). Studije o efektima lipopeptida na *R. solani* pokazale su slične promene u rastu i morfologiji gljive (Nielsen et al., 2000), sa primećenim efektima snižavanja esteraznih i mitohondrijalnih aktivnosti, dovodeći do smanjene hidrofobnosti hifa i intracelularnog pH (Thrane et al, 1999; Hansen et al, 2000).

Pored iznetih rezultata, testirana je antifungalna aktivnost lipopeptidnih ekstrakata na izolatima roda *Phomopsis*, poreklom sa plodova kupina iz različitih regiona Srbije. Takođe, testirana je i aktivnost protiv *Phomopsis juglandina* (izazivača raka kore oraha) i *Sclerotinia sclerotiorum* (izazivavača bele plesni biljaka). Efekti delovanja etil-acetatnih ekstrakata izolata SS-12.6 i SS-13.1 na inhibiciju rasta micelija *S. sclerotiorum* i *P. juglandina* prikazani su na Slici 19, a procenti inhibicije izolata roda *Phomopsis* sa kupina u Tabeli 9.



**Slika 19.** *In vitro* efekat etil-acetatnih ekstrakata (a i c) SS-12.6 i (b i d) SS-13.1 na rast micelija *S. sclerotiorum* (a i b) i *P. juglandina* (c i d), respektivno. K<sup>+</sup> - kontrola bez etil-acetatnih ekstrakata.

**Tabela 9.** Inhibicija rasta micelija potencijalno patogenih sojeva izolovanih sa plodova kupina, etil-acetatnim ekstraktima *Bacillus* izolata SS-12.6 i SS-13.1.

Izolati	Srednja vrednost procenata inhibicije $\pm$ SE		Dužina nekrotičnih lezija (mm) †
	SS-12.6	SS-13.1	
Kontrola	0,00	0,00	0,00
KP-1	70,4 <sup>d</sup> $\pm$ 0,58	33,4 <sup>g</sup> $\pm$ 0,67	63,0 <sup>b</sup> $\pm$ 1,00
KP-2	70,0 <sup>d</sup> $\pm$ 0,15	32,9 <sup>g</sup> $\pm$ 0,31	80,3 <sup>a*</sup> $\pm$ 0,88
KP-3	74,0 <sup>b</sup> $\pm$ 0,37	40,1 <sup>f</sup> $\pm$ 0,41	50,0 <sup>de</sup> $\pm$ 1,15
KP-4	63,8 <sup>j</sup> $\pm$ 0,52	46,7 <sup>b</sup> $\pm$ 0,49	49,0 <sup>ef</sup> $\pm$ 1,00
KP-5	64,6 <sup>j</sup> $\pm$ 0,47	45,2 <sup>c</sup> $\pm$ 0,33	52,3 <sup>cd</sup> $\pm$ 1,45
KP-6	66,7 <sup>hi</sup> $\pm$ 0,49	50,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,25	60,3 <sup>b</sup> $\pm$ 0,88
KP-7	69,5 <sup>def</sup> $\pm$ 0,55	50,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,60	37,7 <sup>i</sup> $\pm$ 1,45
KP-8	66,4 <sup>i</sup> $\pm$ 0,47	43,3 <sup>d</sup> $\pm$ 0,49	30,7 <sup>k</sup> $\pm$ 1,20
KP-9	68,3 <sup>efg</sup> $\pm$ 0,44	43,3 <sup>d</sup> $\pm$ 0,52	30,7 <sup>k</sup> $\pm$ 0,67
KP-10	68,1 <sup>fg</sup> $\pm$ 0,80	42,6 <sup>de</sup> $\pm$ 0,23	31,7 <sup>jk</sup> $\pm$ 0,88
KP-11	67,8 <sup>ghi</sup> $\pm$ 0,54	42,2 <sup>de</sup> $\pm$ 0,61	34,3 <sup>j</sup> $\pm$ 1,20
KP-12	69,0 <sup>defg</sup> $\pm$ 0,26	46,2 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,55	34,3 <sup>j</sup> $\pm$ 0,67
KP-13	56,7 <sup>k</sup> $\pm$ 0,61	0,00 <sup>i</sup> $\pm$ 0,00	29,7 <sup>k</sup> $\pm$ 0,33
KP-14	72,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,39	41,4 <sup>ef</sup> $\pm$ 0,33	54,3 <sup>c</sup> $\pm$ 0,67
KP-15	78,5 <sup>a*</sup> $\pm$ 0,50	13,7 <sup>h</sup> $\pm$ 0,24	45,7 <sup>g</sup> $\pm$ 1,20
KP-16	69,1 <sup>defg</sup> $\pm$ 0,30	46,2 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,30	46,7 <sup>fg</sup> $\pm$ 0,88
KP-17	72,9 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,37	41,8 <sup>e</sup> $\pm$ 0,73	44,0 <sup>gh</sup> $\pm$ 0,58
KP-18	69,7 <sup>de</sup> $\pm$ 0,23	45,4 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,52	42,0 <sup>h</sup> $\pm$ 1,53
KP-19	68,0 <sup>fgh</sup> $\pm$ 0,19	43,3 <sup>d</sup> $\pm$ 0,52	52,3 <sup>cd</sup> $\pm$ 1,45
KP-20	77,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,64	12,6 <sup>h</sup> $\pm$ 0,35	51,0 <sup>de</sup> $\pm$ 1,00

Srednja vrednost procenata inhibicije rasta micelije i standardna greška (SE) su prikazane. \* Vrednosti praćene istim slovom nisu statistički značajne ( $P < 0.05$ ), prema Dankanovom testu višestrukog opsega. † Neobjavljeni rezultati uporedne analize provere patogenosti testiranih fungálnih izolata na lastarima mladih kupina.

Etil-acetatni ekstrakti oba izolata su veoma snažno inhibirali rast *S. sclerotiorum* i *P. juglandina* sa čak 100%. Ovakvi rezultati su u korelaciji sa istraživanjem Alvarez et al. (2011) u kome su primećene promene u morfologiji micelija i klijanju sklerocija u prisustvu lipopeptida iz *Bacillus* kultura. Naime, folijarna primena *B. amiloliquefaciens* sojeva na biljkama soje, se pokazala uspešnom protiv infekcije izazvane *S. sclerotiorum* u poređenju sa neinokulisanim biljkama ili biljkama inokulisanim sojem *B. subtilis* za



koji je pokazano da ne proizvodi lipopeptide. Sagledani rezultati (Tabela 9) inhibicije rasta i uporednih testova provere patogenosti ukazuju na značajan efekat ekstrakta SS-12.6, naročito protiv fungalnog izolata KP-2 koji je pokazao visoku patogenost izazivajući nekrozu mladih lastara u dužini od 80 mm. Kada je primenjen ekstrakt iz SS-13.1 procenat inhibicije na svim testiranim fungalnim izolatima nije bio viši od 50%, a potpuno odsustvo dejstva zabeleženo je za izolat KP-13. Dobijeni rezultati su značajni zbog moguće inhibicije, kako rasta ove kosmopolitski rasprostranjene gljive, tako i bolesti koje izaziva, naročito na zrelom voću. Podaci ukazuju na to da vrste ovog roda mogu uzrokovati truljenje voća nakon berbe, posebno na oštećenom voću (Luongo et al., 2011).

#### **4.3.5 IN VITRO ODREĐIVANJE TIPA INTERAKCIJA I MINIMALNIH INHIBITORNIH, BAKTERICIDNIH I FUNGICIDNIH KONCENTRACIJA LIPOPEPTIDA**

U nekim slučajevima lipopeptidi izolovani iz *Bacillus* vrsta pokazuju direktan efekat na biljne patogene kao rezultat aktivnosti jedne dominantne familije lipopeptida, omogućavajući na taj način inhibiciju rasta, uprkos postojanju i drugih familija u manjoj meri (Falardeau et al., 2013). Dalja istraživanja ovog rada su se odnosila na ispitivanje aktivnosti pojedinih ekstrakata, sa ciljem utvrđivanja postojanja različitih tipova interakcija lipopeptidnih ekstrakata, pojedinačno i u određenim kombinacijama. Istovremeno, praćena je kinetika rasta određenih patogena u prisustvu lipopeptida i određivana je minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakata. Ekperimenti na bakterijskim indikatorskim sojevima su izvedeni etil-acetatnim ekstraktima, bilo iz pojedinačnih kultura ili iz kokultura tri različita *Bacillus* izolata. U eksperimentima sa gljivama korišćeni su metanolni lipopeptidni ekstrakti svih pet izolata pojedinačno ili u različitim kombinacijama. U Tabeli 10 predstavljeni su rezultati testiranja aktivnosti određenih kombinacija ekstrakata izolata SS-10.7, SS-12.6 i SS-38.4.

Već na prvi pogled postaje jasno da je za antibakterijsku aktivnost u ovom slučaju odgovoran pojedinačan ekstrakt, a da određena kombinacija potvrđuje efikasnost jednog od ekstrakata ili blag aditivni efekat. Takođe, ekstrakt izolata SS-10.7 ne pokazuje nikakvo antibakterijsko delovanje pri testiranoj koncentraciji, dok u

smešama daje iste rezultate kao i pojedinačni partnerski ekstrakti ili možda ostvaruje i antagonistički efekat prema testiranim bakterijama.

**Tabela 10.** Antimikrobna aktivnost različitih kombinacija etil-acetatnih ekstrakata *Bacillus* izolata detektovana disk difuzionim metodom.

Kombinacije ekstrakata (750 µg/disk)	<i>L.monocytogenes</i>	<i>X. arboricola</i> 350	<i>X. oryzae</i>	<i>P. poae</i> P64	<i>P. aptata</i> P16
SS-10.7	-	-	-	-	-
SS-12.6	16,0	11,0	9,0	8,0	8,0
SS-38.4	22,0	9,0	7,0	8,0	7,0
SS-10.7 + SS-12.6 *	16,0	9,0	7,0	6,0	7,0
SS-10.7 + SS-38.4	15,0	7,0	7,0	6,0	7,0
SS-12.6 + SS-38.4	21,0	10,5	10,0	8,0	9,0
Mix 1	24,0	13,0	10,0	9,0	10,0
Mix 2†	20,0	8,0	7,0	7,0	7,0

Mix 1 - Kokultura SS-10.7 + SS-12.6 + SS-38.4

Mix 2 - Smeša SS-10.7 + SS-12.6 + SS-38.4

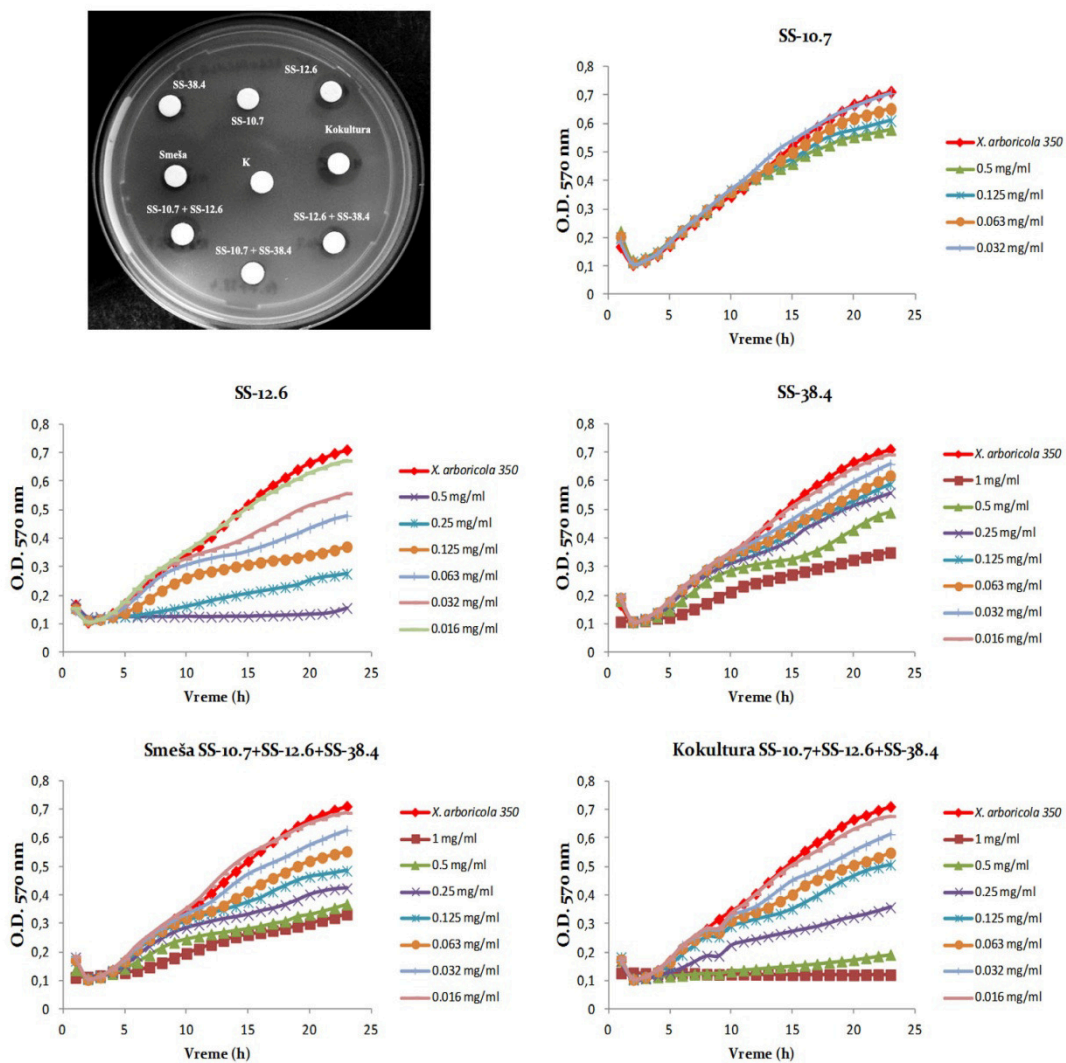
\* Kod testiranja dva ekstrakta istovremeno korišćena je 1/2 koncentracije svakog, a u slučaju pravljenja smeše od tri korišćena je 1/3 koncentracije svakog (†).

U cilju dalje diferencijacije biokontrolnog potencijala odabranih ekstrakata rađeni su tzv. “time-kill” eksperimenti, kako bi se utvrdila kinetika rasta patogenih bakterija u prisustvu etil-acetatnih ekstrakta, mikrodilucionom metodom, u funkciji vremena. Pored pojedinačnih testiranja, sprovedeno je i testiranje ekstrakata dobijenih kokultivisanjem tri soja odjednom, kao i smeše dobijene mešanjem pojedinačnih ekstrakata uniformnih finalnih koncentracija od 1 mg/ml. Na Slici 20 predstavljen je direktni antagonizam pojedinačnih i pomešanih ekstrakata protiv *X. arboricola* 350 u zavisnosti od vremena testiranja.

Za izolat SS-10.7 je potvrđeno odsustvo antagonističkog efekta protiv testiranog patogena, što je u korelaciji sa prethodnim rezultatima. Za izolat SS-12.6 MIC je iznosio 0,5 mg/ml sa izračunatom IC<sub>50</sub> vrednošću od 0,125 mg/ml. Takođe, testirana koncentracija ekstrakta iz SS-38.4 nije bila dovoljna za utvrđivanje minimalnog inhibitornog efekta, s’ tim da se interpolacijom ipak došlo do IC<sub>50</sub> vrednosti od 1mg/ml. Prilikom određivanja aktivnosti smeše tri ekstrakta u poređenju sa smešom dobijenom kokultivacijom sva tri soja odjednom, primećena je razlika u MIC vrednostima, koja je u skladu sa dobijenim rezultatima disk difuzionog testa. Naime, smeša dobijena kokultivacijom je pokazala dva puta niže IC<sub>50</sub> vrednosti (0,25 mg/ml) nego smeša

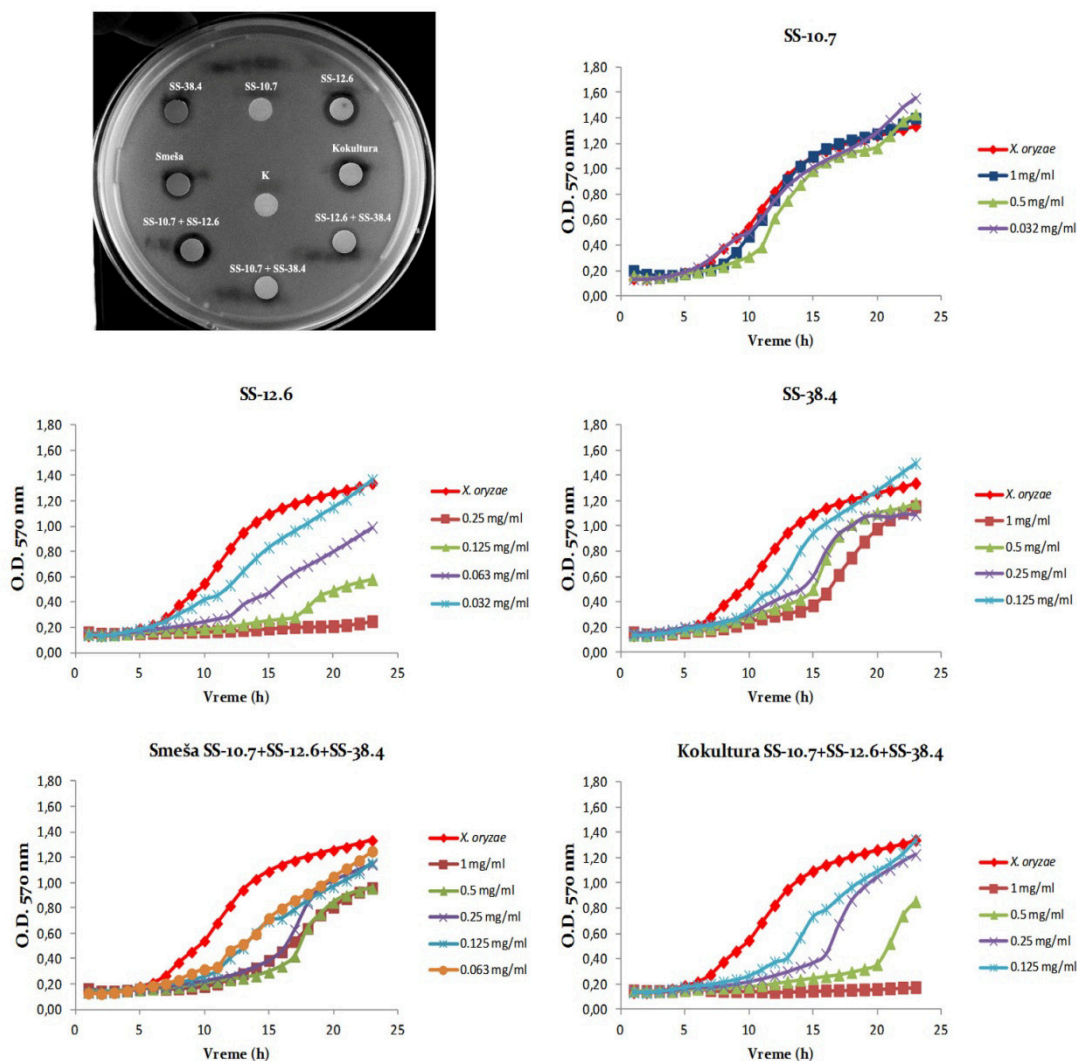
pojedinačnih ekstrakata čija je MIC vrednost premašivala testiranu koncentraciju, verovatno zbog ukupne koncentracije prisutnih lipopeptida.

Sa Slike 20. donekle se uočava i korelacija između pojedinačnih i mešovitih ekstrakata u vidu aditivnog ili antagonističkog efekta sa pretpostavljenim dominantnim uticajem izolata SS-12.6 u ispitivanim smešama na osnovu njegovog pojedinačnog delovanja. Ovi rezultati takođe ukazuju i na istrajni efekat testiranih ekstrakata budući da se stepen inhibicije održavao i do kraja praćenog vremena u okviru inhibitornih koncentracija.



**Slika 20.** Utvrđivanje kinetike rasta *X. arboricola* 350 u prisustvu etil-acetatnih ekstrakta praćenjem O.D. u funkciji vremena.

Slični rezultati su dobijeni prilikom testiranja pojedinačnih ekstrakata i smeša ekstrakata na indikatorskom soju *X. oryzae* pv. *oryzae* (Slika 21). Za ekstrakte SS-10.7 i SS-38.4 nisu određene MIC i IC<sub>50</sub> vrednosti, dok je osetljivost prema ekstraktu izolata SS-12.6 bila niža nego u prethodnom slučaju sa dva puta nižom MIC (0,25 mg/ml) i istom IC<sub>50</sub> vrednošću (0,125 mg/ml).

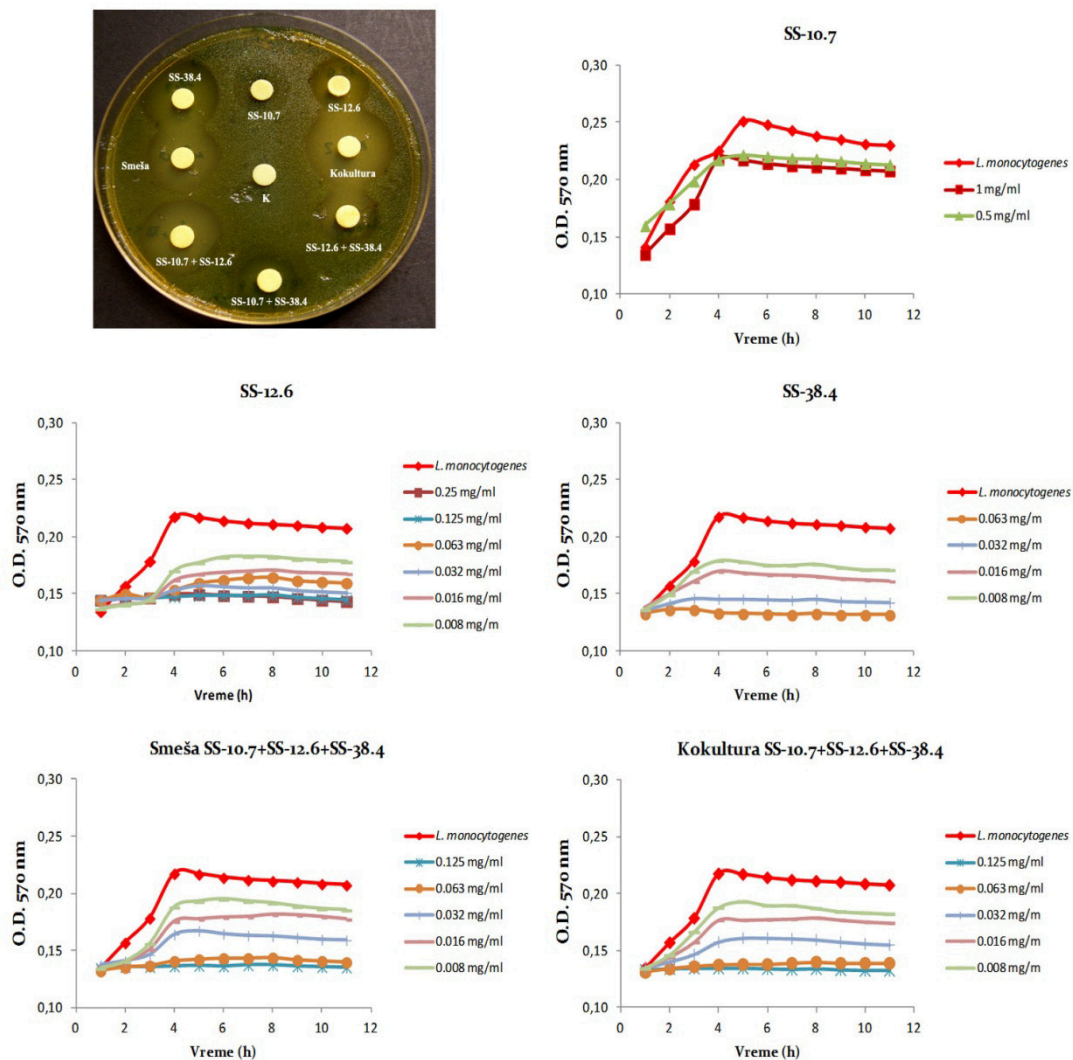


**Slika 21.** Utvrđivanje kinetike rasta *X. oryzae* pv. *oryzae* u prisustvu etil-acetatnih ekstrakata praćenjem O.D. u funkciji vremena.

Ekstrakt dobijen kokultivacijom tri soja istovremeno je pokazao identičnu MIC vrednost od 1 mg/ml kao i kod *X. arboricola* a IC<sub>50</sub> je iznosila 0,75 mg/ml, za razliku od smeše pojedinačnih komponenata kod koje nisu detektovane vrednosti inhibicije u testiranom opsegu koncentracija. Iz poslednjih rezultata se može zaključiti da je za

antimikrobnu aktivnost pomenutih smeša najzaslužniju aktivnost ponovo prikazao ekstrakt izolata SS-12.6, sa pretpostavljenim antagonističkim efektom ostalih izolata u kokulturi budući da je potrebna inhibitorna koncentracija bila četiri puta viša nego u pojedinačnom slučaju. Takođe, i u ovom slučaju primećena je održiva inhibicija rasta indikatorskih sojeva do kraja praćenog vremena.

Najosetljiviji soj ovog testiranja je bila *L. monocytogenes* sa zabeleženim  $IC_{50}$  vrednostima od čak 0,008 mg/ml u slučaju pojedinačnih ekstrakata izolata SS-12.6 i SS-38.4 i dva puta većom vrednošću (0,016 mg/ml) kada su testirani u vidu smeše (Slika 22).



**Slika 22.** Utvrđivanje kinetike rasta *L. monocytogenes* u prisustvu etil-acetatnih ekstrakata praćenjem O.D. u funkciji vremena.

Najniža zabeležena MIC vrednost je iznosila 0,063 mg/ml za ekstrakt SS-38.4 što je u korelaciji sa najvećim zonama inhibicije u disk difuzionom testu inhibicije. Ista MIC koncentracija od 0,125 mg/ml detektovana je za obe smeše i pojedinačni ekstrakt izolata SS-12.6, a potpuno odsustvo inhibicije rasta je ponovo zabeleženo za ekstrakt izolata SS-10.7. Naime, u radu Sabaté and Audisio (2013), pokazano je da je čak sedam različitih izolata *L. monocytogenes* bilo osetljivo na surfaktinsko jedinjenje sa MIC vrednošću od 0,125 mg/ml, što verovatno ukazuje na moguću dominaciju ovog jedinjenja u inhibiciji rasta ovog patogena i u našem slučaju. I pored snažnog efekta ekstrakta SS-38.4 na rast ovog indikatorskog soja, zabeležene inhibitorne koncentracije smeša nisu pokazale znake potencijalnog sinergizma među njima, već očigledni aditivni ili verovatniji antagonistički efekat.

Vođeni ovim rezultatima, u cilju proširivanja spektra patogena i detektovanja potencijalnog sinergističkog efekta na testiranim bakterijskim sojevima, dalja istraživanja su bila usmerena na determinaciju MIC i MBC vrednosti pojedinačnih ekstrakata i njihovih kombinacija, rezazurinskom mikrodilucionom metodom sa dvostrukim serijskim razblaživanjem uzoraka. Najmanja koncentracija pri kojoj nije došlo do promene boje sa istovremenim rastom na čvrstoj hranljivoj podlozi tumačila se kao MIC vrednost, a izostanak rasta kao MBC vrednost. Rezultati MIC i MBC vrednosti pojedinačnih i međusobno kombinovanih lipopeptidnih ekstrakata su prikazani u Tabeli 11, zajedno sa pozitivnim antibiotskim i standardnim kontrolama inhibicije rasta.

Iz priloženih rezultata se može uočiti da je za inhibiciju rasta testiranih patogena u slučaju izolata SS-10.7 bilo potrebno čak 2,5 mg/ml, što objašnjava odsustvo inhibicije u prethodno primenjenim testovima. Ekstrakti izolata SS-12.6 i SS-38.4 su dali ujednačene vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija protiv svih izabranih sojeva roda *Xanthomonas*, dok je u slučaju antagonističkog efekta ka sojevima *P. syringae* ekstrakt SS-12.6 pokazao jače delovanje u odnosu na ostale, sa istovremenim najjačim delovanjem (0,3 mg/ml) usmerenim ka *A. tumefaciens*. Prilikom testiranja odgovarajućih kombinacija primećuje se izvesna korelacija između efekta smeše i efekta najaktivnijeg ekstrakta, u ovom slučaju SS-12.6, koji je u svim navedenim

kombinacijama, čini se imao najviše udela u antibakterijskoj aktivnosti, što potvrđuju i dobijene pojedinačne MIC vrednosti.

**Tabela 11.** Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije testiranih lipopeptidnih ekstrakata (mg/ml).

	<i>X. arboricola</i> 301		<i>X. arboricola</i> 303		<i>X. arboricola</i> 309		<i>X. arboricola</i> 311		<i>X. arboricola</i> 320	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
SS-10.7	2,50	-	2,50	-	2,50	-	2,50	-	2,50	-
SS-12.6	1,25	-	1,25	2,50	1,25	2,50	1,25	2,50	1,25	2,50
SS-38.4	1,25	-	1,25	-	1,25	2,50	1,25	-	1,25	2,50
MIX 1	0,83	-	0,42	0,83	0,42	0,83	0,42	0,83	0,42	0,83
MIX 2	1,25	2,50	0,63	1,25	0,63	1,25	0,63	1,25	0,63	1,25
SS-10.7 + SS-12.6	1,25	-	1,25	-	1,25	-	1,25	-	1,25	-
SS-10.7 + SS-38.4	1,25	-	1,25	-	1,25	-	1,25	-	1,25	-
SS-12.6 + SS-38.4	0,63	1,25	0,31	0,63	0,63	1,25	0,31	0,63	0,63	1,25
Iturin A	0,10	-	>0,50	-	>0,50	-	>0,50	-	>0,50	-
Surfaktin	>0,50	-	>0,50	-	>0,50	-	>0,50	-	>0,50	-
Ampicilin	0,50	1,00	>1,00	-	>1,00	-	>1,00	-	0,50	1,00
Cefepim	0,004	0,125	0,002	0,016	0,002	0,125	0,004	0,250	0,008	0,016
Gentamicin	0,003	0,006	0,002	0,003	0,003	0,006	0,0008	0,0015	0,003	0,006
Streptomycin	0,003	0,006	0,003	0,0125	0,0015	0,003	0,003	0,006	0,003	0,006
Vankomicin	0,25	-	0,25	0,50	0,25	0,50	0,25	-	0,13	0,25
	<i>A. tumefaciens</i>		<i>P. aptata</i> 12		<i>P. aptata</i> 16		<i>P. aptata</i> 53		<i>P. aptata</i> 95	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
SS-10.7	2,50	-	2,50	-	2,50	-	2,50	-	2,50	-
SS-12.6	0,31	0,63	0,63	-	0,63	2,50	0,63	-	1,25	2,50
SS-38.4	1,25	2,50	2,50	-	2,50	-	2,50	-	2,50	-
MIX 1	0,21	0,83	0,83	-	0,83	-	0,83	-	0,83	-
MIX 2	0,63	2,50	2,50	-	1,25	2,50	1,25	-	1,25	2,50
SS-10.7 + SS-12.6	0,31	1,25	1,25	-	0,63	1,25	1,25	-	1,25	-
SS-10.7 + SS-38.4	1,25	-	1,25	-	1,25	>1,25	1,25	-	1,25	-
SS-12.6 + SS-38.4	0,16	0,63	0,63	-	0,63	1,25	0,63	-	0,63	-
Iturin A	0,125	-	>0,50	-	>0,50	-	>0,50	-	>0,50	-
Surfaktin	>0,50	-	>0,50	-	>0,50	-	>0,50	-	>0,50	-
Ampicilin	>1,00	-	>1,00	-	>1,00	-	>1,00	-	>0,50	-
Cefepim	0,50	-	0,25	-	0,13	0,50	0,13	-	0,25	0,50
Gentamicin	0,025	-	0,0008	0,006	0,025	-	0,0006	0,0008	0,0006	0,0008
Streptomycin	0,100	-	0,0015	0,003	0,0125	0,050	0,0015	0,0030	0,0015	0,003
Vankomicin	0,25	0,50	>0,50	-	1,00	-	>0,50	-	>0,50	-

Mix 1 - Kokultura SS-10.7 + SS-12.6 + SS-38.4

Mix 2 - Smeša SS-10.7 + SS-12.6 + SS-38.4

Takođe su zabeležene i nešto niže MIC vrednosti prilikom testiranja ekstrakta kokulture tri izolata *Bacillus* u poređenju sa smešom ekstrakata. Na osnovu svih dobijenih rezultata i ostvarenih interakcija, *in vitro* ekstrakt dobijen kokultivacijom mogao bi se uzeti u dalja razmatranja zbog primenljivih nižih koncentracija prisutnih lipopeptidnih jedinjenja u odnosu na pojedinačne ekstrakte. Testiranjem standardnih jedinjenja iturina A i surfaktina, zabeležena je MIC vrednost oko 0,1 mg/ml jedino za iturin A u slučaju *X. arboricola* 301 i *A. tumefaciens*, dok za surfaktin nije ustanovljena MIC vrednost u testiranim koncentracijama. Pet različitih antibiotika različitog spektra delovanja služili su kao pozitivne kontrole ovog testiranja. Interesantni rezultati su dobijeni u slučaju  $\beta$ -laktamskog cefepimskog antibiotika i dva aminoglikozidna antibiotika, gentamicina i streptomocina. Naime, za većinu testiranih patogena MIC vrednosti su bile na granici mikrogramskih i nanogramskih koncentracija, sa najnižom zabeleženom koncentracijom od 0,0008 mg/ml, sa razlikom kod indikatorskih sojeva roda *Pseudomonas* i *A. tumefaciens* koji su bili otporniji na cefepimski antibiotik. Međutim, prilikom testiranja drugog  $\beta$ -laktamskog antibiotika ampicilina, značajnog inhibitora transpeptidaze nije zabeležena MIC vrednost u okviru testiranih koncentracija, izuzev protiv dva soja *X. arboricola* 301 i 320 sa visokim vrednostima od 0,5 mg/ml. Nešto niže vrednosti inhibitornih koncentracija su zabeležene i u slučaju glikopeptidnog antibiotika vankomicina, ali daleko više nego kod prvopomenute grupe antibiotika. U svakom slučaju, dalja istraživanja mogućeg sinergističkog efekta sa pomenutim antibioticima u nanogramskim koncentracijama, biće od velike koristi u dobijanju efektivnijeg odgovora testiranih smeša za uspešnu primenu u biokontroli određenih bakterijskih patogena, s'obzirom na postojeću činjenicu korišćenja streptomocina u vidu komercijalnog pesticida (Mayerhofer et al., 2009).

U cilju utvrđivanja pojedinačnog doprinosa i odnosa ekstrakata u antimikrobnoj aktivnosti, kao i na osnovu pojedinačnih MIC vrednosti, izračunate su FIC (frakciona inhibitorna koncentracija) i FIC<sub>i</sub> (frakcioni inhibitorni koncentracioni indeks) kako bi se izrazio njihov antimikrobni efekat u različitim kombinacijama (Tabela 12).



**Tabela 12.** FIC i FICi vrednosti ekstrakata u različitim kombinacijama i ostvarena interakcija protiv bakterijskih patogena.

Kombinacije	<i>X. arboricola</i> 301	<i>X. arboricola</i> 303	<i>X. arboricola</i> 309	<i>X. arboricola</i> 311	<i>X. arboricola</i> 320	<i>A. tumefaciens</i>	<i>P. aptata</i> 12	<i>P. aptata</i> 16	<i>P. aptata</i> 53	<i>P. aptata</i> 95
<b>FIC<sub>10.7</sub></b>	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,13	0,50	0,25	0,50	0,50
<b>FIC<sub>12.6</sub></b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00
<b>FICi</b>	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,13	2,50	1,25	2,50	1,50
<b>Interakcija</b>	I	I	I	I	I	I	A	I	A	I
<b>FIC<sub>10.7</sub></b>	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
<b>FIC<sub>38.4</sub></b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,50	0,50	0,50	0,50
<b>FICi</b>	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>Interakcija</b>	I	I	I	I	I	I	Ad	Ad	Ad	Ad
<b>FIC<sub>12.6</sub></b>	0,50	0,25	0,50	0,25	0,50	0,51	1,00	1,00	1,00	0,50
<b>FIC<sub>38.4</sub></b>	0,50	0,25	0,50	0,25	0,50	0,13	0,25	0,25	0,25	0,25
<b>FICi</b>	1,00	0,50	1,00	0,50	1,00	0,64	1,25	1,25	1,25	0,75
<b>Interakcija</b>	Ad	S	Ad	S	Ad	Ad	I	I	I	Ad
<b>FIC<sub>MIX 1</sub></b>										
<b>FIC<sub>10.7</sub></b>	0,33	0,17	0,17	0,17	0,17	0,08	0,33	0,33	0,33	0,33
<b>FIC<sub>12.6</sub></b>	0,66	0,33	0,33	0,33	0,33	0,66	1,33	1,33	1,33	0,66
<b>FIC<sub>38.4</sub></b>	0,66	0,33	0,33	0,33	0,33	0,17	0,33	0,33	0,33	0,33
<b>FICi</b>	1,66	0,83	0,83	0,83	0,83	0,91	1,99	1,99	1,99	1,33
<b>Interakcija</b>	I	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	I	I	I	I
<b>FIC<sub>MIX 2</sub></b>										
<b>FIC<sub>10.7</sub></b>	0,50	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	1,00	0,50	0,50	0,50
<b>FIC<sub>12.6</sub></b>	1,00	0,50	0,50	0,50	0,50	2,00	4,00	2,00	2,00	1,00
<b>FIC<sub>38.4</sub></b>	1,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	1,00	0,50	0,50	0,50
<b>FICi</b>	2,50	1,25	1,25	1,25	1,25	2,75	6,00	3,00	3,00	2,00
<b>Interakcija</b>	A	I	I	I	I	A	A	A	A	I

S-sinergistički efekat  $\leq 0,5$ ; Ad-aditivni efekat 0,5-1; I-indiferentan efekat 1-2; A-antagonistički efekat  $\geq 2$

Mix 1 - Kokultura SS-10.7 + SS-12.6 + SS-38.4; Mix 2 - Smeša SS-10.7 + SS-12.6 + SS-38.4

Prema EUCAST (2000) interakcija dve komponente se definiše kao sinergizam kada je frakcioni indeks inhibitorne koncentracije,  $FICi \leq 0,5$ ; aditivni efekat kada je  $FICi$  0,5-1; indiferentni efekat za  $FICi$  između 1 i 2; a antagonistički kada je  $FICi \geq 2$ . Efekti su tumačeni na sledeći način:

- Sinergistički efekat kombinacije dve ili više komponenti je prisutan ukoliko je efekat te kombinacije veći od aditivnog efekta pojedinačnih komponenti;
- Aditivni efekat definiše slučaj kada je efekat kombinacije dve ili više komponenti jednak zbiru efekata pojedinačnih komponenti;
- Indiferentni efekat definiše onu kombinaciju kada je efekat kombinacije dve ili više komponenti jednak efektu najaktivnije komponente;
- Antagonizam se javlja ako je efekat kombinacije dve ili više komponenti manji u poređenju sa efektom najaktivnije pojedinačne komponente.

Testirane kombinacije su pokazale uglavnom indiferentan ili aditivni efekat. Sinergizam je uočen samo za kombinaciju izolata SS-12.6 i SS-38.4 sa FIC indeksom od 0,50 u slučaju *X. arboricola* 303 i 311. Ista kombinacija na ostalim indikatorskim sojevima uglavnom ostvaruje aditivni efekat pojedinačnih ekstrakata. Antagonistički efekat je jedino primećen kod smeše pojedinačnih ekstrakata, za razliku od ekstrakta iz kokultivisane smeše tri izolata, čiji je ekstrakt uglavnom demonstrirao aditivizam, kao i u slučaju kombinacije SS-10.7 i SS-12.6 protiv određenih izolata roda *Pseudomonas*. Ono što je takođe zanimljivo su i kombinacije između ekstrakta sa najslabijim delovanjem prema indikatorskim bakterijama, SS-10.7 i preostala dva veoma potentna izolata, koje su pokazale uglavnom indiferentan, a samo protiv pseudomonada aditivni efekat u kombinaciji sa ekstraktom iz SS-38.4.

Dalje ispitivanje interakcija lipopeptidnih ekstrakata u određenim kombinacijama, kao i njihovih minimalnih inhibitornih i fungicidnih koncentracija, urađeno je i na gljivama. Ovom prilikom su korišćeni metanolni lipopeptidni ekstrakti finalne koncentracije 14,25 mg/ml. Testirane su gljive izolovane i indetifikovane sa semena nevena korišćenjem suspenzije njihovih spora finalne koncentracije  $1 \times 10^5$  CFU/ml medijuma. Vršeno je dvostruko serijsko razblaživanje ispitivanog ekstrakta, a najmanja koncentracija pri kojoj nije dolazilo do vizuelnog rasta mikromiceta nakon tri dana inkubacije, proglašavana je za MIC vrednost. Kod testiranja dva ekstrakta istovremeno korišćena je 1/2 koncentracije svakog (7,13 mg/ml), a u slučaju pravljenja smeše od tri, korišćena je 1/3 svakog ekstrakta odnosno 4,75 mg/ml. Rezultati MIC i MFC vrednosti pojedinačnih i međusobno kombinovanih lipopeptidnih ekstrakata su prikazani u Tabeli 13, zajedno za mikotikom flukonazolom, kao pozitivnom kontrolom inhibicije rasta micelija. Potvrđena je veoma dobra antifungalna aktivnost testiranih ekstrakata i uočene su značajno niže koncentracije potrebne za inhibiciju rasta, nego što je to bio slučaj u testiranju bakterijskih patogena.

Najniže MIC vrednosti su dobijene za gljive roda *Fusarium* i vrstu *A. ochraceus*, dok su preostale dve vrste roda *Aspergillus* kao i *Penicillium* bile daleko rezistentnije na delovanje pojedinačnih ekstrakata, sa MIC vrednostima većim od 4 mg/ml (Tabela 13).

**Tabela 13.** Minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije testiranih lipopeptidnih ekstrakata pojedinačno i u odgovarajućim kombinacijama (mg/ml).

