

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Neda R. Radovanović

**BIOSTIMULATORI BILJNOG RASTA  
POREKLOM IZ MORSKE SREDINE ZA  
PRIMENU U AGROINDUSTRIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Neda R. Radovanović

**PLANT GROWTH BIOSTIMULATORS  
ORIGINATED FROM MARINE ENVIRONMENT  
INTENDED FOR AGRICULTURAL  
APPLICATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

**MENTOR:**

---

Dr Suzana Dimitrijević–Branković, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

Dr Mirjana Rajilić-Stojanović, docent  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

Dr Vesna Lazić, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

---

Dr Slađana Davidović, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**DATUM ODBRANE:**

---

## **Zahvalnica**

*Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Suzani Dimitrijević-Branković, na ukazanom poverenju i pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije, kao i na razumevanju, strpljenju i uvek pozitivnom stavu i energiji.*

*Veliku zahvalnost dugujem i doc. dr Mirjani Rajilić-Stojanović na sugestijama i korisnim savetima tokom planiranja eksperimenata, pisanja naučnih radova i ove doktorske disertacije.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem dr Aleksandri Nešić, naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke Vinča, Univerziteta u Beogradu na prenetom znanju i nesebičnoj pomoći pri planiranju i izvođenju eksperimenata iz oblasti polimernih materijala.*

*Posebno želim da se zahvalim dr Vesni Lazić, višem naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke Vinča, Univerziteta u Beogradu na uloženom trudu i vremenu, pomoći i korisnim sugestijama koji su doprineli unapređenju ove doktorske teze.*

*Veliko hvala svim kolegama, profesorima i tehničarima sa Katedre za Biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju, Tehnološko-metalurškog fakulteta na kolegijalnosti, pomoći i uvek prijatnoj radnoj atmosferi. Hvala ekipi iz kancelarije (biblioteke)-neiscrpnom izvoru korisnih informacija i zanimljivih tema za razgovor. Hvala kolegincama, dr Katarini Mihajlovski i dr Milici Milutinović, na pomoći u eksperimentalnom radu.*

*Kolegincama, dr Slađani Davidović i dr Mioni Miljković dugujem posebnu zahvalnost. Hvala vam na bezuslovnoj pomoći tokom svih godina zajedničkog rada i iskrenom prijateljstvu.*

*Konačno, najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici. Hvala mojim roditeljima, sestri i bratu na bezrezervnoj podršci, strpljenju, ljubavi i razumevanju koje mi pružaju svakog dana. Quiero agradecer a mi esposo Jesús. Gracias por toda tu ayuda, paciencia y perseverancia, y todo el amor que me diste cada día. Tú haces que todo parezca posible.*

## Biostimulatori biljnog rasta poreklom iz morske sredine za primenu u agroindustriji

### Sažetak

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je izolacija mikroorganizama iz morskog sedimenta, kao i sinteza hidrogel prevlaka, odnosno filmova na bazi polisaharida poreklom iz morskih algi i ispitivanje njihovog biostimulatornog dejstva na rast biljaka, sa ciljem utvrđivanja mogućnosti njihove primene u agroindustriji.

Iz uzorka morskog sedimenta Crvenog mora, izolovano je ukupno 32 bakterijske kulture. Utvrđivanjem prisustva osnovnih direktnih i indirektnih mehanizama stimulacije biljnog rasta, izvršen je odabir najpotentnijeg soja za potencijalnu primenu u agroindustriji. Za dalji rad odabran je izolat PPM3, kod koga je utvrđeno prisustvo svih ispitivanih mehanizama: sposobnost fiksiranja atmosferskog azota i rastvaranja fosfata, antagonističko dejstvo prema četiri biljne patogene plesni (*Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Alternaria* sp. i *Mucor* sp.), kao i sposobnost proizvodnje hidrolitičkih enzima (proteaza, celulaza, hitinaza i amilaza). Standardnim morfološkim, biohemijskim i molekularnim metodama, novi morski izolat PPM3 je identifikovan kao pripadnik roda *Bacillus*, a odlikovali su ga sposobnost rasta na raznovrsnim supstratima u širokom opsegu temperature (4-55 °C) i pH uslova sredine (5-10), kao i sposobnost tolerancije visokih koncentracija soli (do 10 %).

Detaljniji uvid u mehanizme delovanja, kao i mogućnost primene potencijalnih formulacija na bazi odabranog izolata *Bacillus* sp. PPM3 u agroindustriji, dobijen je ispitivanjem antagonističkog dejstva njegovog ekstrakcelijskog filtrata (EF) utvrđivanjem sposobnosti sprečavanja rasta patogenih plesni: *A. flavus*, *F. graminearum*, *Alternaria* sp. i *Mucor* sp. Antagonističko svojstvo EF *Bacillus* sp. PPM3 posledica je proizvodnje termostabilnih antifungalnih jedinjenja, koja direktno sprečavaju rast i germinaciju spora svih ispitivanih plesni. Molekularnom analizom, kod morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 utvrđeno je prisustvo gena odgovornih za sintezu antifungalnih jedinjenja, lipopeptida: iturina, bacilomicina D, mikosubtilina i surfaktina, a njihova uloga u antagonizmu, potvrđena je u *in vitro* testu, ispitivanjem antifungalnog dejstva lipopeptidnog ekstrakta.

Radi utvrđivanja mogućnosti i načina primene *Bacillus* sp. PPM3 na polju, najpre je ispitana njegova potencijalna fitotoksičnost u testu klijavosti semena, a zatim i uticaj na parametre rasta biljke *in vivo*. Na osnovu indeksa klijavosti semena, utvrđeno je da ćelije i EF *Bacillus* sp. PPM3 ne ispoljavaju fitotoksični efekat i bezbedne su za upotrebu, a mogu se okarakterisati kao fitonutrijenti. U *in vivo* testu sa biljkom kukuruza utvrđeno je pozitivno dejstvo soja *Bacillus* sp. PPM3 na rast biljke, kako u uslovima infekcije, uzrokovane patogenom *F. graminearum*, tako i u odsustvu patogena. Svi primenjeni tretmani doveli su do povećanja visine biljke, ukupne dužine korena i biomase, kao i značajnog smanjenja pojave obolelih biljaka. Na osnovu ispoljavanja velikog broja korisnih dejstava na rast biljke, putem raznovrsnih mehanizama, utvrđeno je da postoji veliki potencijal za praktičnu i jednostavnu primenu novog morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 kao biostimulatora biljnog rasta u održivoj poljoprivredi.

Funkcionalizovani filmovi na bazi polisaharida iz morskih algi (agara, alginata i njihovih mešavina) uspešno su sintetisani jednostavnom metodom izlivanja polimernog rastvora uz otparavanje rastvarača. Direktnim umešavanjem EF soja *Bacillus* sp. PPM3 u formulacije filmova, izvršena je njihova funkcionalizacija za primenu u agroindustriji kao filmova za malčiranje i stimulaciju rasta biljaka. Dodatna funkcionalizacija filmova, sa ciljem poboljšanja njihovih optičkih, mehaničkih i barijernih svojstava, izvršena je umrežavanjem polimera posredstvom soli bakra. Svojstva agarnih filmova modifikovana su metodom *in situ* mineralizacije, odnosno istovremenom sintezom bakarnih mineralnih faza i polimerne mreže, dok su svojstva alginatnih i kopolimernih agarno-alginatnih filmova modifikovana eksternim umrežavanjem već formiranih filmova jonima bakra. FT-IR analiza je pokazala da upotrebljenim metodama sinteze i funkcionalizacije filmova ne dolazi do narušavanja hemijske strukture polimera, iako dolazi do određenih interakcija između dodatih bioaktivnih komponenti (EF *Bacillus* sp. PPM3 i umreživača) i polimera. SEM analizom pokazano je da način umrežavanja polimera i prisustvo bioaktivnih komponenti utiču na

mikrostrukturu filmova. Agarni filmovi umreženi bakar-karbonatnom fazom odlikovali su se homogenijom strukturom od filmova umreženih bakar-fosfatom. Eksternim umrežavanjem alginatnih filmova posredstvom soli bakar-sulfata, dobijeni su filmovi ujednačene disperzije i raspodele čestica, dok je kod agarno-alginatnih filmova uočena pojava aglomerata. Pokazano je da prisustvo bakterijskog EF u određenoj meri utiče na disperziju i raspodelu čestica kod svih filmova, odnosno uniformnost njihove strukture. Ispitana su optička, mehanička i barijerna svojstva prema vodenoj pari, svih funkcionalizovanih filmova. Utvrđeno je da EF *Bacillus* sp. PPM3 i umreživač, pojedinačno, značajno poboljšavaju optička, mehanička i barijerna svojstva filmova, dok njihova kombinacija ima manji uticaj na poboljšanje ovih osobina. Sa stanovišta primene sintetisanih filmova u agroindustriji, najbolja optička svojstva (minimalno propuštanje UV zraka, a značajno propuštanje zraka vidljivog dela spektra), utvrđena su kod agarnih filmova sa Cu-karbonatnom mineralnom fazom, i alginatnih filmova umreženih bakarnim jonima. Sa stanovišta funkcionalnosti i trajnosti na polju, najbolje mehaničke (zateznu čvrstoću u opsegu od 35,7-132,1 MPa, izduženje pri kidanju u opsegu od 13-29 %) i barijerne osobine (propustljivost vodene pare u opsegu od  $1,41 \times 10^{-10}$  -  $2,50 \times 10^{-10}$  g/smPa) imali su filmovi na bazi alginata.

Ispitana su biološka svojstva funkcionalizovanih filmova i prevlaka na bazi alginata, odnosno njihova sposobnost sprečavanja rasta biljnih plesni, kao i uticaj na rast biljaka. Utvrđeno je da alginatni filmovi koji sadrže ekstraćelijski filtrat izolata *Bacillus* sp. PPM3, kao i filmovi umreženi bakarnim jonima predstavljaju dobru barijeru patogenim plesnima iz roda *Fusarium*, sprečavajući u potpunosti njihov rast. Ispitana je i mogućnost primene funkcionalizovanih alginatnih filmova u vidu prevlaka, formiranih raspršivanjem direktno na površini zemljišta. Utvrđeno je da se upotrebljenom metodom mogu formirati prevlake koje su postojane i funkcionalne tokom 21 dana, a takođe pozitivno utiču na rast biljke. Udruženo pozitivno dejstvo sastavnih komponenti malčirajućih prevlaka (alginata, EF *Bacillus* sp. PPM3 i  $\text{Cu}^{2+}$  jona) utvrđeno je u ogledu sa biljkama koje su rasle u prisustvu malča, kod kojih je zabeležen najveći porast visine biljke, širine listova i ukupne suve mase. Dobijeni rezultati ukazuju da se funkcionalizovani alginatni filmovi sa metabolitima novog morskog soja *Bacillus* sp. PPM3, umreženi bakarnim jonima, mogu koristiti u vidu malčirajućih filmova za pospešivanje rasta biljaka i zaštitu od infekcija uzrokovanih patogenim plesnima.

Ključne reči: morski sediment, *Bacillus* sp. PPM3, morske alge, stimulacija biljnog rasta, biološka kontrola, biljne plesni, polisaharidni filmovi, bakar, malčiranje zemljišta

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

# Plant growth biostimulators originated from marine environment intended for agricultural application

## Abstract

The scope of this doctoral dissertation was the isolation of microorganisms from marine sediment, as well as the synthesis of hydrogel coatings and films based on marine algae polysaccharides, and determination of their potential application in agriculture as plant growth stimulators.

Thirty-two new bacterial cultures were isolated from the coastal sediment of the Red sea. The selection of strains for potential application in agriculture was done based on the presence of direct and indirect plant growth promoting (PGP) mechanisms. Strain designated as PPM3 exhibited all tested PGP mechanisms: nitrogen fixation, phosphate solubilization, antagonism towards four plant pathogenic fungi (*Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Alternaria* sp. i *Mucor* sp.), as well as the ability to produce hydrolytic enzymes (proteases, cellulases, chitinases and amylases), therefore it was selected for further tests. By employing standard phenotypic, biochemical and molecular approaches, the new marine strain PPM3 was identified as the member of the genus *Bacillus*. *Bacillus* sp. PPM3 was able to grow on various substrates, in a wide range of temperatures (4-55 °C) and pH (5-10) and tolerate high concentrations of salt (up to 10%).

More detailed insight into *Bacillus* sp. PPM3 modes of action, as well as the possibility of utilizing formulations based on this strain in agriculture, was obtained by testing antagonistic activity of its' extracellular filtrate (EF) in an *in vitro* test with pathogenic fungi: *A. flavus*, *F. graminearum*, *Alternaria* sp. i *Mucor* sp. The antifungal effect of the EF from *Bacillus* sp. PPM3 was due to production of highly stable secondary metabolites, that directly suppressed the growth and spore germination of all tested fungi. Molecular analysis confirmed the presence of genes involved in the synthesis of antifungal compounds, lipopeptides: iturin, bacillomycin D, mycosubtilin and surfactin. The role of these compounds in the antagonism of *Bacillus* sp. PPM3 was confirmed *in vitro*, by determining the antifungal activity of the lipopeptide extract.

In order to test the possibility of applying *Bacillus* sp. PPM3 in the field, the phytotoxic effect of its' cells and EF on seed germination was evaluated, as well as their effect on plant growth *in vivo*. Based on the obtained values of germination index, it was determined that cells and EF of *Bacillus* sp. PPM3 do not display a phytotoxic effect on seed germination, and therefore are safe for application in the field, as phytonutrients. In a green house experiment, *Bacillus* sp. PPM3 displayed a positive effect on plant growth in the presence, as well as in the absence of the pathogenic fungi *F. graminearum*. All employed treatments led to a significant increase of the root length, stem height and total biomass of the plant. Due to the multiple beneficial effects of novel marine strain *Bacillus* sp. PPM3 on plant growth, exerted through various PGP mechanisms, there is an ample scope for practical application of this strain as a plant growth stimulator in sustainable agriculture.

Functionalized films based on polysaccharides from marine algae (agar, alginate and their blend) were successfully produced by a solvent casting method. The functionalization of the films for potential application in agriculture as mulching films and plant growth stimulators, was obtained by directly mixing the EF of *Bacillus* sp. PPM3 into the polymer solution. In order to obtain films with improved optical, mechanical and water vapor barrier properties, additional functionalization was employed by copper sulfate mediated cross-linking of the polymer chains. Properties of agar films were modified by *in situ* mineralization by simultaneous formation of copper minerals and polymer network, while properties of alginate and agar-alginate films were modified by external crosslinking with Cu<sup>2+</sup> ions. FT-IR analysis showed that the employed methods of functionalization did not alter the chemical structure of the polymers, although interactions between additives (EF of *Bacillus* sp. PPM3 and cross-linker) and the polymer were detected. SEM analysis showed that the cross-linking method and the presence of the additives in the polymeric network affect the microstructure of all obtained films. Agar films mineralized with copper-carbonate phase had more homogenous structure than the copper-phosphate mineralized films. Externally cross-linked alginate films displayed uniform dispersion and distribution of particles, while a tendency of particle agglomeration was

noticed in agar-alginate films. The presence of the EF in crosslinked films affected the uniformity of the structure of all films. Optical, mechanical and water vapor barrier properties of obtained films were investigated. A significant improvement of all tested properties was obtained with films that contained either EF or the cross-linkers separately, while when combined, their effect on improving tested properties was not so pronounced. The best optical properties (minimal transmission of UV light and significant transmission of visible light) were obtained with agar films mineralized with copper-carbonate phase and cross-linked alginate films. In terms of their functionality and durability in the field, the best mechanical (tensile strength in range from 35.7-132.1 MPa, elongation at brake in the range from 13-29 %) and barrier properties (water vapor permeability in range from  $1.41 \times 10^{-10}$  -  $2.50 \times 10^{-10}$  g/smPa) were obtained with alginate based films.