Ekstrakti [mg/ml]	<i>A. flavus</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. ochraceus</i>		<i>Penicillium sp.</i>	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
SS-10.7	4.90	>4,9	>4,9	-	0.019	0.019	>4,9	-
SS-12.6	2.25	>2,25	>2,25	-	0.017	0.071	>2,25	-
SS-13.1	2.14	>2,14	>2,14	-	0.017	0.034	>2,14	-
SS-27.2	4.50	>4,5	0.563	>4,5	0.141	0.141	>4,5	-
SS-38.4	4.20	>4,2	>4,2	-	0.033	0.066	>4,2	-
Flukonazol	1.80	-	1.80	-	1.80	-	1.80	-
	<i>F. proliferatum</i>		<i>F. semitectum</i>		<i>F. solani</i>		<i>F. oxysporum</i>	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
SS-10.7	0.153	0.153	0.019	0.019	0.076	0.153	0.019	0.019
SS-12.6	0.071	0.071	0.008	0.035	0.282	0.282	0.035	0.071
SS-13.1	0.017	0.034	0.017	0.034	0.067	0.067	0.034	0.067
SS-27.2	0.141	0.563	0.071	0.141	0.563	1.125	0.141	0.563
SS-38.4	0.132	0.263	0.016	0.016	0.132	0.263	0.132	0.263
Flukonazol	1.40	-	1.60	-	1.80	-	0.80	-
Kombinacije ekstrakata [mg/ml]	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. semitectum</i>		<i>A. flavus</i>			
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
SS-10.7 + SS-12.6	0.008	0.067	0.067	0.134	0.267	-		
SS-10.7 + SS-13.1	0.067	0.067	0.067	0.067	0.267	-		
SS-10.7 + SS-27.2	0.008	0.017	0.017	0.034	0.134	-		
SS-10.7 + SS-38.4	0.067	0.134	0.017	0.034	0.535	-		
SS-12.6 + SS-13.1	0.067	0.134	0.067	0.134	0.134	0.267		
SS-12.6 + SS-27.2	0.008	0.067	0.034	0.067	0.134	-		
SS-12.6 + SS-38.4	0.004	0.008	0.008	0.017	0.267	-		
SS-13.1 + SS-27.2	0.067	0.134	0.067	0.067	0.134	0.134		
SS-13.1 + SS-38.4	0.134	0.267	0.067	0.267	0.267	1.07		
SS-10.7 + SS-12.6 + SS-38.4	0.004	0.004	0.008	0.017	0.134	-		

Sa druge strane, najniže koncentracije u opsegu od 0,008 do 0,019 mg/ml, su zabeležene za gotovo sve testirane ekstrakte u zavisnosti od ispitivane gljive, sa najizraženijim delovanjem ekstrakta SS-12.6 na *F. semitectum*, koja je ujedno i najosetljivija indikatorska gljiva ovog istraživanja. Imajući u vidu dobijene rezultate i vođeni idejom postojanja potencijalnog sinergizma između pojedinačnih ekstrakata, odabrane su tri vrste gljiva (*A. flavus*, *F. oxysporum* i *F. semitectum*) u testiranju njihovih kombinacija. Među pomenutim gljivama poznato je da je *A. flavus* kao jedna od najrezistentnijih, a ujedno i najpatogenija gljiva u smislu produkcije mikotoksina.

Iako su dobijene vrednosti za *A. flavus* bile više u poređenju sa vrednostima dobijenim za vrste roda *Fusarium*, ipak su veoma značajne jer su odgovarajuće kombinacije ekstraktata postigle značajnu inhibiciju rasta, što nije bio slučaj kod testiranja pojedinačnih. Kombinacija ekstraktata iz SS-10.7 i SS-38.4 se u ovom slučaju pokazala neefikasnom, jer je za inhibiciju rasta bila potrebna najviša koncentracija ekstraktata, viša od 0,5 mg/ml. Za *F. oxysporum* su zabeležene najniže ostvarene MIC vrednosti od čak 0,004 mg/ml za kombinaciju ekstraktata iz SS-12.6 i SS-38.4 izolata i kombinaciju ekstraktata iz SS-12.6, SS-38.4 i SS-10.7. Prilikom testiranja na *F. semitectum* dobijene vrednosti su bile više u odnosu na efekat pojedinačnih ekstraktata što navodi na pretpostavku da je u pitanju indiferentan ili antagonistički efekat pojedinačnih ekstraktata. Rezultati određenih FIC i FIC<sub>i</sub> vrednosti su prikazani u Tabeli 14.

**Tabela 14.** FIC i FIC<sub>i</sub> vrednosti ekstraktata u različitim kombinacijama i ostvarena interakcija protiv fungalnih patogena.

Kombinacije ekstraktata	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>A. flavus</i>	Kombinacije ekstraktata	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>A. flavus</i>
<b>FIC<sub>10.7</sub></b>	0,42	3,53	0,05	<b>FIC<sub>12.6</sub></b>	0,23	4,25	0,06
<b>FIC<sub>12.6</sub></b>	0,23	8,38	0,12	<b>FIC<sub>27.2</sub></b>	0,06	0,48	0,03
<b>FIC<sub>i</sub></b>	0,65	11,90	0,17	<b>FIC<sub>i</sub></b>	0,29	4,73	0,09
<b>Interakcija</b>	Ad	A	S	<b>Interakcija</b>	S	A	S
<b>FIC<sub>10.7</sub></b>	3,53	3,53	0,05	<b>FIC<sub>12.6</sub></b>	0,11	1,00	0,12
<b>FIC<sub>13.1</sub></b>	1,97	3,94	0,12	<b>FIC<sub>38.4</sub></b>	0,03	0,50	0,06
<b>FIC<sub>i</sub></b>	5,50	7,47	0,18	<b>FIC<sub>i</sub></b>	0,14	1,50	0,18
<b>Interakcija</b>	A	A	S	<b>Interakcija</b>	S	I	S
<b>FIC<sub>10.7</sub></b>	0,42	0,89	0,03	<b>FIC<sub>13.1</sub></b>	1,97	3,94	0,06
<b>FIC<sub>27.2</sub></b>	0,06	0,24	0,03	<b>FIC<sub>27.2</sub></b>	0,48	0,94	0,03
<b>FIC<sub>i</sub></b>	0,48	1,13	0,06	<b>FIC<sub>i</sub></b>	2,45	4,88	0,09
<b>Interakcija</b>	S	I	S	<b>Interakcija</b>	A	A	S
<b>FIC<sub>10.7</sub></b>	3,53	0,89	0,11	<b>FIC<sub>13.1</sub></b>	3,94	3,94	0,12
<b>FIC<sub>38.4</sub></b>	0,51	1,06	0,13	<b>FIC<sub>38.4</sub></b>	1,02	4,19	0,06
<b>FIC<sub>i</sub></b>	4,03	1,96	0,24	<b>FIC<sub>i</sub></b>	4,96	8,13	0,19
<b>Interakcija</b>	A	I	S	<b>Interakcija</b>	A	A	S
<b>FIC<sub>12.6</sub></b>	1,91	8,38	0,06	<b>FIC<sub>10.7</sub></b>	0,21	0,42	0,03
<b>FIC<sub>13.1</sub></b>	1,97	3,94	0,06	<b>FIC<sub>12.6</sub></b>	0,11	1,00	0,06
<b>FIC<sub>i</sub></b>	3,88	12,32	0,12	<b>FIC<sub>38.4</sub></b>	0,03	0,50	0,03
<b>Interakcija</b>	A	A	S	<b>FIC<sub>i</sub></b>	0,36	1,92	0,12
				<b>Interakcija</b>	S	I	S

S-sinergistički efekat  $\leq 0,5$ ; Ad-aditivni efekat 0,5-1; I-indiferentan efekat 1-2; A-antagonistički efekat  $\geq 2$

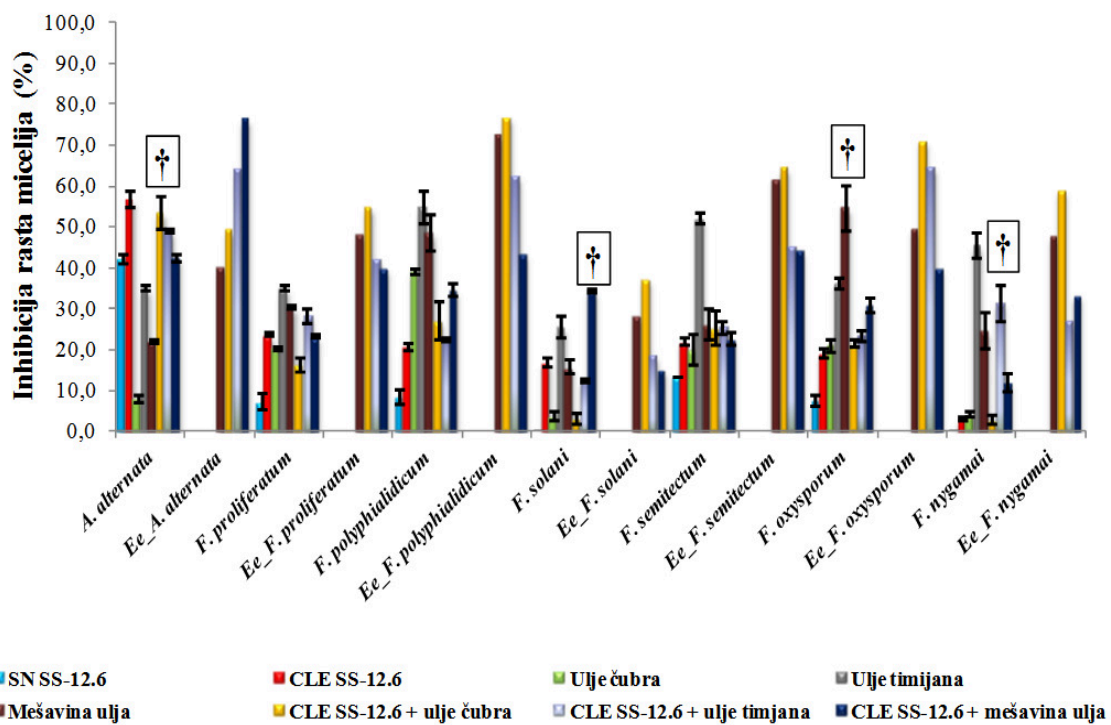
Rezultati mnogih studija ukazuju da sojevi roda *Bacillus* proizvode više od jedne familije lipopeptida, pa se može pretpostaviti da postoje njegove ekološke prednosti usled sinergističke interakcije između različitih jedinjenja. Iturini i fengicini ostvaruju izrazito snažnu biokontrolu biljnih bolesti inhibirajući rast fitopatogena širokog opsega (*F. graminearum*, *R. solani* i *A. flavus*) ili post-žetvenih patogena poput *B. cinerea* i *P. expansum* (Asaka and Shoda, 1996; Toure et al., 2004). Takođe, u studiji Cao et al. (2012) je pokazana značajna inhibicija *F. oxysporum* od strane *B. subtilis* SQRI soja kao producenta fengicina ili *B. subtilis* soja kao dominantnog producenta iturina A, pored ostalih lipopeptida u kontroli pomenutog patogena (Cazorla et al., 2007). Slična aktivnost je primećena i za bacilomicin koji je odgovoran za inhibiciju rasta *Podosphaera fusca*, uzročnika pepelnice (Romero et al., 2007). Pored antifungalne za iturin je pokazana i izrazito jaka antibakterijska aktivnost protiv *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* i *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, dva važna patogena bundeva (Zeriuoh et al., 2011). Iako je prvo pokazano da surfaktini sami po sebi nisu fungitoksični i da mogu ostvarivati izvestan sinergistički efekat sa iturinom A (Peypoux et al., 1999), naša istraživanja ukazuju na izrazit antifungalni potencijal jedinjenja veoma sličnih surfaktinu, protiv nekoliko fungalnih patogena uključujući i *F. oxysporum* (Dimkić et al., 2013), što je u saglasnosti i sa literaturnim podacima (Joshi et al., 2008). Takođe, u skorašnjim radovima je potvrđena jaka inhibitorna aktivnost *B. amyloliquefaciens* izolata, producenata surfaktina, protiv *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Penicillium italicum*, *A. niger* i *B. cinerea* (Romano et al., 2011 i 2013). Nasuprot ovim istraživanjima u radu Tao et al. (2011) je pokazano da surfaktin negativno utiče na antifungalni potencijal fengicina, najverovatnije sprečavanjem pravljenja pora u membrani. Sa druge strane, surfaktin može delovati i pozitivno sa fengicinskim molekulom naglašavajući sinergistički efekat na nivou bakterijske membrane *E. coli* (Huang et al., 2008). Takođe, zaštitom korena *Arabidopsis* od fitopatogenih bakterija *P. syringae* ukazano je na značaj surfaktina u direktnom delovanju protiv bakterija narušavanjem integriteta ćelijske membrane (Bais et al., 2004). Istraživanje Etchegaray et al. (2008) je pokazalo da odgovarajuća mešavina surfaktina i iturina izolovanih iz *B. subtilis* uspešno dovodi do dezintegracije ćelijskog zida *X. campestris* i *X. axonopodis*, uklanjanjem katjona vezanih za negativno naelektrisani ćelijski zid. Interakcije lipopeptidnih molekula su i dalje slabo razjašnjene, a svakako je potrebno dalje ih

ispitivati. Buduća i tekuća istraživanja mehanizma dejstava lipopeptida, njihove diferencijalne aktivnosti i potencijalnih sinergističkih efekata pružiće nesumljivo bolje razumevanje efikasnog korišćenja ovih bakterijskih antagonista u kontroli biljnih patogena.

#### **4.3.6 UTVRĐIVANJE POTENCIJALNOG SINERGISTIČKOG EFEKTA SS-12.6 I ETARSKIH ULJA NA RAST FITOPATOGENIH GLJIVA *IN VITRO* I NA KLIJAVOST I INFICIRANOST SEMENA NEVENA *IN SITU***

Pokazano je da kombinacija komplementarnih bioloških pristupa sa aditivnim i/ili sinergističkim efektom može da obezbedi veću konzistenciju i efikasnost u biokontroli. Danas postoji sve veće interesovanje za etarskim uljima kao mogućoj zameni za konvencionalne sintetičke fungicide u cilju zaštite kultivisanih biljaka od fitopatogenih gljiva, zbog njihove opšte prihvaćenosti od potrošača, relativne bezbednosti za upotrebu i ekološke prihvatljivosti (Abdel-Kader, 2011). Literaturni podaci ukazuju na efikasnost i primenu kako etarskih ulja, tako i izolata roda *Bacillus* u zaštiti povrtarskih biljaka od strane fitopatogenih gljiva, tretmanom zemljišta u kome će biljka rasti, tretiranjem korena biljaka i/ili prskanjem listova (Arrebola et al., 2010b; Abdel-Kader et al., 2011) ili tretmanom etarskim uljima u prevenciji suzbijanja fungalnih infekcija semena (Kritzinger et al., 2002).

Jedan od ciljeva ovog rada bio je i ispitivanje kombinacija etarskih ulja čubra i timijana, kao i ekstrakta izolata SS-12.6 na rast fitopatogenih gljiva izolovanih sa semena nevena. Određivani su stepen inficiranosti semena gljivama i uticaj na klijavost semena *in situ*. Naime, prethodno istraživanje (Stević, 2013) je pokazalo određeni sinergistički antifungalni efekat ulja i ekstrakta SS-12.6 *in vitro* na odabrane fitopatogene gljive izolovanih sa biljnih droga. Rezultati testiranja pojedinačnih agenasa određenih kombinacija *in vitro*, kao i očekivane vrednosti sinergizma (*Ee*), prema Limpelovoj formuli koje ukazuju na moguće sinergističko dejstvo, prikazani su na Slici 23.

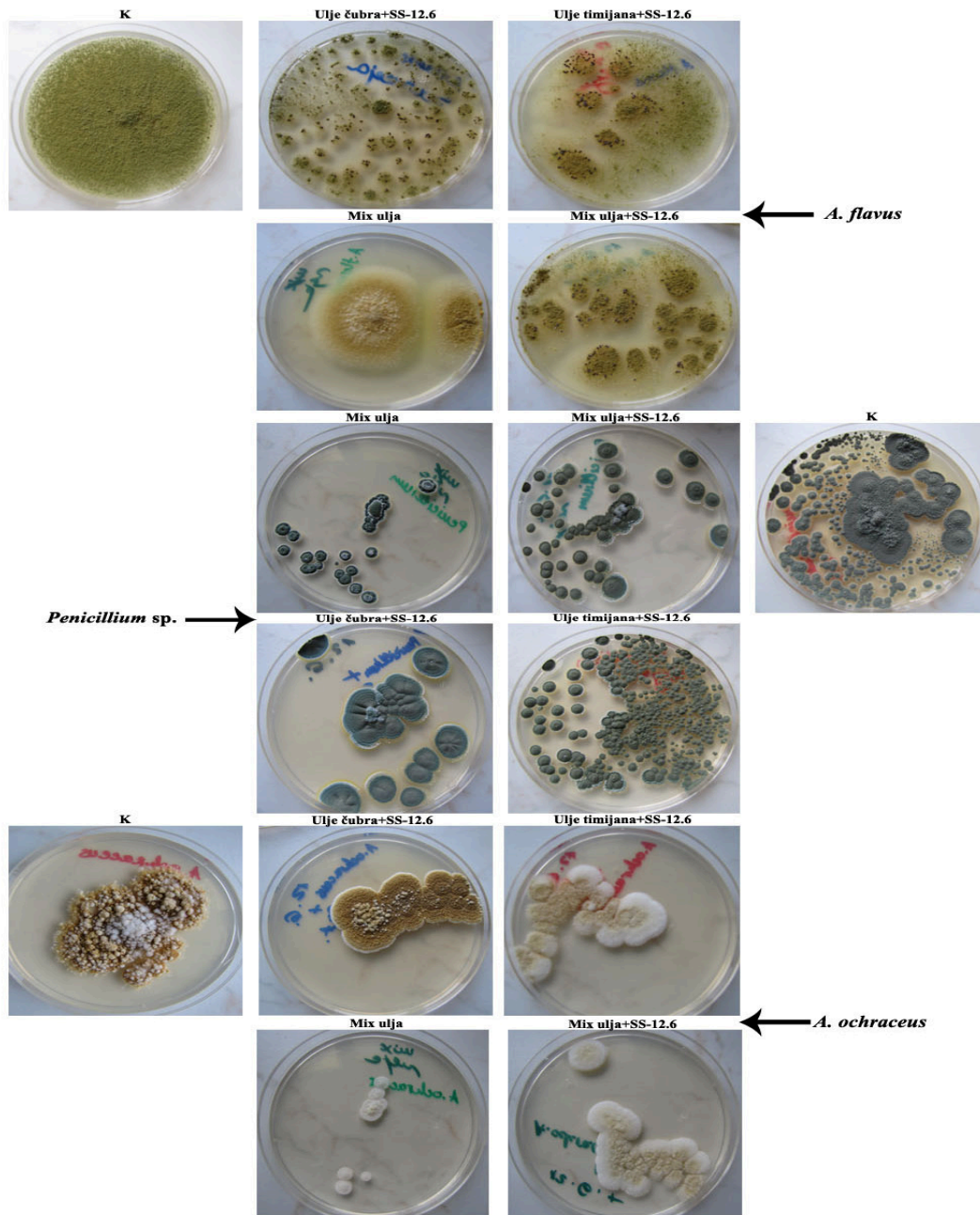


**Slika 23.** Sinergistička antifungalna aktivnost sirovog lipopeptidnog ekstrakta SS-12.6 (CLE) i etarskih ulja čubra i timijana *in vitro*. Prikazane su srednje vrednosti procenta inhibicije rasta vrsta izolovanih sa semena nevena sa pojedinačnim etarskim uljima i ekstraktom SS-12.6, kao i njihove međusobne kombinacije, delovanje besćelijskog supernatanta (SN), ostvareni sinergistički efekat [†] i standardna greška. *Ee* vrednosti predstavljaju očekivane vrednosti sinergizma.

Iz prikazanih rezultata može se uočiti da je ekstrakt SS-12.6 uglavnom jače inhibirao rast većine ispitivanih gljiva u odnosu na ulje čubra, dok je testirani besćelijski supernatant imao najniži inhibitorski potencijal, sem u slučaju *A. alternata*. Sa druge strane, ulje timijana je ostvarilo viši inhibitorski potencijal na svim gljivama u odnosu na ekstrakt SS-12.6. Međutim, *A. alternata*, je bila procentualno najviše inhibirana kako delovanjem samog ekstrakta SS-12.6, tako i kombinacijom sa uljima, sa značajnom statističkom značajnošću prema Džankovom testu višestrukog opsega (podaci nisu prikazani). Takođe, statistički značajna inhibicija rasta u slučaju testiranja pojedinačnih ulja ostvarena je prema *F. polyphialidicum*, dok je njihova kombinacija ispoljila statistički značajnu antifungalnu aktivnost prema *F. polyphialidicum* i *F. oxysporum*. Poređenjem vrednosti procenata inhibicije rasta, korišćenjem Limpelove formule, u

određenim kombinacijama je ipak zabeležena sinergistička aktivnost, jer su ostvarene vrednosti inhibicije rasta gljiva bile veće od preračunatih očekivanih vrednosti (*Ee*). Sinergistička aktivnost je utvrđena za kombinaciju SS-12.6 i ulja čubra na rast *A. alternata*, a takođe i za kombinaciju ovog ekstrakta i ulja timijana u delovanju protiv *F. nygamai*, za razliku od ranijeg istraživanja (Stević, 2013) gde je veći efekat ove kombinacije bio usmeren ka *F. semitectum* i *F. solani*. U kombinaciji oba ulja sa ekstraktom SS-12.6 sinergistička aktivnost je jedino zabeležena na rast *F. solani*, što je veoma značajno s'obzirom na rezistentnost ovog patogena na delovanje pojedinačnih agenasa, što se poklapa sa radom Stević (2013), u kome je sinergistički efekat ka ovom patogenu zabeležen u slučaju kombinacije SS-12.6 sa pojedinačnim uljima timijana i čubra. Pored veoma efikasnog delovanja kombinacije oba ulja aditivnim efektom, detektovan je i sinergistički efekat na rast *F. oxysporum*. U okviru ovog dela istraživanja testirane su različite kombinacije i na *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* i *Penicillium* sp., ali za ove gljive je bilo teško predstaviti procentualnu inhibiciju rasta micelija zbog difuznog i nekompaktnog rasta (Slika 24). *A. ochraceus* je uglavnom bio neosetljiv na supernatant i lipopeptidni ekstrakt SS-12.6, dok je značajnija inhibicija rasta zabeležena tretmanom sa uljem timijana, koje je dovelo do primetnog gubitka pigmentacije micelije, kao i u prethodnom slučaju kod *F. semitectum* i *F. oxysporum*. Gotovo potpuna inhibicija rasta *A. ochraceus* i *Penicillium* sp., ostvarena je korišćenjem mešavine oba ulja što verovatno ukazuje na sinergistički efekat. Takođe, utvrđena je i nešto manja inhibicija rasta u kombinaciji ekstrakta i oba ulja za ove patogene. Naneta zapremina besćelijskog supernatanta i ekstrakta izolata SS-12.6 nije bila dovoljna za inhibiciju rasta micelija ovih gljiva, dok je primetna inhibicija zabeležena u tretmanu sa uljem čubra pojedinačno i kombinaciji sa ekstraktom. Ulje timijana nije ispoljilo značajnu inhibitornu aktivnost na rast *A. flavus*, *A. niger*, i *Penicillium* sp. pojedinačno, ali je nešto bolja aktivnost zabeležena u kombinaciji sa ekstraktom SS-12.6. Ipak najveća inhibitorna aktivnost ostvarena je mešavinom oba ulja, slično kao i kombinacijom oba ulja i ekstrakta izolata SS-12.6.



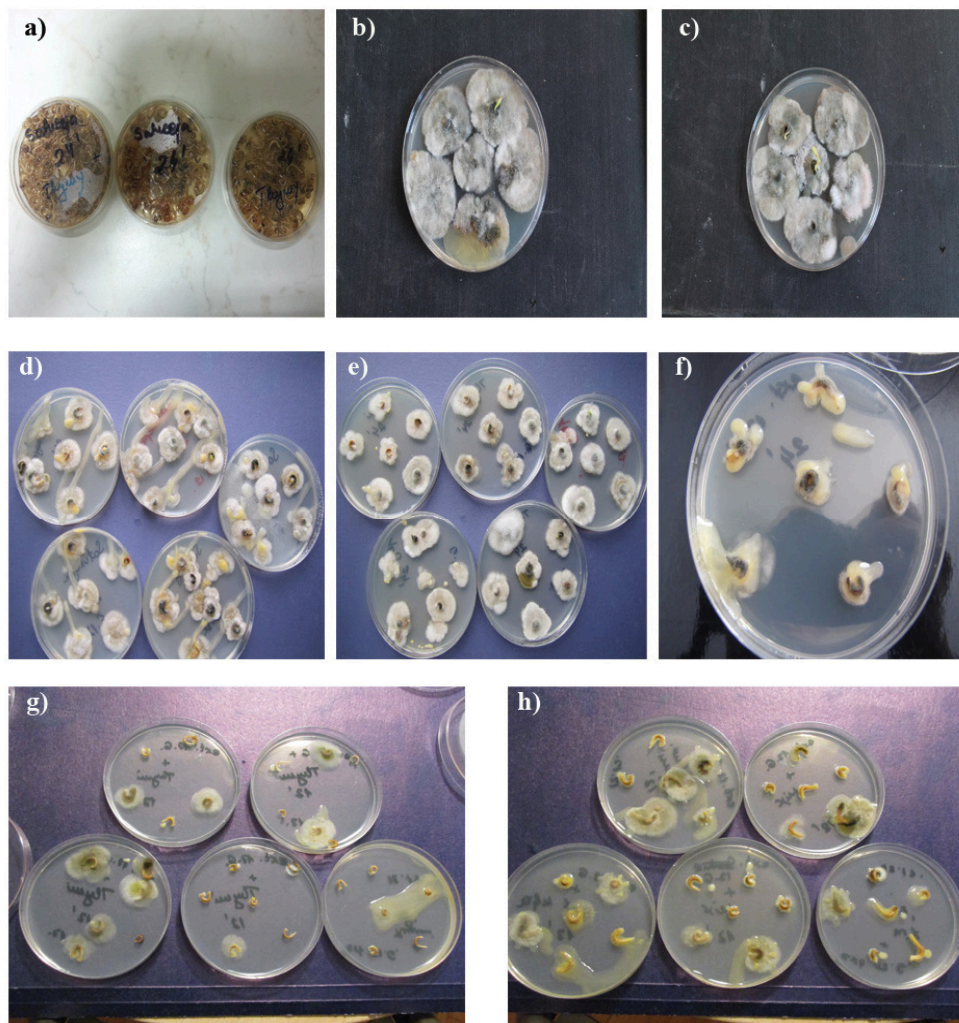


**Slika 24.** Sinergistička aktivnost ekstrakta SS-12.6 i etarskih ulja čubra i timijana *in vitro* prema *A. flavus*, *Penicillium sp.* i *A. ochraceus*.

Eksperimentalno je pokazano da kombinacija etarskih ulja i izolata *Bacillus sp.* može biti vrlo efikasna u kontroli patogenih gljiva na voću. Tako je kombinacijom *B. amyloliquefaciens* i etarskog ulja limunske trave (*Cymbopogon citrates*) postignut izostanak fitopatogenih oboljenja na skladištenim breskvama sinergističkim dejstvom ovih bioloških agenasa (Arrebola et al., 2010b). Takođe, visoka efikasnost u prevenciji kontaminacije patogenim gljivama povrtarskih biljaka postignuta je integrisanim

tretmanom zemlje kombinacijom gljive antagoniste i odabranih etarskih ulja, poput kima, timijana, nane i geranijuma (Abdel-Kader et al., 2011). Sinergizam u antifungalnoj aktivnosti lipopeptidnog ekstrakta i etarskih ulja može se tražiti u hemijskoj strukturi ovih agenasa i aktivnosti usmerenoj ka citoplazmatičnoj membrani. Smanjenje površinskog napona, modifikacije površinskih osobina i perturbacija lipidnog dvosloja su neka od različitih svojstava karakterističnih za surfaktantska jedinjenja, čime se objašnjava deo njihove biološke aktivnosti (Ongena and Jacques, 2008). Zbog velikog broja konstituenata, čini se da etarska ulja nemaju specifične ćelijske targete (Carson et al., 2002) ali, kao tipični lipofilni molekuli prolaze kroz ćelijski zid i citoplazmatičnu membranu, remeteći strukturu permeabilizacijom njihovih različitih slojeva sastavljenih od polisaharida, masnih kiselina i fosfolipida.

Rezultati *in vitro* testiranja, podstakli su dalja ispitivanja antifungalne aktivnosti kombinacije ekstrakta SS-12.6 i etarskih ulja na ukupnu fungalnu infekciju semena nevena *in situ*. Različite kombinacije ekstrakta i ulja su primenjivane na semenima nevena kao što je opisano u eksperimentalnom dizajnu. Posle svakog tretmana semena odgovarajućim pojedinačnim agensima ili njihovim kombinacijama, praćena je njihova efikasnost u kontroli infekcije semena na PDA podlozi (Slika 25). Prirodno inficirana semena bila su potapana u sterilnu destilovanu vodu i bila korišćena u vidu pozitivne kontrole prilikom određivanja procenata fungalne infekcije i klijavosti. Rezultati su dati u Tabeli 15. Može se uočiti da je nakon izlaganja semena lipopeptidnom ekstraktu SS-12.6, inicijalna klijavost 4 dana kasnije bila značajno ugrožena, a posebno tretmanom od 24 h. Prilikom izlaganja semena, ovom ekstraktu, u trajanju od 6 h klijanje je bilo isto u poređenju sa kontrolnim semenima, brojanim posle 7 dana. Isti efekat je postignut, tj. klijavost je bila ista, kao i kod kontrolnih semena, tretiranjem semena nevena ekstraktom SS-12.6 tokom 12 h i brojanjem klijalih semena posle 14 dana (Slika 26b). Za besćelijski supernatant izolata SS-12.6 primećeno je početno kašnjenje klijanja, ali je uočen blagi porast klijavosti u poređenju sa kontrolnim semenima brojanjem posle 7, a posebno posle 14 dana. Ulje timijana je znatno uticalo na klijavost semena nevena posle 24 h izlaganja i tek neznatno posle 12 h tretmana. Ulje čubra nije smanjilo klijavost ni u jednom tretmanu, štaviše, posle tretmana od 24 h klijavost semena je bila povećana u svakoj tački uzorkovanja.

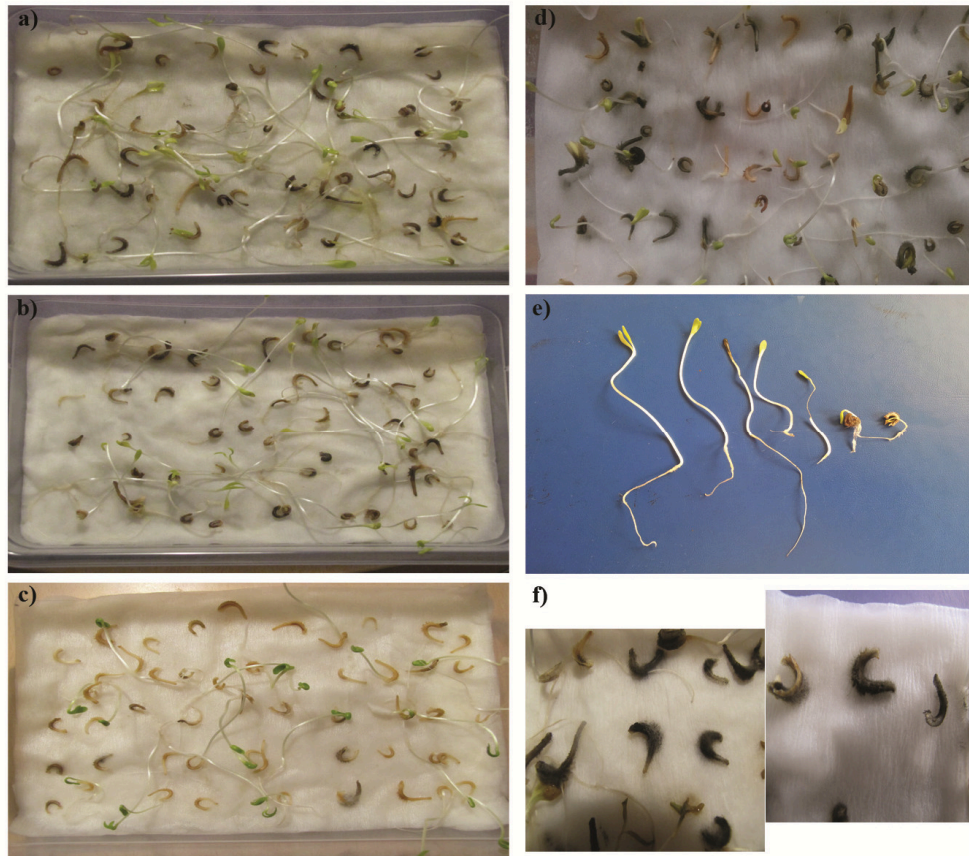


**Slika 25.** Analiza inficiranosti semena nevena. a) Potopljena semena u suspenziju etarskih ulja, pojedinačno i u kombinaciji; b, c) negativna kontrola netretiranih semena; d) 24 h tretirana semena uljem čubra; e) 24 h tretirana semena uljem timijana; f) 24 h tretirana semena etil-acetatnim ekstraktom SS-12.6; g) 12 h tretirana semena kombinacijom ulja timijana i ekstrakta SS-12.6; h) 12 h tretirana semena kombinacijom oba ulja i ekstrakta SS-12.6. Merenja su bila sprovedena nakon sedam dana inkubacije na 25 °C.

Može se reći da je kombinacija oba ulja imala indiferentno ili stimulatивно dejstvo na klijavost semena. Lipopeptidni ekstrakt SS-12.6 u kombinaciji sa uljem timijana je negativno uticao na klijavost. Slično tome, u kombinaciji sa uljem čubra redukcija klijavosti je zabeležena posle tretmana od 12 h i 24 h izloženosti semena ovoj kombinaciji. Nakon 6 h izlaganja, klijavost semena je bila u rangu kontrolnih uzoraka.

Kombinacija ekstrakta SS-12.6 i oba ulja, takođe je značajno redukovala klijavost (Slika 26c).

Jedini izuzetak je bio tretman od 6 h, u kome je posle inicijalnog smanjenja (nakon 4. i 7. dana) procenat klijavosti semena dostigao vrednost kontrolnih semena brojanjem posle 14 dana.



**Slika 26.** Uticaj odabranih antifungalnih agenasa na klijavost semena. a) Klijanje izlagano 6 h supernatantu SS-12.6; b) klijanje nakon tretmana od 12 h ekstraktom SS-12.6; c) klijanje nakon tretmana od 12 h kombinacijom ekstrakta SS-12.6 i oba ulja; d) klijanje negativne kontrole; e) izgled normalnih i zakržljalih klijanaca; f) inficirana semena. Merenja su izvršena nakon 14 dana praćenja.

U odnosu na ukupnu fungalnu infekciju (Tabela 15), ekstrakt izolata SS-12.6 (CLE) je pokazao značajnu redukciju infekcije, u sva tri tretmana izlaganja semena. Još važniji rezultat je bio, da se stepen infekcije i dalje održavao niskim i nakon 14 dana. Sličan efekat je ostvaren i kada je korišćen besćelijski supernatant (SN).

**Tabela 15.** Uticaj lipopeptidnog ekstrakta SS-12.6 i etarskih ulja timijana i čubra na klijavost i inficiranost semena nevena (Sr.vrednost ± St. greška).

<b>% klijavosti semena</b>	Kontrola †	CLE SS-12.6	SN SS-12.6	Ulje timijana	Ulje čubra	Mix oba ulja	CLE SS-12.6 + ulje timijana	CLE SS-12.6 + ulje čubra	CLE SS-12.6 + mix oba ulja
6h day 4		42.7 <sup>b</sup> ± 1.33	33.0 <sup>d</sup> ± 0.58	58.0 <sup>ab</sup> ± 3.46	48.7 <sup>d</sup> ± 2.40	61.3 <sup>bc</sup> ± 1.33	20.0 <sup>c</sup> ± 2.31	44.0 <sup>b</sup> ± 7.02	28.7 <sup>cd</sup> ± 4.81
12h day 4	50.7 <sup>b</sup> ± 0.67	25.3 <sup>c</sup> ± 1.33	25.7 <sup>e</sup> ± 0.33	58.0 <sup>ab</sup> ± 1.15	50.0 <sup>cd</sup> ± 5.77	64.7 <sup>b</sup> ± 3.53	16.0 <sup>cd</sup> ± 7.02	3.3 <sup>e</sup> ± 0.67	18.0 <sup>de</sup> ± 5.03
24h day 4		8.0 <sup>d</sup> ± 4.16	58.0 <sup>c</sup> ± 4.16	34.0 <sup>d</sup> ± 2.31	57.3 <sup>bcd</sup> ± 3.71	52.7 <sup>c</sup> ± 1.76	3.3 <sup>d</sup> ± 2.40	10.0 <sup>e</sup> ± 2.31	8.0 <sup>e</sup> ± 4.00
6h day 7		57.3 <sup>a</sup> ± 2.40	66.7 <sup>ab</sup> ± 1.33	60.7 <sup>ab</sup> ± 4.37	64.7 <sup>ab</sup> ± 1.76	62.0 <sup>bc</sup> ± 2.00	36.7 <sup>b</sup> ± 2.40	58.0 <sup>a</sup> ± 4.16	48.7 <sup>bc</sup> ± 1.76
12h day 7	56.0 <sup>b</sup> ± 1.15	35.3 <sup>bc</sup> ± 3.53	57.3 <sup>c</sup> ± 1.76	58.0 <sup>ab</sup> ± 1.15	56.7 <sup>bcd</sup> ± 3.71	66.0 <sup>b</sup> ± 4.62	32.7 <sup>b</sup> ± 5.81	28.0 <sup>cd</sup> ± 2.31	41.3 <sup>bc</sup> ± 6.67
24h day 7		24.0 <sup>c</sup> ± 5.77	66.0 <sup>b</sup> ± 1.15	44.7 <sup>c</sup> ± 0.67	62.7 <sup>abc</sup> ± 5.46	57.3 <sup>bc</sup> ± 3.53	9.3 <sup>cd</sup> ± 4.37	24.7 <sup>d</sup> ± 4.81	20.7 <sup>de</sup> ± 9.26
6h day 14		<b>62.7<sup>a*</sup> ± 2.91</b>	68.7 <sup>ab</sup> ± 0.67	<b>62.0<sup>a*</sup> ± 4.00</b>	66.7 <sup>ab</sup> ± 1.33	62.0 <sup>bc</sup> ± 2.00	<b>52.0<sup>a*</sup> ± 4.16</b>	<b>62.0<sup>a*</sup> ± 5.77</b>	<b>68.7<sup>a*</sup> ± 4.67</b>
12h day 14	68.7 <sup>a*</sup> ± 4.37	56.7 <sup>a</sup> ± 5.70	70.7 <sup>ab</sup> ± 1.33	58.0 <sup>ab</sup> ± 1.15	62.7 <sup>abc</sup> ± 5.81	<b>75.3<sup>a*</sup> ± 1.76</b>	50.0 <sup>a</sup> ± 1.15	38.0 <sup>bc</sup> ± 2.31	49.3 <sup>b</sup> ± 6.36
24h day 14		43.3 <sup>b</sup> ± 2.91	<b>72.7<sup>a*</sup> ± 2.40</b>	52.7 <sup>bc</sup> ± 2.91	<b>72.7<sup>a*</sup> ± 3.53</b>	65.3 <sup>b</sup> ± 4.81	14.7 <sup>cd</sup> ± 4.81	33.3 <sup>bcd</sup> ± 2.40	33.3 <sup>bcd</sup> ± 9.82
<b>% infektivnosti</b>									
6h day 4		12.7 <sup>ab</sup> ± 2.91	7.3 <sup>bc</sup> ± 0.67	50.0 <sup>a</sup> ± 5.03	48.7 <sup>a</sup> ± 5.46	50.0 <sup>a</sup> ± 2.00	14.7 <sup>ab</sup> ± 4.37	14.0 <sup>bcd</sup> ± 3.06	24.0 <sup>ab</sup> ± 3.06
12h day 4	40.0 <sup>a</sup> ± 1.15	5.3 <sup>c</sup> ± 1.33	4.7 <sup>c</sup> ± 1.33	33.3 <sup>b</sup> ± 1.76	44.7 <sup>a</sup> ± 3.53	27.3 <sup>bc</sup> ± 1.76	0.7 <sup>c</sup> ± 0.67	4.0 <sup>d</sup> ± 1.15	2.7 <sup>d</sup> ± 0.67
24h day 4		4.7 <sup>c</sup> ± 1.33	7.3 <sup>bc</sup> ± 1.76	17.3 <sup>d</sup> ± 3.71	17.3 <sup>b</sup> ± 1.76	12.7 <sup>e</sup> ± 1.76	9.3 <sup>bc</sup> ± 3.33	18.0 <sup>bcd</sup> ± 4.62	14.7 <sup>bc</sup> ± 2.40
6h day 7		15.3 <sup>a*</sup> ± 2.67	8.0 <sup>bc</sup> ± 0.58	52.0 <sup>a</sup> ± 4.62	52.7 <sup>a</sup> ± 1.76	52.7 <sup>a</sup> ± 2.91	20.0 <sup>a</sup> ± 2.00	20.0 <sup>bc</sup> ± 2.00	24.0 <sup>ab</sup> ± 2.31
12h day 7	43.3 <sup>a</sup> ± 2.40	6.0 <sup>bc</sup> ± 1.15	7.3 <sup>bc</sup> ± 0.67	33.3 <sup>b</sup> ± 1.76	51.3 <sup>a</sup> ± 3.53	28.7 <sup>bc</sup> ± 2.91	5.3 <sup>c</sup> ± 2.40	8.7 <sup>cd</sup> ± 2.67	7.3 <sup>cd</sup> ± 0.67
24h day 7		11.3 <sup>abc</sup> ± 2.40	8.7 <sup>abc</sup> ± 1.76	20.0 <sup>cd</sup> ± 2.31	20.7 <sup>b</sup> ± 2.91	18.7 <sup>de</sup> ± 1.76	15.3 <sup>ab</sup> ± 3.53	26.0 <sup>ab</sup> ± 5.03	22.7 <sup>ab</sup> ± 4.06
6h day 14		15.3 <sup>a*</sup> ± 2.91	<b>9.3<sup>abc</sup> ± 0.67</b>	53.3 <sup>a*</sup> ± 3.33	53.7 <sup>a</sup> ± 1.20	54.0 <sup>a*</sup> ± 4.16	21.3 <sup>a*</sup> ± 1.33	22.7 <sup>abc</sup> ± 2.40	24.7 <sup>a</sup> ± 2.91
12h day 14	48.0 <sup>a*</sup> ± 3.46	<b>6.0<sup>bc</sup> ± 1.15</b>	13.3 <sup>a*</sup> ± 2.40	37.7 <sup>b</sup> ± 2.03	54.0 <sup>a*</sup> ± 5.03	32.7 <sup>b</sup> ± 1.33	<b>6.7<sup>bc</sup> ± 2.91</b>	<b>12.7<sup>bcd</sup> ± 2.40</b>	<b>11.3<sup>cd</sup> ± 2.40</b>
24h day 14		12.7 <sup>ab</sup> ± 1.76	10.0 <sup>ab</sup> ± 2.00	<b>28.0<sup>bc</sup> ± 4.16</b>	<b>27.0<sup>b</sup> ± 3.79</b>	<b>24.0<sup>cd</sup> ± 2.31</b>	20.7 <sup>a</sup> ± 2.40	35.3 <sup>a</sup> ± 9.33	26.7 <sup>a*</sup> ± 5.21

\* Srednje vrednosti procenata klijavosti i infektivnosti semena u 6 ponavljanja od po 50 semena, praćene istim slovnim oznakama u okviru kolona nisu statistički značajne ( $P < 0.05$ ), prema Dankanovom testu višestrukog opsega ( $n=3$ ). † Kontrolna prirodno inficirana semena potapana su u sterilnu destilovanu vodu i merenje je izvršeno nakon 4., 7. i 14. dana. Prikazane su prosečne vrednosti u zavisnosti od različitih vremena izlaganja. Podebljane vrednosti predstavljaju istovremeno najviši procenat klijavosti i najniži procenat inficiranih semena nakon 14 dana praćenja.