Biological properties of functionalized alginate films and coatings (the ability to suppress fungal growth and stimulate plant growth) were investigated. It was determined that alginate films with EF from *Bacillus* sp. PPM3 as well as films cross-linked with copper ions suppress the growth of certain fungi from *Fusarium* genus, and therefore present an excellent barrier to plant pathogen growth and penetration. The possibility of applying functionalized alginate films as mulching coatings by spray technics and their effect on plant growth was also investigated. Alginate mulching coatings were successfully formed, maintained their functionality for 21 days and in addition displayed positive effect on plant growth. A synergistic effect of coating constituents (alginate, the EF from *Bacillus* sp. PPM3 and  $\text{Cu}^{2+}$  ions) on the growth of plants grown with the mulch was detected, where plants exhibited the highest improvement of stem height, leaf width, and biomass. The results imply that copper cross-linked alginate films that contain extracellular filtrate of novel marine strain *Bacillus* sp. PPM3 can be used as mulching films for the stimulation of plant growth and protection of plants from infections caused by pathogenic fungi.

Key words: marine sediment, *Bacillus* sp. PPM3, marine algae, stimulation of plant growth, biological control, phytopathogenic fungi, polysaccharide films, copper, soil mulching

**Scientific area:** Technological engineering

**Scientific discipline:** Biochemical engineering and biotechnology



# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>PREGLED LITERATURE</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>MORSKA SREDINA KAO IZVOR BIOAKTIVNIH AGENASA</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>BAKTERIJE STIMULATORI BILJNOG RASTA I MEHANIZMI NJIHOVOG DELOVANJA</b>	<b>3</b>
2.2.1	<i>Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta</i>	4
2.2.1.1	Biloška fiksacija azota	5
2.2.1.2	Rastvaranje fosfata	5
2.2.1.3	Regulacija biljnih hormona	6
2.2.2	<i>Indirektni mehanizmi stimulacije biljnog rasta</i>	7
2.2.2.1	Kompeticija za prostor i hranljive materije	7
2.2.2.2	Antibioza	8
2.2.2.3	Imunizacija biljke	9
2.2.2.4	Proizvodnja hidrolitičkih enzima	9
<b>2.3</b>	<b>POLISAHARIDI IZ MORSKIH ALGI KAO STIMULATORI BILJNOG RASTA I MEHANIZMI NJIHOVOG DELOVANJA</b>	<b>9</b>
2.3.1	<i>Povećanje efikasnosti usvajanja hranljivih materija</i>	11
2.3.2	<i>Regulacija hormonalnog statusa biljaka</i>	11
2.3.3	<i>Uticaj na zemljište i zemljišne mikroorganizme</i>	11
2.3.4	<i>Aktivacija imunog odgovora biljke tokom patogeneze</i>	11
2.3.5	<i>Tolerancija stresa</i>	12
<b>2.4</b>	<b>POLIMERNI FILMOVI I PREVLAKE U AGROINDUSTRIJI</b>	<b>12</b>
2.4.1	<i>Optička svojstva polimernih filmova namenjenih upotrebi u agroindustriji</i>	13
2.4.2	<i>Mehanička svojstva polimernih filmova namenjenih upotrebi u agroindustriji</i>	13
2.4.3	<i>Barijerna svojstva polimernih filmova namenjenih upotrebi u agroindustriji</i>	14
2.4.4	<i>Prirodni polimeri u agroindustriji – polisaharidni filmovi</i>	15
2.4.5	<i>Agar i alginat - strukturna svojstva i mogućnosti funkcionalizacije za pripremu filmova namenjenih upotrebi u agroindustriji</i>	15
<b>3</b>	<b>CILJEVI RADA</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>IZOLACIJA MIKROORGANIZAMA IZ OBALSKOG MORSKOG SEDIMENTA CRVENOG MORA</b>	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>IZOLACIJA BAKTERIJA STIMULATORA BILJNOG RASTA</b>	<b>22</b>
4.2.1	<i>Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta</i>	22
4.2.1.1	Biološka fiksacija atmosferskog azota	22
4.2.1.2	Sposobnost rastvaranja fosfata	22
4.2.2	<i>Indirektni mehanizmi stimulacije biljnog rasta</i>	23
4.2.2.1	Antifungalna aktivnost	23
4.2.2.2	Sposobnost proizvodnje hidrolitičkih enzima	23

<b>4.3</b>	<b>KARAKTERIZACIJA I IDENTIFIKACIJA ODABRANOG IZOLATA PPM3</b>	<b>24</b>
4.3.1	<i>Određivanje morfoloških i fizioloških karakteristika izolata PPM3</i>	24
4.3.2	<i>Određivanje ekoloških karakteristika izolata PPM3</i>	24
4.3.2.1	Temperaturni opseg i optimum rasta bakterije	24
4.3.2.2	pH opseg i optimum rasta bakterije	24
4.3.2.3	Tolerancija soli	25
4.3.3	<i>Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata PPM3</i>	25
4.3.3.1	Izolacija hromozomalne DNK	26
4.3.3.2	Lančana reakcija polimerizacije	26
<b>4.4</b>	<b>UTVRĐIVANJE MEHANIZAMA BIOLOŠKE KONTROLE I POTENCIJALA PRIMENE METABOLITA ODABRANOG IZOLATA <i>BACILLUS</i> SP. PPM3</b>	<b>27</b>
4.4.1	<i>Ispitivanje antifungalne aktivnosti ekstraćelijskog filtrata izolata <i>Bacillus</i> sp. PPM3</i>	27
4.4.2	<i>Ispitivanje uticaja ekstraćelijskog filtrata <i>Bacillus</i> sp. PPM3 na germinaciju spora patogenih plesni</i>	27
4.4.3	<i>Ispitivanje uticaja ekstraćelijskog filtrata <i>Bacillus</i> sp. PPM3 na strukturu ćelija plesni</i>	28
4.4.4	<i>Ispitivanje stabilnosti ekstraćelijskog filtrata izolata <i>Bacillus</i> sp. PPM3</i>	28
4.4.5	<i>Detekcija gena za sintezu lipopeptida</i>	28
4.4.6	<i>Ekstrakcija lipopeptida iz ekstraćelijskog filtrata izolata <i>Bacillus</i> sp. PPM3</i>	29
4.4.7	<i>Ispitivanje antifungalne aktivnosti lipopeptidnog ekstrakta <i>Bacillus</i> sp. PPM3</i>	29
<b>4.5</b>	<b>ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI PRIMENE MORSKOG SOJA <i>BACILLUS</i> SP. PPM3</b>	<b>29</b>
4.5.1	<i>Ispitivanje fitotoksičnosti <i>Bacillus</i> sp. PPM3</i>	29
4.5.2	<i>Ispitivanje uticaja primene <i>Bacillus</i> sp. PPM3 in vivo na rast kukuruza</i>	30
<b>4.6</b>	<b>SINTEZA I FUNKCIONALIZACIJA FILMOVA NA BAZI POLISAHARIDA IZ MORSKIH ALGI</b>	<b>31</b>
4.6.1	<i>Sinteza agarne filmova</i>	31
4.6.2	<i>Sinteza alginatnih filmova</i>	32
4.6.3	<i>Sinteza agarno-alginatnih filmova</i>	32
<b>4.7</b>	<b>KARAKTERIZACIJA FILMOVA NA BAZI POLISAHARIDA IZ MORSKIH ALGI</b>	<b>32</b>
4.7.1	<i>Morfološka svojstva filmova</i>	32
4.7.2	<i>Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)</i>	33
4.7.3	<i>Optička svojstva filmova</i>	33
4.7.4	<i>Mehanička svojstva filmova</i>	33
4.7.5	<i>Barijerna svojstva filmova</i>	33
<b>4.8</b>	<b>ISPITIVANJE BIOLOŠKIH SVOJSTAVA FILMOVA</b>	<b>34</b>
4.8.1	<i>Ispitivanje antifungalnog svojstva funkcionalizovanih alginatnih filmova</i>	34
4.8.2	<i>Ispitivanje uticaja prevlaka na bazi alginata namenjenih malčiranju, na rast biljke in vivo</i>	34
<b>4.9</b>	<b>STATISTIČKA OBRADA PODATAKA</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>REZULTATI I DISKUSIJA</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>IZOLACIJA BAKTERIJA IZ OBALSKOG SEDIMENTA CRVENOG MORA</b>	<b>35</b>
<b>5.2</b>	<b>UTVRĐIVANJE PRISUSTVA MEHANIZAMA STIMULACIJE BILJNOG RASTA</b>	<b>36</b>

5.2.1	<i>Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta</i> .....	37
5.2.1.1	<i>Biološka fiksacija azota</i> .....	37
5.2.1.2	<i>Rastvaranje fosfata</i> .....	39
5.2.2	<i>Indirektni mehanizmi stimulacije biljnog rasta</i> .....	40
5.2.2.1	<i>Antifungalna aktivnost izolata obalskog sedimenta Crvenog mora</i> .....	40
5.2.2.2	<i>Proizvodnja hidrolitičkih enzima</i> .....	42
<b>5.3</b>	<b>IDENTIFIKACIJA PGP IZOLATA PPM3</b> .....	<b>44</b>
5.3.1	<i>Morfološka i fiziološka karakterizacija izolata PPM3</i> .....	44
5.3.2	<i>Ekofiziološke karakteristike izolata PPM3</i> .....	46
5.3.3	<i>Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata PPM3</i> .....	48
<b>5.4</b>	<b>BIOKONTROLNA AKTIVNOST I MEHANIZMI DELOVANJA METABOLITA ODABRANOG IZOLATA</b>	
	<b>BACILLUS SP. PPM3</b> .....	<b>49</b>
5.4.1	<i>Efekat ekstraćelijskog filtrata Bacillus sp. PPM3 na strukturne karakteristike plesni, njihov rast i germinaciju spora</i> .....	49
5.4.2	<i>Stabilnost ekstraćelijskog filtrata izolata Bacillus sp. PPM3</i> .....	52
5.4.3	<i>Detekcija gena za proizvodnju lipopeptida izolata Bacillus sp. PPM3</i> .....	52
5.4.4	<i>Antifungalna aktivnost lipopeptidnog ekstrakta Bacillus sp. PPM3</i> .....	53
<b>5.5</b>	<b>UTICAJ BACILLUS SP. PPM3 NA PARAMETRE RASTA BILJAKA</b> .....	<b>55</b>
5.5.1	<i>Utvrdjivanje fitotoksičnosti Bacillus sp. PPM3</i> .....	55
5.5.2	<i>Uticao Bacillus sp. PPM3 na rast biljke in vivo</i> .....	57
<b>5.6</b>	<b>FUNKCIONALIZOVANI FILMOVI NA BAZI POLISAHARIDA IZ MORSKIH ALGI ZA PRIMENU U</b>	
	<b>AGROINDUSTRIJI</b> .....	<b>60</b>
5.6.1	<i>Sinteza funkcionalizovanih filmova na bazi polisaharida iz morskih algi i njihova morfološka svojstva</i> .....	60
5.6.2	<i>FT-IR analiza</i> .....	63
5.6.3	<i>Optička svojstva filmova na bazi polisaharida poreklom iz morskih algi</i> .....	66
5.6.4	<i>Mehanička svojstva filmova na bazi polisaharida poreklom iz morskih algi</i> .....	70
5.6.5	<i>Barijerna svojstva filmova na bazi polisaharida poreklom iz morskih algi</i> .....	73
<b>5.7</b>	<b>BIOLOŠKA SVOJSTVA FILMOVA</b> .....	<b>75</b>
5.7.1	<i>Antifungalno svojstvo funkcionalizovanih alginatnih filmova</i> .....	75
5.7.2	<i>Uticao prevlaka na bazi alginata na rast biljke</i> .....	77
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>83</b>

## 1 UVOD

Prema poslednjim statističkim podacima, svetska populacija broji preko 7 milijardi ljudi, i taj broj je u stalnom porastu. Uzimajući u obzir konstantan porast broja stanovništva sa jedne strane, i sve veću degradiranost životne sredine usled industrijalizacije sa druge, jasno je da mogućnost proizvodnje hrane za rastuće svetsko stanovništvo predstavlja veliki izazov. Savremena poljoprivreda se u velikoj meri oslanja na upotrebu hemikalija (fertilizatora, herbicida i pesticida) kako bi obezbedila adekvatne prinose i odgovorila na stalno rastuće zahteve za proizvodnjom hrane. Upotreba hemijskih sredstava radi povećanja prinosa i zaštite biljnih kultura, iako uglavnom delotvorna, dugoročno ima negativan uticaj, kako na ljude tako i na celokupnu životnu sredinu [1]. Sve veća ispošćenost obradivih površina, kao i pojava rezistentnih patogena biljnih kultura, nameće potrebu za pronalaženjem novih, ekološki i ekonomski prihvatljivih pristupa, koji će omogućiti smanjenje upotrebe potencijalno štetnih materija i obezbediti održivost u agroindustriji. Posebnu pažnju u oblasti agroindustrije, ima razvoj biostimulatora rasta biljaka, odnosno pronalaženje i razvoj jeftinih hemijskih i bioloških agenasa koji se mogu dobiti iz prirodnih izvora. Poslednjih godina beleži se stalni porast vrednosti svetskog tržišta biostimulatora, koje prema statističkim podacima iz 2020. godine, vredi više od četiri milijarde dolara. Procenjuje se da će se do 2025. godine vrednost ovog tržišta udvostručiti [2].

Među biološkim agensima sa biostimulatornim dejstvom na biljke, mikroorganizmi iz roda *Bacillus*, prepoznati su kao veoma delotvorni [3,4]. Zbog velike rasprostranjenosti i ogromnog genetičkog diverziteta, velikog broja literaturnih podataka, GRAS (engl.-*Generally Regarded As Safe*) statusa i sposobnosti preživljavanja u jako nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine, formiranjem otpornih endospora, vrste roda *Bacillus* smatraju se izrazito pogodnim kandidatima za pripremu različitih preparata [3,5,6]. Čelijske suspenzije, kao i produkti metabolizma ovih mikroorganizama sastavni su delovi komercijalnih proizvoda koji se upotrebljavaju kao fertilizatori ili biopesticidi [1]. Ovi mikroorganizmi mogu stimulisati rast biljaka na različite načine, a krajnji rezultat njihovog delovanja je: poboljšana ishrana biljke, povećan rast nadzemnih i podzemnih delova biljke, povećanje klijavosti, regulacija hormonalnog statusa biljke, ranije plodonošenje, povećanje prinosa, i mnogi drugi [7]. Većina mikroorganizama koji se upotrebljavaju u ove svrhe uglavnom potiču iz zemljišta. Međutim, morska sredina, iako nije previše istraživana, može biti bogat izvor različitih grupa mikroorganizama sa jedinstvenim morfo-fiziološkim svojstvima [8]. Ovi mikroorganizmi i produkti njihovog metabolizma takođe mogu ispoljiti biostimulatorno dejstvo na biljke i stoga, mogu poslužiti kao prirodni, netoksični, ekološki i ekonomični agensi za upotrebu u agroindustriji.

Biostimulatori se često primenjuju u obliku rastvora za prskanje ili spreja, što zahteva puno rada i upotrebu velike količine vode. Rešenje za ovaj problem može biti upotreba hidrogelnih prevlaka, odnosno filmova, koji mogu imati biostimulatorno dejstvo. Takve prevlake su rezultat formiranja kompleksa polielektrolita, interakcijom anjonskih funkcionalnih grupa polielektrolita sa metalnim katjonima, ili reakcije na interfazi vodenih rastvora polielektrolita sa funkcionalnim grupama suprotnog naelektrisanja [9]. Polisaharidi dobijeni iz morskih algi su pokazali veliki potencijal za primenu u agroindustriji zbog raznovrsnih uticaja koji imaju na biljke [10]. Naime, hidrogelne prevlake, odnosno filmovi na bazi polisaharida dobijenih iz morskih algi, mogu pospešiti rast i cvetanje biljaka, razvoj korena, kao i povećati toleranciju biljke na stres iz spoljašnje sredine [9,11]. Uopšteno, zbog mnogobrojnih korisnih svojstava polisaharidi iz morskih algi privlače sve više pažnje kao atraktivan i nov izvor za pripremu preparata za poboljšanje produktivnosti useva. Prednost upotrebe polisaharida kao biostimulatora je to što su biorazgradivi, biokompatibilni, netoksični, biološki reaktivni i jeftini, što ih čini pogodnim za primenu i u održivoj poljoprivredi. U okviru grupe polisaharida poreklom iz morskih algi, od posebnog interesa su alginat i agar.

Alginat je prirodni polisaharidni kopolimer sastavljen od dva tipa monomera:  $\beta$ -D-manuronske kiseline i  $\alpha$ -L-guluronske kiseline. Alginat se ekstrahuje iz mrkih morskih algi (familija *Phaeophyceae*) ili ga vanćelijski proizvode neke bakterije [12,13]. Agar je polisaharid koji se ekstrahuje iz crvenih morskih algi (familija *Gelidiaceae*) i morske trave i sastavljen je od dve

subjedinice: agaroze (linearnog molekula sastavljenog od ponavljajućih jedinica 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galaktoze i  $\beta$ -D galaktoze), odličnih gelirajućih svojstava i agaropektina, koji nema sposobnost geliranja i nakon ekstrakcije uglavnom biva uklonjen. Alginat i agar imaju svojstvo geliranja, u prisustvu određenih stimulanasa. Alginat obrazuje gelove, odnosno filmove u prisustvu dvovalentnih katjona i u uslovima sniženog pH. Agar je u tečnom stanju u uslovima povišene temperature, dok na temperaturama ispod 40 °C formira gelove [14,15].

Utvrđeno je da se polisaharidni filmovi ili prevlake, dobro zadržavaju, odnosno vezuju na površinama kao što su tlo i listovi biljaka. Dobra adhezivna svojstva ovih filmova, kao i mogućnost njihove primene standardnim tehnikama koje se inače koriste u poljoprivrednoj praksi, omogućava njihovu široku primenu. Dodatkom određenih biološki aktivnih komponenti, filmovi i prevlake na bazi polisaharida, mogu funkcionisati ne samo kao biostimulatori, već i kao bio-herbicidi, insekticidi i fungicidi, koji se nanose na tlo, semena, plod ili listove biljaka. Neki od konvencionalnih fungicida koji se koriste u poljoprivredi, radi sprečavanja razvoja plesni i poboljšanja prinosa biljaka, uključuju bakarna jedinjenja, uglavnom primenjivana u vidu folijarnog spreja [16]. Bakar, kao element koji je biljkama neophodan u malim količinama, utiče na brojne fiziološke procese u biljci, pre svega fotosintezu, stimulišući proizvodnju hlorofila, a kao kofaktor mnogih enzima utiče na pravilno funkcionisanje celokupnog metabolizma biljaka. Nedostatak mikronutrijenata u zemljištu, predstavlja još jedan problem savremene intenzivne poljoprivrede pa se osiromašena zemljišta moraju prihranjivati primenom različitih ferilizatora koji sadrže mikroelemente. Polisaharidne prevlake i filmovi našli su primenu i kao nosači, odnosno sistemi za kontrolisano otpuštanje ferilizatora na poljoprivrednim površinama [17].

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je izolacija mikroorganizama iz morskog sedimenta kao i sinteza hidrogel prevlaka, odnosno filmova na bazi polisaharida poreklom iz morskih algi i ispitivanje njihovog biostimulacionog dejstva na rast biljaka. Prvi deo istraživanja obuhvata izolaciju i karakterizaciju mikroorganizama izolovanih iz morskog sedimenta Crvenog mora, kao i odabir sojeva sa najvećim biostimulacionim potencijalom, utvrđivanjem prisustva osnovnih mehanizama stimulacije biljnog rasta. U drugom delu rada izvršena je karakterizacija, kao i identifikacija odabranog soja *Bacillus* sp. PPM3 upotrebom morfoloških, biohemijskih i molekularnih metoda. U cilju sagledavanja mogućnosti pripreme formulacija na bazi novog bakterijskog soja *Bacillus* sp. PPM3, kao i njegove potencijalne primene, u radu je utvrđen biokontrolni potencijal ćelijske suspenzije i ekstraćelijskog filtrata ovog soja, u *in vitro* ogledu sa biljnim patogenim plesnima, ispitana je fitotoksičnost u testu klijavosti kukuruza kokičara (*Zea mays* var. *everta*, L.) i mungo pasulja (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), i utvrđen biostimulacioni uticaj u *in vivo* ogledu sa biljkom kukuruza.

U trećem delu rada sintetisani su filmovi na bazi polisaharida poreklom iz morskih algi (agara, alginata, i njihovih mešavina). U cilju dobijanja filmova sa potencijalnom primenom u stimulaciji i zaštiti biljaka, i poboljšanih optičkih, mehaničkih i barijernih svojstava, izvršena je njihova funkcionalizacija dodatkom ekstraćelijskog filtrata novog soja *Bacillus* sp. PPM3, kao i različitim tehnikama umrežavanja polimera posredstvom soli bakra. U ovoj fazi utvrđena su strukturna, morfološka, optička, mehanička i barijerna svojstva svih dobijenih filmova i izvršen je odabir najboljih formulacija, sa stanovišta njihove potencijalne primene na poljoprivrednim površinama.

U poslednjoj fazi rada utvrđena su biološka svojstva odabranih formulacija na bazi polisaharida alginata. Utvrđeno je antifungalno svojstvo alginatnih filmova, u *in vitro* testu sa biljnim patogenim plesnima, kao i uticaj prevlaka na bazi ovog polisaharida, na rast biljke mungo pasulja, u *in vivo* ogledu.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 Morska sredina kao izvor bioaktivnih agenasa

Morska sredina bogata je organskim komponentama koje pogoduju evoluciji i razvoju živog sveta uopšte. Imajući u vidu da je 80 % života na Zemlji nastanjeno u okeanima, morska staništa predstavljaju ogroman neistraženi izvor novih organizama, sa raznovrsnim funkcionalnim svojstvima [18]. Morski organizmi kao što su bakterije, mikroalge i makroalge, čine skoro polovinu svetskog biodiverziteta i stoga su ogroman izvor bioaktivnih jedinjenja: polisaharida, enzima i bioaktivnih peptida, vitamina, antioksidanasa i mnogih drugih [8,19,20]. Šezdesetih godina dvadesetog veka, započelo je intenzivnije istraživanje morskih ekosistema u potrazi za novim izvorima potencijalno korisnih bioaktivnih agenasa. Uopšteno, intenzivirana su istraživanja koja se tiču biohemijskih svojstava, kao i hemijske strukture bioaktivnih jedinjenja izolovanih iz morskih organizama, sa ciljem sagledavanja njihovog biotehnološkog potencijala i njihove upotrebe prvenstveno u oblasti medicine, što je u poslednjih deset godina dovelo do izolacije velikog broja novih jedinjenja sa različitim svojstvima, uključujući: antimikrobno, antifungalno, antikancerogeno, antiinflamatorno i mnoga druga [8,18,21,22].

Morska staništa sadrže taksonomski različite grupe organizama jedinstvenih morfo-fizioloških karakteristika koje se najčešće razlikuju od onih prisutnih kod njihovih zemljišnih predstavnika. Specifičnosti uslova koji vladaju u morskim sredinama, naročito u obalskim područjima, kao što su brze i česte promene temperature i osvetljenja, ekstremne vrednosti saliniteta, pritiska i pH, plima i oseka, kao i izloženost utraljubičastom zračenju, evolutivno su doveli do razvoja određenih adaptacionih mehanizama koje ovim organizmima omogućavaju preživljavanje. Surovost uslova u kojima žive daje ovim organizmima kompetitivnu prednost u odnosu na iste predstavnike iz zemljišnih ekosistema. Jedan od mehanizama koji im obezbeđuje zaštitu od predatora i opstanak je proizvodnja jedinstvenih bioaktivnih sekundarnih metabolita i upravo na tome se zasniva veliki potencijal njihove primene u različitim granama industrije [18].

Izolacija novih sojeva mikroorganizama iz morskih staništa i ispitivanje njihovog biotehnološkog potencijala, može biti od velikog interesa i značaja u oblasti agroindustrije, gde ovi mikroorganizmi i produkti njihovog metabolizma mogu ispoljiti niz korisnih svojstava na rast i razvoj biljaka.

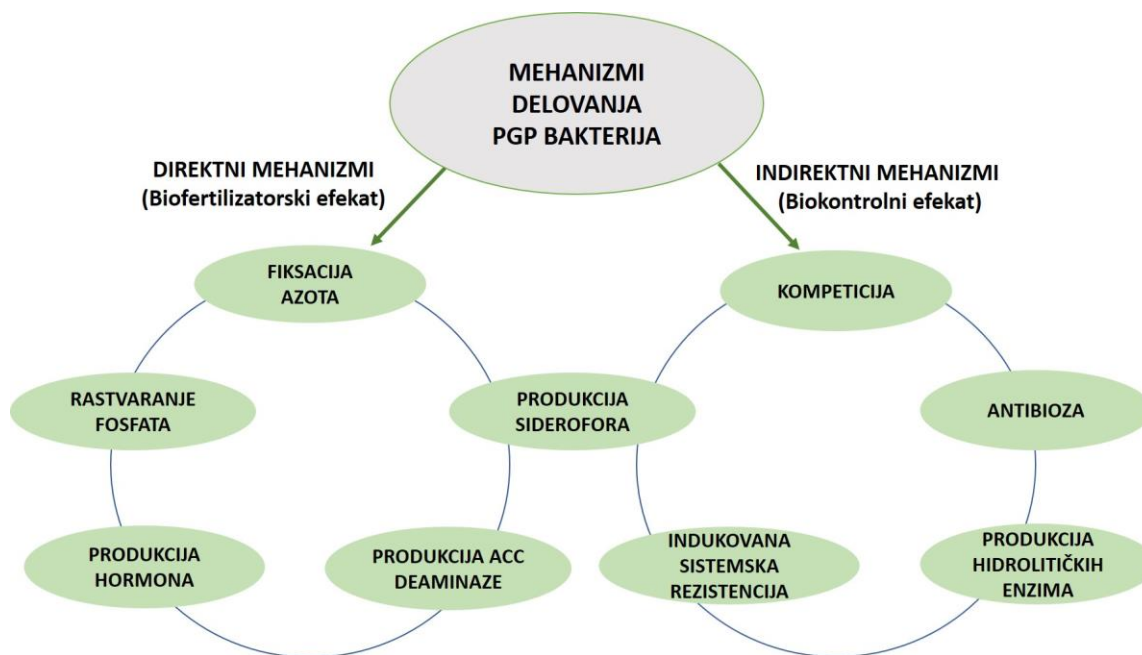
### 2.2 Bakterije stimulatori biljnog rasta i mehanizmi njihovog delovanja

Bakterije koje stimulišu rast biljaka, odnosno PGP (engl. -*Plant Growth Promoting*) bakterije, predstavljaju jako raznoliku grupu mikroorganizama koje imaju koristan efekat na rast, razvoj i zdravlje biljaka, i ne ispoljavaju nikakve negativne efekte na životnu sredinu [4]. PGP bakterije uključuju one koje stupaju u specifične simbiotske odnose sa biljkama, kao što je to slučaj sa predstavnicima roda *Rhizobium*; zatim endofitne forme, koje žive unutar tkiva biljaka, kao i slobodno-živeće forme. Ove bakterije su široko rasprostranjene unutar domena *Bacteria*, a najviše ih je među pripadnicima filuma *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. Kada su prisutne u zemljištu, ove bakterije odgovaraju na hemijske atraktante, takozvane korenske eksudate-raznovrsnu grupu jedinjenja koju sintetiše, skladišti i izlučuje koren biljaka [7]. Korenski eksudati modifikuju hemijska i fizička svojstva zemljišta, a istovremeno predstavljaju i specifične supstrate za rast korisnih mikroorganizama. Na taj način ovi signalni molekuli posreduju u odabiru mikrobne zajednice koja će interagovati sa biljkom.

Upotreba odabranih PGP bakterija predstavlja značajan biotehnološki pristup u savremenoj poljoprivredi, koji omogućava povećanje prinosa različitih biljnih kultura, ublažavanje negativnih posledica abiotičkog stresa, a doprinosi i optimizaciji kruženja osnovnih hranljivih materija na poljoprivrednim površinama [4,23]. Iako su mnogostruke koristi upotrebe bakterija stimulatora biljnog rasta u agroindustriji prepoznate i priznate od strane svetskog agroekonomskog sektora, njihova stvarna primena čini tek jako mali deo poljoprivredne prakse [1]. Njihova upotreba u velikoj

meri je ograničena nedoslednostima u ispoljavanju korisnih svojstava na samim poljoprivrednim površinama. Stoga bi bolje razumevanje raznovrsnosti ovih korisnih mikroorganizama, mehanizama njihovog delovanja, kao i mogućnosti pripreme formulacija i načina njihove primene, trebalo da olakša njihov razvoj u stabilne i pouzdane preparate koji će svoje mesto naći u održivoj poljoprivrednoj praksi [7].

Višestruki korisni efekti koje PGP bakterije ostvaruju na biljni rast, posledica su raznovrsnih mehanizama koji mogu značajno varirati, od jednostavnog zauzimanja slobodnih niša, do uspostavljanja složenih ekoloških odnosa sa autohtonom mikrobiotom i florom staništa [7]. Uopšteno mogu se podeliti na direktne i indirektne mehanizme (slika 2.1).



**Slika 2.1.** Šematski prikaz mehanizama delovanja PGP bakterija

### 2.2.1 Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta

Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta uključuju one kojima PGP bakterije biljkama obezbeđuju osnovne hranljive materije (azot, fosfor, kalijum, gvožđe i druge). Takođe, PGP bakterije direktno mogu stimulisati rast biljaka kroz proizvodnju ili modulaciju nivoa biljnih hormona (auksina, gibberelina, citokinina, etilena) i tako uticati na hormonalni balans biljke [4,7].

Azot i fosfor predstavljaju najvažnije makroelemente neophodne za pravilan razvoj i rast biljaka, i njihova dostupnost značajno utiče na prinose [24]. Mnoge poljoprivredne površine karakteriše nedovoljan sadržaj ovih važnih elemenata, uzrokujući da rast biljaka bude daleko ispod optimalnog. Kako bi se prevazišli ovi problemi i obezbedili viši prinosi, poljoprivrednici su sve više zavisni od upotrebe mineralnih đubriva [4]. Pored visoke cene, proizvodnja mineralnih đubriva dovodi do iscrpljivanja neobnovljivih prirodnih resursa, koristi velike količine nafte i prirodnog gasa, i predstavlja ozbiljnu opasnost za ljude i životnu sredinu. Veliki naponi su uloženi u pronalaženje i testiranje alternativnih metoda i tehnologija, koje će smanjiti ili sprečiti upotrebu hemijskih đubriva u agroekosistemima, a istovremeno obezbediti biljci dovoljan sadržaj osnovnih hranljivih materija. Stoga ne čudi da upotreba efikasnih bioloških sredstava umesto hemijskih đubriva već dugi niz godina privlači pažnju agronomskih stručnjaka [1].