Nešto drugačiji rezultati su dobijeni sa etarskim uljima. Naime, ulje timijana je znatno smanjilo stepen infekcije, ali u manjoj meri u poređenju sa ekstraktom i supernatantom, i to nakon tretmana od 24 h, a tek neznatno posle 12 h izlaganja, dok je ulje čubra primetno redukovalo infekciju tek posle 24 h tretmana. Sličan efekat je postignut i kombinacijom oba ulja. S druge strane, ulja su pokazala više potencijala za suzbijanje fungalne infekcije u kombinaciji sa ekstraktom. Za sve dobijene rezultate korišćenjem različitih kombinacija agenasa, u pogledu kako procenata smanjenja fungalne infekcije, tako i procenata klijavosti semena, realni sinergistički efekat prema Limpelovoj formuli (podaci nisu prikazani) nije zabeležen.

Istorijski gledano, fungicidi su razvijani na bazi neorganskih jedinjenja sumpora, bakra i žive. Toksičnost ovih jedinjenja za seme i životnu sredinu, kao i razvoj novih bioloških jedinjenja, doprineo je drastičnom padu upotrebe tih neorganskih jedinjenja i do konačne zabrane njihovog korišćenja (Mancini and Romanazzi, 2014). U današnje vreme tretmani semena, koji sve više uključuju biljne ekstrakte kao i druge biokontrolne agense predstavljaju atraktivnu zamenu za sintetičke fungicide. Kontaminiranost semena gljivama je čest i veoma rasprostranjen problem što dovodi do značajnog smanjenja prinosa, između ostalog i zbog smanjene klijavosti. Tako je i pokazano na primeru *F. moniliforme* da ovaj patogen može ostati neotkriven u zrnima sve do klijanja, kada inficira novonastale klijance (Galperin et al., 2003). Drugi podaci, pokazuju da semena bez simptoma zaraze mogu biti u stvari latentno inficirana i predstavljaju važan izvor inokuluma patogena (Bressan and Figueiredo, 2010). Etarska ulja su intenzivno ispitivana kao potencijalna sredstava za zaštitu semena protiv gljivične infekcije (Paster et al, 1995; Kritzinger et al., 2002). Među ispitivanim etarskim uljima pokazano je da je ulje timijana najčešće davalo dobru antifungalnu efikasnost u *in vitro* uslovima i testiranjima u polju, verovatno zbog visokog sadržaja timola i drugih antifungalnih jedinjenja (Šegvić Klarić et al., 2007). Sa druge strane, jedan od primera korišćenja antagonista roda *Bacillus* je pokazao, da semena soje premazana slojem izolata *Bacillus* sp. BNM 122 (producent iturinu i surfaktinu sličnih jedinjenja) dobijaju značajnu zaštitu od *R. solani*, u uslovima gajenja u komori za rast i stakleniku (Souto et al., 2004). Takođe, rezultati istraživanja Bressan and Figueiredo (2010) potvrđuju efikasnost antagonističke aktivnosti *Bacillus* sp. izolata u *in vitro* uslovima u smislu redukcije infekcije semena kukuruza patogenom *F. moniliforme*. Ipak

rezultati dobijeni u *in vitro* uslovima ne mogu generalno da potvrde ekspresivnost antagonizma kao dokaz kontrole u *in situ* uslovima (Hoitink and Boechm, 1999). Naime, potvrđujući efikasnost kombinacija ekstrakta SS-12.6 i etarskih ulja timijana i čubra u ovom radu, kao i u pređašnjem istraživanju Stević (2013) na patogene roda *Fusarium*, ispitivanjem njihovih antifungalnih aktivnosti na ukupnu infekciju semena nevena *in situ*, došlo se do nešto drugačijih podataka od dobijenih *in vitro*. Neven je izabran kao veoma važna biljka za proizvodnju različitih fitopreparata. Uzimajući u obzir sve navedene rezultate, u cilju ostvarivanja najboljih rezultata u pogledu klijavosti i ukupne fungalne infekcije semena, tretmani ekstraktom i supernatantom izolata SS-12.6, kao i kombinacijama ekstrakta i ulja čubra ili ekstrakta sa oba ulja u trajanju od 6 h, bi se mogli koristiti. Ulje čubra, kao i kombinacija oba ulja daje zadovoljavajuće rezultate tek nakon 24 h tretmana. Iako je kombinacija ekstrakta SS-12.6 i ulja timijana imala veoma izraženu antifungalnu aktivnost, ona je istovremeno negativno uticala na klijavost semena. Takođe je uočeno, da testirane kombinacije raznih agenasa *in situ* ne dovode do sinergističkog efekta, nasuprot *in vitro* rezultatima nekih kombinacija prema određenoj gljivi. Tako, sinergistički efekat izostaje pri testiranim koncentracijama *in situ* i svaki efekat se može pripisati aditivnom efektu individualnih agenasa. Ipak, kako je stvarni efekat u smislu smanjenja fungalne infekcije bez štetnog uticaja na klijavost semena bio cilj, prednost korišćenja ovakvih kombinacija je upravo potreba za nižim koncentracijama pojedinačnih agenasa. Projektovanjem u velikim razmerama, to bi moglo imati značajan ekonomski efekat i važan uticaj na očuvanje životne sredine. U prilog tome govori i činjenica da pribegavanje prirodnim proizvodima sa antimikrobnim svojstvima, koje mogu umanjiti nivo inficiranosti semena i incidencu bolesti klijanaca, bez obzira na ograničenja u pogledu upotrebe konvencionalnih hemijskih proizvoda, postala je obavezna praksa u EU (Direktiva 2009/128/EC) tokom 2014. godine njihovom inplementacijom u okviru tehnika integrisanog upravljanja štetočinama.

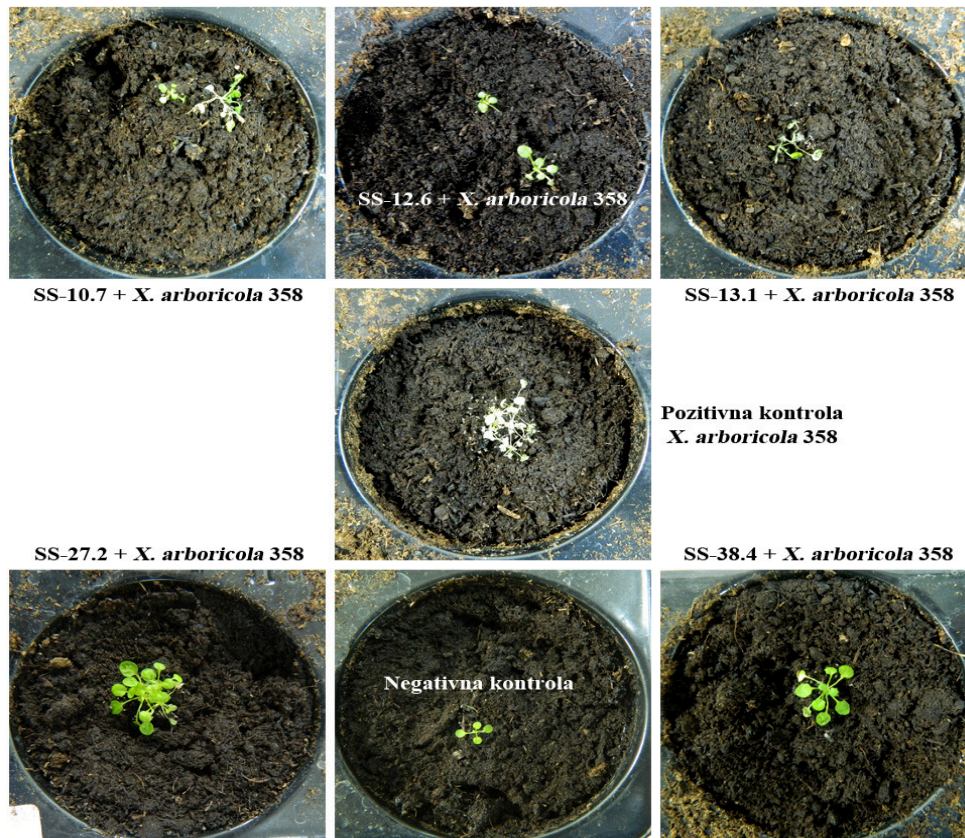
#### **4.3.7 IN PLANTA UTVRĐIVANJE PROTEKTIVNOG EFEKTA LIPOPEPTIDNIH EKSTRAKATA**

Veliki broj sojeva roda *Bacillus* ekspirira antimikrobnu aktivnost koja potiskuje nekrotizujuće patogene/parazite ili na neki drugi način promoviše rast i zdravlje biljaka. Prethodno istraživanje Ivanović (2011) u radu sa istim lipopeptidnim

ekstraktima SS-12.6 i SS-13.1, je dokazalo uspešnu redukciju infekcije izazvane *P. syringae* na listovima *A. thaliana* L. kao model sistema.

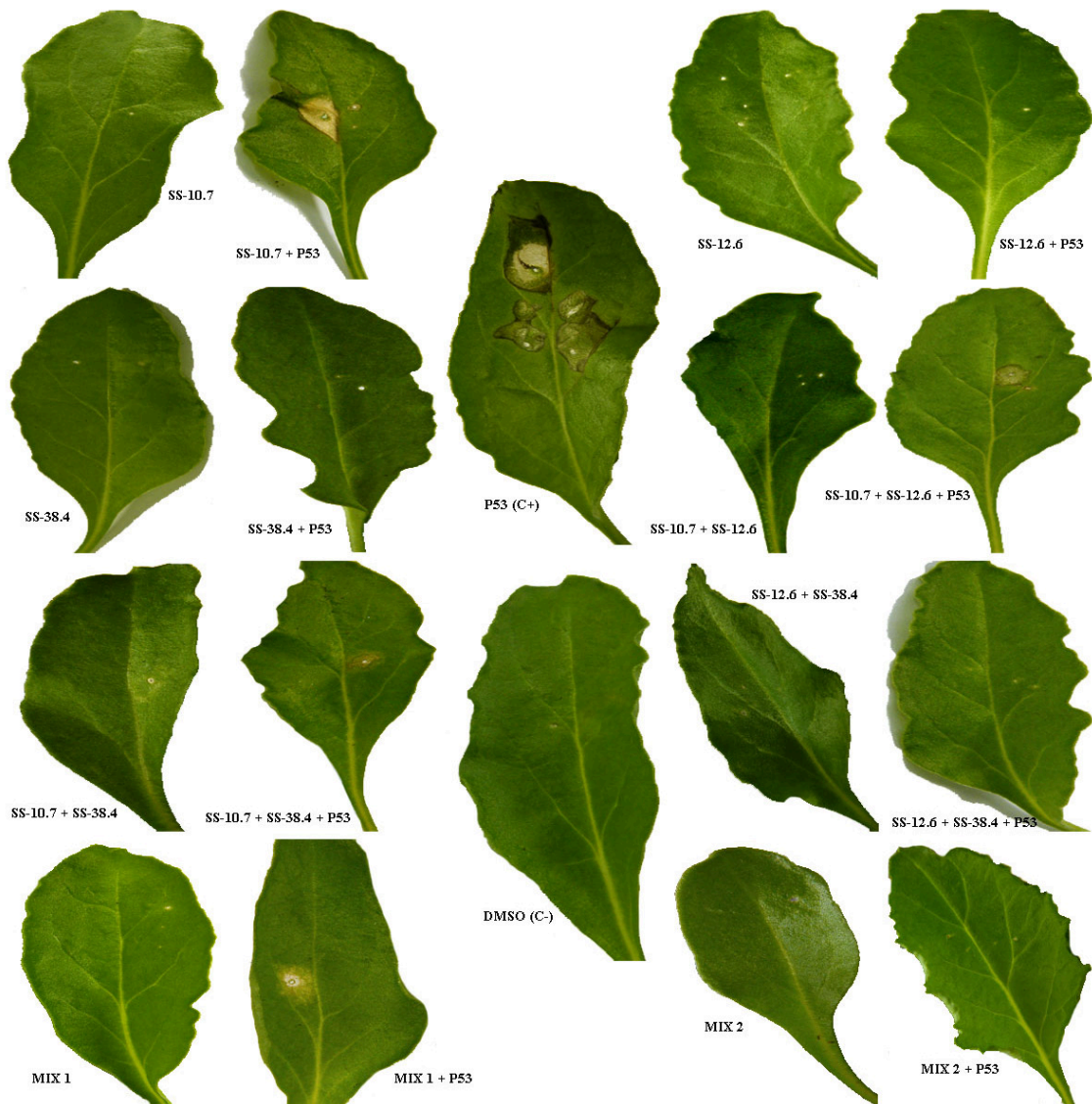
U cilju testiranja direktnog antagonizma lipopeptidnih ekstrakata i utvrđivanja njihove antibakterijske aktivnosti korišćen je metod inokulacije listova smešom lipopeptidnih ekstrakata dobijenih različitim metodama ekstrakcije i odgovarajućih patogena. Kako je uticaj doze antagoniste na efikasnu kontrolu patogena potvrđen u ranijim studijama (Montesions and Bonaterra, 1996; Smith et al., 1997), četiri puta veća koncentracija ekstrakata u odnosu na patogeni indikatorski soj je bila korišćena. U slučaju ispitivanja protektivnog efekta pet metanolnih ekstrakata (SS-10.7, SS-12.6; SS-13.1; SS-27.2 i SS-38.4) na rast indikatorskog soja *X. arboricola* 358 izabran je biljni model sistem *A. thaliana*. *A. thaliana* poslužila je kao model sistem za proučavanje uzajamne interakcije sa sojevima *P. syringae* (Tornero and Dangl, 2001) i odabrana je za ovo istraživanje zbog osetljivosti prema bakterijama koje izazivaju sušenje listova kao i odumiranje čitave biljke. Istraživanja u ovom radu su prvi rezultati korišćenja ovog model sistema i bakterijske vrste *X. arboricola*. Rezultati su prikazani na Slici 26. Četrnaest dana od inokulacije očitavani su rezultati i uočeno je da su kontrolne biljke koje su bile inokulisane samo izolatom *X. arboricola*, pokazivale simptome sušenja cele biljke, za razliku od drugih biljaka, inokulisanih smešom patogena i ekstraktima SS-12.6, SS-27.2 i SS-38.4 gde simptomi sušenja nisu zabeleženi. Međutim, kombinacija patogena i pojedinačnih ekstrakata SS-10.7 i SS-13.1 nije bila efikasna u sprečavanju patogenog dejstva *X. arboricola*, što može da znači da koncentracija aktivnih supstanci nije bila dovoljna. Takođe, bitno je naglasiti da biljke koje su bile inokulisane samo ekstraktima nisu pokazivale simptome sušenja.





**Slika 26.** *In planta* antimikrobni efekat pet različitih ekstrakata *Bacillus* sp. prema izolatu *X. arboricola* 358 poreklom sa oraha.

Dokazani indiferentni, odnosno aditivni efekat *in vitro* više etil-acetatnih ekstrakata protiv izolata *P. syringae* pv. *aptata* poreklom sa šećerne repe, poslužio je za dalja ispitivanja antimikrobne aktivnosti ovih ekstrakata *in planta*. Takođe, uporedo je vršena analiza pet pojedinačnih metanolnih ekstrakata i njihovih kombinacija, kao sekundarnih negativnih kontrola nekroze tkiva listova u cilju testiranja toksičnosti samih ekstrakata, sa istovremenim praćenjem antimikrobnog dejstva. Korišćenje dva različita pristupa ekstrakciji vodilo je ka dokazivanju efikasnijeg načina ekstrakcije u smislu povećanog prinosa lipopeptidnih jedinjenja i potencijalno drugačijih antimikrobnih dejstava usled ekstrakcije drugačijih jedinjenja. Antimikrobna aktivnost je ispitivana inokulacijom listova šećerne repe, *Beta vulgaris* L., različitim pojedinačnim ekstraktima i njihovim kombinacijama protiv patogenog izolata *P. syringae* pv. *aptata* 53 poreklom sa repe. Rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti etil-acetatnih ekstrakata nakon 7 dana inkubacije su prikazani na Slici 27.



**Slika 27.** Antimikrobni efekat *in planta* pojedinačnih etil-acetatnih ekstrakata i njihovih kombinacija prema izolatu *P. syringae* pv. *aptata* 53 poreklom sa šećerne repe.

Mix 1 - Kokultura SS-10.7 + SS-12.6 + SS-38.4

Mix 2 - Smeša SS-10.7 + SS-12.6 + SS-38.4

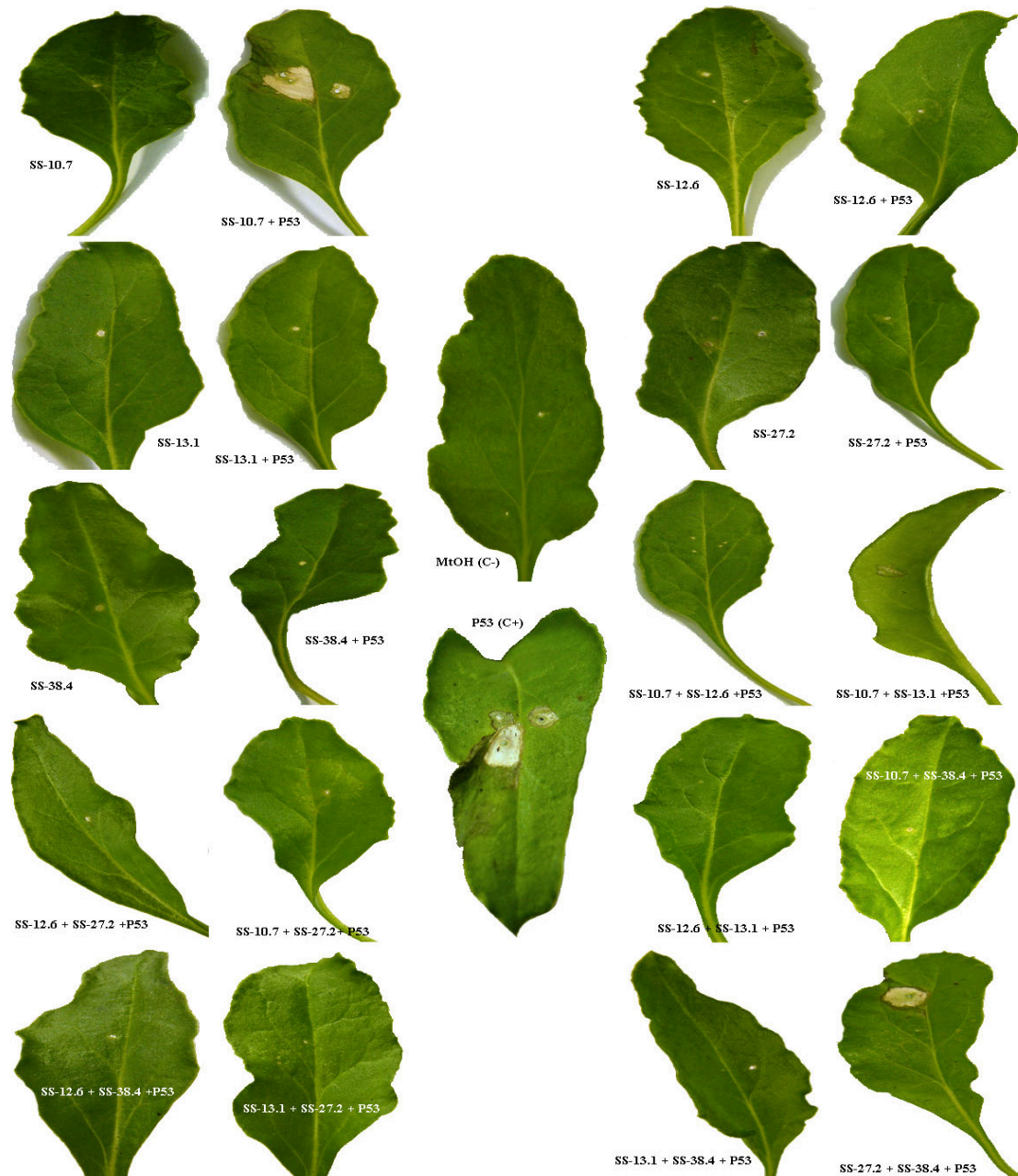
Prema analiziranim rezultatima ono što se zaključuje na prvi pogled jeste da ni u jednom ispitivanom slučaju, tretiranje pojedinačnim ekstraktima i njihovim kombinacijama ne dovodi do pojave nekrotičnih lezija na tkivu lista. Nekrotične promene promera 10 mm uočene su na listovima inokulisanim samo patogenim izolatom, što potvrđuje njegovu visoku patogenost. Listovi biljaka inokulisani smešama patogena i pojedinačnih ekstrakata SS-12.6 i SS-38.4 nisu pokazivali simptome sušenja, za razliku od smeše sa ekstraktom SS-10.7 sa uočenom nekrotičnom zonom od 7 mm.

Međutim, kada se sagledaju rezultati testiranih kombinacija, sve su pokazale izvestan međusoban antagonistički odnos u smislu slabog efekta delovanja dva ekstrakta istovremeno u poređenju sa efektom pojedinačnih ekstrakata, sem u slučaju kombinacija SS-12.6 i SS-38.4 i smeše ekstrakata SS-10.7, SS-12.6 i SS-38.4, koje su uspešno suprimirale infekciju patogenom. Kombinacija SS-10.7 i SS-12.6 je pokazala međusoban antagonistički odnos koji je zabeležen i u *in vitro* uslovima, za razliku od kombinacije SS-10.7 i SS-38.4 sa pokazanim aditivnim efektom *in vitro* i antagonističkim *in planta*. Ipak primećena je dva puta manja zona nekrotične lezije u poređenju sa testiranom SS-10.7 i SS-12.6 kombinacijom. Suprotno, smeša ekstrakata SS-10.7, SS-12.6 i SS-38.4 koja je *in vitro* pokazala značajan međusoban antagonistički odnos u poređenju sa efektima pojedinačnih ekstrakata, u *in planta* testiranju je ipak dovela do inhibicije testiranog patogena.

Kada se analiziraju preliminarni rezultati dobijeni testiranjem pojedinačnih metanolnih ekstrakata i njihovih kombinacija (Slika 28), uočljive su korelacije sa rezultatima testiranja etil-acetatnih ekstrakata. I u ovom slučaju ne dolazi do pojave nekrotičnih lezija na tkivu lista kao posledice tretiranja samim ekstraktima, dok su nekrotične promene promera 10 mm uočljive na listovima inokulisanim samo patogenom. I ovoga puta ekstrakt izolata SS-10.7 je pokazao najslabiju efiksanost u odbrani od patogena. Biljke tretirane ovim ekstraktom su imale lezije veličine 7 mm. Jedina uočena razlika u poređenju sa etil-acetatnim ekstraktima je zabeležena za kombinacije SS-10.7 i SS-12.6, kao i SS-10.7 i SS-38.4 koje su u ovom testiranju uspešno redukovale infekciju patogenom i sprečile nekrozu tkiva. To se verovatno može objasniti činjenicom da su početne koncentracije ovih metanolnih ekstrakata bile nešto više od etil-acetatnih ekstrakata. Izvestan antagonistički odnos je jedino detektovan u kombinacijama SS-10.7 i SS-13.1, sa dva puta manjom nekrotičnom lezijom od one koja je zabeležena u slučaju kombinacije SS-27.2 i SS-38.4.

Dobijeni rezultati su još jednom potvrdili potencijal lipopeptidnih jedinjenja u direktnom antagonizmu protiv bakterijskih patogena, a različiti načini ekstrakcije nisu umanjili njihovu aktivnost i način delovanja. Takođe, istrajnost u delovanju 7 i 14 dana nakon inkubacije sa patogenom, kao i odsutnost toksičnosti prema biljci, svakako

preporučuju lipopeptidne ekstrakte za dalja istraživanja u pogledu njihovog korišćenja kao biokontrolnih agenasa.



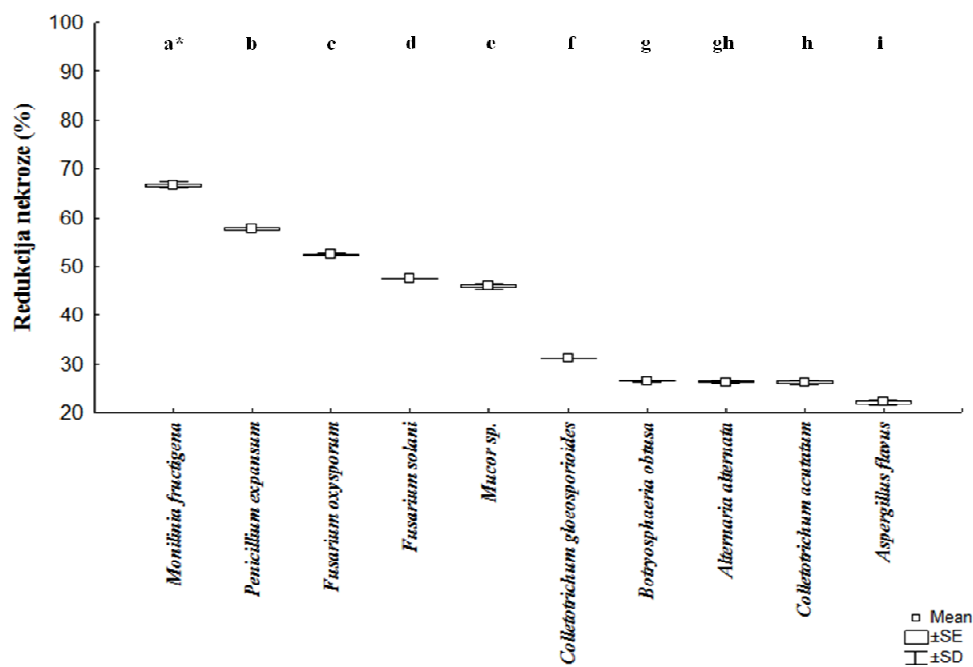
**Slika 28.** *In planta* antimikrobni efekat pojedinačnih metanolnih ekstrakata i njihovih kombinacija prema izolatu *P. syringae* pv. *aptata* 53 poreklom sa šećerne repe.

Za bakterioznu plamenjaču oraha se zna odranije (Belisario et al. 1999), ali interesovanje za njom je poraslo kada su nađene promene na plodovima voća u vidu utonulih crnih tačaka sa hlorotičnim marginama, kao i braon apikalne nekroze, slične

onima opisanim kod pegavosti oraha izazvanim *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Moragrega and Ozaktan 2010; Moragrega et al. 2011). Sa druge strane, ozbiljna bakterijska pegavost je primećena tokom 2013. godine na komercijalnim sortama šećerne repe (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*) u Vojvodini, a kao uzročnik je određena vrsta *P. syringae* pv. *aptata*. Srbija je veliki proizvođač šećerne repe u jugoistočnoj Evropi sa 62.895 hektara i 3 miliona tona prinosa šećerne repe u 2013. godini (Stojšin et al., 2014). Približno u istom periodu detektovana je epidemija bolesti na parcelama šećerne repe u američkoj državi Džordžiji, sa osnovanom sumnjom introdukcije *P. syringae* pv. *aptata* preko kontaminiranih semena (Dutta et al., 2014). Sve navedeno stavlja rezultate naše studije u fokus interesovanja i zahteva dodatna istraživanja o potencijalnim primenama u biološkoj kontroli.

Imajući u vidu sve veće zahteve u smislu redukcije post-žetvenih i skladišnih patogena, a naročito fungalnih, sledeći deo ovog rada se odnosio na dokazivanje potencijala etil-acetatnog ekstrakta odabranog izolata SS-12.6 u biokontroli patogena izolovanih upravo sa ubranih plodova voća i povrća. Ranije je pokazano da post-žetveni gubici usled propadanja, mogu narasti do 50% bez tretmana fungicidima, dok se nakon tretmana post-žetvenim fungicidima ti gubici mogu svesti na 5-10% (Margosan et al., 1997). Međutim, kako upotreba sintetičkih fungicida postaje sve ograničenija zbog javnog zdravlja i zaštite životne sredine, neophodno je razviti alternativne tretmane koji će zameniti postojeće, a biti manje rizični za životnu sredinu i zadovoljiti zahteve potrošača. U ranijim istraživanjima je pokazano da antagonisti roda *Bacillus* poseduju veliki potencijal u smislu značajne redukcije rasta micelija fungalnih patogena (Yoshida et al., 2001; Touré et al., 2004; Wang et al., 2007), što se poklapa i sa rezultatima ove studije u *in vitro* uslovima. Takođe je poznato i da *Bacillus* izolati mogu formirati biofilmove na površinama plodova voća u vidu višćelijskog matriksa glikokaliksa, koji se ponaša kao fizička anjonska barijera u vidu zaštite ploda od spoljnih agenasa (Jeyasekaran et al., 2000).

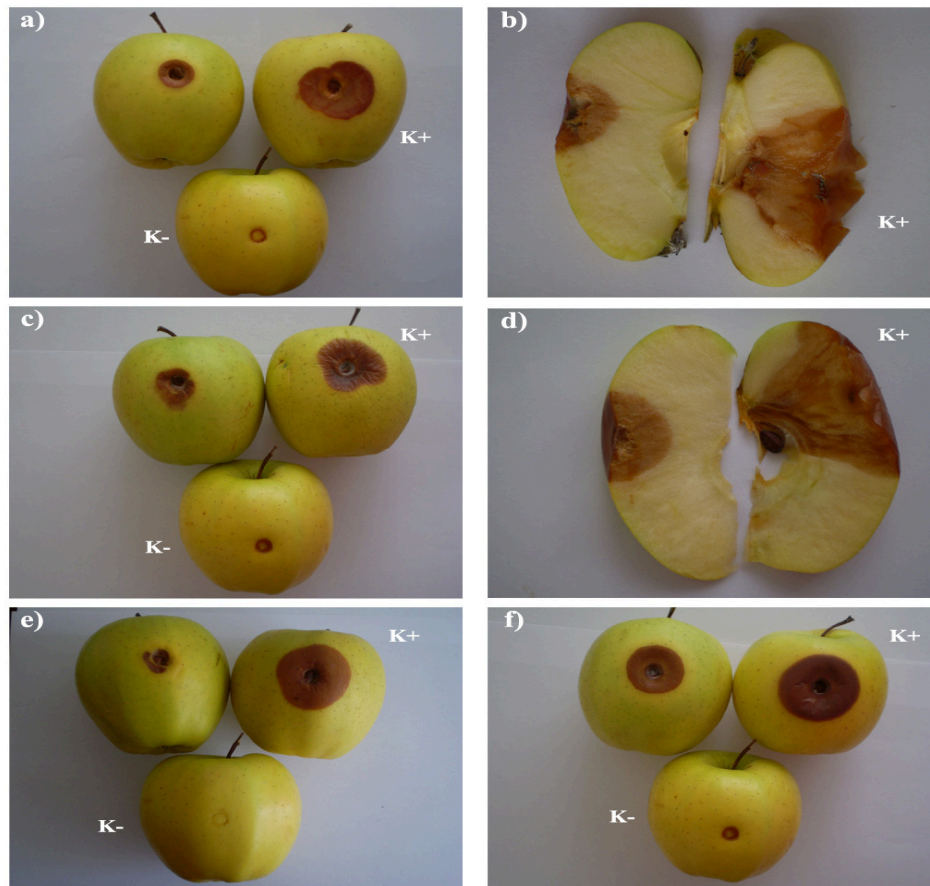
U ovom biokontrolnom testu, plodovi jabuka, sorte „Zlatni Delišes“ su inokulisani lipopeptidnim ekstraktom zajedno sa fungalnim patogenim vrstama poreklom sa različitih plodova voća i povrća. Rezultati redukcije nekroze tkiva plodova jabuka su prikazani na Slici 29.



**Slika 29.** Efekat etil-acetatnog ekstrakta SS-12.6 na nekrozu ploda jabuke izazvanu gljivama. Srednja vrednost (eng. Mean) procenata inhibicije rasta micelija, standardna greška (SE) i devijacija (SD) su prikazani. \*Vrednosti praćene istim slovom nisu statistički značajne ( $P < 0.05$ ), prema Dankanovom testu višestrukog opsega.

Kao što se može videti sa Slike 29, značajna redukcija nekroze uzrokovane ovim post-žetvenim patogenima je dobijena za izolate *M. fructigena* (67%), *P. expansum* (58%), *F. oxysporum* (52%), *F. solani* (47%) i *Mucor sp.* (46%) u poređenju sa pozitivnom kontrolom, inokulisanom samo patogenima. Sa druge strane, za razliku od dobrih rezultata u *in vitro* uslovima, umeren ili čak slab antifungalni efekat je zabeležen za ostale gljive. Ipak, incidenca oboljenja plodova tretiranih ekstraktom je bila statistički značajno niža od one kod kontrolnih plodova ( $P < 0.05$ ), za sve testirane gljive.

Na Slici 30. je prikazan efekat etil-acetatnog ekstrakta na redukciju truljenja plodova jabuka izazvanog fungalnim infekcijama. Kao što se može primetiti, protektivni efekat etil-acetatnog ekstrakta je vidljiv ne samo na površini tretiranih plodova jabuke, već i duboko unutar tkiva što se može videti na poprečnom preseku plodova.



**Slika 30.** *In planta* efekat etil-acetatnog ekstrakata SS-12.6 na fungalnu infekciju na plodovima jabuke. Plodovi jabuka inokulisani konidijalnom suspenzijom *P. expansum* (a i b), *F. oxysporum* (c i d), *M. fructigena* (e) i *Mucor* sp. (f) i ekstraktom; (K+) pozitivna kontrola, plodovi inokulisani fungalnom konidijalnom suspenzijom; (K-) negativna kontrola, plodovi inokulisani sterilnom destilovanom vodom bez etil-acetatnog ekstrakata.

U zaključku se može istaći, da je smanjenje nekroze na plodovima jabuke prouzrokovane post-žetvenim fungalnim patogenima zabeleženo za sve testirane gljive. Odličan rezultat je dobijen za *M. fructigena* kako u *in vitro* tako i u *in planta* uslovima, sa preko 66% ispoljene inhibicije nekroze. Takođe, veoma obećavajući rezultati u smanjenju nekroze tkiva plodova indukovane od strane *P. expansum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Mucor* sp., *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* su dobijeni u *in vitro* uslovima, dok su pokazali značajnu otpornost u *in planta* uslovima. U cilju zaštite od post-žetvenih bolesti, *B. subtilis* GA1 soj koji efikasno proizvodi lipopeptidna jedinjenja iz tri različite familije, a naročito širok spektar fengicina je upotrebljavan u kontroli sive plesni

uzrokovane *B. cinerea* na plodovima jabuka (Touré et al., 2004). Za fengicin je takođe zabeležena antagonistička aktivnost protiv *F. graminearum* (Wang et al., 2007) kao i za iturin protiv izazivača antraknoze, *C. dematium* (Hiradate et al., 2002), *P. roqueforti* (Chitarra et al., 2003), *A. flavus* (Moyné et al., 2001) i *R. solani* (Yu et al., 2002). U mnogim slučajevima je pokazano da ili pune kulture ćelija ili suspenzija spora mogu biti veoma efikasne protiv post-žetvenih fungalnih infekcija (Casals et al., 2012). Međutim, kada je u pitanju njihovo korišćenje u skladištima, to ponekad zahteva izmenu uslova skladištenja u korist mikroorganizama antagonista (Janisiewicz and Korsten, 2002; Sharma et al., 2009). Primena lipopeptidnih ekstrakta umesto kultura ćelija ne zahteva ovakve modifikacije.

#### **4.3.8 IZOLACIJA I PREČIŠĆAVANJE LIPOPEPTIDNIH EKSTRAKATA I NJIHOVA KARAKTERIZACIJA MASENOM SPEKTROMETRIJOM**

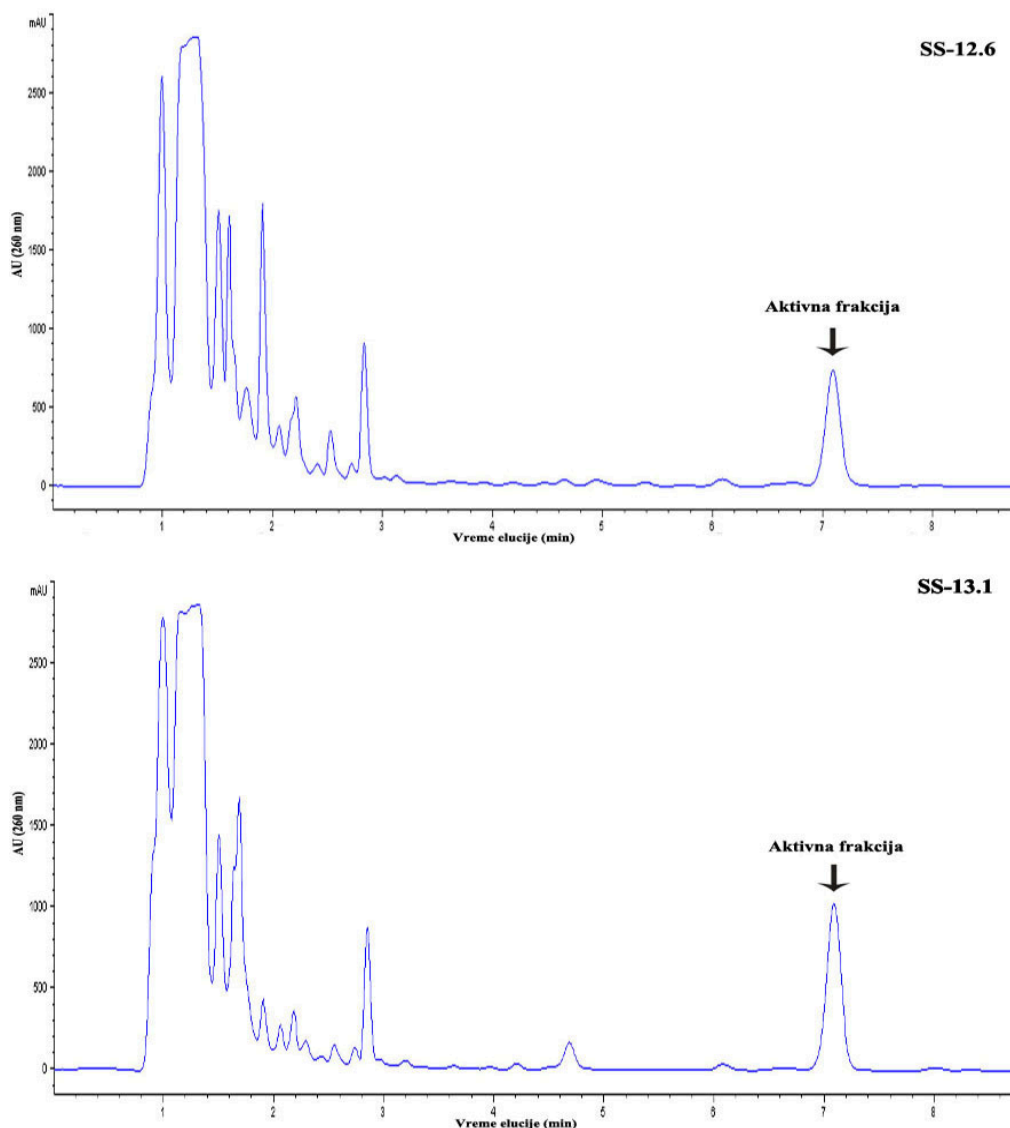
Direktni antagonizam prema fitopatogenima je ključni biokontrolni mehanizam i zavisi od efikasne proizvodnje antibiotika. U raznolikom antibiому *Bacillus* izolata, familije cikličnih lipopeptida poput surfaktina, iturina i fengicina su veoma interesantne, ne samo zbog toga što se proizvode u velikoj količini pod *in vitro* uslovima u bioreaktorima u slučaju *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens* sojeva, već i zato što predstavljaju glavne antimikrobne supstance koje se mogu izlučiti u biološki relevantnim količinama pod prirodnim uslovima rasta u rizosferi (Kinsella et al., 2009; Nihorimbere et al., 2012; Dietel et al., 2013; Debois et al., 2014). Hemijske strukture, biosinteza i svojstva ovih neribozomalno sintetisanih peptidnih antibiotika su već poznate (Stein, 2005). Iturini i surfaktini su ciklični lipoheptapeptidi koji sadrže integralnu 3-amino ili 3-hidroksi acil grupu. Specifični ostaci u peptidnom delu su značajno različiti kod iturinske i surfaktinske familije. Glavni iturini A i B razlikuju se na ostatku 1 (L-Asn ili L-Asp, respektivno), a srodni bacilomicini, imaju značajnu strukturnu raznovrsnost. Ostaci poput D-Tyr-2, D-Asn-3, i L-Thr/L-Ser-7 se nalaze u vidu konzerviranih motiva kod obe familije, ali bacilomicini D, F, i L se takođe razlikuju i u ostacima 1, 4, 5 i 6. Surfaktini se sastoje od konzerviranog niza aminokiselina L-Glu-1, L-Leu-2, D-Leu-3, L-Val-4, L-Asp-5, D-Leu-6, sa jedinom raznolikošću u okviru sedmog aminokiselinskog ostatka na poziciji 7 (L-Leu, L-Val, ili L-Ile za surfactine A, B i C, respektivno). Ove strukturne razlike se nalaze u osnovi



odgovarajućih antifungalnih i antibakterijskih svojstava iturina (bacillomicina) i surfaktina (Stein, 2005). Dužina lanaca masnih kiselina varira od C<sub>13</sub> do C<sub>16</sub> u slučaju surfaktina i od C<sub>14</sub> do C<sub>19</sub> u slučaju iturinske familije (Vater et al., 2002). Nedavno je i nova klasa niže mase (oko 900 Da) lipopeptida okarakterisana kao kurstakinska familija koju karakteriše unutrašnja laktonska veza između C-terminusa i unutrašnjeg Ser ostatka (Hathout et al., 2000; Bechet et al., 2012). Fengicine, ciklične lipodekapeptide karakteriše estarska veza između C-terminalnog Ile ostatka i fenolne grupe D-Tyr, trećeg ostatka u peptidnom lancu (Price et al., 2007). Kao i većina drugih lipopeptida fengicini su terminalno N-acilovani β-hidroksi masnom kiselinom i mogu sadržati 14-18 atoma ugljenika (Ongena et al., 2005).