### 2.2.1.1 Biloška fiksacija azota

Azot ( $N_2$ ) je element koji je biljkama potreban u najvećoj količini, a njegova dostupnost predstavlja glavni faktor koji ograničava rast biljaka [25]. Biljke su sposobne da usvoje azot isključivo u obliku nitratnih jona ( $NO_3^-$ ) ili amonijaka ( $NH_4^+$ ). PGP bakterije imaju sposobnost da azot iz atmosfere pretvore u forme koje će biti dostupne biljci u procesu označenom kao biološka fiksacija azota (BNF, engl. *Biological Nitrogen Fixation*). Ovaj proces zasniva se na sposobnosti specifične grupe bakterija (diazotrofa) da uz pomoć enzima nitrogenaze transformišu atmosferski azot u, biljkama dostupan, amonijum jon. Takođe kroz proces amonifikacije, razgradnjom organske materije uz pomoć specifičnih enzima proteaza, ove bakterije transformišu proteine do amonijaka, koji u zemljištu prelazi u oblike koje biljke lako mogu usvojiti [7,26]. Neki od najzastupljenijih azotofiksatora prepoznati su među pripadnicima rodova: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Gluconoacetobacter*, *Anabaena*, *Nostoc* [24]. Ove bakterije stupaju u specifične odnose sa biljkama, kolonizujući koren ili druge organe same biljke, mahom kod leguminoza, obrazujući specifične kvržice (nodule) i predstavljaju simbiotske azotofiksatore ili *rhizobie*. Među azotofiksirajućim mikroorganizmima nalaze se i oni koji žive u bliskoj asocijaciji sa biljkom, ali ne naseljavaju unutrašnja tkiva biljke, odnosno asocijativni azotofiksatori. Takođe, među azotofiksatorima nalaze se i mnoge slobodnoživeće bakterije [1,23].

Imajući u vidu nedostatak azota u poljoprivrednim ekosistemima, kao i značaj azota u ishrani biljke, bakterije sa sposobnošću biološke fiksacije azota i produkcije amonijaka predstavljaju dobru alternativu upotrebi mineralnih đubriva. Veliki broj istraživanja i ispitivanja PGP sojeva poreklom iz različitih niša životne sredine, potvrđuje potencijal upotrebe azotofiksirajućih bakterija u sklopu održive poljoprivrede [4,24]. Komercijalni preparati na bazi *rhizobia*, na tržištu su još od osamdesetih godina prošlog veka, a današnja praksa upotrebe azotofiksatora kao inokulanata, zasniva se na pripremi preparata koji mahom čine specifične kokulture bakterija za ciljane grupe kultivara [23].

Azotofiksirajuća sposobnost mikrobiote morskih ekosistema uglavnom je ispitivana u kontekstu raznovrsnosti i potencijala usvajanja azota od strane predstavnika *Cyanobacteria* i njihova uloga kao glavnih nosica ovog svojstva je dobro dokumentovana [27]. Međutim, nedavno objavljena istraživanja Delmont i saradnika [28] naglašavaju značaj i potencijal heterotrofnih bakterija u morskim ekosistemima. Smatra se da morski heterotrofni diazotrofi imaju ključnu ulogu u ciklusu azota i da upravo oni, u najvećoj meri, obezbeđuju fiksirani azot koji utiče na primarnu produkciju, odnosno rast i produktivnost u morskim ekosistemima [28,29]. Oskudni podaci o potencijalu i ekološkoj ulozi azotofiksatora i mikroorganizama iz morskih ekosistema, uopšte, posledica su pre svega velikog broja i dalje neistraženih staništa, kao i mnogobrojnih ograničenja u uspešnosti gajenja ovih mikroorganizama u laboratorijskim uslovima. Međutim, poslednjih godina ističe se ogroman biotehnoški potencijal morskih mikroorganizama, pa je i izolacija i karakterizacija PGP mikroorganizama iz ovih staništa i njihova eventualna primena u agroindustriji, sve više u fokusu istraživača [30,31].

### 2.2.1.2 Rastvaranje fosfata

Fosfor je drugi najvažniji element, koji utiče na niz metaboličkih procesa u biljci (disanje, prenos energije i signala, sintezu makromolekula i fotosintezu) [32]. Fosfor se u zemljištu nalazi ili u obliku minerala (apatit, hidroksiapatit) ili u vidu organskog fosfora, a uprkos njegovoj velikoj količini u zemljištu, uglavnom se nalazi u nerastvornom obliku koji biljke ne mogu usvojiti [33]. Kako bi ostvarile maksimalnu produktivnost, biljke zahtevaju oko 30  $\mu\text{mol/L}$  fosfora u vidu ortofosfornih jona ( $H_2PO_4^-$  i  $HPO_4^{2-}$ ), a samo oko 1  $\mu\text{mol/L}$  im je dostupan. Iz ovog razloga se dostupnost fosfora u zemljištu smatra jednim od glavnih ograničavajućih faktora biljnog rasta, kako u poljoprivrednim, tako i u hortikulturnim ekosistemima [10,34]. Nedostupnost fosfora nameće neophodnost unošenja rastvorljivih oblika fosfora u poljoprivredne sisteme u vidu fosfatnih đubriva, koja sama po sebi imaju veliki broj ograničenja: brzu imobilizaciju od strane minerala aluminijuma i gvožđa u kiseloj sredini, oticanje sa poljoprivrednih površina i eutrofikaciju [35]. Takođe, fosfatna đubriva direktno su zavisna



od fosfatnog kamena, koji predstavlja neobnovljiv prirodni resurs, čije rezerve pokazuju značajan pad na svetskom nivou. Procenjuje se da će se rezerve fosfatnog kamena do 2040-te godine iscrpeti i da će se kao posledica toga prinosi pšenice prepoloviti. Imajući u vidu da delotvornost primenjenog fosfatnog đubriva retko prelazi 30 %, pronalaženje alternativnih agrotehničkih metoda, koje se zasnivaju na očuvanju prirodnih resursa od vitalnog je značaja [36].

Veliki broj istraživanja ukazuje na to da određeni mikroorganizmi, naročito zemljišne bakterije, imaju sposobnost oslobađanja organskog fosfata ili rastvaranja neorganskih fosfatnih jedinjenja (trikalcijum fosfata, dikalcijum fosfata, hidroksiapatita i kamenog fosfata) [35,37,38]. Ovi mikroorganizmi, označeni kao PSM (engl.-*Phosphate Solubilizing Microorganisms*), omogućavaju biljkama rastvorljivi fosfat, a za uzvrat od biljke dobijaju šećere i organske kiseline neophodne za sopstveni rast. Bakterijski sojevi iz rodova *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* i *Enterobacter*, smatraju se najpotentnijim PSM [34,35]. Osnovni mehanizam kojim PSM obezbeđuju biljkama fosfor je produkcija organskih kiselina ili specifičnih enzima (fitaza, C-P lijaza, fosfataza). PSM takođe utiču na stimulaciju biljnog rasta poboljšavajući stepen biološke fiksacije azota [39]. Različita istraživanja sa PSM iz rodova: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Micrococcus* i *Rhizobium*, ukazuju da inokulacija pojedinim sojevima ovih bakterija može značajno uticati na povećanje visine biljke, dužine korena, biomase i prinosa kod pšenice, paradajza, soje i kukuruza, u poređenju sa neinokulisanim kontrolama [35,37,40]. Literaturni podaci potvrđuju da primena ćelijskih suspenzija PSM dovodi do znatnog povećanja količine rastvorljivog fosfata, kao i rasta određenih kultivara, na primer mungo pasulja, u poređenju sa neinokulisanim kontrolama [41]. Takođe, mnogi autori smatraju da inokulacija useva mikroorganizmima koji rastvaraju fosfate, može smanjiti upotrebu hemijskih đubriva i do 50 %, bez značajnog uticaja na prinose [35,36]. Ovi mikroorganizmi pokazali su i značajan kapacitet u oporavku slabo produktivnih poljoprivrednih zemljišta [4].

### 2.2.1.3 Regulacija biljnih hormona

Biljni rast i razvoj kao i odgovor biljke na uslove spoljašnje sredine uslovljen je biljnim hormonima. Mnogi PGP mikroorganizmi imaju sposobnost proizvodnje jedinjenja nalik biljnim hormonima, ili mogu učestvovati u njihovoj regulaciji i na taj način uticati na hormonalni balans biljke utičući tako na njen rast i razvoj [4,7].

Auksini, giberelini, citokinini, abscisinska kiselina, etilen i brasinosteroidi su biljni hormoni koji imaju glavnu ulogu u razvoju biljke [7]. Auksine proizvode mnogi predstavnici rodova *Azospirillum*, *Bacillus*, *Paenibacillus* i *Pseudomonas*. Auksini utiču na povećanje mase korena i dužine korena, razvoj bočnih korenova sa povećanim brojem korenskih dlaka, čime utiču na poboljšanje usvajanja hranljivih materija iz podloge, stimulišu izduživanje ćelija, imbibiciju, inhibiraju ili odlažu odbacivanje listova, iniciraju cvetanje i plodonošenje [42]. Giberelini (prvenstveno giberelinska kiselina, GA) su fitohormoni koji utiču na biljnu morfologiju, izduživanje biljnih tkiva i pospešuju klijavost semena. Gibereline sintetišu neki sojevi *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* i *Rhizobium* [43]. Citokinini su klasa biljnih hormona koji pospešuju deobu ćelija, podstiču grananje i prekidaju dormanciju pupoljaka, utiču na rast korena i stabla, nodulaciju kod leguminoza, skladištenje hlorofila i odlažu starenje [1,7]. PGP sojevi iz rodova *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Bacillus* i *Pseudomonas* imaju sposobnost produkcije ovih hormona. Etilen je jedini gasoviti fitohormon. Njegova biosinteza izazvana je fizičkim ili hemijskim razaranjem biljnih tkiva. Prekursor u sintezi etilena je 1-aminociklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminaza, enzim koji razgrađuje ACC i tako omogućava sintezu etilena. Mikroorganizmi iz rodova *Burkholderia*, *Paenibacillus* i *Bacillus* sintetišu etilen čija sekrecija osim na rast biljke utiče i na ispoljavanje biokontrolnog svojstva [44]. Etilen ima značajnu ulogu u odgovoru biljke na stres, a pored pozitivnog uticaja na biljke, može izazvati inhibiciju rasta korena.

## 2.2.2 Indirektni mehanizmi stimulacije biljnog rasta

Indirektni mehanizmi stimulacije biljnog rasta uglavnom se odnose na pospešivanje rasta biljke putem biološke kontrole [4]. Biološka kontrola, ili biokontrola, predstavlja upotrebu određenog organizma ili grupe organizama, kao i proizvoda njihovog metabolizma u suzbijanju brojnosti biljnih patogena, kao i sprečavanju negativnih uticaja ovih organizama na rast i razvoj biljke [45]. Organizmi koji ispoljavaju ovu sposobnost nazivaju se biokontrolni agensi, dok se komercijalni preparati na bazi ovih organizama nazivaju biopesticidi [3]. Biopesticidi mogu biti različitog porekla: bakterijski, poreklom od gljiva, virusa, protozoa ili biljnih metabolita i drugo. Ipak među biopesticidima preovlađuju oni poreklom od mikroorganizama, koji svojim širokim spektrom dejstva čine oko 30 % od ukupne proizvodnje [46].

Upotreba mikrobnih biokontrolnih agenasa i biopesticida u kontroli bolesti biljaka nudi dobru alternativu upotrebi sintetičkih hemikalija, odnosno hemijskih pesticida. Naime, biopesticidi imaju nekoliko prednosti u odnosu na hemijske pesticide. Prvenstveno, podležu bržoj razgradnji u životnoj sredini i uopšteno su manje toksični za druge nepatogene organizme [46]. Takođe, način na koji deluju uglavnom se razlikuje od načina delovanja konvencionalnih pesticida, što ukazuje na njihov potencijal u smanjivanju i sprečavanju pojave rezistentnosti kod patogena, kao i mogućnost njihove upotrebe zajedno sa drugim pesticidima. Prednost se takođe ogleda u tome što biokontrolni mikroorganizmi često zadržavaju aktivnost dugi period vremena, a kako su jedinjenja koja produkuju obično u direktnom kontaktu ili veoma blizu ciljanog organizma, samo male količine su potrebne da ispolje potpunu efikasnost [3].

Mehanizmi biokontrole su raznovrsni, a biokontrolnu sposobnost mikroorganizmi mogu ispoljavati kroz bilo koji od mehanizama, koji se pritom ne moraju međusobno isključivati, a često ih istovremeno može ispoljavati jedan organizam [5].

### 2.2.2.1 Kompeticija za prostor i hranljive materije

Ispoljavanjem kompetitivne prednosti u odnosu na patogene, odnosno takmičenjem za dostupne hranljive materije i prostor, biokontrolni agensi indirektno stimulišu rast biljaka. Mikroorganizmi koji mogu brzo kolonizovati koren biljke, zauzimajući slobodne niše, na ovaj način fizički onemogućavaju uspostavljanje i razvoj patogena. Takođe, biokontrolni agensi mogu formirati biofilme na površini korena biljke, što može imati važnu ulogu u smanjenju osetljivosti biljke na patogene [5]. Literaturni podaci pokazuju da su neki sojevi roda *Bacillus*, sa sposobnošću stvaranja egzopolisaharidnih biofilmova, uticali na smanjenje infekcije biljnim patogenima kao što su: *Bothrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*, *Colleotrichum gleosporoides*, *Fusarium* spp., kod različitih kultivara [47–49].

Kompeticija za hranljive materije, dešava se kada biokontrolni mikroorganizmi efikasnijim iskorišćavanjem hranljivih materija i smanjivanjem njihove dostupnosti patogenima, onemogućavaju njihov rast i razvoj. Pretpostavlja se da je kompeticija za ugljenik, odgovorna za dobro poznat fenomen fungistaze, koju karakteriše inhibicija germinacije spora gljiva u zemljištu [50]. Biokontrola se može uspostaviti i kroz kompeticiju za neophodne mikroelemente. Gvožđe je neophodno za rast većine živih organizama, a njegov nedostatak u dostupnom obliku u staništu predstavlja uslov za kompeticiju. Neke PGP bakterije sposobne su da produkuju siderofore, Fe(III)-specifične proteinske ligande male molekulske mase, koji služe ovim organizmima za efikasno usvajanje gvožđa iz okolne sredine. Siderofore rastvaraju nerastvorne oblike gvožđa koje onda biva transportovano u bakterijsku ćeliju posredstvom specifičnih receptora. Smatra se da siderofore koje proizvode biokontrolni agensi pokazuju veći afinitet za usvajanje gvožđa od biljnih patogena, što vodi do značajnog smanjenja dostupnog Fe i nemogućnosti razvoja patogena u rizosferi [4].

### 2.2.2.2 Antibioza

Antibioza predstavlja jedan od najčešćih mehanizama biokontrole. Naime, mnoge bakterije imaju sposobnost proizvodnje najrazličitijih sekundarnih metabolita, najčešće jedinjenja male molekulske mase, koji mogu ispoljiti antimikrobno, antifungalno, odnosno insekticidno dejstvo, prema brojnim biljnim patogenima. Opseg delovanja ovih jedinjenja je uglavnom veoma širok, a često i preklapajući [51]. Pored velike raznovrsnosti mikroorganizama koji se upotrebljavaju kao biokontrolni agensi, vrste roda *Bacillus* prepoznate su kao glavni nosioci ovog svojstva [5,45]. Većina mikrobnih biopesticida potiče od zemljišnih mikroorganizama, od čega polovinu čine preparati poreklom od vrsta iz roda *Bacillus*. Među njima, preparati na bazi ćelija ili metabolita vrste *B. thuringiensis*, čine 90 % od ukupne proizvodnje [3]. Rod *Bacillus* prisutan je u svim nišama životne sredine, a zbog velikog genetičkog diverziteta, velikog broja literaturnih podataka, GRAS statusa i sposobnosti preživljavanja u jako nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine, formiranjem otpornih endospora, vrste ovog roda smatraju se izrazito pogodnim kandidatima za pripremu preparata za biološku kontrolu [3,5,6]. Sposobnost formiranja otpornih spora, takođe čini ove organizme pogodnim kandidatima za industrijsku proizvodnju, jer omogućava jednostavnu pripremu formulacija sa produženim rokom trajanja kojima je lako rukovati [46]. Vrste kao što su: *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, prepoznati su kao veoma efikasni proizvođači antimikrobnih jedinjenja. U prilog ovome govori činjenica da je prosečno 4-5 % od celokupnog genoma vrste *B. subtilis* odgovorno za sintezu strukturno različitih antimikrobnih komponenti [51], a pokazano je da je kod nekih sojeva *B. amyloliquefaciens* za produkciju antibiotika i siderofora odgovorno približno 8,5 % genoma [52]. Nedavno je utvrđeno da je više od 10 % genoma nekih sojeva vrste *B. velezensis* odgovorno za biosintezu antibiotika i antimikotika [53]. Veliki broj istraživanja potvrđuje ogroman potencijal tih vrsta u kontrolisanju najrazličitijih bolesti biljaka [3,5].

Među jedinjenjima sa antimikrobnim, odnosno antifungalnim dejstvom koje proizvode PGP bakterije, naročito *Bacillus* vrste, izdvajaju se lipopeptidi (LP) iz grupe: iturina, fengicina i surfaktina [3,54]. Lipopeptidi predstavljaju raznovrsnu grupu neribozomalno sintetisanih sekundarnih metabolita bakterija, koji su privukli veliku pažnju istraživača tokom godina upravo zbog svog snažnog antagonističkog dejstva prema velikom broju biljnih patogena [52,55–57]. Za razliku od drugih proteina, koji se sintetišu prevođenjem informacione ribonukleinske kiseline (iRNK), odnosno zavisne su od mašinerije ribozoma, lipopeptide sintetišu specifični enzimski kompleksi, neribozomalne peptid-sintetaze (NRPSs) [58]. Ovi biosintetski sistemi, sastavljeni od modularno organizovanih katalitičkih domena, katalizuju sve neophodne reakcije u biosintezi peptida i odgovorni su za nastanak najraznovrsnijih grupa lipopeptida zavisno od tipa i sekvence aminokiselinskih ostataka, prirode i tipa ciklizacije peptida, dužine i grananja masno-kiselinskog ostatka i drugo [51,54,55]. Bakterijski LP su najčešće ciklični sa kompleksnim cikličnim strukturama, mada linearni i granati neribozomalni peptidi nisu neuobičajeni [58]. LP su amfifilna jedinjenja koja se sastoje od hidrofилne peptidne petlje povezane hidrofobnim lancem masnih kiselina čija dužina može varirati u zavisnosti od tipa lipopeptida [59]. Ova strukturna karakteristika omogućava im kontakt i interakciju sa lipidnim ćelijskim membranama, utičući na njihovu propustljivost, na čemu se i zasniva njihov antimikrobni i antifungalni potencijal [55]. Naime, u kontaktu sa lipopeptidnim jedinjenjima, najčešće iturinom i fengicinom, dolazi do perturbacije ćelijske membrane patogena i formiranja jono-propustljivih kanala, ili narušavanja i razgradnje membrane pod dejstvom surfaktina, što dovodi do oštećenja ćelije, curenja citoplazme i na kraju ćelijske smrti [56,60]. Lipopeptidi takođe mogu uticati i na aktivaciju imunog odgovora biljke, ili obrazovanje biofilmova, indirektno ispoljavajući antagonističko dejstvo [54].

Romero i saradnici [55] pokazali su dejstvo iturinskih i fengicinskih antibiotika iz četiri soja *B. subtilis* u supresiji pepelnice, kod familije *Cucurbitaceae*, koju uzrokuje *Podospaera fusca*. Drugi autori su ispitivali sposobnost određenih sojeva *B. amyloliquefaciens* izolovanih iz blatnih rečnih nanosa u supresiji velikog broja patogenih gljiva, izazivača raznih oboljenja kod biljaka, uključujući pepelnicu, belu kupusnjaču, sivu buđ i mnoge druge [56].

Proizvodnja isparljivih organskih jedinjenja (VOCs, engl.-*Volatile Organic Compounds*) takođe doprinosi biološkoj kontroli, odnosno indirektno stimuliše rast biljaka. Pored predstavnika vrsta roda *Bacillus*, među antagonistima koji proizvode ova jedinjenja najzastupljenije su bakterije iz roda *Pseudomonas* kao i neki predstavnici plesni roda *Trichoderma* [4]. Različiti literaturni podaci potvrđuju snažno antagonističko dejstvo ovih supstanci prema biljnim patogenima [61,62].

### 2.2.2.3 Imunizacija biljke

Još jedan vid indirektno stimulacije biljnog rasta jeste indukcija imunog odgovora biljke. Biljke poseduju različite mehanizme kojima preživljavaju stres. Jedan od vidova aktivne otpornosti je indukovana otpornost, koja predstavlja fiziološko stanje povećane odbrambene sposobnosti biljke i može biti izazvana različitim biotičkim (prisustvo patogena) ili abiotičkim (sredinskim) faktorima [4,63]. Sistemska stečena otpornost ili SAR (engl.-*Systemic Acquired Resistance*) se ispoljava kada je biljka direktno u kontaktu sa organizmom koji je parazitira ili se hrani njenim delovima. U tom slučaju dolazi do akumulacije salicilne kiseline, kao signalnog molekula i povećane sinteze PR (engl.-*Pathogenicity Related*) proteina. Drugi tip je indukovana sistemska rezistencija ili ISR (engl.-*Induced Systemic Resistance*). Naime, PGP bakterije koje se nalaze u zemljištu kao i produkti njihovog metabolizma sposobne su da izazovu imuni odgovor biljke, s tim da u ovom slučaju ne dolazi do sinteze PR proteina, već je proces regulisan nekim biljnim hormonima (jasmonska kiselina, etilen) i ne zahteva direktnu interakciju PGP soja i patogena [63]. Osim etilena i jasmonata, neki bakterijski metaboliti kao što su lipopolisaharidi, proteini, egzopolisaharidi (hitin, glukani), ciklični lipopeptidi (surfaktin) i salicilna kiselina mogu indukovati ISR [3,4,54]. Predstavnici rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* smatraju se najpotentnijim PGP bakterijama, izazivačima ISR kod biljaka [7].

### 2.2.2.4 Proizvodnja hidrolitičkih enzima

Za razliku od antibioze koja uključuje sintezu inhibitornih supstanci male molekulske mase, predatorstvo i/ili parazitizam predstavlja još jedan vid indirektno stimulacije biljnog rasta. Ovi mehanizmi zasnovani su na proizvodnji specifičnih enzima koji razaraju ćelijski zid patogena [5]. Ćelijski zid patogenih gljiva sačinjen je od mreže polisaharida, koje najvećim delom čini mešavina hitina i polimera glukana, manje količine manoproteina i drugih komponenti [64]. Mnogi PGP mikroorganizmi imaju sposobnost da vanćelijski proizvode enzime kao što su: fosfataze, celulaze, hitinaze, proteaze, lipaze,  $\beta$ -1,3-glukanaze i druge, koji mogu biti štetni za biljne patogene i značajno doprinose procesu biokontrole. Literaturni podaci potvrđuju efikasnost bakterijskih enzima u sprečavanju rasta nekih od najčešćih biljnih patogena kao što su: *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* i mnogi drugi [5,64,65].

Smatra se da enzimi koje sekretuju morski mikroorganizmi mogu imati niz prednosti za industrijsku primenu, u odnosu na iste enzime poreklom od zemljišnih predstavnika. Usled surovih uslova koji vladaju u morskoj sredini, a na koje su ovi mikroorganizmi adaptirani, smatra se da enzimi koje proizvode morski mikroorganizmi mogu biti duže stabilni, imati veću temperaturnu i pH stabilnost, kao i toleranciju na različite metale, što su sa stanovišta industrijske primene, svakako pogodne karakteristike [21]. Izolacija novih sojeva iz morskih staništa i ispitivanje njihovog potencijala da proizvode ova biološki aktivna jedinjenja, može biti od velikog interesa i značaja.

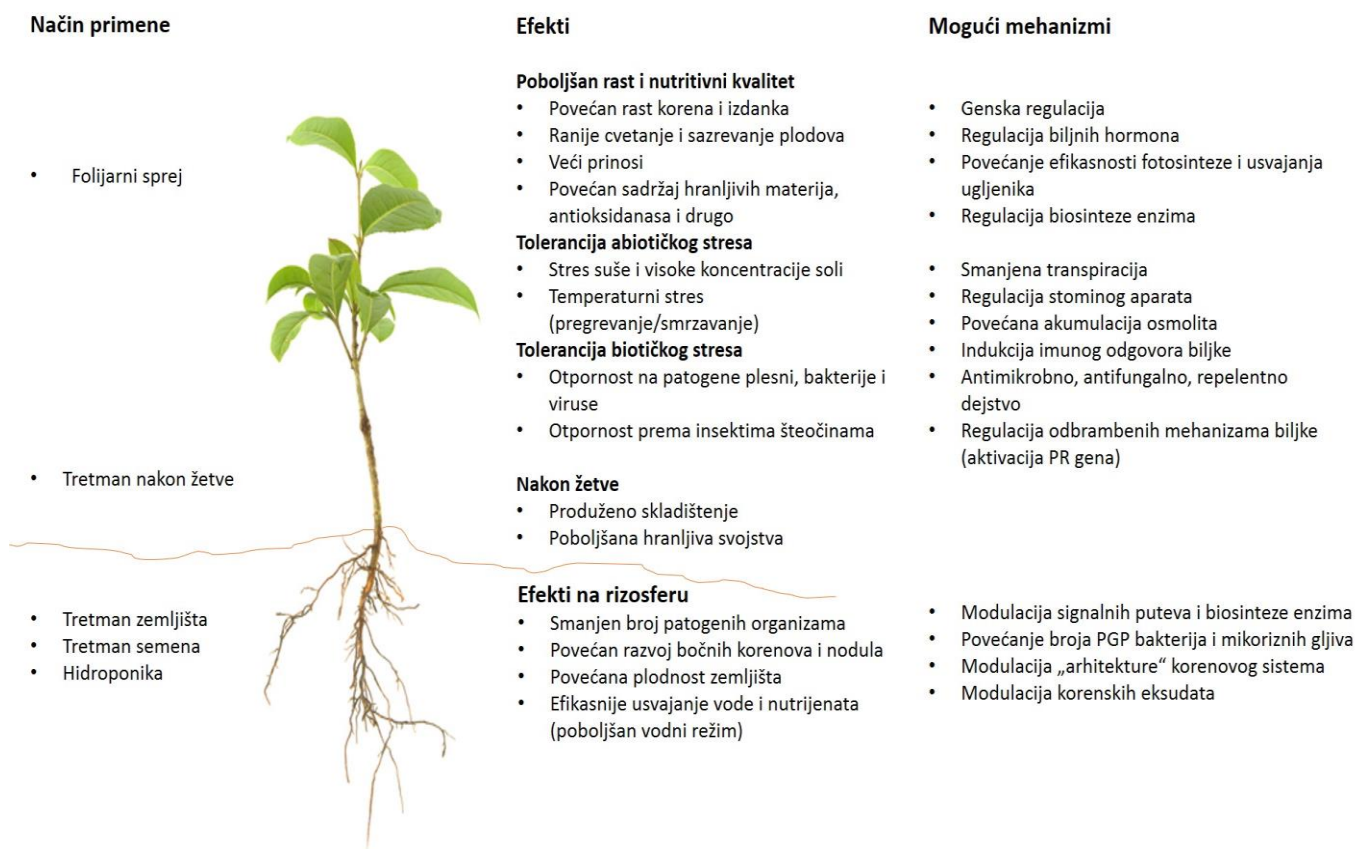
## 2.3 Polisaharidi iz morskih algi kao stimulatori biljnog rasta i mehanizmi njihovog delovanja

Morske alge, naročito makroalge ili morske trave, predstavljaju esencijalne članove morskih ekosistema, obezbeđujući skrovište i hranu raznovrsnom živom svetu mora, a takođe doprinose modifikacijama fizičko-hemijskih osobina morske vode. Biološka aktivnost morskih algi je već dugi niz godina predmet istraživanja različitih naučnih oblasti, a ovi morski organizmi danas nalaze primenu u prehrambenoj industriji, gde se upotrebljavaju kao hrana ili dodatak hrani ljudi i životinja, kao i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, gde predstavljaju bogate izvore bioaktivnih jedinjenja, ili se koriste kao specifični nosači za kontrolisano otpuštanje farmaceutika, nutraceutika i drugo

[66,67]. Zahvaljujući bogatom sadržaju minerala, organskih materija (polisaharida, aminokiselina, vitamina, peptida) i drugih makro- i mikronutrijenata, biotehnoški potencijal morskih algi prepoznat je i u oblasti agroindustrije, gde su ovi organizmi našli primenu kao biostimulatori i regulatori biljnog rasta, aditivi i regulatori kvaliteta zemljišta, fertilizatori, pesticidi i drugo [10,11,68]. Stepenn njihove upotrebe u poljoprivredi, godinama je određivan na osnovu dugogodišnjeg praktičnog iskustva samih agronoma i njihovih preporuka. Od 1950-ih godina, upotreba čitave biomase morskih algi generalno je zamenjena upotrebom ekstrakata dobijenih od različitih predstavnika ove grupe organizama [11]. Značajan broj istraživanja dokumentovao je stimulatívno dejstvo ekstrakata morskih algi na rast biljaka, ističući veliki potencijal njihove primene u agroindustriji, što je dovelo do toga da su ekstrakti morskih algi danas opšte prihvaćeni kao „biljni biostimulatori“ [10,11].

Približno 30-60 % suve mase morskih algi čine polisaharidi. Alginati, laminarani, fukoidani, prisutni su kod mrkih algi, dok se agar, karagenan i ulvan mogu naći kod crvenih, odnosno zelenih makroalgi [10]. Uopšteno, polisaharidi iz morskih algi su sposobni da izazovu niz fizioloških reakcija biljaka, čak i pri niskim koncentracijama, a širok spektar korisnih dejstava koje ispoljavaju utiču na: ranije klijanje semena, razvoj korenovog sistema, poboljšán rast i cvetanje, povećanje lisne površine i sadržaja hlorofila, povećán prinos i kvalitet plodova, kao i produženje roka trajanja nakon berbe [10,11,69–71]. Takođe, različiti polisaharidi iz morskih algi utiču i na povećánu otpornost biljaka na biotičke (prisustvo patogena) i abiotičke stresove (zaslanjenost staništa i ekstremne temperature) [72]. Uopšteno zbog mnogobrojnih korisnih svojstava polisaharidi iz morskih algi privlače sve više pažnje kao atraktívni i nov izvor za pripremu preparata za poboljšanje produktivnosti useva, koji su ekološki prihvatljivi i pogodni za primenu u organskoj poljoprivredi [10].