Početna istraživanja u ovom segmentu su podrazumevala izolaciju aktivnih lipopeptidnih supstanci iz prekonocnih kultura izolata (tj., iz besćelijskih supernatanata) SS-12.6 i SS-13.1 korišćenjem etil-acetatne ekstrakcije. Sve frakcije koje su dobijene posle hromatografije testirane su na antimikrobnu aktivnost protiv *X. arboricola* 301. Antimikrobna aktivnost je detektovana u jednom piknu, u drugoj polovini hromatograma u slučaju oba izolata sa vremenom elucije aktivnog pika sa nešto više od 7 min (Slika 31).

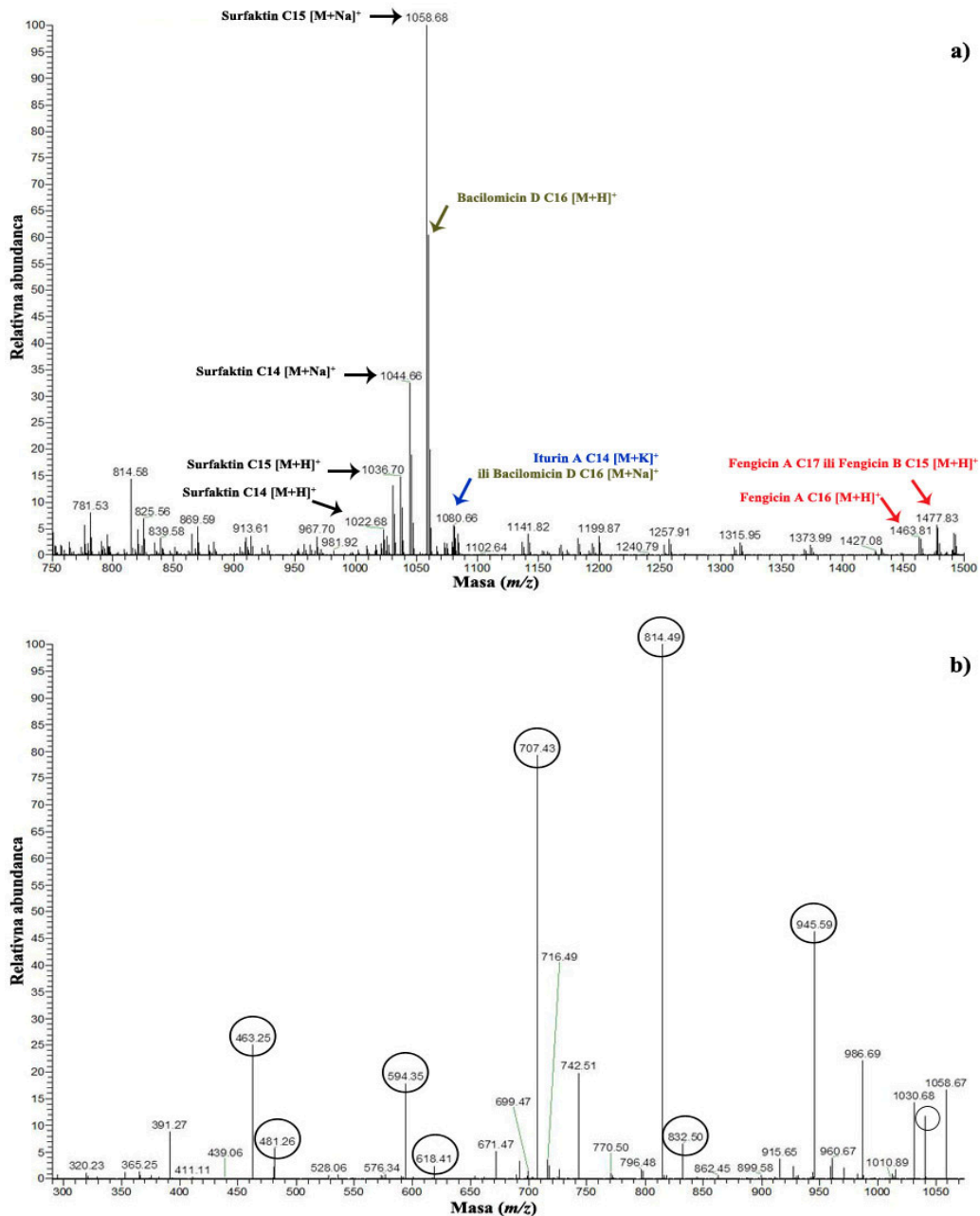
Dalja analiza aktivnog eluata podrazumevala je masenu spektrometriju sa Orbitrap hibridnim masenim spektrometrom (Linear Trap Quadrupole (LTQ) Orbitrap XL), u pozitivnom modu. Maseni spektar je sniman u opsegu odnosa  $m/z$  750-1500. Masenom spektrometrijom ekstrakta izolata SS-12.6 je utvrđeno prisustvo osam jedinjenja sa molekulskom masom u opsegu od 781.5 do 1477.8 Da (Slika 32a). Upoređujući mase sa masama do tada otkrivenih lipopeptidnih kompleksa iz drugih *Bacillus* sojeva (Vater et al., 2002; Cho et al., 2003; Mukherjee and Das, 2005; Ongena et al., 2005; Price et al., 2007; Arguelles-Arias et al., 2009; Athukorala et al., 2009; Kim et al., 2010; de Faria et al., 2011; Velho et al., 2011; Bechet et al., 2012; Villegas-Escobar et al., 2013; Cawoy et al., 2015), glavni lipopeptidni proizvodi ovog izolata se mogu identifikovati kao protonizovani i natrijumovi adukti surfaktina (C<sub>14</sub> i C<sub>15</sub>) i bacilomicina D (C<sub>16</sub>) ili u vidu kalijumovog adukta iturina A (C<sub>14</sub>), a takođe su sa manjim intenzitetom uočeni i protonizovani adukti fengicina A (C<sub>16</sub> i C<sub>17</sub>) ili fengicina B (C<sub>15</sub>).



**Slika 31.** HPLC hromatogram aktivne frakcije etil-acetatne frakcije iz supernatanta izolata SS-12.6 i SS-13.1. Kolona HPLC ZORBAX Eclipse Plus C18. Eluent: acetonitril i 10 mM amonijum acetata (40:60, v/v) sa protokom od 1 ml/min. Detekcija na 260 nm.

Naime, fengicini se sastoje od dve izoforme, fengicina A i B, koje se razlikuju po svojim aminokiselinskim sekvencama. Fengicin A poseduje Ala na poziciji 6, dok je kod fengicina B aminokiselinski ostatak Val na istoj poziciji. Različita homologna jedinjenja svake lipopeptidne familije obično se koproizvode u istom bakterijskom soju (Ceri et al., 2013). Interesantan je i podatak da su jedinjenja iz fengicinske familije detektovana ovom metodom, što je u suprotnosti sa podacima dobijenim u genetičkom skriningu cele kolekcije, gde nismo uspeali da umnožimo gen za fengicin sintetazu sa ponuđenim prajmerima. Na sličan problem su ukazala i skorašnja istraživanja kod kojih

je zabeležen nedostatak gena za proizvodnju surfaktina (Benitez et al., 2010) ili fengicina čiji se gen nije amplifikovao ni korišćenjem 7 različitih para prajmera (Athukorala et al., 2009), a čije je prisustvo ipak detektovano masenom spektrometrijom.



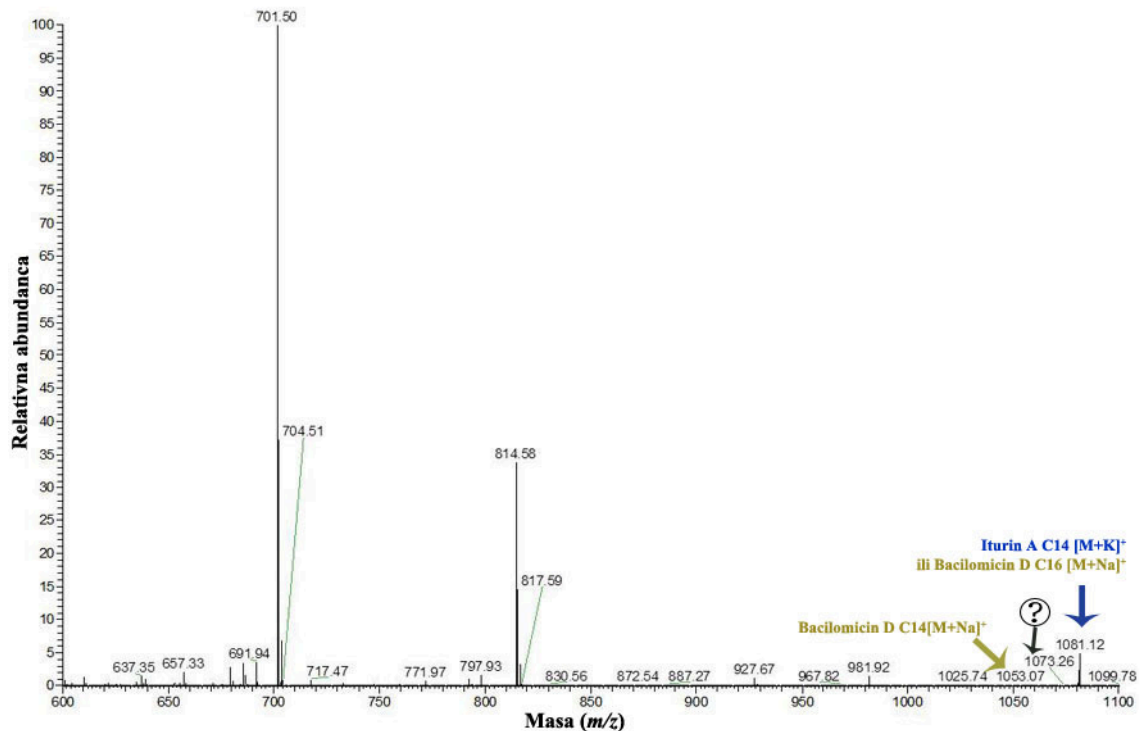
**Slika 32.** Maseni spektar aktivnog pika etil-acetatnog ekstrakta SS-12.6 dobijenog reverzno-faznom HPLC hromatografijom (a) i maseni spektar prekursorskog jona  $m/z$  1058.68 (b). Zaokružene vrednosti predstavljaju komponente pika nastale otvaranjem laktonskog prstena.

Zabeležena masa prekursorskog jona sa najvećim intenzitetom ( $m/z=1058.68$ ) je uzeta za fragmentacionu analizu masenom spektrometrijom. Rezultati takve analize se poklopili sa rezultatima dobijenim fragmentacijom pika identične mase opisanom u patentnoj dokumentaciji izolata *B. licheniformis* V9T14 (Ceri et al., 2013). Proizvodi prekursorskog jona natrijumovog adukta surfaktina  $m/z$  1058.7 su predstavljeni sledećim vrednostima  $m/z$ : 1040.4, 945.6, 832.5, 814.5, 618.4, 707.4, 594.4, 481.3, 463.3 (Slika 32b). Jonu mase 1040.4 odgovara gubitak vode (-18 Da) iz pika  $m/z$  1058.6. Ostali joni se mogu identifikovati i svrstati u dve serije nastale otvaranjem laktonskog prstena, pa tako jedna sadrži lanac masnih kiselina ( $m/z$  945.6, 832.5, 814.5, 618.4), dok se druga odnosi samo na peptidni deo ( $m/z$  707.4, 594.4, 481.3, 463.3). Produktu  $m/z$  945.6 odgovara gubitak Leu (-113 Da) iz prekursorskog jona, dok produktu  $m/z$  832.5 odgovara gubitak Leu (-113 Da) iz produktnog jona 945.5  $m/z$ . Jonu  $m/z$  814.3 odgovara gubitak Leu-Leu-H<sub>2</sub>O (-244 Da) iz prekursorskog jona  $m/z$  1058.6, dok jonu mase na 618.4 odgovara gubitak Asp-Val- (-214 Da) iz produktnog jona  $m/z$  832.5. Produktni jon mase 707.4 odgovara gubitku C15 lanca  $\beta$ -hidroksi masne kiseline-Glu (-352 Da) iz prekursorskog jona 1058.6, dok jon  $m/z$  594.4 odgovara uzastopnim gubitkom 1 Leu (-113 Da), jon  $m/z$  481.3 odgovara gubitku drugog Leu (-113 Da), a jon na  $m/z$  463.3 gubitku Leu-H<sub>2</sub>O (-131 Da).

Analizirani pik sa HPLC etil-acetatnog ekstrakta SS-13.1 pokazuje drugačiji spektar (Slika 33).

Sa prikazanog spektra se može videti da su zastupljeni prekursori joni  $m/z$  701.5 i 814.6 sa visokim afinitetom, praćeni pikovima manjeg intenziteta od 704.5 i 817.6, respektivno. Upoređujući navedene mase pikova najviših intenziteta sa dostupnim literaturnim podacima, nije pronađeno ni jedno lipopeptidno jedinjenje u tom opsegu masa, a preliminarnom fragmentacijom se ipak naslućuje moguće peptidno poreklo i da su ovi pikovi zapravo produkti joni prekursornog jona određenog lipopeptida iz familije iturina ili surfaktina. Naime, pokazano je da kod jedinjenja sličnih surfaktinu, koji produkuje *Bacillus pumilus* (1036 Da), dolazi do prekida cikličnih struktura što rezultuje molekulima čija molekulska masa varira od 394 do 968 Da (Kalinovskaya et al., 2002). Takođe, na spektru se uočavaju i pikovi manjeg intenziteta koji po masama odgovaraju natrijumovim aduktima bacilomicina D sa

dužinama alifatičnog lanca od C14 i C16 (Athukorala et al., 2009; Gond et al., 2014) ili kada je u pitanju pik  $m/z$  1081.1 moglo bi se pretpostaviti da je u pitanju kalijumov adukt iturina A (C14) jer je veoma sličan vrednosti mase od 1081.57 koji je prijavljen ranije (Kim et al., 2010; Cawoy et al. 2015).



**Slika 33.** Maseni spektar aktivnog pika etil-acetatnog ekstrakta SS-13.1 dobijenog reverzno-faznom HPLC hromatografijom.

Ovakvi problemi su uočeni i u ranijim istraživanjima jer su mase jedinjenja toliko slične i veoma često se razlikuju za manje od 1 Da, što je u rangu mase protona (Chen et al., 2008; Benitez et al., 2010). Za detektovani pik vrednosti  $m/z$  1073.3 u našem slučaju, se može uočiti da je između opsega masa natrijumovog (1072.7) i kalijumovog adukta (1074.6) surfaktina A, kako je zabeleženo ranije (Symmank et al. 2002; Athukorala et al., 2009).

Strukturna karakterizacija određenih metabolita, pored molekularno genetičkih pokazatelja sposobnosti njihove proizvodnje, zahteva i tehnike koje uključuju strukturnu analizu visoke rezolucije kao što su napredne hemotaksonomske metode masene spektrometrije. Analitička metoda poput „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-

Time Of Flight“ (MALDI-TOF) masena spektrometrija pokazala se vrlo efikasnom u detekciji i identifikaciji različitih antimikrobnih supstanci, uključujući i analizu lipopeptidnih molekula iz različitih ekstrakata, sirovih filtrata kultura i celih ćelija (Vater et al., 2002; Athukorala et al., 2009). Na ovaj način informacije o sekundarnim metabolitima proizvedenim od strane mikroorganizma, mogu se dobiti vrlo brzo i sa visokom preciznošću, bez potrebe za frakcionisanjem i prečišćavanjem detektovanih jedinjenja.

Ova studija je imala za cilj i istraživanje kako različiti načini ekstrakcije lipopeptida, utiču na njihov prinos i tj., odabir najboljeg načina ekstrakcije za dalju upotrebu sa istovremenom karakterizacijom detektovanih jedinjenja. Pet dokazanih proizvođača lipopeptida (SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2, SS-38.4) su gajeni pod prethodno utvrđenim uslovima u LB medijumu i testirani su ekstrakti dobijeni etil-acetatnom ekstrakcijom i kombinacijom kiselinske precipitacije praćene metanolnom ekstrakcijom. Takođe, ispitivani su i besćelijski supernatanti u obliku vodenih ekstrakata. Tako dobijeni ekstrakti su podvrgnuti MALDI-TOF analizi u masovnom opsegu 800-1700 Da sa pozitivnom jonskom detekcijom i reflektorskim modom operacije. Kao pozitivna kontrola je korišćen LB medijum čije su karakteristike analizirane pod istim uslovima, da bi mogli da se otklone pikovi sumnjivih masa detektovanih u ekstraktima, a naročito u supernatantima testiranih izolata (Prilog 9). Iz prikazanih rezultata spektra LB medijuma vidljivo je da se u analiziranim opsezima masa nalaze pikovi sličnih masa lipopeptidnih jedinjenja. Takođe, primećeni su i pikovi masa 861.0, 862.0, 883.2, 1001.0, 1123.1, 1124.1, 1154.7, 1174.1, 1196.1 i 1197.1 Da visokog intenziteta, koji su sveprisutni u određenim spektrima testiranih ekstrakata, a naročito supernatantata SS-12.6 i SS-13.1 i kao takvi nisu uzimani u dalje razmatranje. Analizirani maseni spektri svih testiranih ekstrakata, a naročito u slučaju izolata SS-10.7, SS-27.2 i SS-38.4 jasno su pokazali tri odvojena klastera sa masenim opsezima od: 850-950  $m/z$  koji odgovara masama predstavnika kurstakinske familije, zatim 1000-1150  $m/z$  koji uključuje predstavnike surfaktinske i iturinske familije i opsega od 1450-1550  $m/z$  koji predstavlja klaster masa fengicinske familije (Prilozi 10-12). U slučaju izolata SS-13.1 ni u jednom od testiranih ekstrakata nije došlo do izdvajanja klastera pikova u masenom rangu fengicinske familije, što je potvrdilo rezultate PCR „skrininga“ na početku ove studije, gde je detekcija gena fengicin sintetaze izostala.

Posmatrajući dobijene spektre postaje odmah uočljivo da je prinos, odnosno intenzitet dobijenih pikova najviši za ekstrakte dobijene etil-acetatnom ekstrakcijom. Na to je ukazala i pažljiva analiza pojedinačnih spektara svih izolata i načina ekstrakcije, sa pokušajem preliminarne karakterizacije jedinjenja bez fragmentacije pikova, već upoređivanjem dobijenih masa sa masama prijavljenih za lipopeptidne komplekse iz drugih *Bacillus* sojeva. Upoređivanjem ostvarenih intenziteta u svim ispitivanim ekstraktima svakog izolata dobijeni su preliminarni podaci o zastupljenosti i količini pretpostavljenih jedinjenja, analiziranjem uvećanih centroidnih delova spektra u opsegu dobijenih klastera. Ekstrakti izolata SS-12.6 i SS-13.1 dobijeni kiselinom precipitacijom i metanolnom ekstrakcijom nisu podvrgnuti ovoj vrsti analize intenziteta masa, jer su preliminarni rezultati ukazivali na neuspešnu ekstrakciju ili neki drugi problem. Rezultati detaljne analize intenziteta masa spektara besćelijskog supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-10.7 (Prilog 13) sa pretpostavljenim lipopeptidnim jedinjenjima su prikazani u Tabeli 16.

**Tabela 16.** Analiza intenziteta masa pretpostavljenih lipopeptidnih jedinjenja prema masenim spektrima supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-10.7.

Izolat SS-10.7						
m/z	Supernatant	Intenzitet (%)		Pretpostavljeni lipopeptid	Komparacija masa pretpostavljenih lipopeptida	
		HCl-MtOH	Etil-acetat		m/z	Literaturni podaci
916.2	×	×	10,31	Kurstakin C11 [M+K] <sup>+</sup> cikl.	916.5	Bechet et al., 2012
1031.3	46,12	30,17	49,48	Bacilomicin D C14 [M+H] <sup>+</sup>	1031.5	Athukorala et al., 2009
				Surfaktin A C13 [M+Na] <sup>+</sup>	1030.8	Arguelles-Arias et al., 2009
1046.3	26,37	15,58	22,93	Surfaktin A C13 [M+K] <sup>+</sup>	1046.6	Mukherjee and Das, 2005; Athukorala et al., 2009
					1046.7	Symmank et al., 2002; Vater et al., 2002
<b>1059.4</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	Bacilomicin D C16 [M+H] <sup>+</sup>	1059.6	Athukorala et al., 2009
				Surfaktin A C15 [M+Na] <sup>+</sup>	1059.1	Velho et al., 2011
					1060.6 i 1060.8	Athukorala et al., 2009; Velho et al., 2011
1060.4	67,96	67,68	80,07	Surfaktin A C14 [M+K] <sup>+</sup>	1060.7	Vater et al., 2002 i 2009
					1060.5	Mukherjee and Das, 2005
1075.3	26,37	24,93	18,88	Surfaktin A C15 [M+K] <sup>+</sup>	1075.1	Velho et al., 2011
1081.4	18,20	12,56	34,12	Bacilomicin D C16 [M+Na] <sup>+</sup>	1081.6	Athukorala et al., 2009
				Iturin A C14 [M+K] <sup>+</sup>	1081.6	Cawoy et al., 2015
1500.6	10,55	7,64	44,87	Ala-6 Fengicin C17 [M+Na] <sup>+</sup>	1499.9	Vater et al., 2002; Arguelles-Arias et al., 2009
				Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1501.7	Athukorala et al., 2009
1501.5	8,91	7,28	40,70	Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1501.8	Vater et al., 2002
				Ala-6 Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1501.9	Arguelles-Arias et al., 2009
				Fengicin B C14 [M+K] <sup>+</sup>	1501.8	Cawoy et al., 2015
1529.6	8,57	6,13	31,95	Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1529.7	Athukorala et al., 2009
				Val-6 Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1529.9	Arguelles-Arias et al., 2009

Najdominantije detektovano jedinjenje zabeležene mase od 1059.4 Da sa intenzitetom od 100% u svim ekstraktima ukazuje da je reč najverovatnije o protonizovanom aduktu bacilomicina D, dužine alifatičnog lanca od 15 ugljenikovih atoma, iako je takođe literaturno prijavljena i bliska  $m/z$  vrednost za natrijumov adukt surfaktina A iste dužine alifatičnog lanca. Takođe, sa visokim intenzitetom pika je detektovan i kalijumov adukt surfaktina sa jednim ugljenikovim atomom manje, čija se  $m/z$  vrednost poklapa sa literaturno opisanim jedinjenjem sa prihvatljivim odstupanjem u granici greške mernog uređaja. Zanimljivo je istaći da je jedino u etil-acetatnom ekstraktu detektovan pik koji odgovara masi cikličnog kurstakina C11, što se ne podudara sa rezultatima „skrininga” prisustva kurstakinskog operona na početku ove studije. Kako su korišćeni izrođeni prajmeri, pored podataka o preciznim masama pomenutih jedinjenja koji su veoma oskudni, ovaj rezultat treba uzeti za rezervom, a naročito jer je intenzitet detektovanog jedinjenja tek nešto iznad 10%. Primećuje se još da su u ispitivanom klasteru masa koji odgovara iturinskoj i surfaktinskoj porodici zastupljeni adukti surfaktina i bacilomicina D različitih dužina alifatičnih lanaca, ali pored njih se nalazi i pik sa intenzitetom većim od 34% čija se karakterizacija može smatrati ambivalentnom budući da su prijavljene iste vrednosti  $m/z$  od 1081.6, koje odgovaraju bacilomicinu D i iturinu A različitih dužina alifatičnih lanaca. U svakom slučaju, detaljnom fragmentacijom pikova i njihovom daljom analizom slične situacije se mogu razrešiti i potvrditi prisustvo pravog jedinjenja bez ikakve sumnje. Najintenzivniji pik predstavnika fengicinske porodice je detektovan kod pretpostavljenog natrijumovog adukta C17 fengicina sa položajem alaninskog ostatka na poziciji 6 peptidnog dela molekula. Imajući u vidu cilj ovog dela istraživanja, pokazano je da je kod skoro svih detektovanih pikova intenzitet bio značajno viši kod ekstrakta dobijenog etil-acetatnom ekstrakcijom, za razliku od metanolne koja je u određenim slučajevima smanjila prinos detektovanih jedinjenja. Ovaj podatak svakako favorizuje etil-acetatnu ekstrakciju kao vid dodatnog prečišćavanja i koncentrovanja lipopeptidnih jedinjenja.

Slični rezultati su zabeleženi i kod ispitivanja ekstrakata izolata SS-27.2 i SS-38.4. Lipopeptidna mešavina ekstrakata SS-27.2 je uglavnom bila sačinjena od adukata bacilomicina D i surfaktina sudeći prema literaturnim podacima (Tabela 17, Prilog 14). Kao i u prethodnom slučaju, teško je zasigurno reći da li je reč o datom jedinjenju budući da se mase dobijenih adukata razlikuju za red veličine  $m/z$  od 0.1-0.5. U svakom



slučaju, detektovano jedinjenje najjačeg intenziteta je najverovatnije protonizovani adukt bacilomicina D C16, a sa nešto nižim intenzitetom od 90% primećen je i kalijumov adukt surfaktina sa dužinom lanca od 14C atoma. Ono što razlikuje ovaj soj od prethodno opisanog jesu intenziteti pikova surfaktinske i iturinske familije sa značajnije višim vrednostima, kao i primećena raznolikost fengicinskih, uglavnom kalijumovih adukata sa dva puta nižim intenzitetima nego u SS-10.7 izolatu.

**Tabela 17.** Analiza intenziteta masa pretpostavljenih lipopeptidnih jedinjenja prema masenim spektrima supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-27.2.

Izolat SS-27.2						
m/z	Supernatant	Intenzitet (%)		Pretpostavljeni lipopeptid	Komparacija masa pretpostavljenih lipopeptida	
		HCl-MtOH	Etil-acetat		m/z	Literatumi podaci
916.3	×	3,75	2,75	Kurstakin C11 [M+K] <sup>+</sup> cikl.	916.5	Bechet et al., 2012
954.6	×	×	4,69	Kurstakin iC14 [-OH(3)] lin.	953.5	Abderrahmani et al., 2011
1031.4	19,26	15,28	52,69	Bacilomicin D C14 [M+H] <sup>+</sup>	1031.5	Athukorala et al., 2009
				Surfaktin A C13 [M+Na] <sup>+</sup>	1030.8	Arguelles-Arias et al., 2009
1045.4	67,80	51,08	69,86	Bacilomicin D C15 [M+H] <sup>+</sup>	1045.6	Athukorala et al., 2009
				Surfaktin A C14 [M+Na] <sup>+</sup>	1045.1	Velho et al., 2011
1046.4	43,53	31,11	54,19	Surfaktin A C13 [M+K] <sup>+</sup>	1046.6	Mukherjee and Das, 2005; Athukorala et al., 2009
					1046.7	Symmank et al., 2002; Vater et al., 2002
<b>1059.4</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	Bacilomicin D C16 [M+H] <sup>+</sup>	1059.6	Athukorala et al., 2009
				Surfaktin A C15 [M+Na] <sup>+</sup>	1059.1	Velho et al., 2011
					1060.6 i 1060.8	Athukorala et al., 2009; Velho et al., 2011
1060.4	67,11	59,54	89,43	Surfaktin A C14 [M+K] <sup>+</sup>	1060.7	Vater et al., 2002 i 2009
					1060.5	Mukherjee and Das, 2005
1075.4	22,26	27,09	27,58	Surfaktin A C15 [M+K] <sup>+</sup>	1075.1	Velho et al., 2011
1081.4	19,85	10,78	44,27	Bacilomicin D C16 [M+Na] <sup>+</sup>	1081.6	Athukorala et al., 2009
				Iturin A C14 [M+K] <sup>+</sup>	1081.6	Cawoy et al., 2015
1464.7	×	18,77	4,27	Fengicin A C16 [M+H] <sup>+</sup>	1464.1	Malfanova et al., 2012
					1464.0	Velho et al., 2011
1486.6	11,86	12,19	12,37	Fengicin C16 [M+Na] <sup>+</sup>	1485.8	Vater et al., 2002
				Fengicin B C14 [M+Na] <sup>+</sup>	1485.8	Cawoy et al., 2015
1487.7	10,48	10,02	10,14	Ala-6 Fengicin C15 [M+K] <sup>+</sup>	1487.9	Arguelles-Arias et al., 2009
1500.6	13,06	13,14	21,56	Ala-6 Fengicin C17 [M+Na] <sup>+</sup>	1499.9	Vater et al., 2002; Arguelles-Arias et al., 2009
				Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1501.7	Athukorala et al., 2009
1501.6	11,77	12,01	18,50	Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1501.8	Vater et al., 2002
				Ala-6 Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1501.9	Arguelles-Arias et al., 2009
				Fengicin B C14 [M+K] <sup>+</sup>	1501.8	Cawoy et al., 2015
1515.7	7,86	8,70	6,49	Ala-6 Fengicin C17 [M+K] <sup>+</sup>	1515.9	Vater et al., 2002; Arguelles-Arias et al., 2009
				Fengicin C17 [M+K] <sup>+</sup>	1515.7	Athukorala et al., 2009
1529.7	7,67	7,79	8,40	Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1529.7	Athukorala et al., 2009
				Val-6 Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1529.9	Arguelles-Arias et al., 2009

Takođe, osim pomenutog pretpostavljenog cikličnog kurstakinskog jedinjenja, čije je prisustvo detektovano i u metanolnom ekstraktu SS-27.2 izolata nešto višeg intenziteta, zabeležen je i pik za koji bi se moglo reći da ukazuje na prisustvo i linearnih

formi ove familije. Njihovo prisustvo međutim nije zabeleženo u supernatantima, a podaci „skringinga” potvrđuju mogućnost njihove sinteze.

Lipopeptidna mešavina ekstrakata SS-38.4 je dala veoma slične rezultate kao izolat SS-27.2, ali sa većim intenzitetom dobijenih pikova, naročito u ispitivanom masenom klasteru fengicinske familije (Tabela 18, Prilog 15).

**Tabela 18.** Analiza intenziteta masa pretpostavljenih lipopeptidnih jedinjenja prema masenim spektrima supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-38.4.

m/z	Intenzitet (%)			Pretpostavljeni lipopeptid	Komparacija masa pretpostavljenih lipopeptida	
	Supernatant	HCl-MtOH	Etil-acetat		m/z	Literaturni podaci
916.3	4,76	×	2,74	Kurstakin C11 [M+K] <sup>+</sup> cik	916.5	Bechet et al., 2012
954.5	×	×	4,25	Kurstakin iC14 [-OH(3)] I	953.5	Abderrahmani et al., 2011
1031.4	27,69	24,05	56,87	Bacilomicin D C14 [M+H] Surfaktin A C13 [M+Na] <sup>+</sup>	1031.5 1030.8	Athukorala et al., 2009 Arguelles-Arias et al., 2009
1045.4	64,84	53,27	73,25	Bacilomicin D C15 [M+H] Surfaktin A C14 [M+Na] <sup>+</sup>	1045.6 1045.1	Athukorala et al., 2009 Velho et al., 2011
1046.4	46,11	32,91	56,10	Surfaktin A C13 [M+K] <sup>+</sup>	1046.6 1046.7	Mukherjee and Das, 2005; Athukorala et al., 2009 Symmank et al., 2002; Vater et al., 2002
<b>1059.5</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	Bacilomicin D C16 [M+H] Surfaktin A C15 [M+Na] <sup>+</sup>	1059.6 1059.1	Athukorala et al., 2009 Velho et al., 2011
1060.5	66,75	66,25	90,35	Surfaktin A C14 [M+K] <sup>+</sup>	1060.6 i 1060.8 1060.7	Athukorala et al., 2009; Velho et al., 2011 Vater et al., 2002 i 2009
1075.5	26,54	32,51	24,14	Surfaktin A C15 [M+K] <sup>+</sup>	1060.5 1075.1	Mukherjee and Das, 2005 Velho et al., 2011
1081.5	20,15	14,40	35,72	Bacilomicin D C16 [M+N] Iturin A C14 [M+K] <sup>+</sup>	1081.6 1081.6	Athukorala et al., 2009 Cawoy et al., 2015
1464.7	×	8,85	5,81	Fengicin A C16 [M+H] <sup>+</sup>	1464.1 1464.0	Malfanova et al., 2012 Velho et al., 2011
1486.7	7,25	6,23	22,78	Fengicin C16 [M+Na] <sup>+</sup> Fengicin B C14 [M+Na] <sup>+</sup>	1485.8 1485.8	Vater et al., 2002 Cawoy et al., 2015
1487.7	×	×	19,21	Ala-6 Fengicin C15 [M+K] <sup>+</sup>	1487.9	Arguelles-Arias et al., 2009
1500.7	6,00	5,78	33,95	Ala-6 Fengicin C17 [M+N] Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1499.9 1501.7	Vater et al., 2002; Arguelles-Arias et al., 2009 Athukorala et al., 2009
1501.7	×	×	30,70	Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup> Ala-6 Fengicin C16 [M+K] Fengicin B C14 [M+K] <sup>+</sup>	1501.8 1501.9 1501.8	Vater et al., 2002 Arguelles-Arias et al., 2009 Cawoy et al., 2015
1515.7	6,70	×	13,23	Ala-6 Fengicin C17 [M+K] Fengicin C17 [M+K] <sup>+</sup>	1515.9 1515.7	Vater et al., 2002; Arguelles-Arias et al., 2009 Athukorala et al., 2009
1529.7	×	×	15,28	Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup> Val-6 Fengicin C16 [M+K]	1529.7 1529.9	Athukorala et al., 2009 Arguelles-Arias et al., 2009

Ono što takođe izdvaja ovaj izolat od prethodna dva, jeste i činjenica da su u metanolnom ekstraktu detektovani pikovi fengicinskih predstavnika u manjem broju. Takođe, je zabeleženo i odsustvo kurstakinskih predstavnika u ovom ekstraktu. Ovi podaci ukazuju na verovatno neefikasnu ekstrakciju metanolom. Svakako, i u ovom slučaju najprominentniji pikovi su dobijeni etil-acetatnom ekstrakcijom.

Prilikom analize dobijenih spektara besćelijskog supernatanta, metanolnih i etil-acetatnih ekstrakata izolata SS-12.6 i SS-13.1 primećeni su nešto drugačiji rezultati u poređenju sa prethodnim (Prilozi 16 i 17). Naime, kada se posmatraju supernatanti ovih izolata postaje jasno da su najizraženiji pikovi sa vrednostima intenziteta zabeleženim kao i u slučaju pozitivne kontrole odnosno LB medijuma (Prilog 9). Jedino, za oba supernatanta zabeležen je pik sa  $m/z$  vrednošću od 1046.3 za koga se pretpostavlja da je kalijumov adukt C13 surfaktina (Mukherjee and Das, 2005; Athukorala et al., 2009). Intenzitet ovog pika je bio ispod 30% što verovatno ukazuje na sam početak i prvenstvo sinteze ovog lipopeptida. Razlog dobijanja slabih intenziteta pretpostavljenih jedinjenja verovatno leži u činjenici da su u supernatantima nekoliko puta niže koncentracije lipopeptida. Takođe, metanolna ekstrakcija je izdvojila jedinjenja koja su po pretpostavljenim masama odgovarala aduktima bacilomicina D i surfaktina, kod izolata SS-12.6 (Prilog 16), odnosno uglavnom protonizovanim aduktima iturina A kod izolata SS-13.1 (Prilog 17). Primećena je i razlika između etil-acetnih i metanolnih ekstrakata u smislu intenziteta i raznovrsnosti pretpostavljenih lipopeptidnih jedinjenja. Zapravo kad se posmatraju etil-acetatni ekstrakti uočava se karakteristična distribucija pikova po principu prethodno spomenutih klusterskih masa lipopeptida.

Lipopeptidna mešavina etil-acetatnog ekstrakta SS-12.6 je dala skoro identične rezultate onima dobijenim analizom Orbitrap masenom spektrometrijom. I u ovom slučaju najintenzivniji pik je dobijen za lipopeptid koji odgovara surfaktinskom jedinjenju sa dužinom alifatičnog lanca od C15 atoma (Tabela 19). I ovom prilikom je potvrđeno prisustvo fengicinskih predstavnika sa pikovima nižih intenziteta, iako su rezultati „skrininga” biosintetskih operona pokazali nedostatak fengicinskog gena. Zasižno se može smatrati da ovaj izolat produkuje surfaktinske, kao i određene forme pretpostavljenih bacilomicinskih jedinjenja što je jedino bilo evidentno testiranjem etil-acetatnog ekstrakta.

**Tabela 19.** Analiza intenziteta masa pretpostavljenih lipopeptidnih jedinjenja prema masenim spektrima supernatanta i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-12.6.

Izolat SS-12.6					
m/z	Intenzitet (%)		Pretpostavljeni lipopeptid	Komparacija masa pretpostavljenih lipopeptida	
	Supernatant	Etil-acetat		m/z	Literaturni podaci
1030.6	×	11,75	Surfaktin C13 [M+Na] <sup>+</sup>	1030.6	Price et al., 2007; Athukorala et al., 2009
1044.4	4,18	33,84	Surfaktin C14 [M+Na] <sup>+</sup>	1044.8	Price et al., 2007; Athukorala et al., 2010
1045.5	4,31	16,50	Bacilomicin D C15 [M+H] <sup>+</sup>	1045.6	Athukorala et al., 2009
			Surfaktin A C14 [M+Na] <sup>+</sup>	1045.1	Velho et al., 2011
1046.4	28,12	7,13	Surfaktin A C13 [M+K] <sup>+</sup>	1046.6	Mukherjee and Das, 2005; Athukorala et al., 2009
				1046.7 i 1046.8	Vater et al., 2002 i 2009
<b>1058.6</b>	5,57	<b>100,00</b>	Surfaktin A C15 [M+Na] <sup>+</sup>	1058.6	Mukherjee and Das, 2005; Athukorala et al., 2009
1059.5	4,37	54,79	Bacilomicin D C16 [M+H] <sup>+</sup>	1059.6	Athukorala et al., 2009
			Surfaktin A C15 [M+Na] <sup>+</sup>	1059.1	Velho et al., 2011
1060.5	3,61	20,73	Surfaktin A C14 [M+K] <sup>+</sup>	1060.6 i 1060.8	Athukorala et al., 2009; Velho et al., 2011
				1060.7	Vater et al., 2002 i 2009
1081.5	×	11,05	Bacilomicin D C16 [M+Na] <sup>+</sup>	1060.5	Mukherjee and Das, 2005
			Iturin A C14 [M+K] <sup>+</sup>	1081.6	Athukorala et al., 2009
1450.7	2,70	2,49	Fengicin A C15 [M+H] <sup>+</sup>	1081.6	Cawoy et al., 2015
1464.7	×	18,28	Fengicin A C16 [M+H] <sup>+</sup>	1450.0	Velho et al., 2011
				1464.1	Malfanova et al., 2012
1478.8	×	18,82	Fengicin A C17 [M+H] <sup>+</sup>	1464.0	Velho et al., 2011
1486.7	×	13,49	Fengicin C16 [M+Na] <sup>+</sup>	1478.1	Malfanova et al., 2012
			Fengicin B C14 [M+Na] <sup>+</sup>	1485.8	Vater et al., 2002
1487.7	×	7,43	Ala-6 Fengicin C15 [M+K] <sup>+</sup>	1485.8	Cawoy et al., 2015
1500.7	×	14,22	Ala-6 Fengicin C17 [M+Na] <sup>+</sup>	1487.9	Arguelles-Arias et al., 2009
			Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1499.9	Vater et al., 2002; Arguelles-Arias et al., 2009
1501.7	×	7,10	Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1501.7	Athukorala et al., 2009
			Ala-6 Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1501.8	Vater et al., 2002
			Fengicin B C14 [M+K] <sup>+</sup>	1501.9	Arguelles-Arias et al., 2009
1529.8	×	1,43	Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1501.8	Cawoy et al., 2015
			Val-6 Fengicin C16 [M+K] <sup>+</sup>	1529.7	Athukorala et al., 2009
				1529.9	Arguelles-Arias et al., 2009

Zabeležena različitost u sintezi više lipopeptidnih jedinjenja nije primećena za izolat SS-13.1 (Tabela 20). Pikovi najvišeg intenziteta su ostali neokarakterisani, jer za date vrednosti detektovanih masa ( $m/z$  1020.2 i 1021.2) ne postoje poklapanja sa literaturnim podacima. Najpribližnija  $m/z$  vrednost, 1022.6 prijavljena je u slučaju protonizovanog adukta surfaktina C14 (Vater et al., 2002; Athukorala et al., 2009). Postojanje pikova nižih intenziteta je potvrdilo pretpostavku zastupljenosti iturinskih adukata, sa takođe primećenim odgovarajućim vrednostima za surfaktinska jedinjenja. Dalja analiza dobijenih spektara je potrebna u cilju ukljanjanja ovakvih nedoumica.

**Tabela 20.** Analiza intenziteta masa pretpostavljenih lipopeptidnih jedinjenja prema masenim spektrima supernatanta i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-13.1.

Izolat SS-13.1					
m/z	Intenzitet (%)		Pretpostavljeni lipopeptid	Komparacija masa pretpostavljenih lipopeptida	
	Supernatant	Etil-acetat		m/z	Literaturni podaci
1000.7	×	54,80	-	-	-
1020.2	15,06	100,00	-	-	-
1021.2	×	54,91	-	-	-
1042.6	10,18	50,89	Iturin A C14 [M+H] <sup>+</sup>	1042.7	Velho et al., 2011
1046.6	27,74	14,20	Surfaktin A C13 [M+K] <sup>+</sup>	1046.6	Mukherjee and Das, 2005; Athukorala et al., 2009
				1046.7 i 1046.8	Vater et al., 2002 i 2009
				1060.6 i 1060.8	Athukorala et al., 2009; Velho et al., 2011
1060.4	×	15,90	Surfaktin A C14 [M+K] <sup>+</sup>	1060.7	Vater et al., 2002 i 2009
				1060.5	Mukherjee and Das, 2005
1109.1	×	17,36	Iturin A C16 [M+K] <sup>+</sup>	1109.7	Athukorala et al., 2009

Sumarno posmatrano, ovakva studija je uključivala hipotezu testiranja najboljeg načina ekstrakcije, kroz preliminarnu karakterizaciju lipopeptidnih jedinjenja u poređenju sa rezultatima ostvarenim kroz molekularni skrining biosintetskih operona. Ono što je nesumljivo potvrđeno u slučaju svih testiranih izolata je da je uočeni klaster pikova, iturinske i surfaktinske familije jedinjenja sličnih intenziteta, ukazao na njihovo dominantno prisustvo u svim izolatima. To potvrđuju i ranija istraživanja koja su ukazala na njihovo dominantno prisustvo u *Bacillus* izolatima (Vater et al., 2002; Ramarathnam et al., 2007; Athukorala et al., 2009). Zanimljivo je i da su pretpostavljene vrednosti surfaktinskih jedinjenja, pronađene u svim testiranim izolatima. Jedan od razloga što je ovako, mogla bi biti i činjenica da surfaktin više doprinosi procesu formiranja biofilмова, nego odbrambenoj ulozi u prirodnom okruženju (Hofemeister et al., 2004). Kada se uporede rezultati dobijeni u ovom delu studije sa PCR skriningom postaje jasno da većina izolata istovremeno proizvodi nekoliko različitih jedinjenja. Međutim, detektovani geni ne predstavljaju i dokaz istovremene sinteze njihovih produkata. Slična zapažanja su prijavljena i ranije u slučaju detekcije biosintetskih operona, ali bez pojave odgovarajućih antibiotika u ekstraktima (Kunst et al., 1997; Athukorala et al., 2009). Ovakva zapažanja potvrđuju činjenicu da iako pored postojanja svih gena kod pojedinih izolata, samo se 1-2 antibiotika sintetišu u visokim koncentracijama, dok je izostanak drugih verovatno nastao usled mutacija na bilo kom genu genskog klastera (Mootz et al., 2001). Alternativno produkcija pojedinih antibiotika može biti i odložena u odnosu na druge

što može ukazati na različitost u intenzitetu pikova (Hofemeister et al., 2004). Ovo samo pokazuje da je za potrebe determinacije i karakterizacije određenih jedinjenja potrebno koristiti više dokazanih pristupa istraživanja.

Takođe, analize masenih spektara su izdvojile etil-acetatnu ekstrakciju kao najbolji metod za dobijanje većih količina i raznorodnih lipopeptidnih jedinjenja. To je u saglasnosti sa ranijim studijama na *Bacillus* izolatima, koje su pokazale da je korišćenje kiselinske precipitacije praćene metanolnom ekstrakcijom, dovelo do smanjenja biosurfaktantske aktivnosti (75%) prisutne u besćelijskom supernatantu, na svega 23% početne aktivnosti (Mc Keen et al., 1986; Yakimov et al., 1995). Prečišćavanje biotehnoloških proizvoda obično čini oko 60% ukupnih troškova, što komercijalnu proizvodnju ovakvih proizvoda čini prilično skupom (Satpute et al., 2010). Stoga, metode koje smanjuju troškove korišćenjem jeftinih i obnovljivih supstrata su često neophodne. U tom smislu, ekstrakcija etil-acetatom, u kome se verovatno hidrofobni ostaci lipopeptidnih jedinjenja rastvaraju bolje nego u metanolu, preporučuje sama sebe, a uz relativno nisku cenu čine ovaj rastvarač pogodnim kandidatom za dalja istraživanja i komercijalnu proizvodnju.

#### **4.3.9 ANALIZA I DETEKCIJA ANTIMIKROBNIH KOMPONENATA IZ LIPOPEPTIDNIH EKSTRAKATA VISOKOEFIKASNOM TANKOSLOJNOM HROMATOGRAFIJOM (HPTLC) PRAĆENOM INDIREKTNOM BIOAUTOGRAFIJOM**

Tankoslojna hromatografija kombinuje biološki i hemijski metod detekcije aktivnih jedinjenja. Kada se se kombinuje sa biološkim metodama, poznata je kao TLC bioautografija (Marston, 2011). Ovakvi testovi se često koriste u cilju dokazivanja aktivnosti ekstrakta ili pojedinih čistih supstanci dobijenih iz živih mikroorganizama ili drugih organizama.

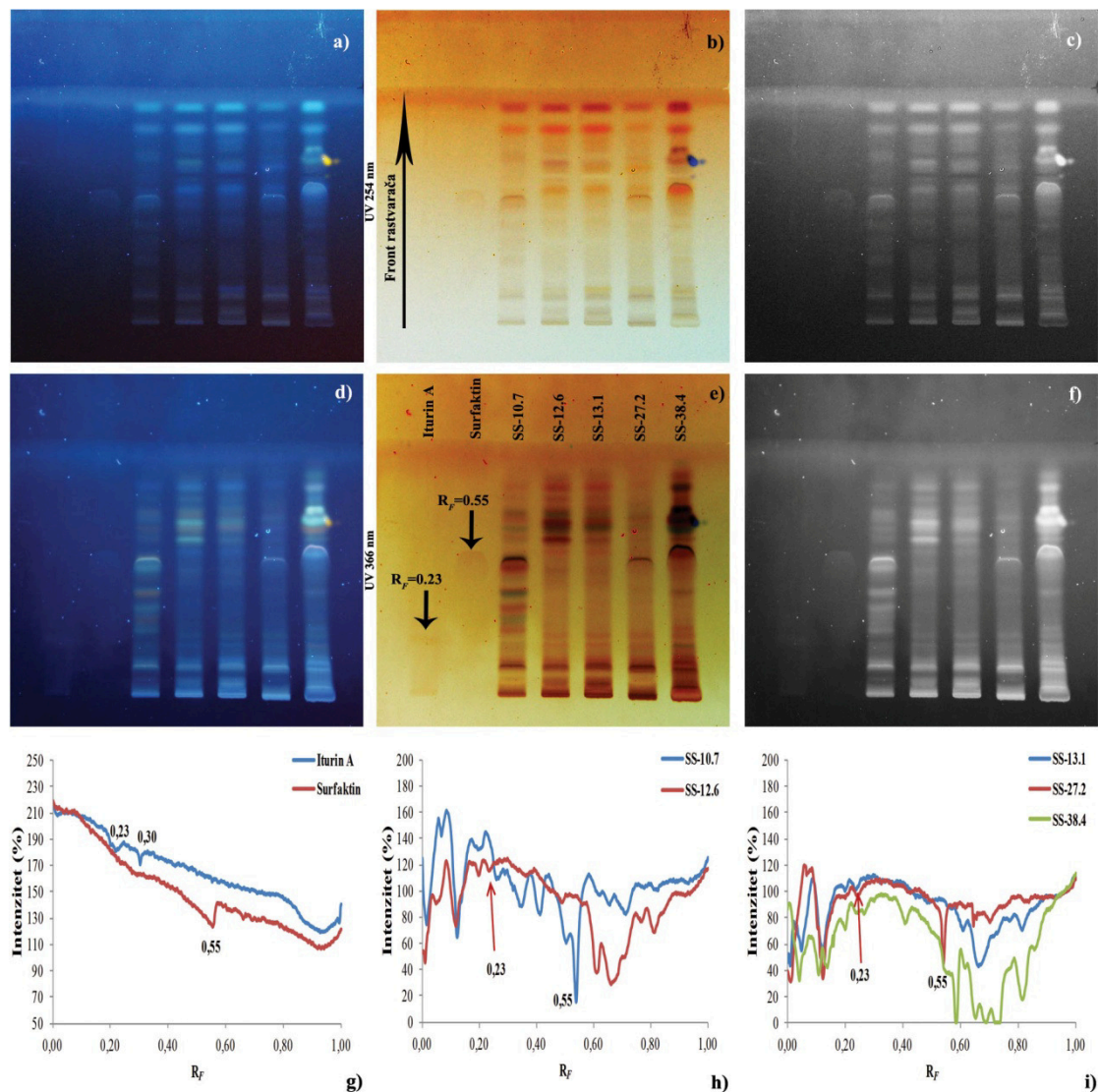
TLC hromatografija je u ovom radu korišćena za razdvajanje kompleksne smeše lipopeptidnih metanolnih ekstrakata pet *Bacillus* izolata (SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 i SS-38.4) finalnih koncentracija 14,25 mg/ml uz određivanje antimikrobne aktivnosti razdvojenih komponenti, indirektnom agar „overlay” metodom. Za određivanje prisustva odgovarajućih lipopeptidnih jedinjenja korišćeni su visoko

prečišćeni standardi iturina A i surfaktina. Uzorci lipopeptidnih ekstrakata i standarda naneti su na HPTLC ploče i razvijeni hloroform : metanol : voda (65:25:4, v/v/v) smešom rastvarača, koja je ranije pokazala visoku rezoluciju u razdvajanju ovih jedinjenja (Symmank et al., 2002). Vizualizacija dobijenih profila traka je izvedena pod UV svetlošću na 254 i 366 nm talasne dužine, zbog različitog apsorbovanja svetlosti. Rezultati su dokumentovani fotografijama koje su obrađene u ImageJ softveru za obradu slike hromatograma. Ispitivani ekstrakti na ploči su označeni duž cele ploče, sa jedne strane i od startne mrlje do fronta rastvarača, sa druge strane. Dobijeni profili uzoraka i standarda su predstavljali grafički prikaz zavisnosti intenziteta zona (izraženog u pikselima) u funkciji rastojanja (Slika 34).

Iz prikazanih rezultata potvrđena je velika raznolikost testiranih ekstrakata u smislu produkcije i ekstrakcije različitih jedinjenja, kod svakog pojedinačnog izolata. Takođe, evidentne su i razlike između izolata u intenzitetu dobijenih signala i  $R_F$  vrednosti pojedinih supstanci. Razlike između analiziranih hromatograma se uočavaju i u pogledu primenjenih talasnih dužina UV svetlosti.

Na datom primeru standardnih lipopeptidnih jedinjenja primećuje se i razlika u intenzitetu signala na dve talasne dužine, a jedini primetan signal u slučaju iturina A je uočen korišćenjem UV svetlosti na 366 nm, dok je za surfaktinsko jedinjenje signal detektovan na obe talasne dužine UV svetlosti. Ovakav podatak ne iznenađuje budući da su u ranijim istraživanjima potvrđeni različiti maksimumi apsorpcije UV svetlosti lipopeptidnih jedinjenja u metanolnom rastvoru na 254, 255 i 277 nm UV spektra, ali i njihovo odsustvo na talasnoj dužini većoj od 300 nm, koja odgovara karakterističnoj apsorpciji peptidne veze (Kumar et al., 2009). Kako je intenzitet dobijenog signala u slučaju iturinskog jedinjenja i pri vizuelizaciji na 366 nm veoma slab, za razliku od detektovanih jedinjenja u ekstraktima sličnih  $R_F$  vrednosti, to nas navodi na zaključak da je korišćena premala koncentracija standardnog jedinjenja, koja je u ovom slučaju iznosila 50 µg/ml ili da nije određen pravi apsorpcioni maksimum. U svakom slučaju, dobijeni intenziteti su poslužili za grafičko određivanje  $R_F$  vrednosti za oba standarda i za testirane ekstrakte. Na Slici 34g uočavaju se dva maksimuma intenziteta iturina A sa  $R_F$  vrednostima od 0.23 i 0.30, dok je u slučaju surfaktina primećen jedan pik sa  $R_F$  vrednosti od 0.55. Pažljivom analizom testiranih ekstrakata uočavaju se pikovi  $R_F$

vrednosti 0.23 kod izolata SS-12.6 (Slika 34h), SS-13.1 i SS-27.2, kao i nešto veća vrednosti ( $R_F = 0.27$ ) u slučaju izolata SS-38.4 (Slika 34i).



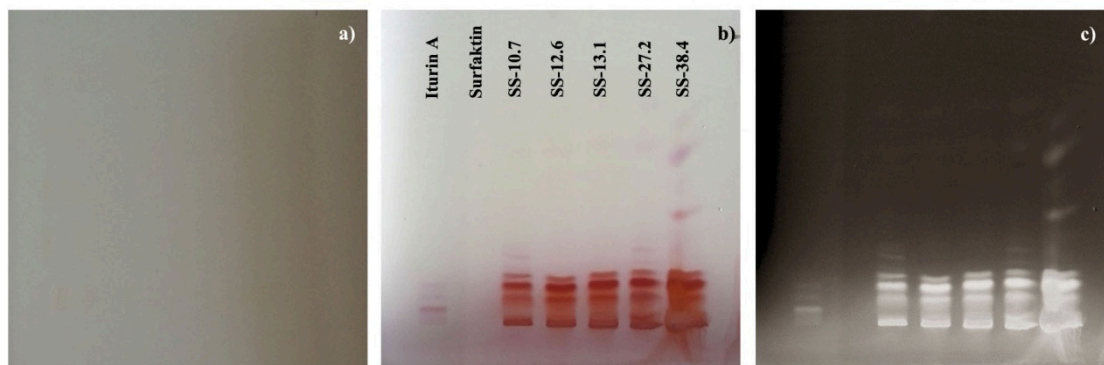
**Slika 34.** Analizirani hromatogrami standardnih jedinjenja iturina A, surfaktina i pet *Bacillus* izolata (SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 i SS-38.4) pod UV svetlošću od 254 nm (a-c) i 366 nm (d-f) u vidu regularnih (a i d), invertovanih (b i e) i fotografija u “greyscale” modu. Grafički prikaz zavisnosti intenziteta zona (izraženog u pikselima) u funkciji rastojanja iturina A i surfaktina (g), ekstrakata izolata SS-10.7 i SS-12.6 (h) i izolata SS-13.1, SS-27.2 i SS-38.4 (i).

Najizraženiji pikovi sa  $R_F$  vrednostima za surfaktinski molekul su detektovani kod izolata SS-10.7 (Slika 34h) i SS-27.2 (Slika 34i). U ekstraktu izolata SS-38.4 detektovan je pik intenziteta  $R_F$  vrednosti 0.58, slično vrednosti pređenog puta



surfaktinskog standarda. Ovakvi nalazi su u korelaciji sa prethodnim rezultatima ovog istraživanja, jer ispitivani izolati poseduju gene iturinskog operona, a MALDI-TOF analiza je ukazala na prisustvo pretpostavljenog jedinjenja koje po masi odgovara iturinu A sa dužinom alifatičnog lanca od 14 ugljenikovih atoma. Iako je potvrđeno prisustvo surfaktinskog molekula u svim ispitivanim izolatima, rezultati dobijeni TLC hromatografijom otkrivaju prisustvo ovog jedinjenja samo u izolatima SS-10.7 i SS-27.2. Drugačije  $R_F$  vrednosti kod SS-38.4 (0.58), SS-12.6 i SS-13.1 (0.65) verovatno upućuju na postojanje strukturalnog diverziteta ovih heptapeptidnih molekula podrazumevajući različitosti i u aminokiselinskom sastavu.

U cilju identifikacije hromatografskih zona koje odgovaraju peptidnim jedinjenjima, hromatogrami su derivatizovani uranjanjem u rastvor za derivatizaciju, odnosno 0.2% rastvor ninhidrina u metanolu. Tako derivatizovan hromatogram daje zone različite boje, što zavisi od selektivnosti reagensa za derivatizaciju. Tretman sa ninhidrinom treba da rezultira u pojavi intenzivne ljubičaste boje, ako ekstrakt sadrži peptidne komponente u svom sastavu i često se koristi u TLC analizama lipopeptida (Kumar et al., 2009; Gordillo and Maldonado, 2012). Rezultati ninhidrinske reakcije predstavljeni su na Slici 35.



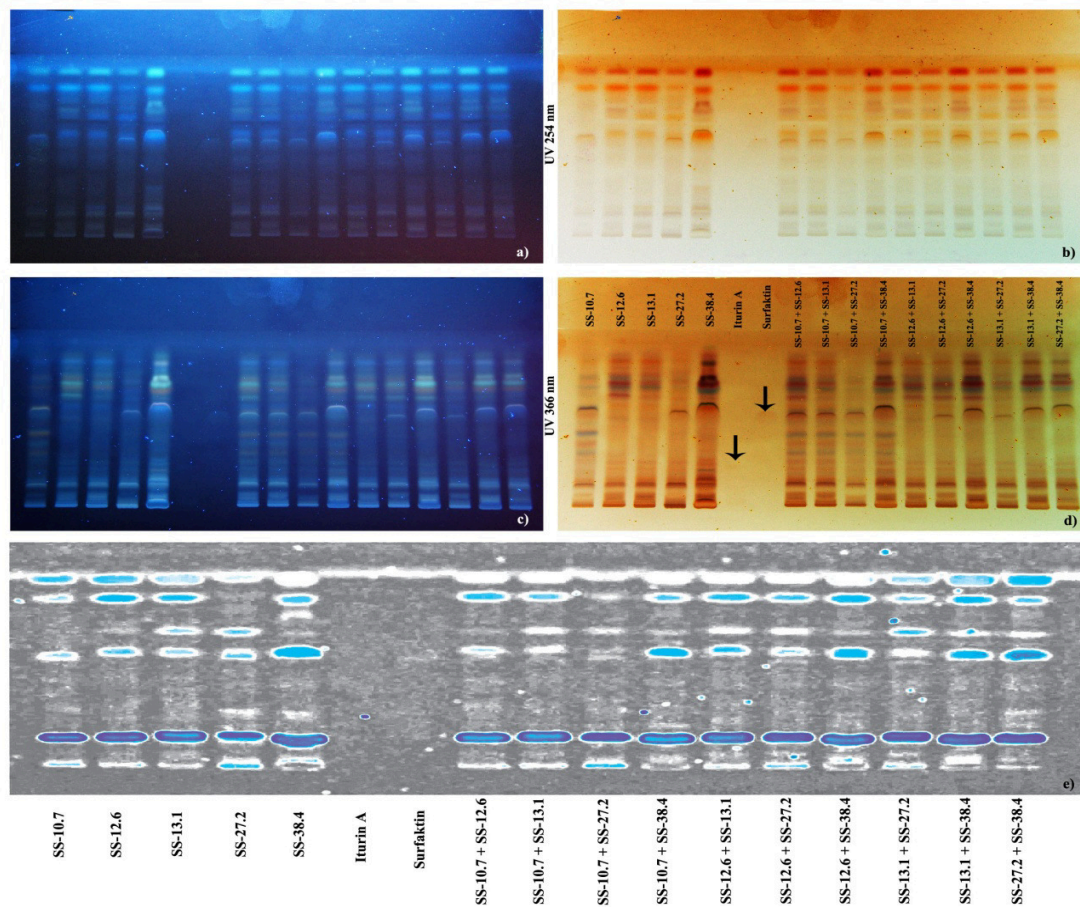
**Slika 35.** Ninhidrinska reakcija lipopeptidnih ekstrakata. Izgled ploče hromatograma pre derivatizacije (a), nakon derivatizacije (b) i nakon derivatizacije u invertovanom obliku slike (c).

Kao što se vidi iz priloženog, svi ekstrakti pokazuju pozitivnu ninhidrinsku reakciju, što nesumnjivo ukazuje na prisustvo (lipo)peptidnih jedinjenja u ekstraktima testiranih izolata sa različitim intenzitetima i  $R_F$  vrednostima. Interesantan je i podatak

da je dobijeno nekoliko traka standardnog jedinjenja iturina A za koga je proizvođač (Sigma-Aldrich, SAD) garantovao visoku stopu prečišćenosti jedinjenja, sa preko 95%, jer je verovatno u pitanju strukturni diverzitet ovog jedinjenja. Većina aminokiselina reaguje pozitivno u prisutvu ninhidrina dajući ljubičastu obojenost (Rosen, 1957). Međutim, ukoliko jedinjenje u svom sastavu sadrži aminokiseline, prolin i hidroksi-prolin dolazi do neefikasne reakcije, jer amino grupa nije dostupna za reakciju i ostaje u strukturi prstena. U tom slučaju, detekcija žute boje ili neretko i izostajanje boje uopšte se može očekivati. Odsustva reakcije surfaktinskog standarda i eventualno još nekih jedinjenja analiziranih pod UV svetlošću, se verovatno može objasniti ovom činjenicom. Zbog toga, izračunavanje  $R_F$  vrednosti nije uzeto u razmatranje.

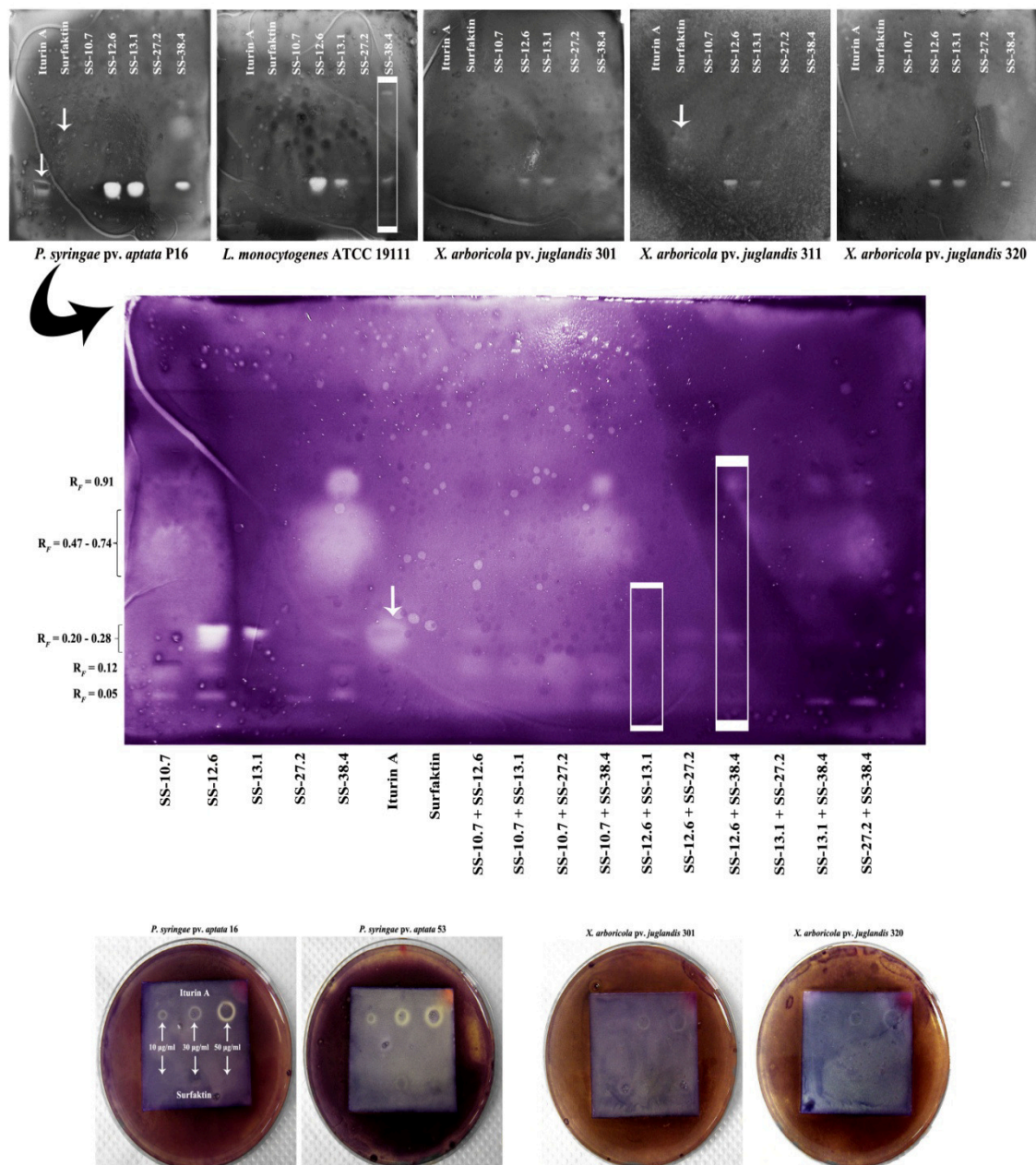
Još jedan od pristupa ove studije je bio i dokazivanje potencijalnih sinergističkih efekata mešanjem pojedinačnih ekstrakata izolata. Na Slici 36 predstavljeni su hromatogrami analizirani pod UV svetlošću na 254 i 366 nm talasne.

Uzimajući u obzir dobijene rezultate postaje jasno da su zone najačeg intenziteta (tamnoplavi) sa  $R_F$  vrednosti od 0.12 prisutne u svim analiziranim kombinacijama i pojedinačnim ekstraktima. Međutim, kako data  $R_F$  vrednost ne odgovara ni jednom testiranom standardu nije moguće precizirati o kom je jedinjenju reč. Kada se uporede dobijeni umereni intenziteti (svetloplavi), uočava se njihova distribucija u gornjem delu hromatograma, a prisustvo signala na  $R_F$  vrednosti od 0.55 ili sličnih, što odgovara pređenom putu surfaktina, je uočeno kod svih pojedinačnih ekstrakata i sporadično kod pojedinih kombinacija. Kako intenzitet boje direktno ukazuje i na koncentraciju prisutnih jedinjenja, ovako je nesumnjivo pokazana značajna koncentracija surfaktantskih jedinjenja, budući da je koncentracija od 50  $\mu\text{g/ml}$  standarda surfaktina zabeležila jedva detektibilnu zonu. Takođe, kada su u pitanju rezultati dobijeni analiziranjem  $R_F$  vrednosti koje odgovaraju iturinskom standardu primećuju se signali slabijeg intenziteta koji ukazuju na manje koncentracije ovih jedinjenja. Interesantan rezultat je dobijen za kombinaciju SS-10.7 i SS-27.2, sa zonama srednjeg intenziteta u gornjem delu hromatograma, kada se upoređuju njihovi pojedinačni ekstrakti u odnosu na datu kombinaciju, kod koje dolazi do veoma slabog mešanja odnosno detekcije istih signala. Verovatno da takav rezultat ukazuje na negativne interakcije određenih komponenata lipopeptidnih jedinjenja različitih izolata.



**Slika 36.** Analizirani hromatogrami standardnih jedinjenja i pet ekstrakata *Bacillus* izolata pojedinačno i u kombinacijama pod UV svetlošću od 254 nm (a i b) i 366 nm (c i d) u vidu regularnih (a i c) i invertovanih (b i d) fotografija. Prikaz hromatograma sa oduzetom pozadinom slike, sa naglašavanjem najintenzivnijih zona prisutnih lipopeptida pojedinačnih ekstrakata i u njihovim kombinacijama (e). Najjači intenzitet je obeležen tamnoplavom, srednji svetloplavom, a najslabiji belom bojom.

Sledeći pristup ovog dela istraživanja odnosio se na dokazivanje antimikrobne aktivnosti pojediničnih lipopeptidnih jedinjenja korišćenjem indirektno bioautografske metode. Princip ove metode je veoma jednostavan i bazira se na činjenici da tokom inkubacije odgovarajućeg indikatorskog soja, aktivne supstance sa adsorbenta difunduju u agar i inhibiraju rast bakterija (Choma and Grzelak, 2011). Na mestima gde je ostvarena antimikrobna aktivnost uočavaju se prosvetljene zone tj. zone inhibicije rasta. Na ovaj način testirana je antimikrobna aktivnost pojedinačnih ekstrakata protiv nekoliko indikatorskih sojeva (*X. arboricola* pv. *juglandis*, *P. syringae* pv. *aptata* i *L. monocytogenes*) i njihovih kombinacija protiv *P. syringae* pv. *aptata* 16 (Slika 37).



**Slika 37.** Bioautografska analiza testiranih standardnih jedinjenja i lipopeptidnih ekstrakata *Bacillus* izolata pojedinačno, kao i u kombinacijama protiv odabranih indikatorskih sojeva. Razvijeni hromatogrami su prelivani tankim slojem inokulisanog LA soft medijuma sa odgovarajućim patogenima ( $1 \times 10^8$  CFU/ml). Analiza je izvršena nakon 24 h inkubacije na  $30^\circ\text{C}$  i prskanja rastvorom 0.2% MTT-a i 0.1% Triton X-100 radi vizualizacije zona inhibicije rasta. Strelicama na hromatogramima su označeni dobijeni ili očekivani retencioni faktori ( $R_F$ ) standardnih jedinjenja, a pravougaonicima primećene različitosti. Dobijene  $R_F$  vrednostima različitih izolata označene su sa leve strane središnjeg hromatograma.

Na osnovu rezultata testiranja standardnih jedinjenja postaje jasno da je za inhibiciju rasta izolata rodova *Xanthomonas* i *Pseudomonas*, zaslužan iturinski analog. Pokazano je da pri niskim koncentracijama standarda dolazi do značajne inhibicije rasta patogena roda *Pseudomonas* izolovanih sa šećerne repe, dok je za inhibiciju rasta sojeva roda *Xanthomonas* potrebna nešto viša koncentracija od testirane. Inhibicija rasta nije zabeležena za surfaktinski standard, u opsegu ispitivanih koncentracija, osim u slučaju *X. arboricola* 311 gde je primetna veoma slaba zona inhibicije rasta sa odgovarajućom  $R_F$  vrednosti ovog jedinjenja. Zaista, kada se posmatraju učinci pojedinačnih ekstrakata jasno je da ekstrakti izolata SS-12.6, SS-13.i i SS-38.4 poseduju najviše koncentracije iturina, pa su i ostvarene zone inhibicije najveće, dok je slučaju izolata SS-27.2 koncentracija ovog jedinjenja bila dovoljna samo za inhibiciju rasta *L. monocytogenes* sa izostankom inhibicije rasta drugih patogena. Najslabiji antibakterijski efekat su ostvarili ekstrakti izolata SS-10.7 i SS-27.2 prema svim ispitivanim patogenima, osim na *P. syringae* sa jednom uočljivom zonom inhibicije na  $R_F$  vrednosti od 0.05 u slučaju oba izolata i još jednom od 0.12 za SS-10.7. U svakom slučaju, na ovaj način je pokazano da je antimikrobni efekat ostvaren delovanjem više lipopeptidnih jedinjenja istovremeno. I ovom prilikom se pokazalo da je izolat SS-12.6 najpotentniji sa  $R_F$  vrednosti između 0.20 i 0.28 što ukazuje na verovatan sinergizam nekoliko analoga iturina ili na veću količinu jednog od njih. Međutim, kako je ninhidrinskom reakcijom uočeno postojanje više traka ovog jedinjenja, verovatno je da samo odgovarajuće forme iskazuju antibakterijski efekat (Slika 35). To je jasno i analizom rezultata dobijenih nanošenjem iturinskog standarda u vidu spota na hromatogramsku pločicu, sa centralnim delom bez antibakterijske aktivnosti, kao i kod detektovane aktivnosti protiv *P. syringae* pv. *aptata* 16, u više slučajeva (Slika 37). Iako je nedvosmisleno pokazano prisustvo surfaktinskog jedinjenja u dosadašnjim analizama, očigledno da je njegova koncentracija isuviše niska za potrebnu inhibiciju rasta. Jedini izuzetak od ovog pravila je ekstrakt izolata SS-38.4 sa veoma naglašenom inhibicijom rasta *P. syringae* pv. *aptata* 16 sa  $R_F$  vrednošću između 0.47 i 0.74, što svakako pokriva i opseg vrednosti surfaktinskog standarda.

Slične  $R_F$  vrednosti iturina (0.36) i surfaktina (0.80) su zabeležene u istraživanjima lipopeptidnih ekstrakata *B. subtilis* UMAF6639 izolata protiv *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* i *Pectobacterium carotovorum* subsp.

*carotovorum* (Zerouh et al., 2011), kao i protiv fitopatogenih gljiva u slučaju ekstrakta izolata *B. amyloliquefaciens* PPCB004 sa  $R_F$  vrednošću iturina od 0.3 i surfaktina između 0.75 i 0.80 (Romero et al., 2007; Arrebola et al., 2010a i 2010b). Takođe je u ovim studijama zabeležena i  $R_F$  vrednost fengicinskih analoga između 0.08 i 0.2 što se poklapa sa opsegom detektovanih zona u našem istraživanju, za sve ekstrakte, osim za SS-13.1. U radu Yáñez-Mendizábal et al., (2012) pokazano je da ekstrakt *B. subtilis* CPA-8, protiv indikatorskih gljiva *Monilinia laxa* i *M. fructicola* pokazuje nešto drugačije  $R_F$  vrednosti od prethodnih istraživanja. Osim tipičnih  $R_F$  vrednosti koje odgovaraju vrednostima analoga fengicina (0.1-0.2), uočene su i vrednosti za bacilomicin D (0.3), iturin A (0.4) i surfaktin (0.7). Ovakve razlike u predenom putu ispitivanih supstanci mogu nastati usled razlika u sastavu mobilne faze, temperature, vlažnosti, instrumentalne nestabilnosti i slučajnih grešaka usled kojih dolazi do pomeranja zona ispitivanih uzoraka unutar jedne ili više ploča (Wong et al., 2014).

Kada se analiziraju dobijeni rezultati za različite kombinacije ekstrakata uočavaju se izvesna odstupanja od jake antibakterijske aktivnosti nastale delovanjem pojedinačnih ekstrakata. Ovim istraživanjem je definitivno potvrđen jači antimikrobni efekat pojedinačnih ekstrakata sa istovremenim delovanjem više aktivnih susptanci, nego kada je u pitanju delovanje različitih smeša lipopeptidnih ekstrakata. Na takav efekat naročito ukazuju i kombinacije najjačih antagonista SS-12.6 i SS-13.1 i SS-12.6 i SS-38.4 prikazanih na Slici 36 u okvirenim pravougaonicima, gde bi se očekivala izrazita antimikrobna aktivnost. Međutim, evidentno je da je pojava zona inhibicije svedena na minimum ili je totalno redukovana što može ukazati na izražen antagonistički efekat između istih ili različitih aktivnih supstanci. Takođe, moglo bi se istaći da nije primećen potencijalni sinergistički efekat, a detektovanim slabim zonama inhibicije se može pripisati eventualni aditivni efektat pojedinačnih jedinjenja. Postoje generalno prihvaćeni mehanizmi antimikrobne interakcije kojima se ostvaruje sinergizam. Među predloženim mehanizama su sekvencijalna inhibicija opštih biosintetskih puteva, inhibicija protektivnih enzima i delovanje na aktivne komponente ćelijskog zida čime se pospešuje ulazak antimikrobnih jedinjenja. Međutim, mehanizmi interakcija kojima se ostvaruje anatgonizam su manje istraženi. Neki od predloženih mehanizama podrazumevaju da jedinjenja deluju na isto ciljno mesto na

mikroorganizmu ili hemijske (direktne ili indirektne) interakcije između jedinjenja gde jedno jedinjenje umanjuje aktivnost drugog (Bassolé and Juliani, 2012).

Bioautografija je analitička metoda kod koje se jedinjenja, prethodno razdvojena na hromatografskoj ploči, detektuju primenom živih organizama (bakterije, plesni, gljive, ćelijske organele i enzime) i datira još od 1946 godine. Ovo je osetljiva metoda za detekciju antimikrobnih jedinjenja prisutnih čak i u malim količinama. Stoga, je pogodna kao metoda u inicijalnim fazama istraživanja, kao i u ciljno usmerenoj izolaciji jedinjenja (Märghitaş et al., 2013). Kod difuzionih i dilucionih metoda nije moguće praviti razliku između aktivne i neaktivne komponente iz smeše jer se one zajedno nalaze u zoni inhibicije. TLC bioautografija omogućava da se identifikuje aktivna komponenta iz smeše ekstrakata lipopeptida na veoma efikasan način, *in situ*. Na hromatogramu se tako može ispitivati antimikrobna aktivnost razdvojenih komponenti, a uporedo se može i pratiti efekat pojedinačnih standardnih jedinjenja. Potrebne su male količine uzorka, izvodi se za kratko vreme i veći broj uzoraka se može istovremeno razvijati na istoj HPTLC ploči što je čini pogodnom metodom. Glavnu primenu TLC bioautografija može naći u brzom skriningu uzoraka na bioaktivnost (Marston, 2011) kako se pokazalo i u ovom radu. Poslednjih decenija dvadesetog veka razvijen je veliki broj komercijalno dostupnih visokoefikasnih stacionarnih faza i automatizovanih uređaja, kombinovanih sa velikim brojem masenih detektora što je značajno proširilo primenu tankoslojne hromatografije na različite oblasti industrije i nauke. Na ovaj način je prvobitni princip tankoslojne hromatografije zamenjen visokoefikasnom tehnikom koja, zbog svoje jednostavnosti, brzine i niske cene, predstavlja jednu od osnovnih metoda u analizi različitih jedinjenja, uključujući i lipopeptide *Bacillus* izolata u mnogim laboratorijama širom sveta.

#### 4.4 BIOHEMIJSKE I FILOGENETSKE ANALIZE

Rod *Bacillus* sadrži veoma heterogenu grupu aerobnih ili fakultativno anaerobnih, gram-pozitivnih, štapićastih vrsta sposobnih da formiraju endospore u nepovoljnim uslovima, sa kosmopolitskim rasprostranjenjem. U najnovijem izdanju „Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Logan and de Vos, 2009) čak 142 vrste su priključene rodu *Bacillus*. Tradicionalno, *Bacillus* sp. izolati se identifikuju u laboratorijama pomoću klasičnih biohemijskih testova, kao i korišćenjem API

identifikacionih kitova koji su se pokazali pouzdanijim u poređenju sa klasičnim biohemijskim testovima, koristeći kombinaciju 12 enzimatskih reakcija API 20 E identifikacionog kita, kao i 49 reakcija API CHB 50 kita baziranog na fermentaciji šećera (Wu et al., 2006). Međutim, ograničenost fenotipski i biohemijski zasnovanih identifikacionih metoda, dovela je do razvoja niza molekularno-genetičkih metoda identifikacije. Tako je poslednjih godina, izgrađena značajna baza 16S rRNK gena (rDNK), koja se uspešno primenjuje u određivanju filogenetskih odnosa ili u identifikaciji bakterija (Goto et al., 2000).

Preliminarnom identifikacijom pet *Bacillus* izolata na osnovu biohemijskih i enzimatskih testova identifikacionih kitova API 20 E i 50 CHB, kao i BLASTn analize bazirane na parcijalnoj sekvenci 16S rDNK, dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 21.

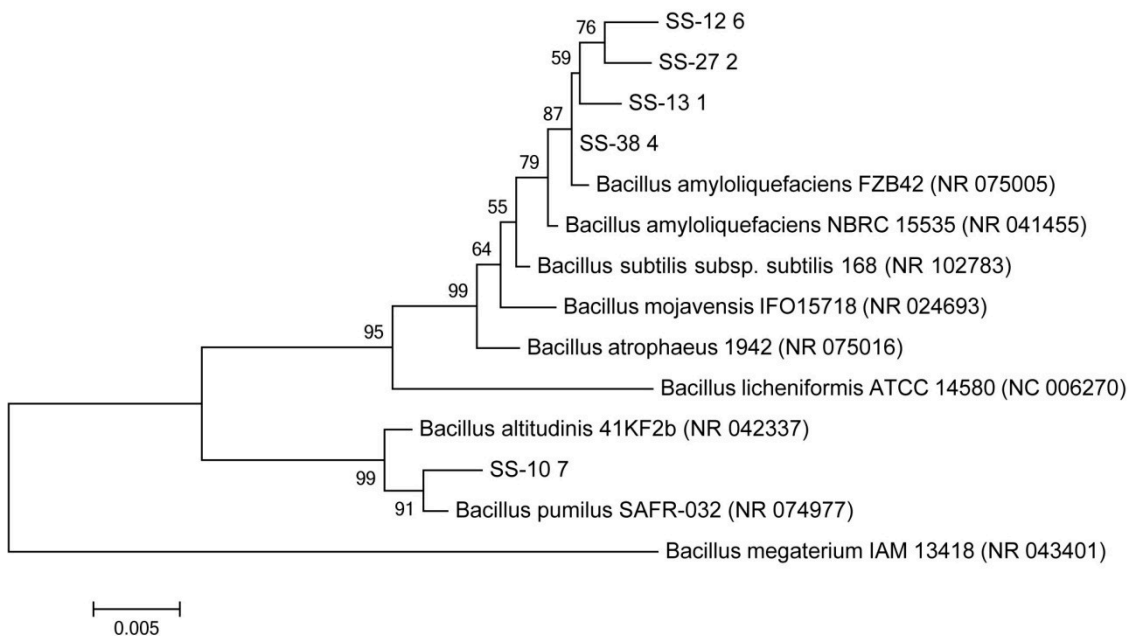
**Tabela 21.** Identifikacija pet *Bacillus* sp. izolata u odnosu na referentne sojeve na osnovu biohemijskih testova API identifikacionih kitova 20 E i 50 CHB i parcijalne 16S rDNK sekvence.

Izolat	Procenti identifikacije bazirani na biohemijskoj analizi (API)	Najbliži referentni soj iz NCBI baze i ostvareni maksimalni identitet (%) prema delimičnoj 16S rDNA sekvenci	
SS-10.7	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	90.0	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 (NR_074977) 98.86
			<i>Bacillus safensis</i> FO-036b (NR_041794) 98.77
			<i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a (NR_042336) 98.51
SS-12.6	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	94.5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 (NR_075005) 99.13
	<i>Bacillus licheniformis</i>	5.8	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168 (NR_102783) 98.90
			<i>Bacillus vallismortis</i> DSM11031 (NR_024696) 98.82
SS-13.1	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	98.9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 (NR_075005) 99.62
			<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168 (NR_102783) 99.63
			<i>Bacillus vallismortis</i> DSM11031 (NR_024696) 99.24
SS-27.2	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	94.7	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 (NR_075005) 99.04
			<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168 (NR_102783) 98.77
			<i>Bacillus vallismortis</i> DSM11031 (NR_024696) 98.69
SS-38.4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	81.9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 (NR_075005) 99.60
	<i>Bacillus licheniformis</i>	13.5	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168 (NR_102783) 99.36
	<i>Bacillus subtilis</i>	4.3	<i>Bacillus vallismortis</i> DSM11031 (NR_024696) 99.28



Kao što se vidi, četiri izolata (SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 i SS-38.4) prema analiziranoj sekvenci, su najsirodniji vrsti *B. amyloliquefaciens*, za razliku od izolata SS-10.7 koji pokazuje najviše srodnosti sa *B. pumilus*.

U cilju dobijanja informacije o srodnosti datih izolata sa referentnim sojevima iz baze podataka, izvršena je i filogenetska analiza konstruisanjem filogenetskog stabla. Filogenetska rekonstrukcija bazirana na delimičnoj nukleotidnoj sekvenci izolata SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 i SS-38.4 zajedno sa *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (NR\_075005) podržana je visokim „bootstrap“ vrednostima, dok izolat SS-10.7 formira pojedinačnu granu i najsičniji je sa *Bacillus pumilus* SAFR-032 (NR 074977) što je prikazano na Slici 38.