Polisaharidi iz morskih algi indirektno stimulišu rast biljaka prvenstveno povećánjem efikasnosti biljke da usvaja hranljive materije, ili poboljšávanjem teksture i vodnog režima zemljišta modifikóvanjem njegovih fizičkih, hemijskih i bioloških svojstava (slika 2.2).



**Slika 2.2.** Šematski prikaz efekata primene polisaharida iz morskih algi na fiziološki odgovor biljke i mogući mehanizmi delovanja (preuzeto i modifikóvano od [10])

### 2.3.1 Povećanje efikasnosti usvajanja hranljivih materija

Polisaharidi poreklom iz morskih algi stimulišu rast biljaka povećavajući efikasnost usvajanja neophodnih hranljivih materija, regulacijom specifičnih gena uključenih u bazalni metabolizam i ćelijsku deobu [73]. Literaturni podaci pokazuju da je tretman zemljišta ekstraktom na bazi polisaharida iz mrke alge *Ascophyllum nodosum* uticao na ekspresiju gena uključenih u transport azota i auksina, što je za posledicu imalo povećanje broja bočnih korenova kod biljke i intenzivnije usvajanje azota [74]. Takođe, pokazano je da primena ekstrakta mrkih algi u vidu folijarnog spreja dovodi do povećanog usvajanja bakra, gvožđa i kalcijuma kod vinove loze, zelene salate i kupusa [69], kao i usvajanja i skladištenja osnovnih makro i mikroelemenata kod povrtarskih kultura [75,76].

### 2.3.2 Regulacija hormonalnog statusa biljaka

Polisaharidi prirodno prisutni u ćelijskom zidu biljaka, deluju kao signalni molekuli koji podstiču produkciju fitohemikalija ključnih za rast i razvoj biljnih tkiva. Poznato je da je uticaj polisaharida na rast biljke sličan onom koji ispoljavaju biljni hormoni [77]. Dosadašnja istraživanja potvrđuju da su neki od fizioloških odgovora biljke, nakon primene komercijalnih preparata na bazi polisaharida iz morskih algi, istovetni efektu koji imaju biljni hormoni, stimulišući rast u manjim koncentracijama i inhibirajući ga u većim koncentracijama [10,78]. Pokazano je da primenom polisaharidnog ekstrakta *A. nodosum* dolazi do indukovanja enzima amilaze kod semena ječma, nezavisno od prisustva hormona giberelina, koji inače ima ključnu ulogu u aktivaciji amilaze i ubrzavanju procesa klijanja [79]. U drugom istraživanju, pokazano je da je biostimulacioni efekat na biljku, ostvaren primenom polisaharidnog ekstrakta morskih algi, sličan onom koji indukuju biljni hormoni citokinini [80].

### 2.3.3 Uticaj na zemljište i zemljišne mikroorganizme

Pored regulacije hormonalnog statusa biljke, polisaharidi iz morskih algi utiču i na fizičko-hemijska svojstva zemljišta, a takođe predstavljaju specifične supstrate za rast korisnih zemljišnih mikroorganizama, čime indirektno stimulišu rast biljaka. Mrke alge bogate su poliuronatima čija gelirajuća svojstva, odnosno sposobnost formiranja polimernih mreža, velike molekulske mase, utiče na opšte stanje zemljišta, poboljšavajući pre svega njegov kapacitet zadržavanja vode, što za posledicu ima stimulaciju rasta korenovog sistema, kao i aktivnosti rizosfernih mikroorganizama [11]. Literaturni podaci pokazuju da alginati ekstrahovani iz mrkih algi utiču i na obrazovanje mikorize, specifičnog simbiotskog odnosa koji se ostvaruje između korenovog sistema biljke i gljiva, a ima važnu ulogu u ishrani biljke, kao i regulaciji bioloških i hemijskih svojstava zemljišta [32]. Alginati mogu značajno stimulisati rast i uticati na izduženje hifa mikoriznih (simbiotskih) gljiva, što za posledicu ima povećano usvajanje hranljivih materija i poboljšan rast biljke [81]. Takođe, u prisustvu polisaharidnog ekstrakta alge *A. nodosum*, zabeležen je povećan broj azotofiksirajućih nodula kod mikoriznih rizobija, kao i aktivacija ekspresije gena koji učestvuju u komunikaciji rizobija sa biljkom i uspostavljanju same mikorize [69]. Polisaharidi poreklom iz crvenih i zelenih algi (agar, karagenan i ulvan), takođe imaju značajnu ulogu u obrazovanju mikoriza kod viših biljaka. Pokazano je da njihova primena stimuliše rast i kolonizaciju korena od strane korisnih rizosfernih gljiva i bakterija [82]. Takođe, polisaharidi iz morskih algi, stimulišu rast i aktivnost antagonističkih (biokontrolnih) zemljišnih mikroorganizama, čime indirektno ispoljavaju biokontrolnu aktivnost [83].

### 2.3.4 Aktivacija imunog odgovora biljke tokom patogeneze

Polisaharidi i oligosaharidi poreklom iz morskih algi, posreduju u aktiviranju odbrambenih mehanizama biljke. Naime, ovi polisaharidi učestvuju u ranoj signalizaciji tokom procesa patogeneze, aktivirajući proizvodnju sekundarnih metabolita i mobilizaciju signalnih molekula kod same biljke. Veliki broj istraživača prepoznao je ovu značajnu ulogu polisaharida morskih algi i dokumentovao

njihovu efikasnost u stimulaciji imunog odgovora kod duvana, paradajza, pšenice, pirinča, spanaća i drugih biljaka [17,84,85]. Pokazano je takođe, da nakon tretmana semena polisaharidima iz morskih algi, dolazi do aktivacije enzima peroksidaza (POD) i fenilalanin amonijum lijaza (PAL), produkcije fitoaleksina, kao i povećane sekrecije fenolnih jedinjenja, kao odgovor na prisustvo patogena [17,85]. Povećanje aktivnosti enzima POD, PAL, kao i sadržaja ukupnih polifenola u tretiranim biljkama, pripisuje se aktivaciji mehanizama sistemski stečene rezistencije (SAR) kod biljke [11].

### **2.3.5 Tolerancija stresa**

Primena polisaharida poreklom iz morskih algi, takođe se pokazala uspešna u ublažavanju negativnih efekata abiotičkog stresa kod velikog broja biljaka [68]. Polisaharidni ekstrakti iz različitih mrkih algi poseduju ulogu osmolita i predstavljaju zaštitne komponente u odgovoru biljke na stresore iz spoljašnje sredine. Pored ublažavanja negativnih efekata stresora iz spoljašnje sredine, polisaharidi iz morskih algi ispoljavaju i dodatno stimulatorno dejstvo na rast biljaka. Različiti autori beleže povećan stepen tolerancije različitih biljnih kultura na stres suše, zaslanjenosti i stres niskih temperatura, nakon upotrebe polisaharidnih ekstrakata poreklom iz morskih algi, a ujedno i poboljšan rast u uslovima stresa [9,86].

## **2.4 Polimerni filmovi i prevlake u agroindustriji**

Odgovor biljke na tretman ekstraktima polisaharida iz morskih algi može znatno varirati, i u nekim slučajevima ekstrakti mogu ispoljiti i negativne efekte na rast biljke. Doziranje, učestalost tretmana i vreme tretmana treba da varira u zavisnosti od vrste, čak i sorte biljke, geografske lokacije, sezone i lokalnih klimatskih uslova [11]. U zavisnosti od načina primene i krajnje namene, formulacije na bazi polisaharida iz morskih algi mogu se pripremati tako da zadovolje specifične zahteve određenih biljnih kultura. Uopšteno, biostimulatori se uglavnom primenjuju u obliku rastvora za prskanje, direktno primenom na seme ili druge delove biljke, što zahteva puno rada i upotrebu velike količine vode [9]. Adekvatniji pristup u ovom smislu mogao bi uključiti upotrebu prevlaka na bazi hidrogelova, odnosno filmova sa biostimulatornim dejstvom na rast biljke.

Rast biljaka određen je specifičnim mikroklimatskim uslovima supstrata u kome biljka raste. Na poljoprivrednim površinama, povoljni mikroklimatski uslovi mogu se veštački uspostaviti upotrebom malčeva, uključujući i plastične pokrivke, odnosno filmove. Upotreba plastičnih prevlaka i filmova na površini zemljišta, odnosno malčiranje kao agrotehnička mera, datira od 50-ih godina dvadesetog veka [87]. I u savremenoj poljoprivredi, filmovi i prevlake za malčiranje intenzivno se upotrebljavaju u cilju sprečavanja pojave korova, uspostavljanja povoljnog termičkog i vodnog režima zemljišta, sprečavanja oticanja nutrijenata sa poljoprivrednih površina, kao i zaštite biljaka od patogena [88]. Dugogodišnja poljoprivredna praksa upotrebe filmova za malčiranje, zasniva se uglavnom na upotrebi različitih filmova poreklom od sintetičkih materijala kao što su: polietilen (PE), polivinil-hlorid (PVC), polibutilen, kopolimer etilena sa vinil-acetatom (EVA) i drugi, zbog njihovih dobrih mehaničkih, optičkih i termičkih svojstava, jednostavnosti procesuiranja i postavljanja, kao i niske cene [88,89]. Međutim, nakon vegetacijske sezone, isluženi plastični filmovi, odnosno njihovi ostaci, koje odlikuju izuzetno niske stope razgradnje, moraju se ukloniti sa poljoprivrednih površina, što je u većini slučajeva jako otežano, skupo i vremenski zahtevno [90]. Najčešća praksa poljoprivrednika uključuje njihovo odlaganje na deponije, zakopavanje u zemljište ili spaljivanje, čime dolazi do oslobađanja štetnih materija koje mogu uzrokovati ozbiljna zagađenja životne sredine, a potencijalno predstavljati i opasnost za ljudsko zdravlje [89,91]. U cilju prevazilaženja problema koji se tiču prekomerne upotrebe i odlaganja otpadnih plastičnih filmova, poslednjih godina razvoj biorazgradivih materijala iz obnovljivih izvora je u sve većoj ekspanziji i uključuje: okso-razgradive filmove [26], papirne filmove [92] i biorazgradive filmove poreklom od prirodnih polimera [93,94].

Adekvatnost upotrebe različitih polimernih materijala u agroindustriji određena je najviše njihovim optičkim, mehaničkim i barijernim svojstvima [91].



#### 2.4.1 Optička svojstva polimernih filmova namenjenih upotrebi u agroindustriji

Stepen propuštanja svetlosti kroz materijale namenjene upotrebi u agroindustriji jedna je od ključnih karakteristika koja će odrediti potencijalnu korist samog materijala. Kvalitet sunčevog zračenja koji će proći kroz film u velikoj meri će uticati na rast i razvoj biljaka, a samo mala razlika u propuštenom zračenju može imati ogroman efekat na rast useva [95].

Plastični filmovi za malčiranje svojim fizičkim karakteristikama, kontrolišu stepen sunčevog zračenja koji dospeva do zemljišta, utičući na njegov termički i vodni režim [96]. Transparentni filmovi omogućavaju prolazak sunčevog zračenja i indukuju zagrevanje tla ispod filma, pri čemu oslobođena toplota biva „zarobljena” usled pojave efekta „staklene bašte”. Ovi filmovi omogućavaju difuziju toplote do dubljih slojeva zemljišta, kao i smanjenje temperaturnih amplituda u rizosfernoj zoni, što dalje može uticati na pospešivanje fizioloških procesa same biljke, povećanje produktivnosti, brži razvoj useva i raniju žetvu [88]. Transparentni filmovi se upotrebljavaju i za delimičnu sterilizaciju zemljišta nakon berbe. Ova tehnika, česta u poljoprivrednoj praksi, uključuje pokrivanje nezasejanog zemljišta transparentnim filmom, u trajanju od 4 do 6 nedelja u najtoplijem periodu godine, čime se omogućava zagrevanje viših slojeva zemljišta do temperatura koje su letalne za veliki broj zemljišnih patogena [97,98]. Oblast spektra sunčevog zračenja talasnih dužina između 400 i 700 nm, obuhvata takozvano fotosintetički aktivno zračenje ili PAR zračenje (engl.-*Photosynthetically Active Radiation*), koje je ključno za obavljanje fotosinteze, pa transparentni filmovi koji dozvoljavaju potpuno propuštanje u ovoj oblasti, pozitivno utiču na produktivnost biljaka [89,96]. Međutim, transparentni filmovi utiču i na povećanu pojavu korova, upravo zbog sposobnosti propuštanja svetlosti PAR regiona. U većini slučajeva, poželjne karakteristike koje filmovi sa namenom malčiranja zemljišta treba da poseduju, isključuju jedna drugu, pa do sada nije razvijen ni jedan materijal koji bi sam zadovoljio sve zahteve.

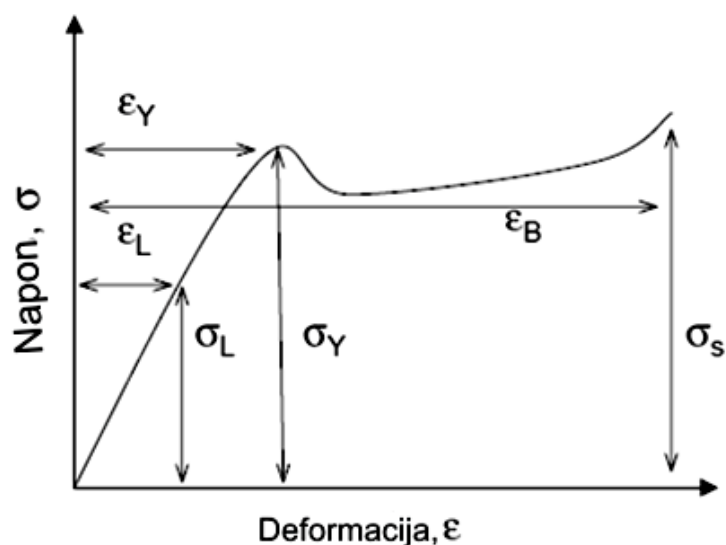
Regulacijom dostupne svetlosti i spektralne raspodele, filmovi različitih boja, mogu biti dizajnirani tako, da svojom fotoselektivnošću mogu uticati na: morfogenezne procese kod biljke i uticati na njen rast i prinose; odbijati insekte i druge patogene, i uticati na temperaturu i vlagu zemljišta. Selekcijom propuštene svetlosti u tačno određenom opsegu talasnih dužina sunčevog spektra filmovi ostvaruju specifičan efekat na biljke [94,95]. Tamni filmovi od polietilena male gustine (LDPE, engl.-*Low Density Polyethylen*) su najčešće upotrebljavani u agroindustriji za sprečavanje razvoja korova, blokirajući prolazak svetlosti u okviru PAR regiona, a dodatno korisno svojstvo ostvaruju i kroz zagrevanje tla ispod filma [89,91]. Plavo-ljubičasta sunčeva svetlost ima stimulatívni efekat na stomin aparat kod biljaka, a ista svetlost utiče i na razvoj nekih gljiva, dok je crveni deo spektra od ključne važnosti za osnovne morfogenezne procese kod biljaka [95]. Slabo izračivanje sa površine listova, dovodi do izduživanja izdanaka i listova, dok istovremeno utiče na smanjeno plodonosenje i cvetanje biljaka, kao i kvalitet polena [91]. Optička svojstva filmova za malčiranje utiču i na pojavu štetočina i razvoj bolesti kod različitih gajenih kultura. Svetlost ultraljubičastog (UV) dela spektra neophodna je za sporulaciju nekih biljnih plesni, kao i orijentaciju i aktivnost insekata, pa filmovi koji blokiraju ovu svetlost mogu imati koristan efekat u sprečavanju pojave ovih štetnih organizama [98].