**Slika 38.** „Neighbor-joining” filogenetsko stablo bazirano na parcijalnoj sekvenci 16S rDNK sekvenci (1096 bp) sa prikazom odnosa testiranih izolata SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2, SS-38.4 i povezanih referentnih sojeva roda *Bacillus*. *B. megaterium* (NC\_043401) je korišćen kao „out“ grupa. „Bootstrap” vrednosti (izražene u procentima od 1000 ponavljanja) veće od 50 prikazane su na tačkama grananja. Bar, 1 supstitucija na 100 nukleotida pozicijama. Bar, 2 supstitucije na 100 nukleotida pozicijama. Horizontalna traka ukazuje na genetsko rastojanje od 0.005.

Kako je pokazano da neki sojevi *B. amyloliquefaciens* ne poseduju gene koji kodiraju *Bacillus* enterotoksine ili ključni gen umešan u sintezu emetičkih toksina

(European Food Safety Authority, 2008), kao i da se pomenuti sojevi zajedno sa ostalim članovima *B. subtilis* grupe smatraju bezopasnim i imaju opšte prihvaćeni status sigurnih mikroorganizama "GRAS" (Food and Drug Administration, 1999), uz ostvarene rezultate potentnog antimikrobnog delovanja ove studije, svakako ih kandiduje za dalja istraživanja i primenu u biokontroli.

\*\*\*\*\*

Razumevanje i karakterizacija bioaktivnih jedinjenja, kao i optimizacija uslova njihove proizvodnje tokom fermentacije, može povećati efikasnost i doslednost biopesticida na način koji je više uporediv sa sintetičkim pesticidima (Fira et al., 2014). Međutim, njihova upotreba će verovatno postaviti određena pitanja u vezi njihovih uticaja na hranu i potencijala razvijanja rezistentnosti. Glavne regulatorne agencije već podrazumevaju i traže toksikološke testove na mikroorganizmima i njihovim bioaktivnim jedinjenjima, a naročito ako su ona uključena u krajnjem proizvodu. Rizik razvoja rezistencije može se smatrati niskim ukoliko se način delovanja zasniva na kombinaciji nekoliko bioaktivnih jedinjenja i ponekad živih mikroorganizama, uporedo sa njihovom fiziološkom interakcijom sa ciljnim štetočinama (Bailey et al., 2011).

Biorazgradivost mikroorganizama i njihovih produkata, ublažava moguće probleme narušavanja životne sredine, ali dovodi do nedostatka trajne aktivnosti sa druge strane. Ekološke studije su do sada pokazale da biokontrolni agensi mogu biti kompetentni u rizosferi ili filosferi, pa samim tim se i budući napredak biopesticida može postići formulacijama koje poboljšavaju mikrobijalni opstanak u ovim zonama. Takođe, danas se sve više semena tretira produktima mikroorganizama u cilju kontrole bolesti izazvanih pre- i post-žetvenim patogenima, a oblaganje semena biopesticidima predstavlja jeftinu opciju koja omogućava ciljanu isporuku i potencijalno poboljšava kolonizaciju rizosfere biokontrolnim sojevima, dok sa druge strane zahteva bolju efikasnost tehnologije u smislu poboljšavanja materijala za oblaganje. Imajući to u vidu, genetička i biohemijska karakterizacija sojeva *Bacillus* je od najveće važnosti za razvoj „zelenih“ pesticida i identifikaciju novih biokontrolnih sojeva koji promovišu konstantan rast biljaka (Fira et al., 2014).

Čvrsti primeri uspeha biokontrolnih agenasa i pronicljivi marketing će biti potrebni da se promeni percepcija o njima. Biopesticidi se razlikuju od sintetičkih pesticida u fundamentalnim načinima i često zahtevaju specifično rukovanje i primenu, pa još uvek nisu dobro prihvaćeni od uzgajivača, predstavnika prodaje i potrošača. Takođe, striktne regulative pojedinih zemalja za stavljanje u promet ovih proizvoda, uključujući njihovo kretanje preko nekih geopolitičkih granica nastavlja da ograničava tržišni pristup biopesticidima.

Postavlja se pitanje da li su biopesticidi sazreli za situaciju u kojoj se nalazimo. Svakako da je izvestan napredak učinjen, razvojem mnogih novih biopesticida i kontinuiranim tehnološkim razvojem sa ciljem prevazilaženja brojnih prepreka. Iako još uvek nisu dostigli svoj potencijal korišćenja, sva predviđanja ukazuju da će nadigrati sve ostale opcije u kontroli štetočina u smislu udela na tržištu koji će konstantno rasti u bliskoj budućnosti. Svetla budućnost biopesticida je ostvariva samo ako istraživačke i industrijske grupe razmišljaju šire i delaju udruženim snagama, sprovodeći bolju komunikaciju o pozitivnim efektima biopesticida kako bi pokazali njihovu sposobnost u upravljanju štetočinama na veoma efikasan i ekonomičan način.

## **5. ZAKLJUČCI**

## 5 ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih i analiziranih rezultata ove studije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Analizom genetičkog diverziteta kolekcije 205 *Bacillus* sp. izolata na prisustvo gena odgovornih za proizvodnju različitih lipopeptidnih jedinjenja za najveći broj izolata (171 izolat) je detektovan DNK fragment koji odgovara bacilomicin D sintetazi. Takođe, kod velikog broja izolata su dobijene očekivane veličine fragmenata u slučaju kurstakinskog (154 izolata) i surfaktinskog operona (142 izolata), za razliku od očekivanih fragmenata iturinskog operona čije je prisustvo potvrdilo svega 84 izolata. Najmanja učestalost u kolekciji je detektovana za gen fengicin sintetaze sa 59 izolata.
2. Analizom distribucije biosintetskih operona u zavisnosti od ekoloških niša, prisustvo svih pet biosintetičkih operona je potvrđeno kod 2 izolata poreklom iz đubriva (SS-27.2 i SS-29.1) i kod 9 zemljišnih izolata (SS-6.2; SS-21.7; SS-35.4; SS-38.2; SS-38.3; SS-38.4; SS-39.1; SS-39.3 i SS-40.2). Najveća zastupljenost fengicinskog operona sa više od 50% kod populacije iz stajskog đubriva, za razliku od najbrojnije populacije zemljišnih izolata sa detekcijom tek oko 22% ovog operona je takođe utvrđena.
3. Analizom pet odabranih izolata (SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1, SS-38.4 i SS-27.2) na proizvodnju antimikrobnih supstanci utvrđeno je da su svi ispoljili jaku antibakterijsku aktivnost protiv 15 sojeva *X. arboricola* poreklom sa oraha, dok je u slučaju 2 soja *P. carotovorum* testirana aktivnost izostala. Izrazit antibakterijski efekat je detektovan i protiv *L. monocytogenes*.

4. Inhibitorno delovanje izolata SS-12.6 i SS-13.1 protiv 10 fitopatogenih gljiva izolovanih sa plodova voća i povrća potvrđeno je sa najvećom osetljivošću sojeva *F. oxysporum*, *A. alternata* i *M. fructigena* na delovanje izolata SS-12.6 sa oko 70% inhibicije rasta micelija, u proseku. Potpuno odsustvo antifungalne aktivnosti utvrđeno je za SS-13.1 protiv *P. expansum* izolovanog sa limuna, dok je najjači efekat ostvaren protiv *M. fructigena* sa preko 74% inhibicije rasta micelije.
5. Utvrđivanje dinamike sinteze antimikrobnih jedinjenja pet odabranih *Bacillus* izolata gajenih u četiri različita medijuma je u većini slučajeva, istaklo njihovu produkciju u eksponencijalnoj ili ranoj stacionarnoj fazi rasta, sa primećenom pojavom više maksimuma aktivnosti, ukazavši na prisustvo više različitih antimikrobnih supstanci. Izolati gajeni u LB medijumu daju najveće zone inhibicije u stacionarnoj fazi, dok je aktivnost u sličnom, nešto nižem opsegu primećena za izolate gajene u BHI i ŠFS medijumima.
6. Ispitivanjem antimikrobnog efekta lipopeptidnih ekstrakata odabranih izolata *in vitro*, pokazana je veoma visoka senzitivnost testiranih bakterijskih i fungalnih patogena, potvrđujući na taj način ulogu lipopeptidnih jedinjenja u direktnom antagonizmu.
7. Utvrđivanjem tipa interakcija i minimalne inhibitorne koncentracije lipopeptidnih ekstrakata pojedinačno i u različitim kombinacijama *in vitro*, uočeni su svi tipovi interakcija, sa naglašenim aditivnim i sinergističkim efektima u pojedinim kombinacijama protiv bakterijskih i fungalnih patogena.
8. Utvrđen je jak antimikrobni efekat prema fungalnim patogenima roda *Fusarium*, kao i izražen antibakterijski potencijal, naročito ka fitopatogenim vrstama rodova *Xanthomonas* i *Pseudomonas*, sa najnižim zabeleženim minimalnim inhibitornim koncentracijama od 0,06 mg/ml kod bakterijskih, odnosno 0,008 mg/ml kod fungalnih patogena.

9. Ispitivanjem tipa interakcija ekstrakta SS-12.6 i etarskih ulja *in vitro*, detektovan je sinergistički efekat kombinacije ekstrakta sa uljem čubra na rast *A. alternata*, sa uljem timijana protiv *F. nygamai*, kao i u kombinaciji sa oba ulja ka *F. solani*.
10. Za sve dobijene rezultate korišćenjem različitih kombinacija agenasa, u pogledu kako procenata smanjenja fungalne infekcije, tako i procenata klijavosti semena nevena *in situ*, realni sinergistički efekat nije detektovan. Tretmanima u trajanju od 6 h ekstraktom i supernatantom izolata SS-12.6, kao i kombinacijama ekstrakta i ulja čubra ili istovremeno sa oba ulja, postiže se dobar antifungalni efekat bez negativnog uticaja na klijavost semena.
11. Utvrđivanjem direktnog antagonističkog efekta *in planta* ekstrakata lipopeptida dobijenih različitim metodama ekstrakcije, ustanovljen je izrazit protektivni efekat u smislu redukcije nekroze tkiva listova *A. thaliana* i *B. vulgaris* tretiranih bakterijskim patogenima. Takođe, u *in situ* uslovima postignuta je značajna redukcija nekroze tkiva ploda jabuke izazvana fungalom infekcijom.
12. Različite metode ekstrakcije i koncentracije ekstrakata lipopeptida su pokazale njihovu istrajnost u delovanju nakon 7 i 14 dana inkubacije sa patogenima. Pored toga, potvrđeno je i odsustvo toksičnosti prema samom tkivu biljaka.
13. Karakterizacijom lipopeptidnih jedinjenja iz različitih ekstrakata masenom spektrometrijom (MALDI TOF), pokazana je njihova raznovrsnost i dominantno prisustvo članova iturinske i surfaktinske familije na osnovu pretpostavljenih *m/z* vrednosti. Takođe, ovom metodom je potvrđeno da etil-acetatna ekstrakcija daje najbolji prinos ovih jedinjenja.
14. Karakterizacijom aktivnih lipopeptidnih supstanci odabranih izolata visokoefikasnom tankoslojnom hromatografijom praćenom indirektnom bioautografijom, utvrđeno je da je za antibakterijski efekat lipopeptidnih ekstrakata odgovorno jedinjenje iz iturinske familije.

15. Filogenetska rekonstrukcija odabranih *Bacillus* sp. izolata bazirana na sekvenci gena za 16S rRNK pokazala je da izolati: SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 i SS-38.4 pokazuju najviše sličnosti sa *Bacillus amyloliquefaciens*, odnosno *Bacillus pumilus* u slučaju izolata SS-10.7.

\*\*\*\*\*

\*\*\*

Uzimajući u obzir sve ostvarene rezultate potentnog antimikrobnog delovanja i činjenicu da se testirani izolati zajedno sa ostalim članovima *B. subtilis* grupe mogu smatrati bezopasnim, uz opšte prihvaćeni status sigurnih mikroorganizama „Generally recognized as safe - GRAS”, generalni zaključak ove disertacije je promovisanje ispitivanih izolata za dalja istraživanja i primenu u biološkoj kontroli.



## **6. LITERATURA**

## 6 LITERATURA

- Abdel-Kader, M., El-Mougy, N., & Lashin, S. (2011). Essential oils and *Trichoderma harzianum* as an integrated control measure against faba bean root rot pathogens. *Journal of Plant Protection Research*, 51(3), 306-313.
- Abderrahmani, A., Tapi, A., Nateche, F., Chollet, M., Leclère, V., Wathelet, B., ... & Jacques, P. (2011). Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(3), 571-581.
- Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201-232.
- Adaskaveg, J., Forster, H., & Wade, L. (2011). Kasugamycin in combination with copper or mancozeb for management of walnut blight in California. In *Phytopathology* (pp. S2-S2). American Phytopathological Society, USA.
- Ainsworth, C., Sparrow, K., & Sussman, A. (1973). *The Fungi. An advanced treatise. A taxonomic review with keys: Ascomycetes and fungi imperfecti*. Academic Press, London and New York.
- Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology*, 114(3), 329-341.
- Alcaraz, L. D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., ... & Herrera-Estrella, L. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5803-5808.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Alvarez, F., Castro, M., Príncipe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., & Jofre, E. (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 159-174.
- Antoun, H., & Prévost, D. (2006). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In *Biocontrol and biofertilization* (pp.1-38). Springer Netherlands.

- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., & Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 8(63), 1-12.
- Arima, K., Kakinuma, A., & Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31(3), 488-494.
- Aron, Z. D., Dorrestein, P. C., Blackhall, J. R., Kelleher, N. L., & Walsh, C. T. (2005). Characterization of a new tailoring domain in polyketide biogenesis: the amine transferase domain of MycA in the mycosubtilin gene cluster. *Journal of the American Chemical Society*, 127(43), 14986-14987.
- Arrebola, E., Jacobs, R., & Korsten, L. (2010a). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 386-395.
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R., & Korsten, L. (2010b). Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Protection*, 29(4), 369-377.
- Asaduzzaman, S. M., & Sonomoto, K. (2009). Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(5), 475-487.
- Asaka, O., & Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), 4081-4085.
- Assie, L. K., Deleu, M., Arnaud, L., Paquot, M., Thonart, P., Gaspar, C. H., & Haubruge, E. (2001). Insecticide activity of surfactins and iturins from a biopesticide *Bacillus subtilis* Cohn (S499 strain). *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)*, 67(3), 647-655.
- Athukorala, S. N., Fernando, W. D., & Rashid, K. Y. (2009). Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(9), 1021-1032.
- Bai, Y., Zhou, X., & Smith, D. L. (2003). Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of strains with. *Crop Science*, 43(5), 1774-1781.
- Bailey, K. L., Boyetchko, S. M., & Längle, T. (2010). Social and economic drivers shaping the future of biological control: a Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biological Control*, 52(3), 221-229.

- Bailey, K. L., Pitt, W. M., Leggett, F., Sheedy, C., & Derby, J. (2011). Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds. *Biological Control*, 59(2), 268-276.
- Bais, H. P., Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, 134(1), 307-319.
- Bakker, P. A., Pieterse, C. M., & Van Loon, L. C. (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97(2), 239-243.
- Baruzzi, F., Quintieri, L., Morea, M., & Caputo, L. (2011). Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 1102-1111.
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.
- Béchet, M., Caradec, T., Hussein, W., Abderrahmani, A., Chollet, M., Leclère, V., ... & Jacques, P. (2012). Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3), 593-600.
- Belisario, A., Zoina, A., Pezza, L., & Luongo, L. (1999). Susceptibility of species of *Juglans* to pathovars of *Xanthomonas campestris*. *European Journal of Forest Pathology*, 29(1), 75-80.
- Benitez, L. B., Velho, R. V., Lisboa, M. P., da Costa Medina, L. F., & Brandelli, A. (2010). Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *The Journal of Microbiology*, 48(6), 791-797.
- Bent, E. (2006). Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In *Multigenic and induced systemic resistance in plants* (pp. 225-258). Springer US.
- Berić, T. (2010). Biohemijska i molekularno genetička karakterizacija izolata *Bacillus* sp. sa područja Srbije. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Berić, T., Kojić, M., Stanković, S., Topisirović, L., Degrassi, G., Myers, M., ... & Fira, D. (2012). Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 50(1), 25-31.
- Besson, F., Peypoux, F., Michel, G., & Delcambe, L. (1977). Structure de la bacillomycine L, antibiotique de *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 77(1), 61-67.

- Besson, F., & Michel, G. (1987). Isolation and characterization of new iturins: iturin D and iturin E. *The Journal of Antibiotics*, 40(4), 437-442.
- Besson, F., & Michel, G. (1989). Mycosubtilins B and C: minor antibiotics from mycosubtilin-producer *Bacillus subtilis*. *Microbios*, 62(251), 93-99.
- Bierbaum, G., & Sahl, H. G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 2-18.
- Booth, C. (1971a). *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Booth, C. (1971b). Fungal culture media. In: Norris, J. R., Ribbons, D. W., eds. *Methods in Microbiology* (pp. 49-94). Academic Press, London and New York.
- Borisova, S., Circello, B., Zhang, J., van der Donk, W., Metcalf, W. (2010). Biosynthesis of rhizocitines, antifungal phosphonate oligopeptide produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Chemistry and Biology*, 17, 28-37.
- Bressan, W., & Figueiredo, J. F. (2010). Chitinolytic *Bacillus* spp. isolates antagonistic to *Fusarium moniliforme* in maize. *Journal of Plant Pathology*, 343-347.
- Brown, U. (1987). A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). *Nova Hedwigia Beihefte*, 89, 1-700.
- Bullied, J. W., Buss, T. J., & Vessey, K. J. (2002). *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: Field studies. *Canadian Journal of Plant Science*, 82(2), 291-298.
- Bumpus, S. B., Evans, B. S., Thomas, P. M., Ntai, I., & Kelleher, N. L. (2009). A proteomics approach to discovering natural products and their biosynthetic pathways. *Nature Biotechnology*, 27(10), 951-956.
- Burgess, W., Summerell, A., Bullock, S., Gott, K., & Backhouse, D. (1994). *Laboratory manual for Fusarium research*. *Fusarium* Research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, Sydney.
- Butt, T. M., Harris, J. G., & Powell, K. A. (1999). *Microbial biopesticides*. In *Biopesticides: Use and delivery* (pp. 23-44). Humana Press.
- Camacho, M., Santamaria, C., Temprano, F., Rodriguez-Navarro, D. N., & Daza, A. (2001). Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(11), 1058-1062.
- Cao, Y., Xu, Z., Ling, N., Yuan, Y., Yang, X., Chen, L., ... & Shen, Q. (2012). Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Scientia Horticulturae*, 135, 32-39.
- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.

- Casals, C., Elmer, P. A. G., Viñas, I., Teixidó, N., Sisquella, M., & Usall, J. (2012). The combination of curing with either chitosan or *Bacillus subtilis* CPA-8 to control brown rot infections caused by *Monilinia fructicola*. *Postharvest Biology and Technology*, *64*(1), 126-132.
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleantous, C., Llobes, R., Postle, K., ... & Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *71*(1), 158-229.
- Cawoy, H., Bettioli, W., Fickers, P., & Ongena, M. (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases. *Pesticides in the modern world—pesticides use and management. In Tech, Rijeka*, 273-302.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*, doi:10.1111/1751-7915.12238
- Cazorla, F. M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B. J. J., Vicente, A. D., & Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(5), 1950-1959.
- Ceri, H., Turner, R. J., Martinotti, M. G., Rivardo, F., & Allegrone, G. (2013). *U.S. Patent No. 8,377,455*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., & Borriss, R. (2008). More than anticipated—production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *16*(1-2), 14-24.
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süssmuth, R., ... & Borriss, R. (2009a). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, *140*(1), 27-37.
- Chen, X. H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., & Borriss, R. (2009b). Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology*, *140*(1), 38-44.
- Chiocchini, C., Linne, U., & Stachelhaus, T. (2006). *In vivo* biocombinatorial synthesis of lipopeptides by COM domain-mediated reprogramming of the surfactin biosynthetic complex. *Chemistry & Biology*, *13*(8), 899-908.
- Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J. R., Van Aelst, A. C., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10–20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(2), 159-166.

- Cho, S. J., Lim, W. J., Hong, S. Y., Park, S. R., & Yun, H. D. (2003). Endophytic colonization of balloon flower by antifungal strain *Bacillus* sp. CY22. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(10), 2132-2138.
- Choma, I. M., & Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684-2691.
- Cochrane, S. A., & Vederas, J. C. (2014). Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Medicinal Research Reviews*. doi:10.1002/med.21321.
- Conrath, U., Beckers, G. J., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., ... & Mauch-Mani, B. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), 1062-1071.
- Cosby, W. M., Vollenbroich, D., Lee, O. H., & Zuber, P. (1998). Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *Journal of Bacteriology*, 180(6), 1438-1445.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788.
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2006). Assessment of mosquito larvicidal potency of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strains. *Acta Tropica*, 97(2), 168-173.
- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1675-1684.
- de Faria, A. F., Stéfani, D., Vaz, B. G., Silva, Í. S., Garcia, J. S., Eberlin, M. N., ... & Durrant, L. R. (2011). Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* LSFM-05 grown on raw glycerol. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(7), 863-871.
- Debois, D., Jourdan, E., Smargiasso, N., Philippe, T., De Pauw, E., & Ongena, M. (2014). Spatiotemporal monitoring of the antibiome secreted by *Bacillus* biofilms on plant roots using MALDI Mass Spectrometry Imaging. *Analytical chemistry*, 86(9), 4431-4438.
- Deleu, M., Paquot, M., & Nylander, T. (2008). Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophysical Journal*, 94(7), 2667-2679.
- Dietel, K., Budiharjo, A., & Borriss, R. (2013). Bacterial traits involved in colonization of *Arabidopsis thaliana* roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *The Plant Pathology Journal*, 29(1), 59-66.

- Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., & Fira, D. (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*, 65(3), 312-321.
- Du, L., Sánchez, C., & Shen, B. (2001). Hybrid peptide–polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metabolic Engineering*, 3(1), 78-95.
- Dubois, T., Faegri, K., Perchat, S., Lemy, C., Buisson, C., Nielsen-LeRoux, C., ... & Lereclus, D. (2012). Necrotrophism is a quorum-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathogens*, 8, e1002629.
- Duitman, E. H., Hamoen, L. W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., ... & Vater, J. (1999). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13294-13299.
- Dutta, B., Ingram, T., Gitaitis, R. D., Langston, D. B., Brenneman, T., Webster, T. M., & Davis, R. F. (2014). First report of bacterial blight of sugar beet caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Georgia, USA. *Plant Disease*, 98(10), 1423-1423.
- Ellis, M. B., & Ellis, J. P. (1997). *Microfungi on land plants. An identification handbook. New enlarged edition.* The Richmond Publishing Co. Ltd, Slough, England.
- Eshita, S. M., Roberto, N. H., Beale, J. M., Mamiya, B. M., & Workman, R. F. (1995). Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *The Journal of Antibiotics*, 48(11), 1240-1247.
- Estevez de Jensen, C., Percich, J. A., & Graham, P. H. (2002). Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. *Field Crops Research*, 74(2), 107-115.
- Etchegaray, A., de Castro Bueno, C., de Melo, I. S., Tsai, S. M., de Fátima Fiore, M., Silva-Stenico, M. E., ... & Teschke, O. (2008). Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of Microbiology*, 190(6), 611-622.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2000). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection*, 6, 503-508.
- European Food Safety Authority (2008). Safety and efficacy of Ecobiol<sup>®</sup> (*Bacillus amyloliquefaciens*) as feed additive for chickens for fattening. *The EFSA Journal*, 773, 2-13.



- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. J. (2013). Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 869-878.
- Finking, R., & Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides 1. *Annual Review of Microbiology*, 58, 453-488.
- Fira, Dj., Berić., T., & Stanković, S., (2014). Biological control of plant pathogens by the strains of *Bacillus* sp. In: Kumar, F. A., ed. *Biotechnology Vol. 2. Plant Biotechnology*. Studium Press LLC, India.
- Fokkema, N. J. (1978). Fungal antagonisms in the phyllosphere. *Annals of Applied Biology*, 89(1), 115-119.
- Food and Drug Administration (1999). Code of Federal Regulations, Title 21: Food and Drugs, Chapter 1: Food and Drug Administration Department of Health and Human Services, Part 184: Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe. US Government Printing Office, Washington, DC.
- From, C., Hormazabal, V., & Granum, P. E. (2007). Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 319-324.
- Fuentes-Ramirez, L. E., & Caballero-Mellado, J. (2006). *Bacterial biofertilizers*. In *PGPR: Biocontrol and biofertilization* (pp. 143-172). Springer Netherlands.
- Galli, G., Rodriguez, F., Cosmina, P., Pratesi, C., Nogarotto, R., & Guido Grandi, F. (1994). Characterization of the surfactin synthetase multi-enzyme complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1205(1), 19-28.
- Galperin, M., Graf, S., & Kenigsbuch, D. (2003). Seed treatment prevents vertical transmission of *Fusarium moniliforme*, making a significant contribution to disease control. *Phytoparasitica*, 31(4), 344-352.
- Gebhardt, K., Schimana, J., Müller, J., Fiedler, H. P., Kallenborn, H. G., Holzenkämpfer, M., ... & Dettner, K. (2002). Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. *FEMS Microbiology Letters*, 217(2), 199-205.
- Gerlach, W., & Nirenberg, H. (1982). *The genus Fusarium - a pictorial atlas*. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.
- Gevers, W., Kleinkauf, H., & Lipmann, F. (1968). The activation of amino acids for biosynthesis of gramicidin S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 60(1), 269.
- Gilden, R. C., Huffling, K., & Sattler, B. (2010). Pesticides and health risks. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*, 39(1), 103-110.

- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., ... & Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, 30(5), 250-258.
- Gond, S. K., Bergen, M., Torres, M., & White, J. F. (2014). Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defense gene expression in maize. *Microbiological Research*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2014.11.004>.
- Gordillo, M. A., Navarro, A. R., Benitez, L. M., Plaza, I. T. D., & Maldonado, M. C. (2009). Preliminary study and improve the production of metabolites with antifungal activity by a *Bacillus* sp. strain IBA 33. *Microbiology Insights*, 2, 15-24.
- Gordillo, M. A., & Maldonado, M. C. (2012). Purification of peptides from *Bacillus* strains with biological activity. In: Dhanarasu, S., ed. *Chromatography and its applications* (pp. 201-224). Shanghai, China, InTech.
- Goto, K., Omura, T., Hara, Y., & Sadaie, Y. (2000). Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 46, 1-8.
- Grangemard, I., Bonmatin, J. M., Bernillon, J., Das, B. C., & Peypoux, F. (1999). Lichenysins G, a novel family of lipopeptide biosurfactants from *Bacillus licheniformis* IM 1307: production, isolation and structural evaluation by NMR and mass spectrometry. *The Journal of Antibiotics*, 52(4), 363-373.
- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307-319.
- Hagelin, G. (2005a). Structure investigation of maltacine B1a, B1b, B2a and B2b: cyclic peptide lactones of the maltacine complex from *Bacillus subtilis*. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(4), 527-538.
- Hagelin, G. (2005b). Structure investigation of maltacine C1a, C1b, C2a and C2b: cyclic peptide lactones of the maltacine complex from *Bacillus subtilis*. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(10), 1276-1286.
- Hagelin, G. (2005c). Structure investigation of maltacine D1a, D1b and D1c: cyclic peptide lactones of the maltacine complex from *Bacillus subtilis*. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(10), 1287-1299.
- Hagelin, G. (2005d). Mass spectrometric investigation of maltacines E1a and E1b—2 members of the maltacine family of peptide antibiotics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(24), 3633-3642.
- Hagelin, G., Indrevoll, B., & Hoeg-Jensen, T. (2007). Use of synthetic analogues in confirmation of structure of the peptide antibiotics maltacines. *International Journal of Mass Spectrometry*, 268, 254-264.

- Hahn, M., & Stachelhaus, T. (2004). Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(44), 15585-15590.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT systems. *Nucleic Acids Symposium Series 41*, 95–98.
- Hamdache, A., Azarken, R., Lamarti, A., Aleu, J., & Collado, I. G. (2013). Comparative genome analysis of *Bacillus* spp. and its relationship with bioactive nonribosomal peptide production. *Phytochemistry Reviews*, *12*(4), 685-716.
- Hansen, M., Thrane, C., Olsson, S., & Sørensen, J. (2000). Confocal imaging of living fungal hyphae challenged with the fungal antagonist viscosinamide. *Mycologia*, 216-221.
- Harnois, I., Maget-Dana, R., & Ptak, M. (1989). Methylation of the antifungal lipopeptide iturin A modifies its interaction with lipids. *Biochimie*, *71*(1), 111-116.
- Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E., & Klaenhammer, T. R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, *52*(6), 384-387.
- Harwood, C. R., & Cranenburgh, R. (2008). *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends in Microbiology*, *16*(2), 73-79.
- Hasumi, K., Takizawa, K., Takahashi, F., Park, J. K., & Endo, A. (1995). Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase by isohalobacillin, a complex of novel cyclic acylpeptides produced by *Bacillus* sp. A1238. *The Journal of Antibiotics*, *48*(12), 1419-1424.
- Hathout, Y., Ho, Y. P., Ryzhov, V., Demirev, P., & Fenselau, C. (2000). Kurstakins: A new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Natural Products*, *63*(11), 1492-1496.
- Heerklotz, H., & Seelig, J. (2007). Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *European Biophysics Journal*, *36*(4-5), 305-314.
- Heng, N. C., & Tagg, J. R. (2006). What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, *4*(2), doi:10.1038/nrmicro1273-c1.
- Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., & Fujii, Y. (2002). Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, *61*(6), 693-698.
- Hirata, F., & Axelrod, J. (1980). Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science*, *209*(4461), 1082-1090.

- Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., ... & Vater, J. (2004). Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(4), 363-378.
- Hoitink, H. A. J., & Boehm, M. J. (1999). Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology*, 37(1), 427-446.
- Hong, H. A., Duc, L. H., & Cutting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 813-835.
- Hoster, F., Schmitz, J. E., & Daniel, R. (2005). Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), 434-442.
- Hsieh, F. C., Li, M. C., Lin, T. C., & Kao, S. S. (2004). Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Current Microbiology*, 49(3), 186-191.
- Huang, X., Wei, Z., Zhao, G., Gao, X., Yang, S., & Cui, Y. (2008). Optimization of sterilization of *Escherichia coli* in milk by surfactin and fengycin using a response surface method. *Current Microbiology*, 56(4), 376-381.
- Hwang, Y. H., Park, B. K., Lim, J. H., Kim, M. S., Park, S. C., Hwang, M. H., & Yun, H. I. (2007). Lipopolysaccharide-binding and neutralizing activities of surfactin C in experimental models of septic shock. *European Journal of Pharmacology*, 556(1), 166-171.
- Ivanović, Ž. (2011). Molekularna karakterizacija prirodnih izolata bakterije *Pseudomonas syringae* i identifikacija agenasa za njihovu biološku kontrolu. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Ivanović, Ž., Popović, T., Janse, J., Kojić, M., Stanković, S., Gavrilović, V., & Fira, D. (2014). Molecular assessment of genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains from Serbia by various DNA fingerprinting techniques. *European Journal of Plant Pathology*, 1-13.
- Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*, 59(2), 171-200.
- Jacob, F. A., Lwoff, A. S., & Siminovitch, A. A. and Wollman, E. 1953. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)*, 84, 222-224.
- Jacques, P. (2011). Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In *Biosurfactants* (pp. 57-91). Springer Berlin Heidelberg.

- Janisiewicz, W. J., & Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 411-441.
- Jenny, K., Deltrieu, V., & Käppeli, O. (1993). Lipopeptide production by *Bacillus licheniformis*. *Surfactant Science Series*, 135-156.
- Jeyasekaran, G., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2000). Effect of sanitizers on *Listeria* biofilm on contact surfaces. *Asian Fisheries Science*, 13(3), 209-213.
- Joshi, S., Bharucha, C., & Desai, A. J. (2008). Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technology*, 99(11), 4603-4608.
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J. P., Thonart, P., & Ongena, M. A. R. C. (2009). Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(4), 456-468.
- Kajimura, Y., Sugiyama, M., & Kaneda, M. (1995). Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. *The Journal of Antibiotics*, 48(10), 1095-1103.
- Kalinovskaya, N. I., Kuznetsova, T. A., Ivanova, E. P., Romanenko, L. A., Voinov, V. G., Huth, F., & Laatsch, H. (2002). Characterization of surfactin-like cyclic depsipeptides synthesized by *Bacillus pumilus* from ascidian *Halocynthia aurantium*. *Marine Biotechnology*, 4(2), 179-188.
- Kameda, Y., Oira, S., Matsui, K., Kanatomo, S., & Hase, T. (1974). Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 22(4), 938-944.
- Katz, E., & Demain, A. L. (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological reviews*, 41(2), 449.
- Kikuchi, T., & Hasumi, K. (2002). Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis *in vitro* and *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1596(2), 234-245.
- Kim, P. I., Ryu, J., Kim, Y. H., & Chi, Y. T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 138-145.
- Kim, S. D., Park, S. K., Cho, J. Y., Park, H. J., Lim, J. H., Yun, H. I., ... & Rhee, M. H. (2006). Surfactin C inhibits platelet aggregation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(6), 867-870.

- Kinsella, K., Schulthess, C. P., Morris, T. F., & Stuart, J. D. (2009). Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(2), 374-379.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 10th International Mycological Institute*. CAB International, Wallingford, UK.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 39-85.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259-1266.
- Konz, D., Doekel, S., & Marahiel, M. A. (1999). Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *Journal of Bacteriology*, 181(1), 133-140.
- Kopp, F., & Marahiel, M. A. (2007). Macrocyclization strategies in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Natural Product Reports*, 24(4), 735-749.
- Korsten, L., & De Jager, E. S. (1995). Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 18, 124-130.
- Koumoutsis, A., Chen, X. H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., ... & Borriss, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186(4), 1084-1096.
- Kritzinger, Q., Aveling, T. A. S., & Marasas, M. F. O. (2002). Effect of essential plant oils on storage fungi, germination and emergence of cowpea seeds. *Seed Science and Technology*, 30, 609-619.
- Kumar, A., Saini, P., & Shrivastava, J. N. (2009). Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47, 57-62.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G. O., Azevedo, V., ... & Haga, K. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249-256.
- Laloo, R., Maharajh, D., Görgens, J., & Gardiner, N. (2010). A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(2), 499-508.
- Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B., & Urdaci, M. C. (2000). Biochemical and genetic characterization of coagulins, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5213-5220.

- Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J. S., Wathelet, B., Ongena, M., ... & Jacques, P. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4577-4584.
- Lee, J. P., Lee, S. W., Kim, C. S., Son, J. H., Song, J. H., Lee, K. Y., ... & Moon, B. J. (2006). Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological control*, 37(3), 329-337.
- Lee, S. C., Kim, S. H., Park, I. H., Chung, S. Y., & Choi, Y. L. (2007). Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. *Archives of Microbiology*, 188(4), 307-312.
- Lehr, P. (2010). Biopesticides: the Global Market. Report code CHM029B, BCC Research.
- Li, L., Mo, M., Qu, Q., Luo, H., & Zhang, K. (2007). Compounds inhibitory to nematophagous fungi produced by *Bacillus* sp. strain H6 isolated from fungistatic soil. *European Journal of Plant Pathology*, 117(4), 329-340.
- Li, Y. M., Haddad, N. I., Yang, S. Z., & Mu, B. Z. (2008). Variants of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* HSN221 in different medium components evaluated by a rapid method ESI-MS. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 14(3), 229-235.
- Liu, R. F., Zhang, D. J., Li, Y. G., Tao, L. M., & Tian, L. (2010). A new antifungal cyclic lipopeptide from *Bacillus marinus* B-9987. *Helvetica Chimica Acta*, 93(12), 2419-2425.
- Logan, N. A., Popovic, T., & Hoffmaster, A. (2007). *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In *Manual of clinical microbiology* (pp. 455-473). ASM Press, Washington, DC.
- Logan, N.A., & De Vos, P. (2009). Genus *Bacillus*. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. and Whitman, W.B. eds. *Volume Three The Firmicutes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition* (pp. 21–128). Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Loper, J. E., & Henkels, M. D. (1997). Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 99-105.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.

- Luongo L., Santori A., Riccioni L., & Belisario A. (2011). *Phomopsis* sp. associated with post-harvest fruit rot of kiwifruit in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 93(1), 205-209.
- Ma, Z., Wang, N., Hu, J., & Wang, S. (2012). Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. *The Journal of Antibiotics*, 65(6), 317-322.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., & Ptak, M. (1992). Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*, 74(12), 1047-1051.
- Maget-Dana, R., & Peypoux, F. (1994). Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*, 87(1), 151-174.
- Malfanova, N., Franzil, L., Lugtenberg, B., Chebotar, V., & Ongena, M. (2012). Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Archives of Microbiology*, 194(11), 893-899.
- Mancini, V., & Romanazzi, G. (2014). Seed treatments to control seedborne fungal pathogens of vegetable crops. *Pest Management Science*, 70(6), 860-868.
- Manjula, K., & Podile, A. R. (2005). Production of fungal cell wall degrading enzymes by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(10), 892.
- Mărghitaș, L. A., Dezmirean, D. S., & Bobiș, O. (2013). Important developments in Romanian propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-9.
- Margosan, D. A., Smilanick, J. L., Simmons, G. F., & Henson, D. J. (1997). Combination of hot water and ethanol to control postharvest decay of peaches and nectarines. *Plant Disease*, 81(12), 1405-1409.
- Marston, A. (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2676-2683.
- May, R., Völksch, B., & Kampmann, G. (1997). Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* *in vitro* and *in planta*. *Microbial ecology*, 34(2), 118-124.
- Mayerhofer, G., Schwaiger-Nemirova, I., Kuhn, T., Girsch, L., & Allerberger, F. (2009). Detecting streptomycin in apples from orchards treated for fire blight. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, doi:10.1093/jac/dkp055.
- Mc Keen, C. D., Reilly, C. C., & Pusey, P. L. (1986). Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 76(2), 136-139.



- Mc Spadden Gardener, B. B. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 94(11), 1252-1258.
- Medina, A., Probanza, A., Gutierrez Mañero, F. J., & Azcón, R. (2003). Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effects on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). *Applied Soil Ecology*, 22(1), 15-28.
- Melo, F. M. P. D., Fiore, M. F., Moraes, L. A. B. D., Silva-Stenico, M. E., Scramin, S., Teixeira, M. D. A., & Melo, I. S. D. (2009). Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. *Scientia Agricola*, 66(5), 583-592.
- Miller, J. M. (2005). *Chromatography: concepts and contrasts*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Mizumoto, S., Hirai, M., & Shoda, M. (2006). Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(5), 869-875.
- Mofid, M. R., Finking, R., Essen, L. O., & Marahiel, M. A. (2004). Structure-based mutational analysis of the 4'-phosphopantetheinyl transferases Sfp from *Bacillus subtilis*: carrier protein recognition and reaction mechanism. *Biochemistry*, 43(14), 4128-4136.
- Monteiro, S. M., Clemente, J. J., Henriques, A. O., Gomes, R. J., Carrondo, M. J., & Cunha, A. E. (2005). A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*, 21(4), 1026-1031.
- Montesinos, E., & Bonaterra, A. 1996. Dose-response models in biological control of plant pathogens: an empirical verification. *Phytopathology*, 86, 856-863.
- Mootz, H. D., Finking, R., & Marahiel, M. A. (2001). 4'-Phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37289-37298.
- Moragrega, C., & Özaktan, H. (2010). Apical necrosis of Persian (English) walnut (*Juglans regia*): An update. *Journal of Plant Pathology*, S67-S71.
- Moragrega, C., Matias, J., Aletà, N., Montesinos, E., & Rovira, M. (2011). Apical necrosis and premature drop of Persian (English) walnut fruit caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Plant Disease*, 95(12), 1565-1570.
- Morlock, G., & Schwack, W. (2010). Hyphenations in planar chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217(43), 6600-6609.
- Moyne, A. L., Shelby, R., Cleveland, T. E., & Tuzun, S. (2001). Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 622-629.

- Moyne, A. L., Cleveland, T. E., & Tuzun, S. (2004). Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiology Letters*, 234(1), 43-49.
- Mukherjee, A. K., & Das, K. (2005). Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(3), 479-489.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), 183-198.
- Munimbazi, C., & Bullerman, L. B. (1998). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 959-968.
- Nagórska, K., Bikowski, M., & Obuchowski, M. (2007). Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 495-508.
- Nakano, M. M., & Hulett, F. M. (1997). Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS Microbiology Letters*, 157(1), 1-7.
- Nelson, E., Toussoun, A., & Marasas, O. (1983). *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.
- Nes, I. F., Yoon, S., & Diep, D. B. (2007). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*, 16(5), 675.
- Nett, M., Ikeda, H., & Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports*, 26(11), 1362-1384.
- Nicolas, J. P. (2003). Molecular dynamics simulation of surfactin molecules at the water-hexane interface. *Biophysical Journal*, 85(3), 1377-1391.
- Nielsen, T. H., Thrane, C., Christophersen, C., Anthoni, U., & Sørensen, J. (2000). Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin—a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), 992-1001.
- Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 176-191.
- Nishikiori, T., Naganawa, H., Muraoka, Y., Aoyagi, T., & Umezawa, H. (1986a). Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus*

- BMG302-fF67. III. Structural elucidation of plipastatins. *The Journal of Antibiotics*, 39(6), 755-761.
- Nishikiori, T., Naganawa, H., Muraoka, Y., Aoyagi, T., & Umezawa, H. (1986b). Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-fF67. II. Structure of fatty acid residue and amino acid sequence. *The Journal of Antibiotics*, 39(6), 745-754.
- Nissen-Meyer, J., & Nes, I. F. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbiology*, 167(2-3), 67-77.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P., & Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84(5), 593-604.
- Obagwu, J., & Korsten, L. (2003). Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology*, 28(1), 187-194.
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., & Thonart, P. (2005). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(1), 29-38.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., ... & Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology*, 9(4), 1084-1090.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 2, 1117-1142.
- Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., & Juven, B. (1995). Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection*, 58(1), 81-85.
- Pathak, K. V., Keharia, H., Gupta, K., Thakur, S. S., & Balaram, P. (2012). Lipopeptides from the banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: mass spectrometric characterization of a library of fengycins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 23(10), 1716-1728.
- Pedersen, P. B., Bjørnvad, M. E., Rasmussen, M. D., & Petersen, J. N. (2002). Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 36(2), 155-161.