#### 2.4.2 Mehanička svojstva polimernih filmova namenjenih upotrebi u agroindustriji

Mehanička svojstva filmova sa namenom upotrebe u agroindustriji od ključnog su značaja, jer direktno određuju njihovu trajnost i funkcionalnost. Tokom postavljanja, kao i tokom njihove upotrebe, a takođe i pod dejstvom različitih klimatskih uslova, filmovi za malčiranje trpe različite mehaničke stresove, i stoga bi trebalo da zadovolje određene zahteve koji se tiču pre svega njihove jačine i fleksibilnosti [89]. Jačina i fleksibilnost filmova, kao najvažnije osobine filmova za malčiranje zemljišta, i uopšteno upotrebu na polju, uobičajeno se procenjuju određivanjem zatezne čvrstoće i izduženja pri kidanju u testu opterećenja, korišćenjem univerzalne mašine za istezanje, tzv. kidalice, koja mereći silu istezanja i pomeraj, daje podatak o primenjenom naponu i izduženju ispitivanog materijala.



Zatezna čvrstoća i izduženje pri kidanju određuju se sa krive napon-deformacija dobijene u testu opterećenja, prema standardnoj metodi Američkog društva za ispitivanje i materijale (American Society for Testing and Materials – ASTM). Uobičajen izgled krive napon-deformacija za hidrokolidne filmove prikazan je na slici 2.3.



**Slika 2.3.** Izgled krive napon – deformacija za hidrokolidne filmove [88]

Zatezna čvrstoća ( $\sigma$ ) se izražava u MPa, a predstavlja količnik maksimalne sile koju je potrebno primeniti pre kidanja filma ( $\sigma_Y$ ) i početne površine poprečnog preseka filma. Izduženje pri kidanju ( $\epsilon$ ) mera je fleksibilnosti filma i predstavlja se kao procenat promene početne dužine uzorka filma pre kidanja ( $\epsilon_B$ ). Još jedna veličina, koja predstavlja meru rigidnosti filmove, odnosno Jungov modul elastičnosti  $Y = \sigma_L / \epsilon_L$ , može se odrediti sa nagiba krive.

Osnovni zahtevi o jačini i fleksibilnosti konvencionalnih plastičnih filmove za potrebe agroindustrije, odnosno malčiranja zemljišta regulisane su propisima evropskog standarda EN 13655 [99], koji se primenjuje za različite tipove plastičnih filmove debljine od 10-250  $\mu\text{m}$ . Uopšteno za konvencionalne plastične filmove (PE, LDPE, HDPE, PVC) debljine u opsegu od 10-50  $\mu\text{m}$ , zahtevi za vrednosti zatezne čvrstoće kreću se od 15-25 MPa, dok su minimalne vrednosti izduženja pri kidanju propisane EN 13655 između 180-300 %. Standardne metode i standardni zahtevi koji se tiču biorazgradivih filmove kao i prevlaka formiranih sprej-tehnikama, nisu još uvek dostupni. Utvrđivanje mehaničkih svojstava ovih materijala određuje se formiranjem filmove raspršivanjem u kalupe i testiranjem formiranih filmove standardnim metodama uz pomoć kidalice [89].

### 2.4.3 Barijerna svojstva polimernih filmove namenjenih upotrebi u agroindustriji

Barijerna svojstva filmove i prevlaka namenjenih upotrebi u agroindustriji, odnose se pre svega na mogućnost smanjivanja ili sprečavanja stepena isparavanja vode sa površine zemljišta, kao i kontrole oticanja hranljivih materija sa poljoprivrednih površina. Upotrebom malčirajućih filmove u ovom smislu se značajno mogu smanjiti zahtevi za navodnjavanjem, kao i ublažiti različiti fiziološki poremećaji kod biljaka, vezani za sadržaj vode ili hranljivih materija [100,101]. Uopšteno, nakon pokrivanja zemljišta filmom, stepen prenosa vlage između zemljišta i okolne sredine trebalo bi da bude minimalan. Smanjenjem stepena isparavanja vode, filmove za malčiranje utiču na stvaranje povoljnog vodnog režima zemljišta, uspostavljanjem odgovarajućih uslova vlage neophodne za rast biljke. Plastični malčevi mogu očuvati visok stepen vlažnosti i povećati efikasnost iskorišćenja vode kod velikog broja kultivara. Njihova efikasnost u velikoj meri zavisi ne samo od tipa materijala, već i od tipa zemljišta, kultivara i načina navodnjavanja. Većina autora beleži pozitivan uticaj malčeva na povećanje efikasnosti iskorišćenja vode, u poređenju sa nepokrivenim zemljištem [102,103].

Povećanje vlažnosti zemljišta putem malčiranja pripisuje se izrazitoj nepropusnosti plastičnih filmova za molekule vodene pare. Jednostavno, služeći kao fizička prepreka vodenoj pari, čak i u uslovima sredine koju karakteriše povećan stepen isparavanja, zemljište prekriveno malčem će zadržati vlažnost.

#### **2.4.4 Prirodni polimeri u agroindustriji – polisaharidni filmovi**

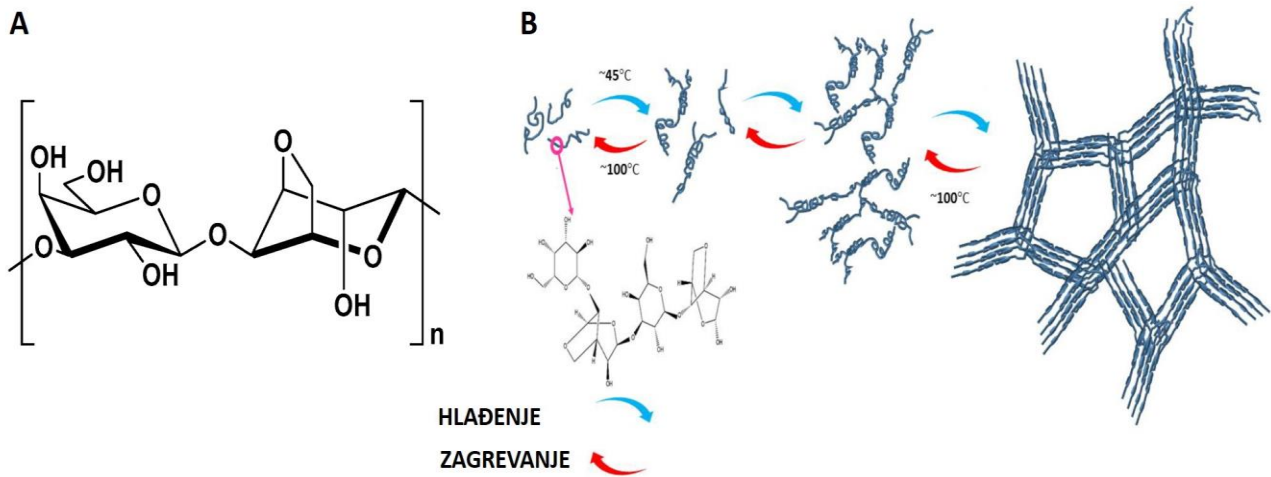
Od prirodnih polimera sa odličnim kapacitetom formiranja filmova, a koji poseduju poželjna svojstva kao što su: biokompatibilnost, biorazgradivost i netoksičnost, izdvajaju se polisaharidi. Različiti filmovi na bazi skroba, celuloze, hitina i hitozana, glukomanana i drugih, mogu se dizajnirati tako da poseduju fizičke karakteristike slične plastičnim filmovima, a sa dodatnim povoljnim svojstvom potpune razgradnje i potencijalnim pozitivnim uticajem na rast biljaka [96,104–107].

Inovativni pristup u formiranju malčeva, uključuje formiranje tankih prevlaka odnosno filmova, upotrebom sprej tehnologije. Naime, tanke zaštitne membrane, odnosno prevlake, mogu se formirati direktnim raspršivanjem vodenih, ili vodeno-alkoholnih rastvora polisaharida na površini zemljišta. Ovakve prevlake rezultat su formiranja kompleksa polielektrolita, interakcijom anjonskih funkcionalnih grupa polielektrolita sa metalnim katjonima, ili reakcije na interfaci vodenih rastvora polielektrolita sa funkcionalnim grupama suprotnog naelektrisanja [9]. Utvrđeno je da se polisaharidni hidrogelovi, odnosno filmovi dobro zadržavaju na površinama kao što su tlo i listovi biljaka [94,108]. Dodatkom određenih komponenti u polisaharidne filmogene rastvore, na primer celuloznih vlakana, pšeničnih mekinja, čađi, kao i prirodnih plastifikatora (glicerola i poliglicerola) mogu se modifikovati mehaničke i optičke karakteristike i na kraju poboljšati malčirajuća svojstva ovih prevlaka [88]. Takođe, dodatkom različitih bioaktivnih komponenti mogu se funkcionalizovati tako da ostvare ne samo biostimulacioni efekat, već mogu imati ulogu bio-herbicida, insekticida ili fungicida koji se inače sprej-tehnologijom nanose na tlo, semena, ili biljku u standardnoj poljoprivrednoj praksi.

U okviru grupe polisaharida poreklom iz morskih algi, od posebnog interesa su agar i alginat, pre svega zbog njihovih sposobnosti formiranja hidrogelova, odnosno filmova, kao i zbog dokumentovanog pozitivnog uticaja koje ovi polimeri imaju na rast i razvoj biljaka [10,17,88].

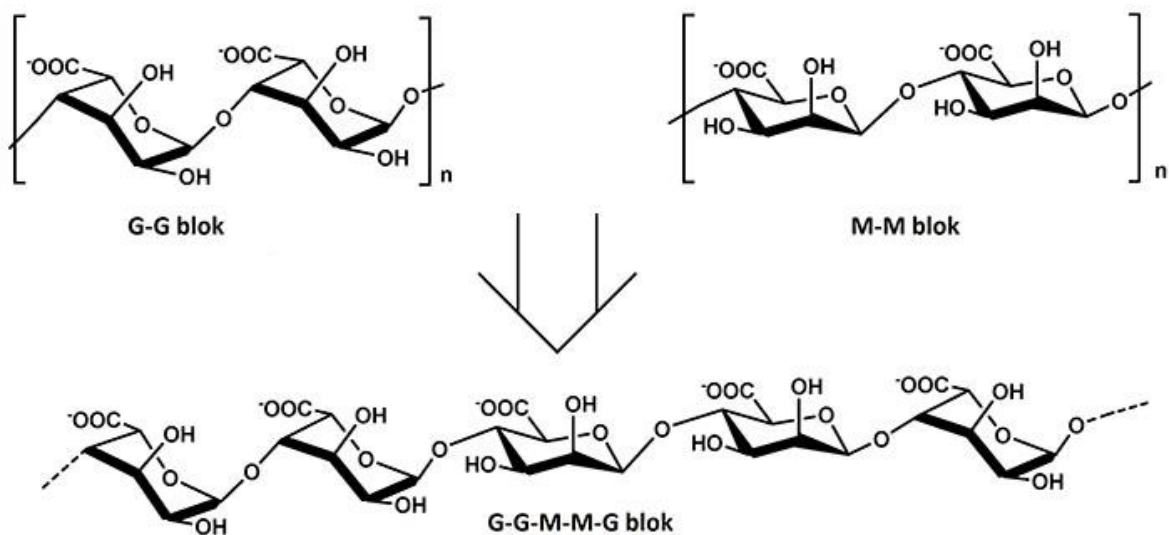
#### **2.4.5 Agar i alginat - strukturna svojstva i mogućnosti funkcionalizacije za pripremu filmova namenjenih upotrebi u agroindustriji**

Agar pripada klasi galaktana, polisaharidima ekstrahovanim iz tela crvenih algi (najčešće iz familije *Gelidiaceae*) i ima funkciju održavanja strukturnog integriteta tela alge, analogno celulozi kod zemljišnih biljaka. Generalno, agari potiču od neutralnog polimera agaroze, koji ima veliku sposobnost formiranja gelova, i agaropektina, sulfatovanog polisaharida slabih gelirajućih svojstava koji nakon prerade sirove biomase uglavnom biva uklonjen [109]. Agarozna, gelirajući deo agara, predstavlja linearni molekul sastavljen od ponavljajućih jedinica 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galaktoze i  $\beta$ -D galaktoze povezanih 1,3 i 1,4 glikozidnim vezama. Agar je nerastvorljiv u vodi na sobnoj temperaturi, dok na temperaturama između 85 i 100 °C dolazi do njegovog rastvaranja. Očvršćavanje, odnosno geliranje agara odvija se na temperaturama između 30 i 40 °C, i zasniva se na promeni neuređene konformacije, oblika jednostavne zavojnice koja postoji kada je agar u tečnom stanju, u rigidnu, uređenu strukturu dvostrukih zavojnica koje, formiranjem zona povezivanja i agregacijom sa daljim hlađenjem, grade trodimenzionalnu poroznu polimernu mrežu [110] (slika 2.4).



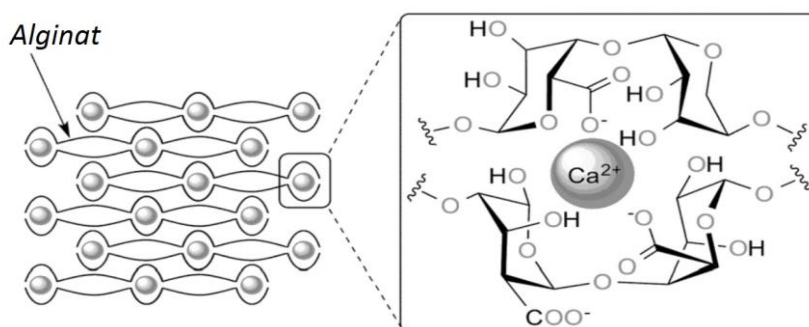
**Slika 2.4.** Hemijska struktura agara (A) i šematski prikaz mehanizma geliranja agara (B) (preuzeto i modifikovano od [110])

Alginati su polisaharidni polimeri zastupljeni u ćelijskom zidu mrkih morskih algi (familija *Phaeophyceae*) kao što su: *Ascophyllum* sp., *Laminaria* sp., *Fucus* sp., *Macrocystis* sp. i nekih vrsta roda *Ecklonia* [12,111]. U manjoj meri sintetišu ih neke bakterije iz roda *Azotobacter* i *Pseudomonas* u vidu egzopolisaharida [13]. Strukturno, alginati su linearni anjonski kopolimeri sastavljeni od dva tipa monomera:  $\beta$ -D-manuronske (M) i  $\alpha$ -L-guluronske (G) kiseline, povezane 1,4-glikozidnim vezama (slika 2.5). U zavisnosti od vrste algi, guluronski (G) i manuronski (M) monomeri mogu biti organizovani u vidu ponavljajućih homopolimernih (GG ili MM) ili heteropolimernih (GM ili MG) blokova unutar alginatnog lanca. Organizacija i odnos M-G blokova utiče na raznovrsnost hemijske strukture, pre svega u pogledu molekulske mase, kao i na fizičko-hemijske osobine alginata. Uopšteno, GG blokovi obezbeđuju rigidniju stukturu alginata, dok MM blokovi daju fleksibilnost [15,112].