- Pérez-García, A., Romero, D., & De Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 187-193.
- Peypoux, F., Guinand, M., Michel, G., Delcambe, L., Das, B. C., & Lederer, E. (1978a). Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 17, 3992-3996.
- Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., Delcambe, L., & Das, B. C. (1978b). Structure de l'iturine C de *Bacillus subtilis*. *Tetrahedron*, 34(8), 1147-1152.
- Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., & Delcambe, L. (1981). Structure of bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin group. *European Journal of Biochemistry*, 118(2), 323-327.
- Peypoux, F., Marion, D., Maget-Dana, R., Ptak, M., Das, B. C., & Michel, G. (1985). Structure of bacillomycin F, a new peptidolipid antibiotic of the iturin group. *European Journal of Biochemistry*, 153(2), 335-340.
- Peypoux, F., Pommier, M. T., Marion, D., Ptak, M., Das, B. C., & Michel, G. (1986). Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Antibiotics*, 39(5), 636-641.
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M., & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), 553-563.
- Pitt, I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. *Journal of Basic Microbiology*, 21, 629-629.
- Price, N. P., Rooney, A. P., Swezey, J. L., Perry, E., & Cohan, F. M. (2007). Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. *FEMS Microbiology Letters*, 271(1), 83-89.
- Priest, F. (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria* (pp. 3-16). ASM Press, Washington, DC.
- Pueyo, M. T., Bloch Jr, C., Carmona-Ribeiro, A. M., & di Mascio, P. (2009). Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. *Microbial Ecology*, 57(2), 367-378.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 494-507.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037-1062.
- Rahman, M. S., Ano, T., & Shoda, M. (2006). Second stage production of iturin A by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14. *Journal of Biotechnology*, 125(4), 513-515.

- Rahman, M. M., Richardson, A., & Sofian-Azirun, M. (2010). Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, 4(16), 1872-1878.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., & Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20(1), 1-11.
- Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernando, W. D., Xuewen, G., & De Kievit, T. (2007). Molecular and biochemical detection of fengycin-and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(7), 901-911.
- Rao, Y. K., Lin, H. Y., Wu, W. S., & Tzeng, Y. M. (2008). Evaluation of HPLC and MEKC methods for the analysis of lipopeptide antibiotic iturin A produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 6(2), 85-96.
- Rey, M. W., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpin, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, M., ... & Berka, R. M. (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, 5(10), r77.
- Richer, D. L. (1987). Synergism: a patent view. *Pest Management Science*, 19, 309-315.
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002a). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84(5), 357-364.
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002b). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 117-137.
- Romano, A., Vitullo, D., Di Pietro, A., Lima, G., & Lanzotti, V. (2011). Antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO7. *Journal of Natural Products*, 74(2), 145-151.
- Romano, A., Vitullo, D., Senatore, M., Lima, G., & Lanzotti, V. (2013). Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO5A. *Journal of Natural Products*, 76(11), 2019-2025.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., ... & Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430-440.
- Roongsawang, N., Thaniyavarn, J., Thaniyavarn, S., Kameyama, T., Haruki, M., Imanaka, T., ... & Kanaya, S. (2002). Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles*, 6(6), 499-506.

- Roongsawang, N., Washio, K., & Morikawa, M. (2010). Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 141-172.
- Rosen, H. (1957). A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 67(1), 10-15.
- Rückert, C., Blom, J., Chen, X., Reva, O., & Borriss, R. (2011). Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7<sup>T</sup> reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Biotechnology*, 155(1), 78-85.
- Ryan, P. R., Dessaux, Y., Thomashow, L. S., & Weller, D. M. (2009). Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant and Soil*, 321(1-2), 363-383.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3), 1017-1026.
- Sabaté, D. C., & Audisio, M. C. (2013). Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. *Microbiological Research*, 168(3), 125-129.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), 283-300.
- Sang-Cheol, L., Kim, S. H., Park, I. H., Chung, S. Y., Chandra, M. S., & Yong-Lark, C. (2010). Isolation, purification, and characterization of novel fengycin S from *Bacillus amyloliquefaciens* LSC04 degrading-crude oil. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(2), 246-253.
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(2), 127-144.
- Schoenafinger, G., & A Marahiel, M. (2009). Nonribosomal peptides: biosynthesis. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, 3,432-440.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C. (2007). *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. CRC Press, New York.
- Šegvić Klarić, M., Kosalec, I., Mastelić, J., Pieckova, E., & Pepeljnak, S. (2007). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*, 44(1), 36-42.
- Seydlová, G., & Svobodová, J. (2008). Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Central European Journal of Medicine*, 3(2), 123-133.

- Sharma, N., Attri, A., & Gautam, N. (2009). Purification and characterization of bacteriocin like substance produced from *Bacillus lentus* with perspective of a new biopreservative for food preservation. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 52, 191-199.
- Shoresh, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 21-43.
- Sieber, S. A., & Marahiel, M. A. (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chemical Reviews*, 105(2), 715-738.
- Siefert, J. L., Larios-Sanz, M., Nakamura, L. K., Slepecky, R. A., Paul, J. H., Moore, E. R., ... & Jurtshuk Jr, P. (2000). Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. *Current Microbiology*, 41(2), 84-88.
- Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J., & Handelsman, J. (1994). Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2023-2030.
- Silo-Suh, L. A., Stabb, E. V., Raffel, S. J., & Handelsman, J. (1998). Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. *Current Microbiology*, 37(1), 6-11.
- Slepecky, R. A., & Hemphill, H. E. (2006). The genus *Bacillus*—nonmedical. In *The prokaryotes* (pp. 530-562). Springer US.
- Smith, K. P., Havey, M. J., & Handelsman, J. (1993). Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. *Plant Disease*, 77(2), 139-142.
- Smith, K. P., Handelsman, J., & Goodman, R. M. (1997). Modeling dose-response relationships in biological control: partitioning host responses to the pathogen and biocontrol agent. *Phytopathology*, 87(7), 720-729.
- Solaiman, D. K. Y. (2005). Applications of microbial biosurfactants. *Inform-Champaign*, 16(7), 408.
- Sorokulova, I. B., Krumnow, A. A., Pathirana, S., Mandell, A. J., & Vodyanoy, V. (2008). Novel methods for storage stability and release of *Bacillus* spores. *Biotechnology Progress*, 24(5), 1147-1153.
- Souto, G. I., Correa, O. S., Montecchia, M. S., Kerber, N. L., Pucheu, N. L., Bachur, M., & Garcia, A. F. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1247-1256.
- Stanković, S. (2003). Identifikacija introna kod *Bacillus* sp. izolovanih iz prirodnih staništa. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

- Stankovic, S., Soldo, B., Beric-Bjedov, T., Knezevic-Vukcevic, J., Simic, D., & Lazarevic, V. (2007). Subspecies-specific distribution of intervening sequences in the *Bacillus subtilis* prophage ribonucleotide reductase genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 30(1), 8-15.
- Stanković, S., Mihajlović, S., Draganić, V., Dimkić, I., Vukotić, G., Berić, T., & Fira, Đ. (2012). Screening for the presence of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates of *Bacillus* sp. *Archives of Biological Sciences*, 64(4), 1425-1432.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857.
- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., ... & Vater, J. (1999). Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chemistry & Biology*, 6(1), 31-41.
- Steller, S., Sokoll, A., Wilde, C., Bernhard, F., Franke, P., & Vater, J. (2004). Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD-thioesterase protein. *Biochemistry*, 43(35), 11331-11343.
- Stević, T. (2013). Komparativna analiza agenasa za biološku kontrolu patogenih gljiva izolovanih sa lekovitih biljaka, Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Stević, T., Berić, T., Šavikin, K., Soković, M., Gođevac, D., Dimkić, I., & Stanković, S. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 55, 116-122.
- Stojšin, V., Balaž, J., Budakov, D., Stanković, S., Nikolić, I., Ivanović, Ž., & Popović, T. (2014). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* causing bacterial leaf spot on sugar beet in Serbia. *Plant Disease*, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0628-PDN>.
- Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Phytopathology*, 43.
- Sun, L., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., & Yang, S. (2006). Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1259-1266.
- Symmank, H., Franke, P., Saenger, W., & Bernhard, F. (2002). Modification of biologically active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. *Protein Engineering*, 15(11), 913-921.
- Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., ... & Horikoshi, K. (2000). Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium



- Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4317-4331.
- Takami, H., Takaki, Y., Chee, G. J., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, H., ... & Uchiyama, I. (2004). Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Nucleic Acids Research*, 32(21), 6292-6303.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Tao, Y., Bie, X. M., Lv, F. X., Zhao, H. Z., & Lu, Z. X. (2011). Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer*. *The Journal of Microbiology*, 49(1), 146-150.
- Tendulkar, S. R., Saikumari, Y. K., Patel, V., Raghotama, S., Munshi, T. K., Balaram, P., & Chattoo, B. B. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2331-2339.
- Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2(3), 194-208.
- Thasana, N., Prapagdee, B., Rangkadilok, N., Sallabhan, R., Aye, S. L., Ruchirawat, S., & Loprasert, S. (2010). *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtilene A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated beta-amino acid. *FEBS Letters*, 584(14), 3209-3214.
- The International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (pp. 489-521). 56 International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Thimon, L., Peypoux, F., Wallach, J., & Michel, G. (1995). Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiology Letters*, 128(2), 101-106.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876-4882.
- Thrane, C., Olsson, S., Nielsen, T. H., & Sørensen, J. (1999). Vital fluorescent stains for detection of stress in *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* challenged with

- viscosinamide from *Pseudomonas fluorescens* DR54. *FEMS Microbiology Ecology* 33, 11-23.
- Tornero, P., & Dangl, J. L. (2001). A high-throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 28(4), 475-481.
- Toro, M., Azcon, R., & Barea, J. (1997). Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability ((sup32) P) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4408-4412.
- Tosato, V., Albertini, A. M., Zotti, M., Sonda, S., & Bruschi, C. V. (1997). Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology*, 143(11), 3443-3450.
- Toure, Y., Ongena, M. A. R. C., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1151-1160.
- Trischman, J. A., Jensen, P. R., & Fenical, W. (1994). Halobacillin: A cytotoxic cyclic acylpeptide of the iturin class produced by a marine *Bacillus*. *Tetrahedron Letters*, 35(31), 5571-5574.
- Tsuge, K., Ano, T., & Shoda, M. (1996). Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8. *Archives of Microbiology*, 165(4), 243-251.
- Tsuge, K., Ano, T., Hirai, M., Nakamura, Y., & Shoda, M. (1999). The genes *degQ*, *pps*, and *lpa-8* (*sfp*) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9), 2183-2192.
- Tsuge, K., Akiyama, T., & Shoda, M. (2001). Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6265-6273.
- Tsuge, K., Inoue, S., Ano, T., Itaya, M., & Shoda, M. (2005). Horizontal transfer of iturin A operon, *itu*, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 4641-4648.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (2011). Regulating Biopesticides. <http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/>.
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Nishikiori, T., Okuyama, A., Yamagishi, Y., Hamada, M., & Takeuchi, T. (1986). Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-fF67. I. Taxonomy, production, isolation and preliminary characterization. *The Journal of Antibiotics*, 39(6), 737-744.

- Urdaci, M. C., & Pinchuk, I. (2004). Antimicrobial activity of *Bacillus* probiotics. In: Ricca, E., Henriques, A. O., Cutting, S. M., eds. *Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications* (pp. 171-182). Norfolk UK, Horizon bioscience.
- Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369-380.
- Van Belkum, M. J., & Stiles, M. E. (2000). Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Natural Product Reports*, 17(4), 323-335.
- Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 243-254.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., & Jung, G. (1986). Fengycin - a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *The Journal of Antibiotics*, 39(7), 888-901.
- Vater, J. (1986). Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 72, 12-18.
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., & Cameotra, S. S. (2002). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6210-6219.
- Vater, J., Gao, X., Hitzeroth, G., Wilde, C., & Franke, P. (2003). "Whole Cell"-Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry, an Emerging Technique for Efficient Screening of Biocombinatorial Libraries of Natural Compounds-Present State of Research. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 6(6), 557-567.
- Velho, R. V., Medina, L. F. C., Segalin, J., & Brandelli, A. (2011). Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiologica*, 56(4), 297-303.
- Velmurugan, N., Choi, M. S., Han, S. S., & Lee, Y. S. (2009). Evaluation of antagonistic activities of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* against wood-staining fungi: *in vitro* and *in vivo* experiments. *The Journal of Microbiology*, 47(4), 385-392.
- Vessey, J. K., & Buss, T. J. (2002). *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: Controlled-environment studies. *Canadian Journal of Plant Science*, 82(2), 282-290.
- Villegas-Escobar, V., Ceballos, I., Mira, J. J., Argel, L. E., Orduz Peralta, S., & Romero-Tabarez, M. (2013). Fengycin C produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *Journal of Natural Products*, 76(4), 503-509.

- Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M., & Vater, J. (1997). Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 44-49.
- Volpon, L., Besson, F., & Lancelin, J. M. (1999). NMR structure of active and inactive forms of the sterol-dependent antifungal antibiotic bacillomycin L. *European Journal of Biochemistry*, 264(1), 200-210.
- Volpon, L., Besson, F., & Lancelin, J. M. (2000). NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub>. *FEBS Letters*, 485(1), 76-80.
- Wang, J., Liu, J., Chen, H., & Yao, J. (2007). Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 889-894.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(1), 487-511.
- Willey, J. M., & van Der Donk, W. A. (2007). Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology*, 61, 477-501.
- Wong, K. H., Razmovski-Naumovski, V., Li, K. M., Li, G. Q., & Chan, K. (2014). Differentiating Puerariae Lobatae Radix and Puerariae Thomsonii Radix using HPTLC coupled with multivariate classification analyses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 95, 11-19.
- Wu, X. Y., Walker, M. J., Hornitzky, M., & Chin, J. (2006). Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), 107-119.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Wray, V., & Fredrickson, H. L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1706-1713.
- Yáñez-Mendizábal, V., Zerriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., ... & Teixidó, N. (2012). Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 132(4), 609-619.
- Yang, S. Z., Wei, D. Z., & Mu, B. Z. (2006). Determination of the amino acid sequence in a cyclic lipopeptide using MS with DHT mechanism. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 68(1), 69-74.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., & Shirata, A. (2001). Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 91(2), 181-187.

- Yoshida, S., Shirata, A., & Hiradate, S. (2002). Ecological characteristics and biological control of mulberry anthracnose. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 36(2), 89-96.
- Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., & Bertagnolli, B. L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7), 955-963.
- Zambonelli, A., d'Aulerio, A. Z., Bianchi, A., & Albasini, A. (1996). Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. *Journal of Phytopathology*, 144(9-10), 491-494.
- Zeigler, D. R., & Perkins, J. B. (2009). The Genus *Bacillus*. Practical handbook of Microbiology. *Taylor & Francis Group*, 200, 24.
- Zeriouh, H., Romero, D., García-Gutiérrez, L., Cazorla, F. M., de Vicente, A., & Pérez-García, A. (2011). The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(12), 1540-1552.
- Zhang, D. J., Liu, R. F., Li, Y. G., Tao, L. M., & Tian, L. (2010). Two new antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus marinus* B-9987. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(12), 1630-1634.
- Zhang, H. L., Hua, H. M., Pei, Y. H., & Yao, X. S. (2004). Three new cytotoxic cyclic acylpeptides from marine *Bacillus* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(8), 1029-1030.
- Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C., & Gu, Y. (2010). Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology*, 101(1), 292-297.
- Zheng, X. Y., & Sinclair, J. B. (2000). The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of *Rhizoctonia* root rot of soybean. *BioControl*, 45(2), 223-243.

## **7. PRILOZI**

## 7 PRILOZI

Prilog 1. Detekcija biosintetskih operona kod *Bacillus* sp. izolata poreklom iz sena i slame.

Redni br.	Izolat	FEND	BACC	ITUP	P17/P18	AKS/TKS
1	SS-1.1	-	-	-	+	-
2	SS-2.1	-	+	-	+	-
3	SS-2.2	-	+	-	+	+
4	SS-2.3.2	-	-	-	+	-
5	SS-2.4	-	+	+	+	+
6	SS-2.5	-	+	+	+	-
7	SS-2.6	+	+	-	+	+
8	SS-2.7	-	-	-	-	+
9	SS-2.8	-	+	-	+	+
10	SS-2.9	-	+	+	+	+
11	SS-2.10	-	+	-	+	+
12	SS-2.11	-	-	-	+	+
13	SS-2.12	-	+	-	+	+
14	SS-2.13	-	-	-	+	+
15	SS-2.14	+	-	-	+	+
16	SS-2.15	-	-	-	-	+
17	SS-3.1	-	+	-	+	+
18	SS-3.2	-	+	-	+	+
19	SS-4.1	-	+	-	+	+
20	SS-5.1	-	+	-	+	+
21	SS-5.2	-	-	-	+	+
22	SS-5.3	-	+	-	+	+
23	SS-5.4	-	-	-	+	+

\* Žuta boja označava da pored trake očekivane dužine postoje i nespecifične trake kod testiranih izolata.

Prilog 2. Detekcija biosintetskih operona kod *Bacillus* sp. izolata poreklom iz đubriva.

Redni br.	Izolat	FEND	BACC	ITUP	P17/P18	AKS/TKS
1	SS-26.1	+	+	-	+	+
2	SS-26.2	+	-	-	+	+
3	SS-26.3	+	+	-	+	+
4	SS-26.4	+	+	-	+	-
5	SS-26.5	+	+	-	+	+
6	SS-26.6	-	+	+	+	+
7	SS-26.7	-	-	-	+	-
8	SS-26.8	+	+	-	+	-
9	SS-26.9	-	+	+	+	+
10	SS-26.10	-	+	-	+	+
11	SS-27.1	+	+	-	+	+
12	SS-27.2	+	+	+	+	+
13	SS-27.3	-	+	+	+	+
14	SS-27.4	-	+	-	-	-
15	SS-27.5	-	+	+	+	+
16	SS-27.6.1	-	+	+	-	-
17	SS-27.7.1	-	+	-	-	+
18	SS-27.8	+	+	-	+	-
19	SS-27.9	-	-	-	-	-
20	SS-28.1	+	+	-	+	+
21	SS-28.2	-	+	-	-	+
22	SS-28.3	+	-	-	+	+
23	SS-28.4	-	+	-	+	-
24	SS-28.5	-	+	+	-	+
25	SS-28.6	-	+	-	+	-
26	SS-29.1	+	+	+	+	+
27	SS-29.2	+	+	-	+	-
28	SS-29.3	+	+	-	-	+
29	SS-29.4	-	+	+	+	+
30	SS-29.5	-	-	-	+	-
31	SS-29.6	-	+	-	-	-
32	SS-29.7	-	+	+	+	-
33	SS-30.1	+	+	-	+	-
34	SS-30.2	+	+	-	+	+
35	SS-30.3	-	+	+	+	-
36	SS-30.4	-	-	-	+	-
37	SS-30.5	+	+	-	+	-
38	SS-30.6	-	-	-	+	-
39	SS-30.7	+	-	-	-	+
40	SS-32.1	+	+	-	+	+



## Prilog 2. nastavak

Redni br.	Izolat	FEND	BACC	ITUP	P17/P18	AKS/TKS
41	SS-32.3	+	+	-	-	+
42	SS-32.4	-	+	-	-	+
43	SS-32.5	+	-	-	+	+
44	SS-32.6	+	+	-	+	+
45	SS-32.7	-	+	+	+	-
46	SS-32.8	+	-	-	+	+
47	SS-33.1	-	+	-	-	-
48	SS-33.2	-	+	-	-	+
49	SS-33.3	-	+	-	-	+
50	SS-33.4	-	-	-	-	+
51	SS-33.5	+	+	-	-	+
52	SS-33.6	+	+	-	-	+
53	SS-33.7	+	+	-	-	+
54	SS-33.8	+	+	-	+	-
55	SS-34.1	+	+	-	+	+
56	SS-34.2	+	+	-	+	+
57	SS-34.3	+	+	-	+	+
58	SS-34.4	+	+	-	-	+
59	SS-34.5	-	+	-	-	+
60	SS-34.6	-	-	-	-	-
61	SS-34.7	-	+	-	-	+

\* Žuta boja označava da pored trake očekivane dužine postoje i nespecifične trake kod testiranih izolata.  
Zelena boja označava izolate kod kojih je prikazano prisustvo svih pet biosintetskih operona.

Prilog 3. Detekcija biosintetskih operona kod *Bacillus* sp. izolata poreklom iz zemljišta.

Redni br.	Izolat	FEND	BACC	ITUP	P17/P18	AKS/TKS
1	SS-6.1	-	+	+	+	+
2	SS-6.2	+	+	+	+	+
3	SS-6.3	-	+	+	+	+
4	SS-6.4	-	+	+	+	+
5	SS-6.5	-	-	-	+	-
6	SS-6.6	-	+	+	+	-
7	SS-7.1	-	+	+	+	+
8	SS-8.1	-	+	+	+	+
9	SS-8.2	-	+	+	+	+
10	SS-8.3	-	+	+	+	-
11	SS-8.4	-	+	+	+	-
12	SS-9.1.2	-	+	-	-	-
13	SS-9.2	-	+	+	+	+
14	SS-9.3	-	+	+	+	+
15	SS-9.4	-	-	-	+	+
16	SS-10.1	-	+	+	+	-
17	SS-10.2	-	+	+	+	-
18	SS-10.3	-	+	+	+	-
19	SS-10.4	-	+	+	-	+
20	SS-10.5	+	+	+	-	+
21	SS-10.6	-	+	-	-	+
22	SS-10.7	+	+	+	+	-
23	SS-10.8	-	+	+	+	+
24	SS-11.1	+	+	-	+	+
25	SS-11.2	+	+	-	+	+
26	SS-11.3	-	+	+	+	+
27	SS-11.4	-	+	+	-	+
28	SS-12.1	+	+	-	+	+
29	SS-12.2	-	+	-	-	-
30	SS-12.3	-	+	-	-	+
31	SS-12.4	-	-	-	-	-
32	SS-12.5	-	+	-	+	+
33	SS-12.6	-	+	+	+	+
34	SS-12.7	-	+	+	+	+
35	SS-12.8	-	+	+	+	+
36	SS-12.9	-	+	+	+	+
37	SS-13.1	-	+	+	+	-
38	SS-13.2	-	+	+	+	-
39	SS-13.3	-	+	+	+	+
40	SS-13.4	-	+	+	+	+

## Prilog 3. nastavak

Redni br.	Izolat	FEND	BACC	ITUP	P17/P18	AKS/TKS
41	SS-14.3	-	+	+	+	+
42	SS-14.4	-	+	+	+	+
43	SS-14.6	+	+	-	+	+
45	SS-15.4	-	+	+	+	+
46	SS-16.1	-	+	+	+	+
47	SS-16.2	+	+	-	+	+
48	SS-16.4	-	-	-	-	+
49	SS-16.5	-	+	+	+	+
50	SS-17.1	-	+	+	+	+
51	SS-17.2	-	+	+	+	+
52	SS-17.3	-	+	-	-	+
53	SS-17.4	-	+	-	+	+
54	SS-18.1	-	+	+	+	+
55	SS-18.2	+	+	-	-	+
56	SS-18.3	-	+	+	+	-
57	SS-18.4	-	+	+	+	+
58	SS-19.1	-	+	-	+	-
59	SS-19.2	-	+	+	+	-
60	SS-19.3	+	-	-	+	+
61	SS-19.4	+	+	-	+	+
62	SS-20.1	-	+	+	-	+
63	SS-20.2	-	+	-	-	+
64	SS-20.3	-	+	+	+	-
65	SS-20.4	-	+	+	+	+
66	SS-21.1	-	+	-	+	+
67	SS-21.2	-	+	-	-	-
68	SS-21.3	-	+	+	+	+
69	SS-21.4	-	+	-	-	-
70	SS-21.5	-	+	+	+	-
71	SS-21.6	-	+	-	+	+
72	SS-21.7	+	+	+	+	+
73	SS-22.1	-	+	-	-	-
74	SS-22.2	-	+	-	+	+
75	SS-22.3	-	+	+	+	+
76	SS-22.4	-	+	+	+	+
77	SS-22.5	-	-	+	-	+
78	SS-23.1	-	+	+	+	-
79	SS-23.2	-	+	+	+	+
80	SS-23.3	+	+	-	+	+

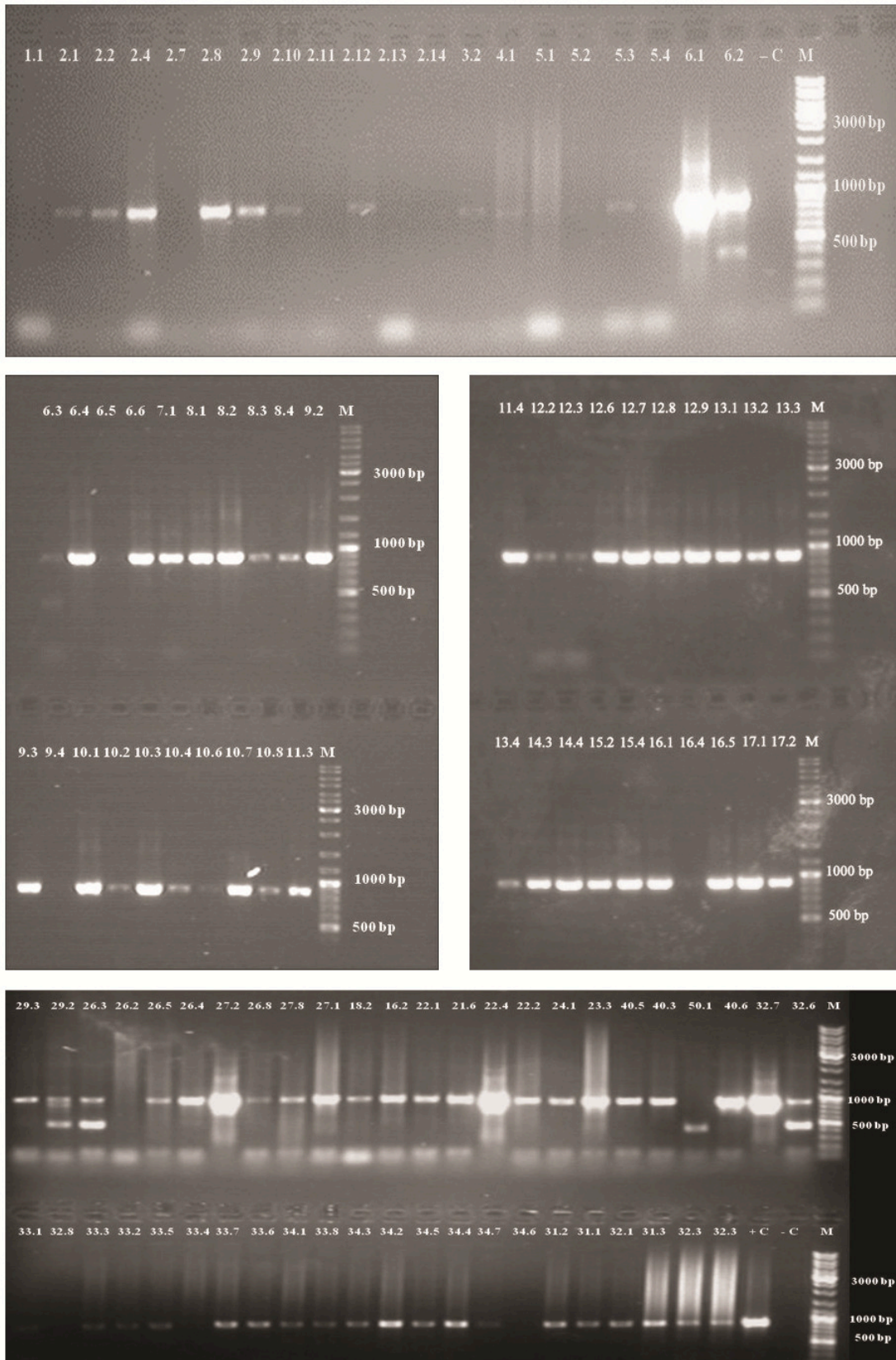
\* Žuta boja označava da pored trake očekivane dužine postoje i nespecifične trake kod testiranih izolata.

Zelena boja označava izolate kod kojih je prikazano prisustvo svih pet biosintetskih operona.

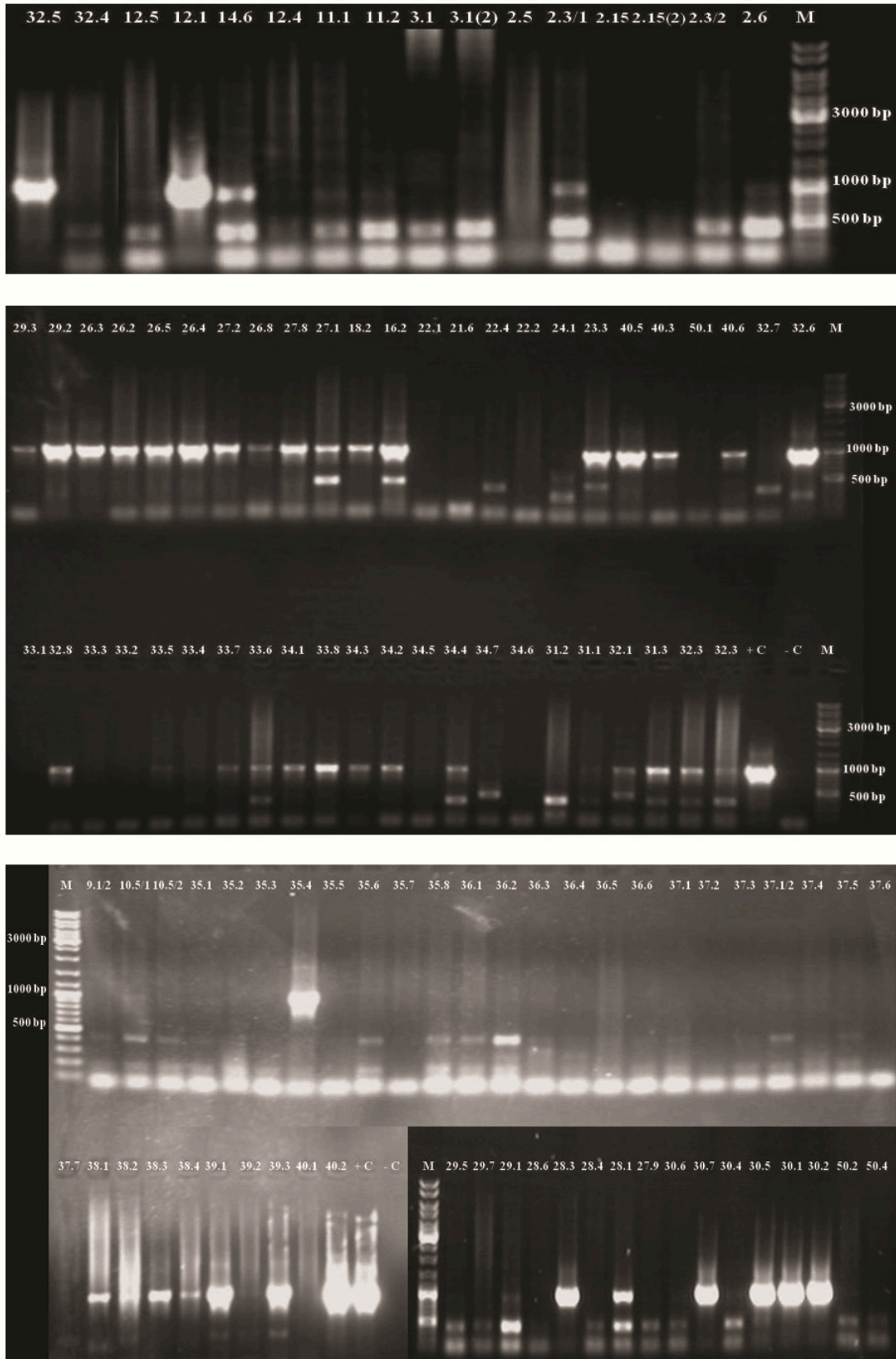
## Prilog 3. nastavak

Redni br.	Izolot	FEND	BACC	ITUP	P17/P18	AKS/TKS
81	SS-23.4	-	-	-	-	+
82	SS-24.1	-	+	-	+	+
83	SS-31.1	+	+	-	-	+
84	SS-31.2	-	+	-	-	+
85	SS-31.3	+	+	-	-	-
86	SS-35.1	-	+	+	-	+
87	SS-35.2	-	+	+	-	+
88	SS-35.3	-	+	+	-	+
89	SS-35.4	+	+	+	+	+
90	SS-35.5	-	-	-	-	+
91	SS-35.6	-	+	-	-	+
92	SS-35.7	-	+	-	-	+
93	SS-35.8	-	+	-	-	+
94	SS-36.1	-	+	-	-	+
95	SS-36.2	-	+	-	+	+
96	SS-36.3	-	+	+	+	+
97	SS-36.4	-	-	-	-	+
98	SS-36.5	-	+	+	+	+
99	SS-36.6	-	+	+	-	+
100	SS-37.1	-	+	+	-	+
101	SS-37.2	-	+	-	-	+
102	SS-37.3	-	+	-	-	+
103	SS-37.4	-	+	+	-	+
104	SS-37.5	-	+	-	-	+
105	SS-37.6	-	+	-	-	+
106	SS-37.7	-	+	-	-	+
107	SS-38.1	+	+	-	-	+
108	SS-38.2	+	+	+	+	+
109	SS-38.3	+	+	+	+	+
110	SS-38.4	+	+	+	+	+
111	SS-39.1	+	+	+	+	+
112	SS-39.2	-	+	-	+	+
113	SS-39.3	+	+	+	+	+
114	SS-40.1	-	-	-	+	+
115	SS-40.2	+	+	+	+	+
116	SS-40.3	+	+	-	+	+
117	SS-40.5	+	+	-	+	+
118	SS-40.6	+	+	+	+	-
119	SS-50.1	-	-	-	+	-
120	VPS-50.2	-	+	+	+	+
121	SS-50.4	-	-	-	+	-

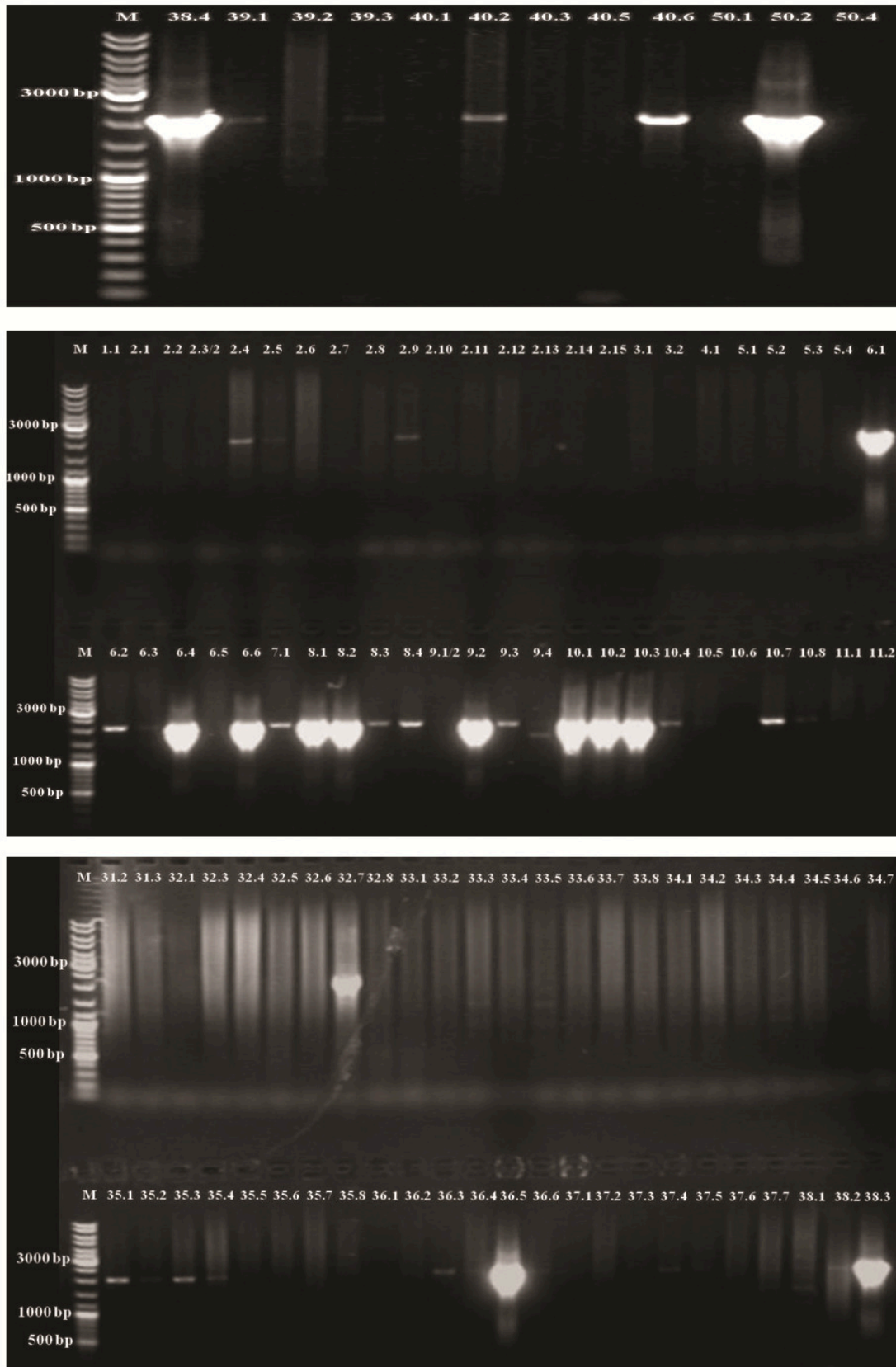
**Prilog 4.** Elektforeza na 1% agaroznom gelu PCR produkata dobijenih u skriningu određenih izolata *Bacillus* sp. na *bamC* gen bacilomicin D sintetaze.



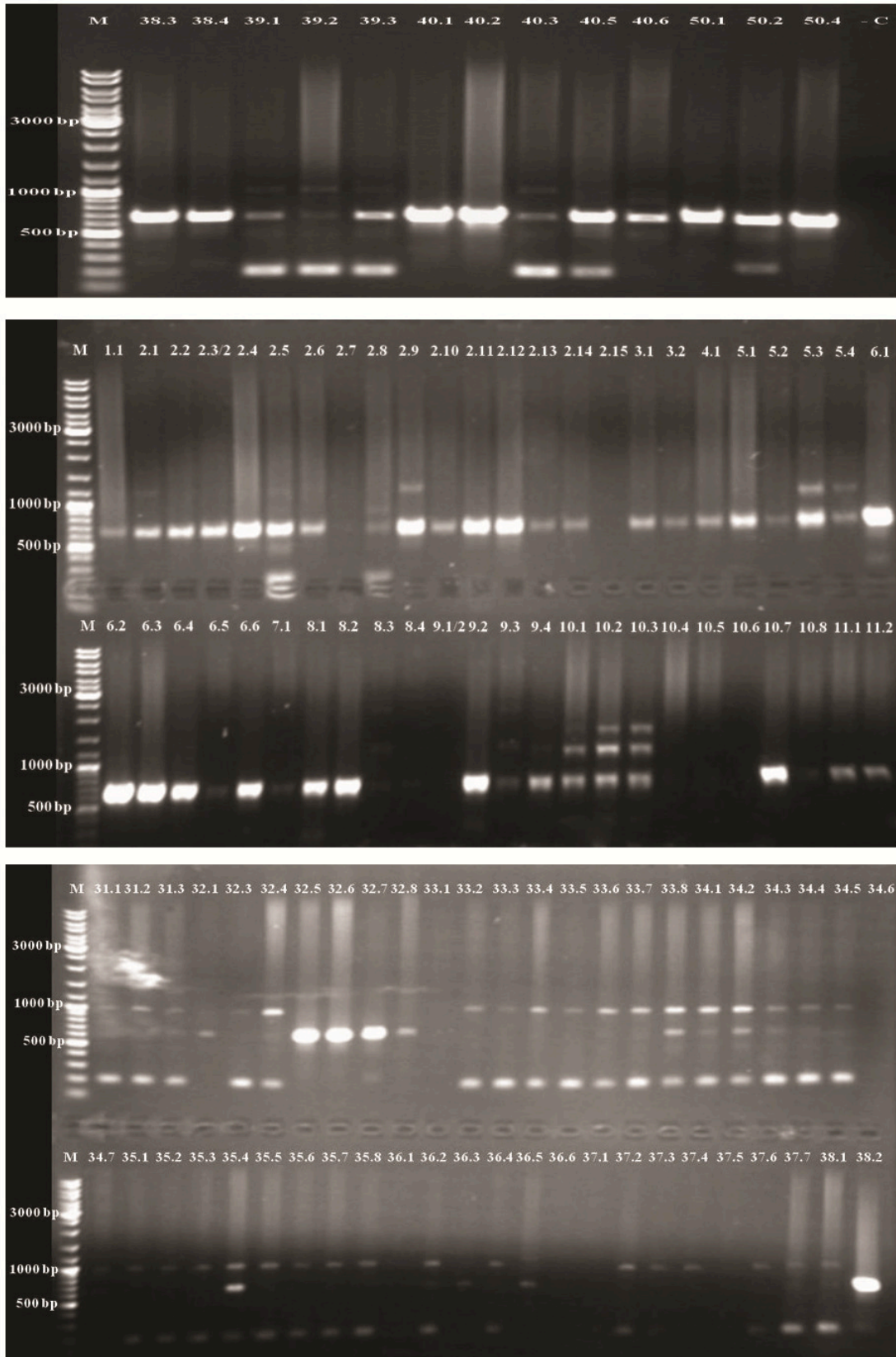
**Prilog 5.** Elektoreza na 1% agaroznom gelu PCR produkata dobijenih u skriningu određenih izolata *Bacillus* sp. na *fenD* gen fengicin sintetaze.



**Prilog 6.** Elektforeza na 1% agaroznom gelu PCR produkata dobijenih u skriningu određenih izolata *Bacillus* sp. na delove gena *ituA* i *ituB* sa intergenskim regionom.

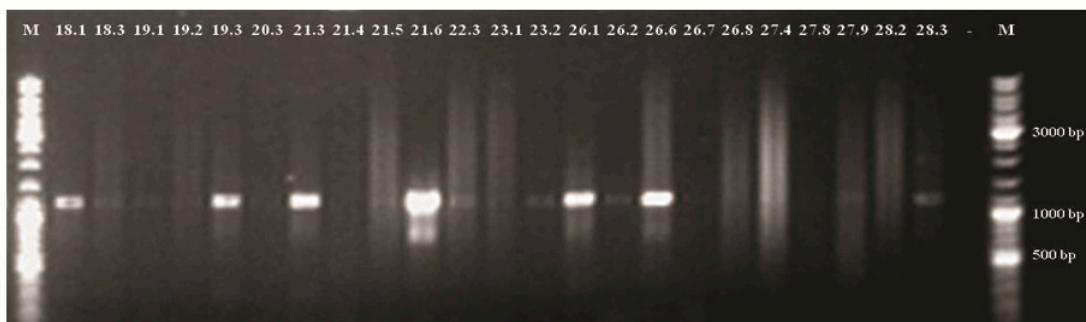
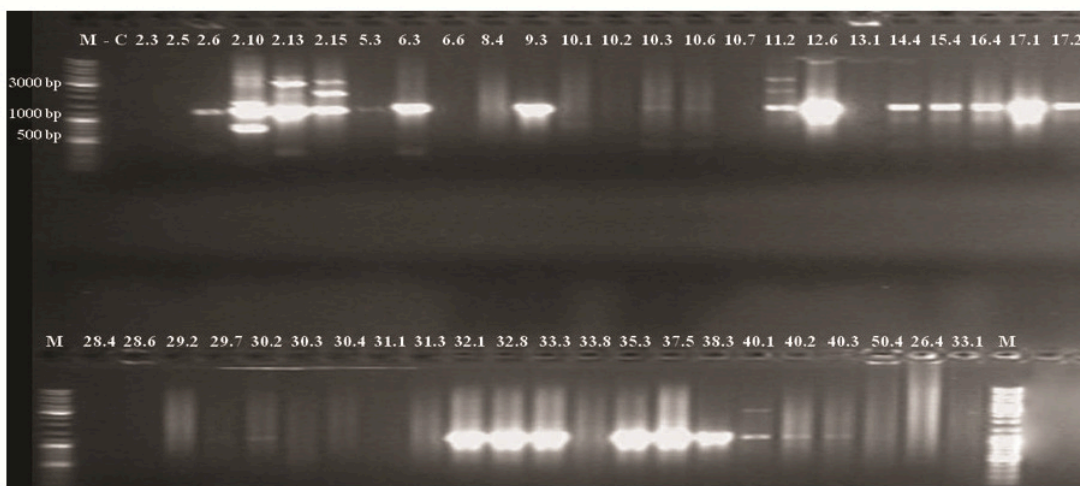
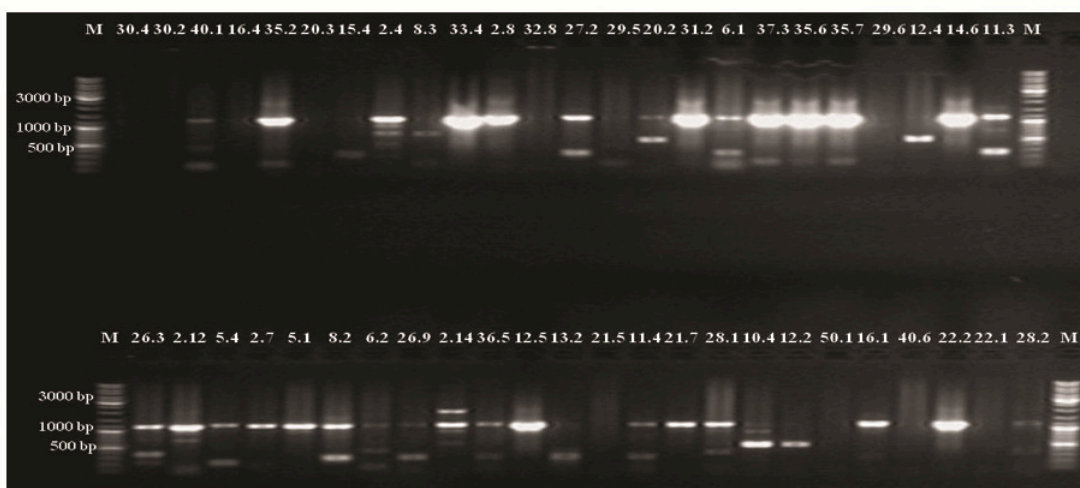
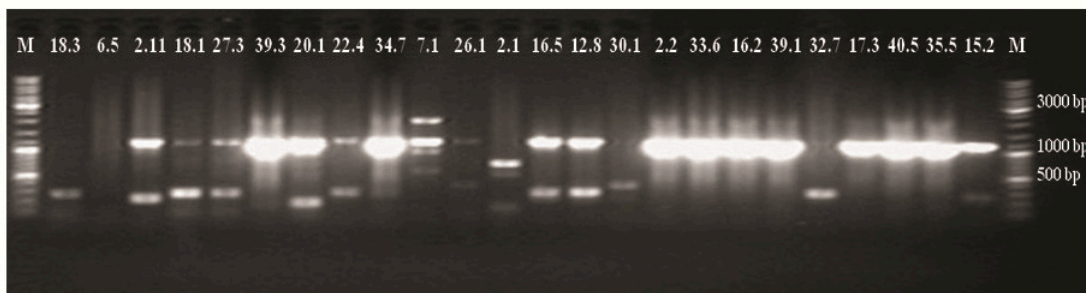


**Prilog 7.** Elektroforeza na 1% agaroznom gelu PCR produkata dobijenih u skriningu određenih izolata *Bacillus* sp. na *sfp* gen surfaktin sintetaze.

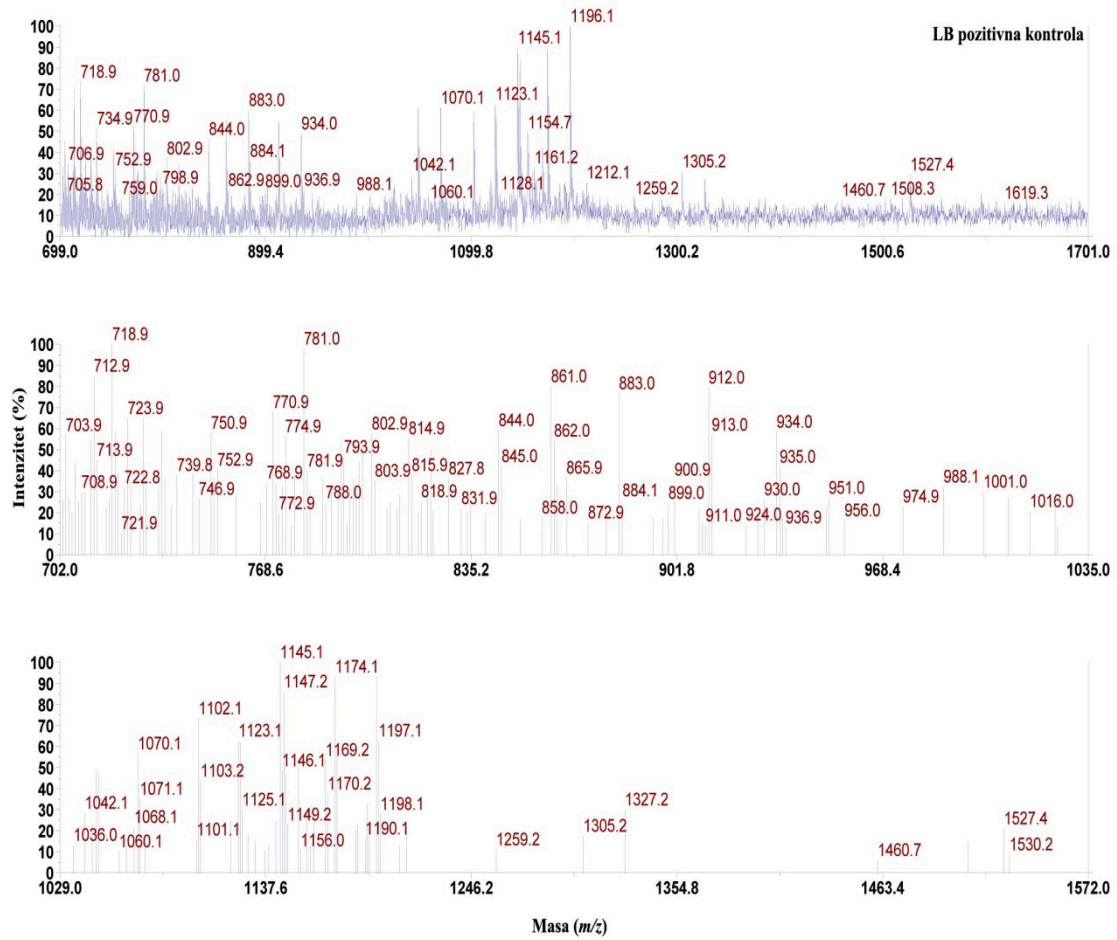




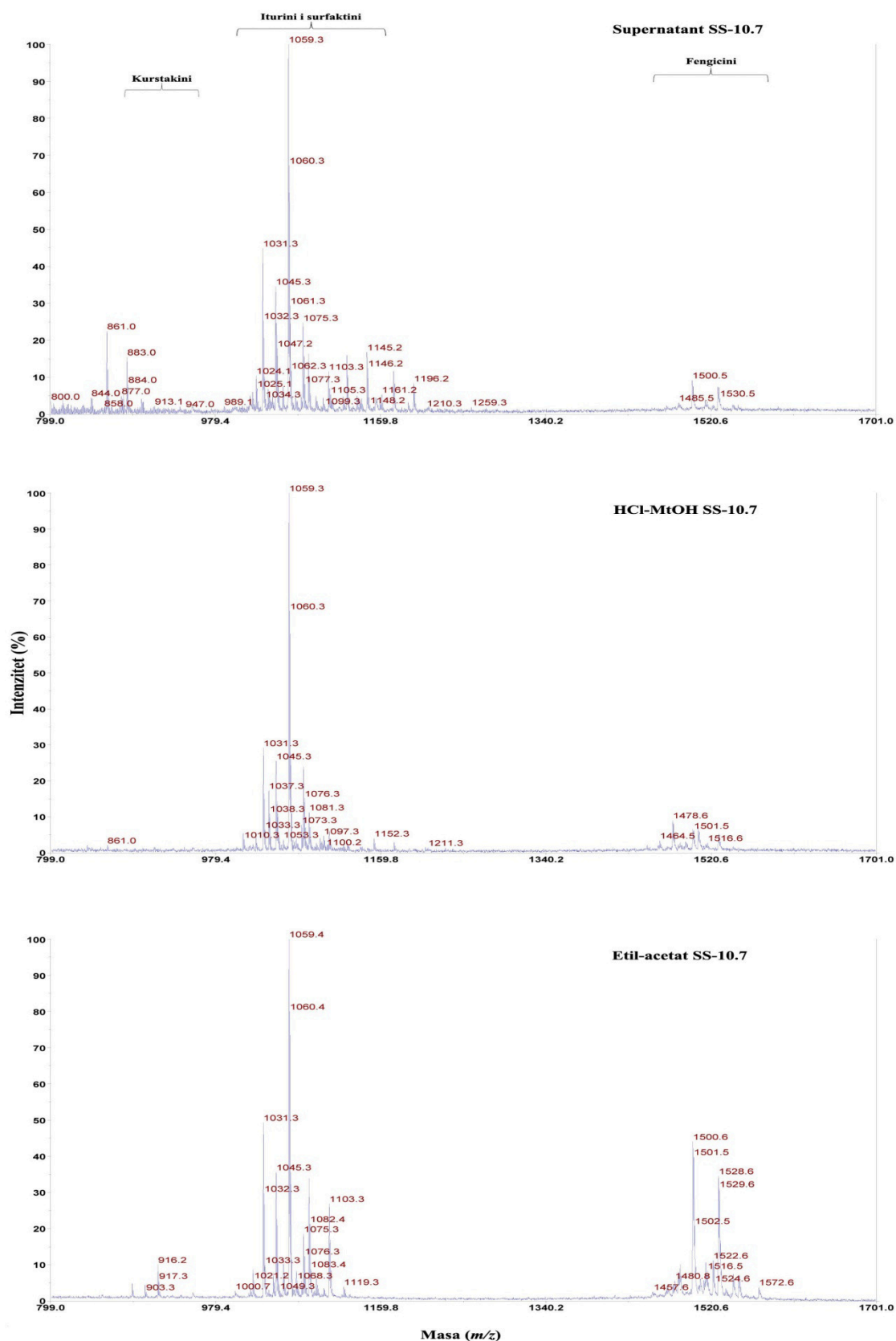
**Prilog 8.** Elektforeza na 1% agaroznom gelu PCR produkata dobijenih u skriningu određenih izolata *Bacillus* sp. na kurstakinski operon.



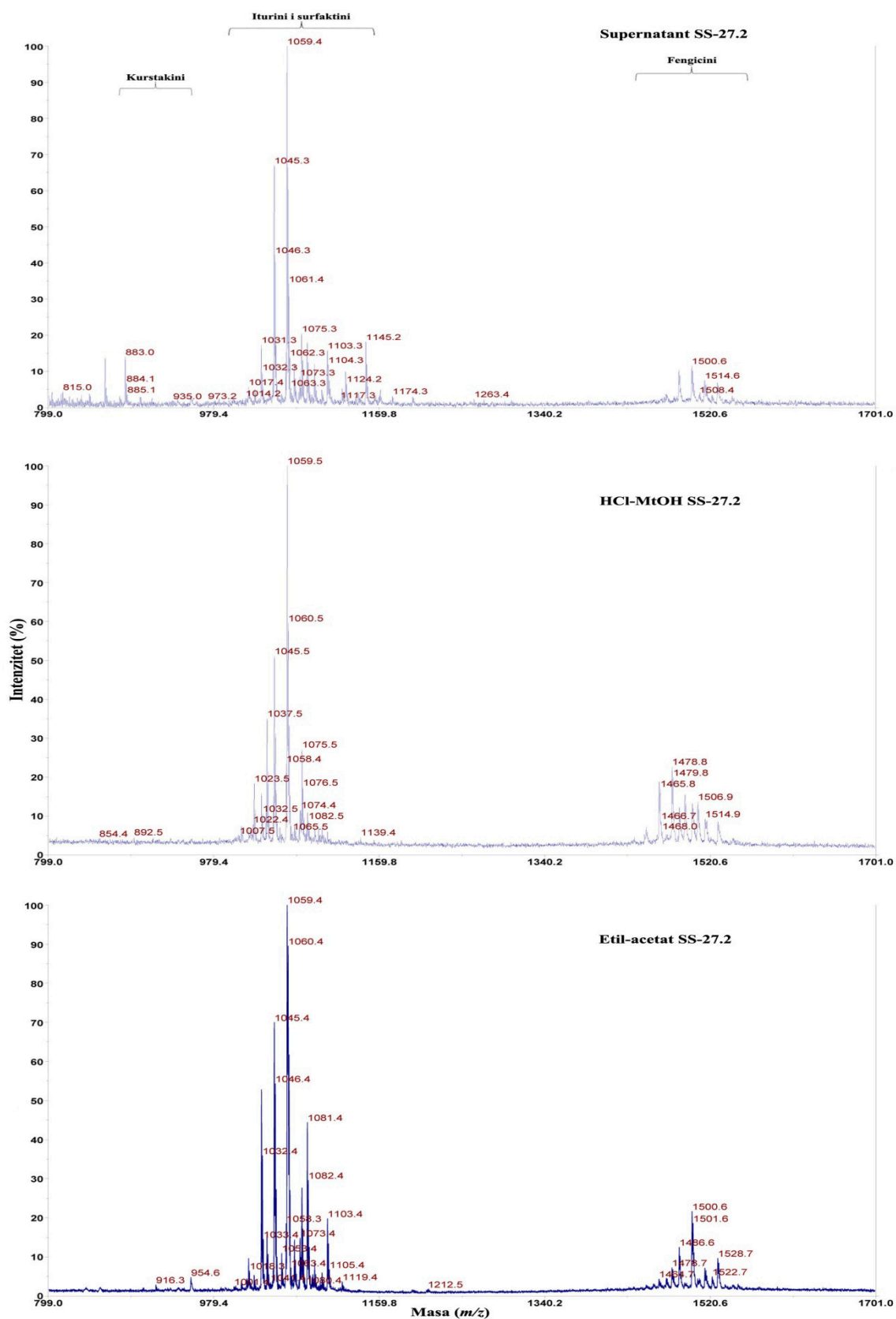
**Prilog 9.** MALDI-TOF maseni spektar LB medijuma u vidu pozitivne kontrole u opsegu  $m/z$  800-1700.



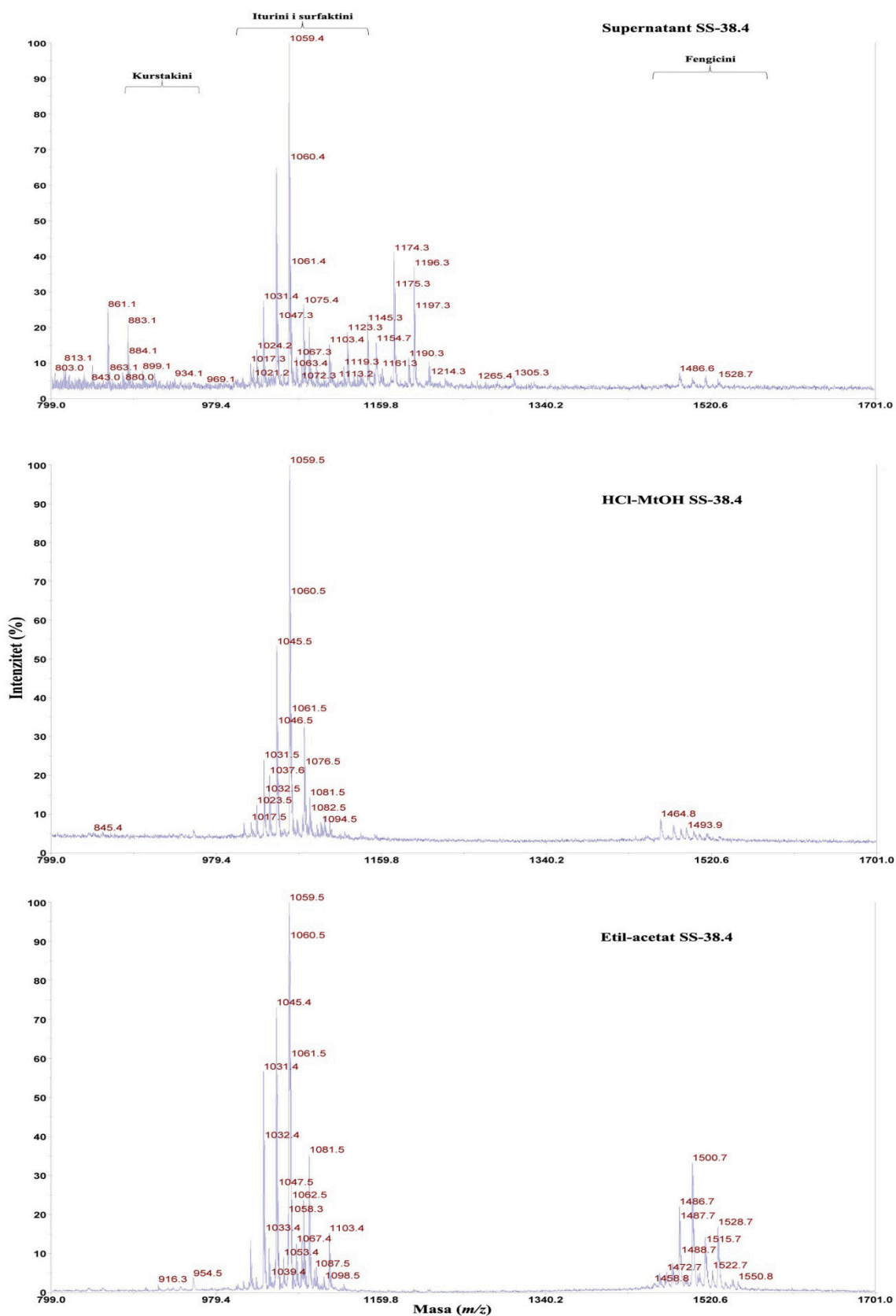
**Prilog 10.** MALDI-TOF maseni spektar besćelijskog supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-10.7. Lipopeptidna jedinjenja su detektovana u opsegu  $m/z$  800-1700.



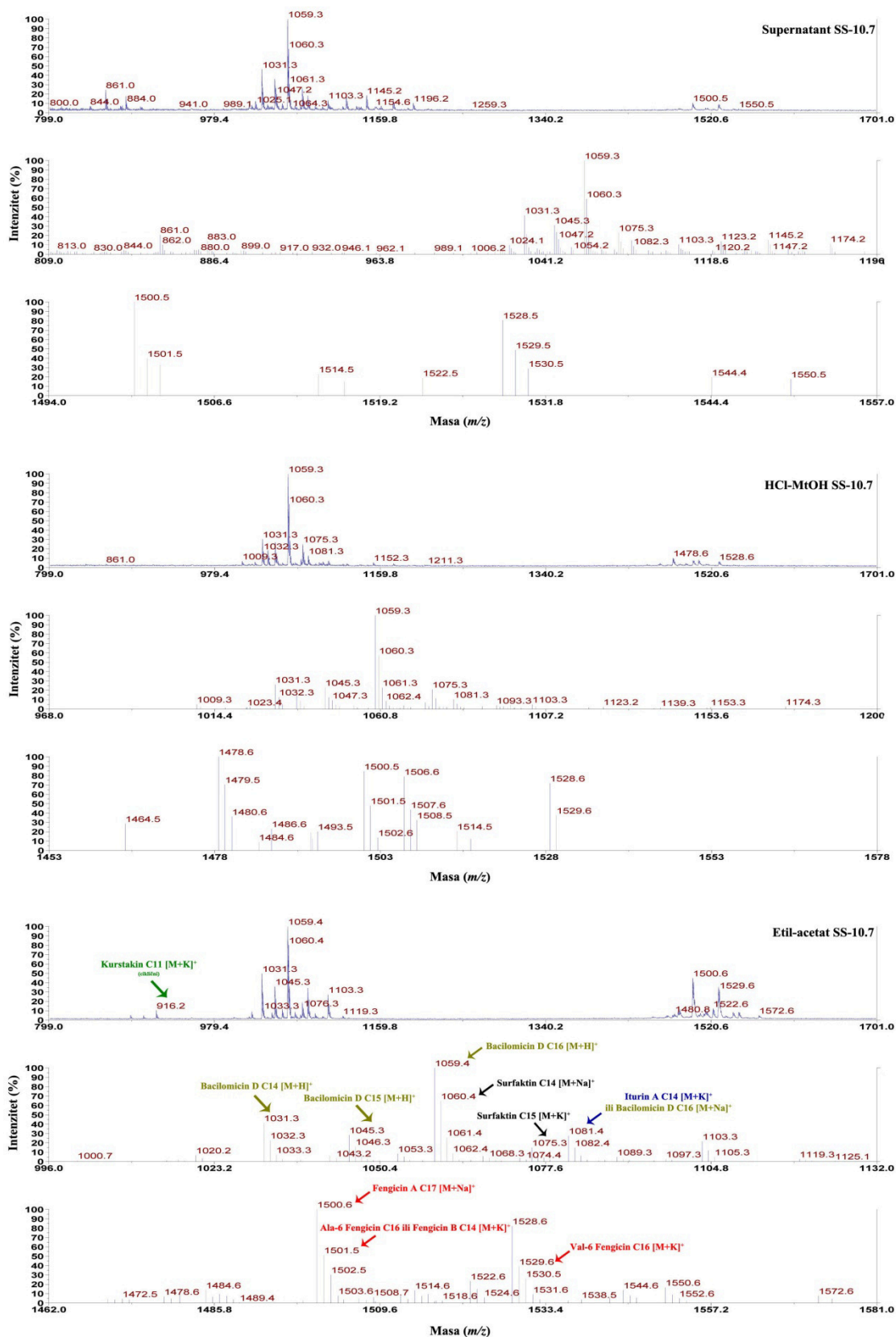
**Prilog 11.** MALDI-TOF maseni spektar besćelijskog supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-27.2. Lipopeptidna jedinjenja su detektovana u opsegu  $m/z$  800-1700.



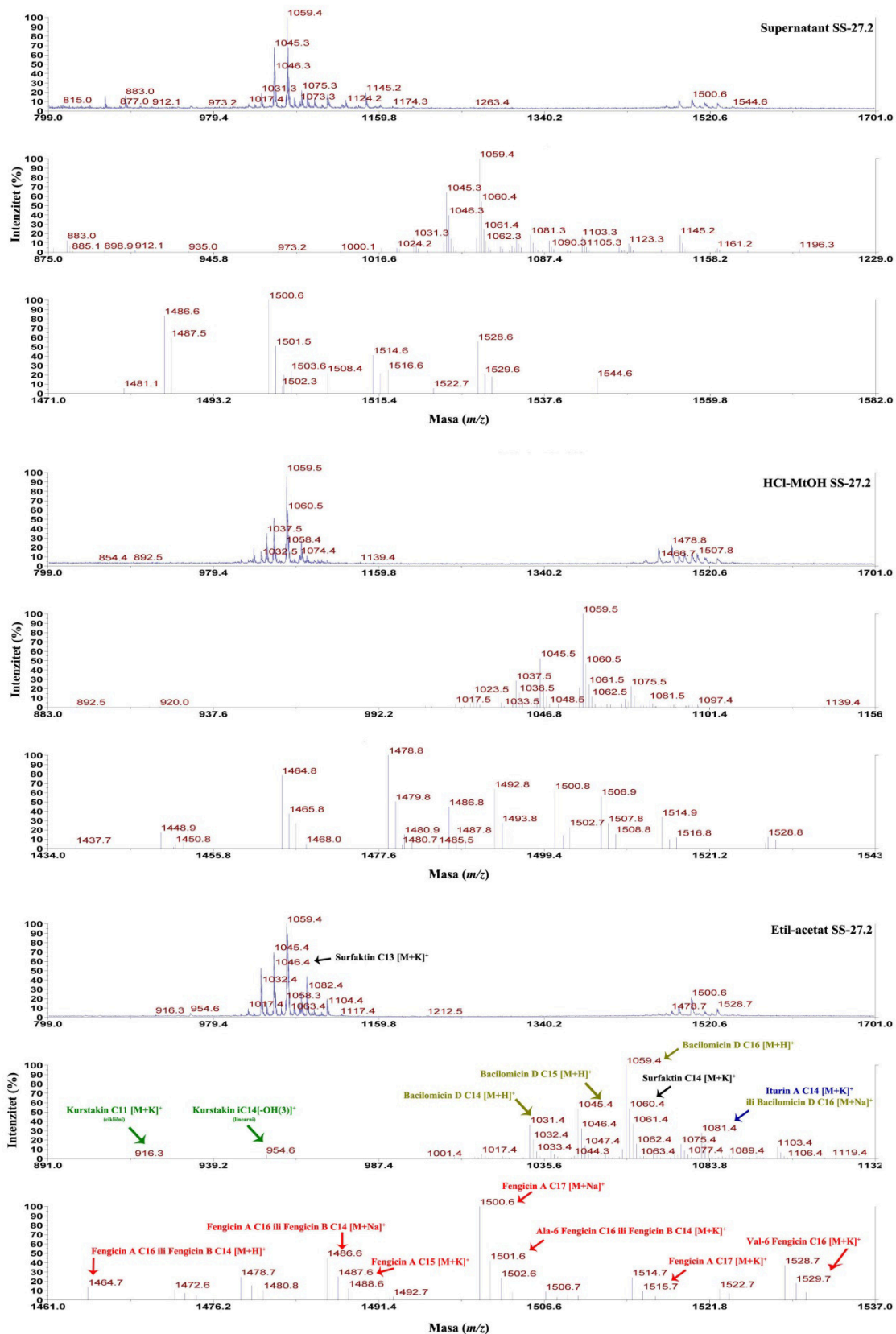
**Prilog 12.** MALDI-TOF maseni spektar besćelijskog supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-38.4. Lipopeptidna jedinjenja su detektovana u opsegu  $m/z$  800-1700.



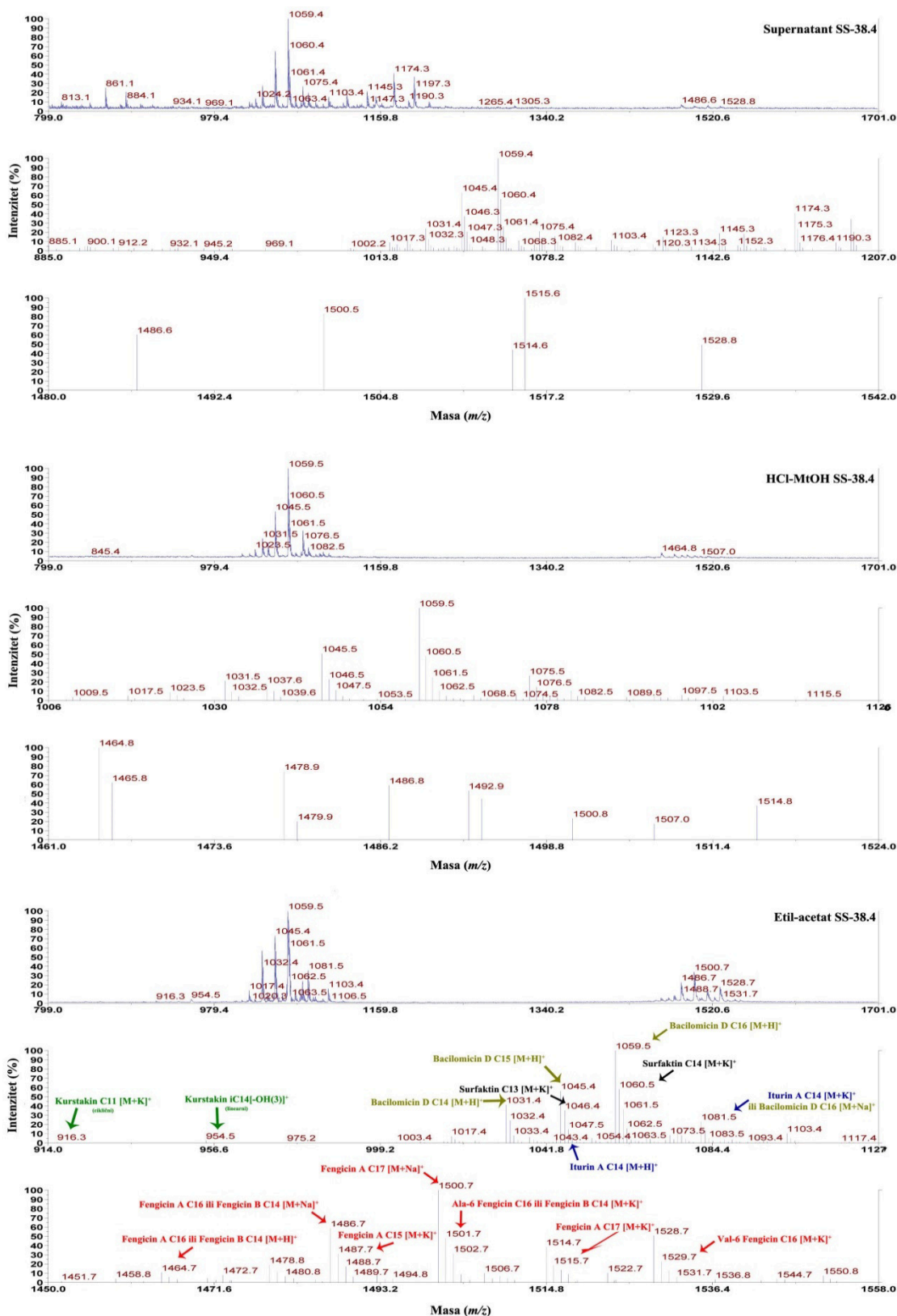
**Prilog 13.** MALDI-TOF maseni spektar besćelijskog supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-10.7 u opsegu  $m/z$  800-1700 zajedno sa uvećanim centroidnim delovima spektra analiziranih klastera pretpostavljenih lipopeptidnih jedinjenja.



**Prilog 14.** MALDI-TOF maseni spektar besćelijskog supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-27.2 u opsegu m/z 800-1700 zajedno sa uvećanim centroidnim delovima spektra analiziranih klastera pretpostavljenih lipopeptidnih jedinjenja.

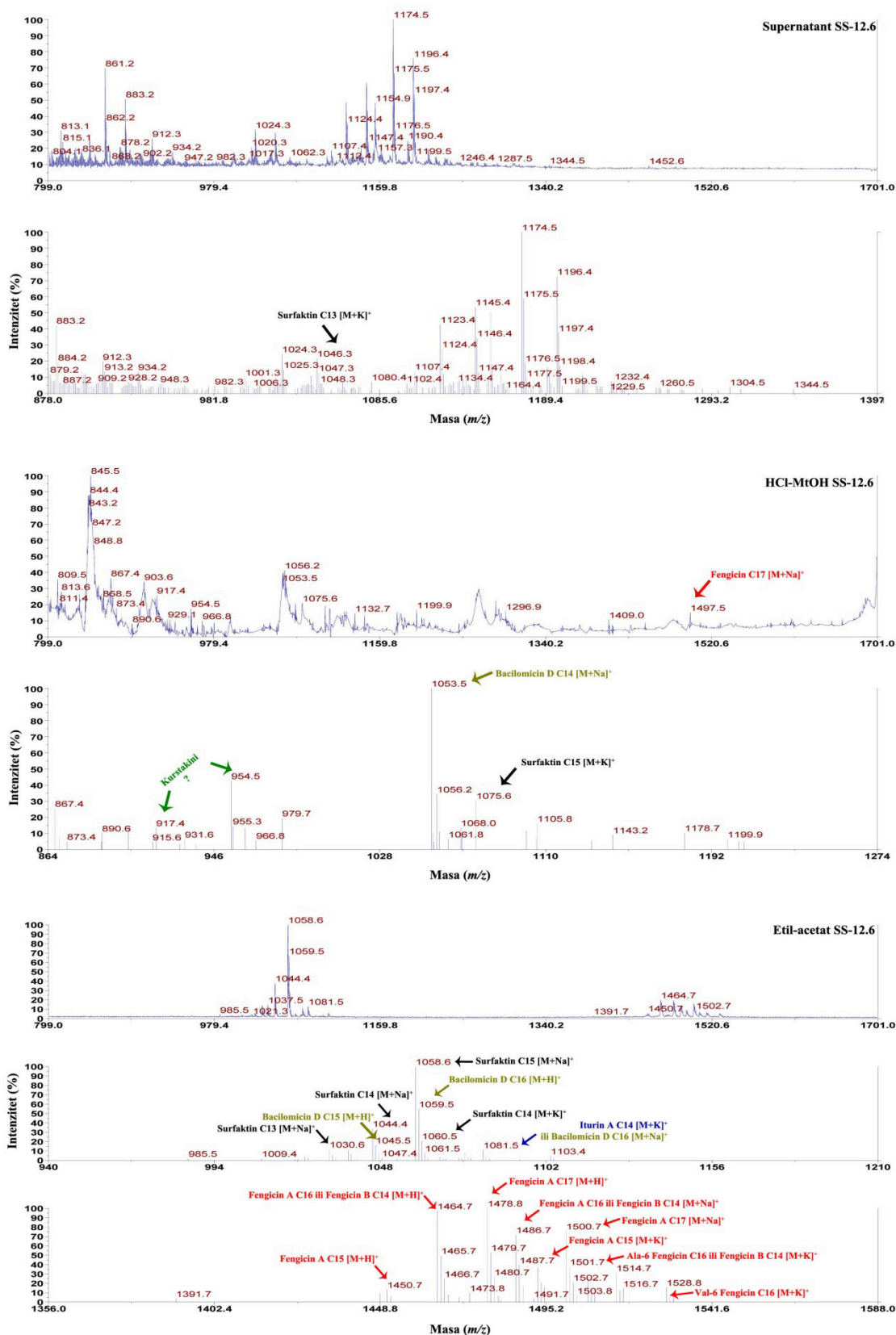


**Prilog 15.** MALDI-TOF maseni spektar besćelijskog supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-38.4 u opsegu  $m/z$  800-1700 zajedno sa uvećanim centroidnim delovima spektra analiziranih klastera pretpostavljenih lipopeptidnih jedinjenja.

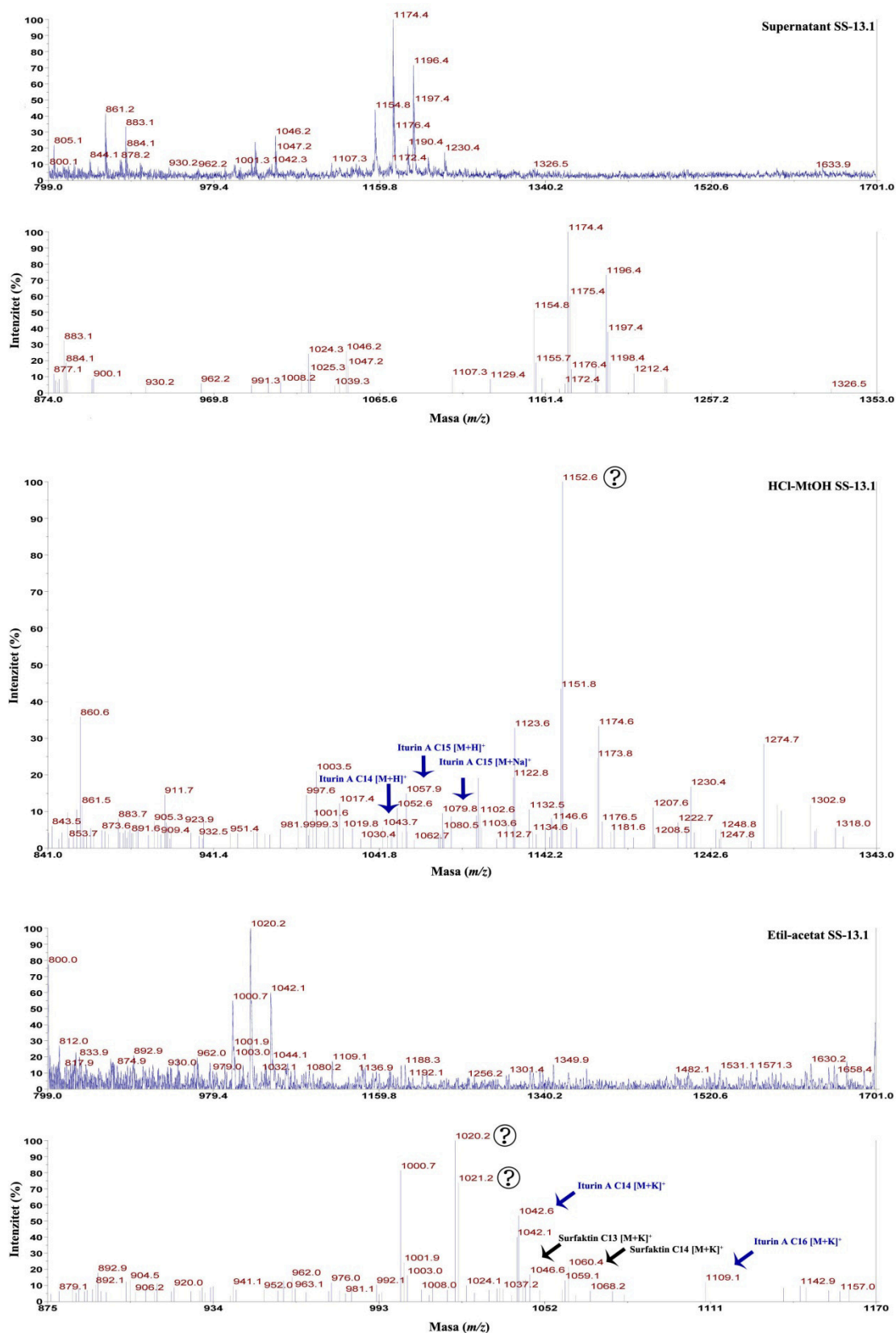




**Prilog 16.** MALDI-TOF maseni spektar besćelijskog supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-12.6 u opsegu  $m/z$  800-1700 zajedno sa uvećanim centroidnim delovima spektra analiziranih klastera pretpostavljenih lipopeptidnih jedinjenja.



**Prilog 17.** MALDI-TOF maseni spektar besćelijskog supernatanta, metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta izolata SS-13.1 u opsegu  $m/z$  800-1700 zajedno sa uvećanim centroidnim delovima spektra analiziranih klastera pretpostavljenih lipopeptidnih jedinjenja.



***OPŠTI I PODACI O AUTORSKIM PRAVIMA***

## BIOGRAFIJA

Ivica Z. Dimkić je rođen 10.08.1983. godine u Gnjilanu, Republika Srbija. Osnovnu školu je završio u Gnjilanu, a gimnaziju "Bora Stanković" u Nišu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2002/03, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, a diplomirao 2010. godine. Diplomski rad pod nazivom "Utvrđivanje mehanizama nastanka mikronukleusa pod dejstvom diazinona", uradio je na Institutu za nuklearne nauke Vinča pod rukovodstvom dr Gordane Joksić, naučnog savetnika i dr Slaviše Stankovića, docenta Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Tokom studija bavio se organizovanjem naučno-sportskih manifestacija studenata prirodnih nauka, bio je aktivni član studentskog Parlamenta Biološkog fakulteta, a takođe, osnivač je Sportskog društva Biološkog fakulteta.

Školske 2010/11 godine upisao je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Mikrobiologija. Od januara 2011. godine angažovan je kao istraživač-pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije OI 173026 „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“, a od septembra 2012. godine u zvanju istraživač-saradnik. Na Katedri za mikrobiologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 2010. godine uključen je u praktični deo nastave na predmetima Mikrobiologija i Mikrobiološki praktikum, a od 2011. u okviru seminara u Istraživačkoj stanici Petnica, u svojstvu saradnika. Od 2010. godine Ivica Dimkić je član Udruženja mikrobiologa Srbije i Federation of European Microbiological Societies (FEMS), Društva genetičara Srbije, Srpskog Biološkog Društva, a od 2012. godine i Društva za Zaštitu Bilja Srbije. 2014. godine osvojio je prvu nagradu za najbolji rad kao koautor u okviru konferencije „Second Symposium of Quality Milk - UNESP Jaboticabal - São Paulo“, održane u Brazilu. Iste godine učestvovao je u preliminarnim istraživanjima konzervacije starih spisa, ikona i fresaka manastira Hilandar, u organizaciji Narodne biblioteke Srbije i Zadužbine Hilandar.

Do sada je objavio 5 naučnih radova i imao 16 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu i učestvovao u Komisiji za pregled, ocenu i odbranu 5 diplomskih i 5 master radova.

## Изјава о ауторству

Потписани Ивица З. Димкић

број уписа Б3037/2010

### Изјављујем

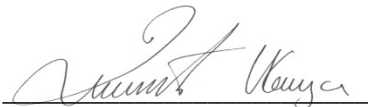
да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација антимикробних супстанци природних изолата *Bacillus* sp. за примену у биолошкој контроли фитопатогених бактерија и гљива

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 11.02.2015.



**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора Ивица З. Димкић

Број уписа Б3037/2010

Студијски програм Биологија/Микробиологија

Наслов рада Карактеризација антимикуробних супстанци природних  
изолата *Bacillus* sp. за примену у биолошкој контроли  
фитопатогених бактерија и гљива

Ментор Проф. др Славиша Станковић

Потписани Ивица З. Димкић

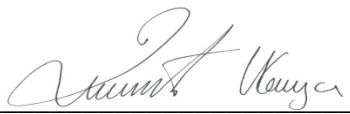
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 11.02.2015.

  
\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Карактеризација антимикуробних супстанци природних изолата *Bacillus sp.* за примену у биолошкој контроли фитопатогених бактерија и гљива**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

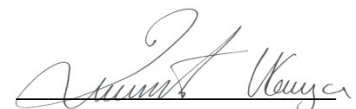
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 11.02.2015.



1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.