**Slika 2.5.** Hemijska struktura alginata

Alginat je potpuno rastvorljiv u vodi, međutim u prisustvu dvovalentnih katjona, kao posledica jakih veza koje se obrazuju između  $\text{COO}^-$  grupe guluronata u alginatu i dvovalentnih katjona, dolazi do formiranja stabilne trodimenzionalne strukture i gelova ograničene rastvorljivosti u vodi, poznate kao „egg-box” struktura [112] (slika 2.6). Sam proces geliranja je kooperativan u kome je nakon vezivanja prvog jona, vezivanje svakog sledećeg sve povoljnije [15]. Gelirajuća svojstva alginata zavisice od njegove strukture, kao i od tipa dvovalentnih jona. Vezivanje dvovalentnih jona za G blokove alginata je favorizovano, a udeo G monomera, kao i molekulska masa će odrediti kako će blokovi monomera interagovati i rasporediti se unutar polimera, što će i uticati na fizička svojstva formiranih struktura [113].



**Slika 2.6.** Prikaz „egg-box” strukture kao posledice geliranja alginata dvovalentnim katjonima, na primeru jona  $\text{Ca}^{2+}$  (preuzeto i modifikovano od [113])

Industrijska primena agara i alginata zasniva se upravo na njihovoj sposobnosti formiranja hidrogelova, trodimenzionalnih hidrofilnih polimernih mreža. Formirani hidrogelovi zavisno od specifičnih fizičkih ili hemijskih povezivanja mogu usvajati velike količine vode bez rastvaranja. U agroindustriji, primenom na površini zemljišta, agar i alginat mogu uticati na zadržavanje vlažnosti zemljišta, poboljšanje njegove strukture, što dalje može uticati na bolju aeraciju i kapilarnu aktivnost zemljišnih pora. Krajnji rezultat njihove primene je razvijeniji korenov sistem biljaka, kao i stimulacija aktivnosti korisne zemljišne mikrobiote i pospešen rast biljke [10]. S obzirom da i agar i alginat potiču iz obnovljivih izvora, da su biorazgradivi i netoksični, izuzetno su interesantni i u održivoj poljoprivrednoj praksi [114]. Dejstvom mikroorganizama, mogu se lako razgraditi, a proizvode razgradnje, biljke mogu usvojiti čime se dodatno može pospešiti njihov rast [9,17]. Upotreba agara i alginata u agroindustriji u tom smislu odražava ekološki koncept korišćenja resursa.

Metodom izlivanja polimernog rastvora polisaharida uz naknadno otparavanje rastvarača, mogu se dobiti filmovi homogene strukture, i dobrih barijernih svojstava prema gasovima [112,115]. Međutim, širu industrijsku primenu agara i alginata ograničavaju njihova loša mehanička i barijerna svojstva u odnosu na vodenu paru, što je posledica hidrofilne prirode samih molekula. Takođe, s obzirom da su alginati potpuno rastvorljivi u vodi, kao takvi nisu pogodni za upotrebu u poljoprivredi kao filmovi ili prevlake za malčiranje zemljišta. Filmove na bazi alginata i agara odlikuje rigidna struktura, što je posledica međumolekulskih interakcija koje se ostvaruju između polimernih lanaca. Kako bi se povećala fleksibilnost i omogućilo lakše rukovanje, polimernim rastvorima se često dodaju plasifikatori (glicerol, poliglicerol, sorbitol i drugi) koji smanjuju interakcije između polimernih lanaca i na taj način povećavaju elastičnost struktura [116]. U zavisnosti od krajnje namene filmova na bazi ovih polisaharida, prirodna strukturalna i funkcionalna svojstva mogu biti poboljšana različitim modifikacijama [117].

Funkcionalizacija polimernih materijala može se vršiti na više načina: modifikacijom materijala tokom sinteze, što je uglavnom teško kontrolisati; ubacivanjem aktivnih komponenti u polimernu mrežu tokom prerade, odnosno sinteza kompozita; ili modifikacijom površine polimernih materijala, korišćenjem različitih agenasa [15,118]. Najjednostavniji i najčešći način modifikacije jeste ubacivanje aktivnih komponenti jednostavnim umešavanjem u polimerni rastvor. Ovakav način funkcionalizacije polimera je najprihvatljiviji i sa industrijskog aspekta, jer su potrebne neznatne

modifikacije u procesu proizvodnje materijala, što doprinosi finansijskoj isplativosti. Odabir aktivnih komponenti koje će se dodati polimernoj mreži, zavisice od krajnje namene rezultujućeg funkcionalnog materijala. Aktivne komponente mogu biti prirodnog porekla, kao što su na primer ekstrakti i etarska ulja različitih biljaka, produkti metabolizma mikroorganizama i drugo, koja imaju izražena antioksidativna, antimikrobna, antiinflamatorna i druga svojstva [105,119–121]. Takođe, radi poboljšanja mehaničkih i barijernih svojstava polisaharida, u polimernu mrežu se mogu dodati i različite biološki aktivne komponente sintetskog porekla: čestice i nanočestice oksida metala, ugljenična mikro- i nanopunila, nanoglina i drugo [122–125].

Ograničavajući činilac prilikom dodavanja aktivnih komponenti, odnosno punila u polimere, jeste postizanje dobre disperzije unutar polimerne mreže, koja će osigurati zadovoljavajuću aktivnost funkcionalnog materijala. Svojstva polimernih kompozita zavise od prirode i intenziteta interakcija na graničnoj površini polimer-punilo. Intenzitet interakcija će biti veći što je veća granična međupovršina, tako da je jako važno postići dobru disperziju i uniformnu raspodelu čestica punila u polimernoj mreži [126]. Međutim, ukoliko je koncentracija dodatih punila neadekvatna, ili postoji nekompatibilnost sastavnih komponenti, može doći do pojave aglomerata, razdvajanja faza i destabilizacije strukture kompozitnog materijala. Bez obzira na način umešavanja čestica punila, umešavanjem je teško postići homogenu raspodelu i sprečiti njihovu aglomeraciju u polimernoj mreži. Homogeniju raspodelu čestica je moguće postići njihovom *in situ* sintezom u polimernoj mreži polisaharida. Ovaj pristup se pokazao uspešnim prilikom sinteze agar/hidroksiapatit nanokompozita za biomedicinsku primenu, gde je mineralna faza - hidroksiapatit, formirana u agarnoj mreži biomineralizacijom putem imerzione tehnike [127]. Međutim, prilikom ispitivanja mogućnosti primene istog principa biomineralizacije za sintezu biomaterijala na bazi agara i metala cinka, pokazano je da se upotrebom imerzione tehnike, gde mineralni prekursori difunduju u hidrogel, a zatim dolazi do reakcije između njih i deponovanja mineralne faze unutar polimerne mreže, ne mogu dobiti agarni filmovi homogene strukture [128]. Mineralna faza remeti prostorni raspored molekula polisaharida, dolazi do kontrakcije i narušavanja strukture polimera. Nasuprot ovoj metodi, pokazano je da je biomaterijale homogene strukture i dobre disperzije čestica punila, moguće sintetisati istovremenim formiranjem hidrogela i mineralne faze. Ovaj metod pokazao se uspešnim za pripremu biokompozita na bazi kalcijum alginata i hidroksiapatita u vidu mikrokuglica [129]. Metodom *in situ* mineralizacije agara u prisustvu mineralnih prekursora i metala Zn i Cu, uspešno su sintetisani filmovi poboljšanih mehaničkih, barijernih i optičkih svojstava sa dodatnom antimikrobnom funkcijom [123,130,131]. Međutim, istim principom funkcionalizacije alginatnog polimera nije bilo moguće dobiti homogene biokompozitne alginatne filmove [128].

Umrežavanje alginatnog polimera posredstvom dvovalentnih katjona, odnosno jonsko umrežavanje predstavlja najjednostavniji i najčešće korišćen metod u praksi, sa ciljem poboljšanja mehaničkih i barijernih svojstava alginatnih filmova. Joni kalcijuma najčešće su upotrebljavani kao umrežavajući agensi, najčešće u vidu soli hlorida, a pokazano je da tip soli ima uticaj na krajnja svojstva formiranih filmova. Umrežavanje solima  $\text{CaCl}_2$ , usled njihove velike rastvorljivosti, biće veoma brzo i teže kontrolisano, dok će umrežavanje slabije rastvorljivim solima kao na primer  $\text{CaSO}_4$  i  $\text{CaCO}_3$ , omogućiti sporije i uniformnije geliranje [15,115,132]. Afinitet dvovalentnih jona za vezivanje sa alginatom je različit, i može se predstaviti sledećim opadajućim redosledom:  $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$  [133]. Većina katjona, vezuje se preferencijalno za guluronske blokove dok se joni  $\text{Cu}^{2+}$  sa jednakim afinitetom vezuju kako za guluronske, tako i za manuronske blokove [134].

Krajnja svojstva alginatnih filmova zavisice i od načina uvođenja umrežavajućeg jona [113]. Naime, formiranje filmova izlivanjem filmogenog rastvora koji je dobijen direktnim mešanjem alginata sa umrežavajućim agensom, često nije moguće. Usled trenutnog geliranja alginata u prisustvu dvovalentnih katjona, dolazi do neujednačenog geliranja, u smislu raspodele zona povezivanja. Zone povezivanja, odnosno umrežavanja nisu raspoređene uniformno unutar celog filma, pa su filmovi dobijeni ovom metodom lošeg kvaliteta i nehomogene strukture [112,135]. U cilju dobijanja filmova uniformnije strukture uveden je metod internog (unutrašnjeg ili *in situ*) geliranja, koji omogućava kontrolu uvođenja ili otpuštanja umrežavajućeg katjona iz slabo rastvornih

soli ( $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ) sintezom kompozita metodom elektrostatičke ekstruzije [12,15,132]. Međutim, glavna mana internog geliranja je teškoća primene na industrijskom nivou. Stoga se smatra da je eksterno geliranje, kako sa biotehnološkog, tako i sa industrijskog aspekta, najpogodnija metoda, jer omogućava dobijanje homogenih filmova na jednostavan način, prostim potapanjem prethodno formiranih alginatnih filmova u rastvor sa umrežavajućim agensom. Veliki broj literaturnih podataka ukazuje na pogodnost eksternog umrežavanja alginata u cilju poboljšanja mehaničkih, barijernih i funkcionalnih karakteristika alginatnih filmova za različite primene [112,114,136].

Odabirom odgovarajuće metode sinteze kao i funkcionalizacije polimera agara i alginata, moguće je dobiti strukture poboljšanih karakteristika za specifičnu namenu. Formulacije na bazi agara i alginata, danas nalaze primenu kao sistemi za kontrolisano otpuštanje nutrijenata, biopesticida i bioinsekticida, zadržavanje vlage i sprečavanje oticanja hranljivih materija sa poljoprivrednih površina, kao i specifičnih nosača koji sadrže imobilisane PGP bakterije ili njihove metabolite [68,105,137,138].

### 3 CILJEVI RADA

Ciljevi ove doktorske disertacije izvedeni su iz polazne hipoteze da morska sredina predstavlja bogat izvor organizama i bioaktivnih jedinjenja koji mogu imati pozitivan uticaj na rast biljaka.

Sagledavajući negativan uticaj konvencionalnih agrotehničkih mera i rastuće zahteve za pronalazanjem novih ekoloških i ekonomski prihvatljivih pristupa u poljoprivrednoj praksi, postavljen je osnovni cilj istraživanja: utvrđivanje biostimulatornog dejstva mikroorganizama izolovanih iz morskog sedimenta, kao i hidrogelnih prevlaka, odnosno filmova na bazi polisaharida poreklom iz morskih algi, na rast i zaštitu biljaka.

Specifični ciljevi disertacije obuhvataju:

- izolaciju i karakterizaciju novih mikroorganizama iz morskog sedimenta koji poseduju sposobnost stimulacije rasta biljaka;
- identifikaciju i karakterizaciju odabranog najpotentnijeg soja i utvrđivanje mehanizama stimulacije biljnog rasta;
- utvrđivanje opsega dejstva i mogućnosti primene formulacija na bazi ćelija i produkovanih metabolita odabranog novog bakterijskog soja, utvrđivanjem antifungalne aktivnosti, fitotoksičnosti i uticaja na rast biljke;
- dobijanje funkcionalnih hidrogel prevlaka, odnosno filmova na bazi polisaharida poreklom iz morskih algi (agara, alginata i njihovih mešavina) jednostavnom procedurom izlivanja iz polimernog rastvora uz otparavanje rastvarača;
- utvrđivanje optičkih, mehaničkih i barijernih osobina sintetisanih filmova kao najvažnijih osobina za primenu u agroindustriji i
- određivanje bioloških svojstava sintetisanih hidrogelnih prevlaka, odnosno filmova, u pogledu antifungalne aktivnosti, odnosno zaštite biljaka od patogeni, kao i uticaja različitih formulacija na osnovne parametre rasta biljke.

## 4 MATERIJAL I METODE

### 4.1 Izolacija mikroorganizama iz obalskog morskog sedimenta Crvenog mora

Izolacija mikroorganizama vršena je metodom decimalnih razblaženja i zasejavanja na selektivne mikrobiološke podloge. Za izolaciju mikroorganizama korišćen je uzorak obalskog sedimenta Crvenog mora, prikupljen sa dubine od 2 m sa lokaliteta Hurgada, Egipat sledećih geografskih koordinata: 27°5'4.36" severne geografske širine i 33°51'30.47" istočne geografske dužine.

#### Hranljive podloge korišćene za izolaciju mikroorganizama:

ISP1 bujon, „HiMedia Laboratories“, Indija

Sastav podloge:.....	g/L
Hidrolizat kazeina	5,0
Ekstrakt kvasca	3,0
Agar (za ISP1 agar, ISP1A) HiMedia Laboratories, Indija	15,0

R2 bujon, modifikovan

Sastav podloge:	g/L
Tripton	0,25
Hidrolizat kazeina	0,75
Ekstrakt kvasca	0,5
Glukoza	0,5
Skrob	0,5
Kalijum-hidrogenfosfat	0,3
Natrijum-piruvat	0,3
Magnezijum-sulfat	0,024
Natrijum-hlorid, Centrohema, Srbija	20,00
Agar (za R2 agar, R2A), HiMedia Laboratories, Indija	15,0

Tripton soja bujon (TSB), „Torlak“, Srbija

Sastav podloge .....	g/L
Pepton od kazeina	17,25
Soja pepton	3,0
Glukoza	2,50
Natrijum-hlorid	5,0
Kalijum-hidrogen fosfat	2,5
Agar (za tripton soja agar, TSA) HiMedia Laboratories, Indija	15,0

Mikrobiološke podloge su pripremane rastvaranjem tačno odmerene količine svakog od sastojaka, prema recepturi proizvođača, u destilovanoj vodi i sterilisanjem u autoklavu (Sutjeska, Srbija) na 121 °C u trajanju od 20 minuta.

Fiziološki rastvor je pripreman rastvaranjem 8,5 g NaCl (Centrohema, Beograd, Srbija) u 1L destilovane vode. Pripremljen rastvor je raspoređen u epruvete po 9 mL i sterilisan u autoklavu na 121 °C u trajanju od 20 minuta.

#### Postupak:

Tačno odmerena količina sedimenta (1 g) je mehanički homogenizovana u 9 mL fiziološkog rastvora mešanjem na vorteksu. Zatim su iz ove suspenzije napravljena decimalna razblaženja iz kojih je uzorak zasejan na čvrste podloge ISP1A, TSA i R2A. Podloge su inkubirane dva dana na 30 °C i morfološki različite kolonije bakterija sa zasejanih čvrstih podloga su prečišćene metodom



iscrpljivanja. Prisustvo sporogenih mikroorganizama utvrđeno je na TSA hranljivoj podlozi zasejavanjem decimalnih razblaženja koja su prethodno zagrevana na 80 °C u trajanju od 10 min. Provera čistoće kultura vršena je posmatranjem mikroskopskih preparata na svetlosnom mikroskopu (Axio Imager A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH., Nemačka).

Dobijene čiste kulture su čuvane na kosom TSA i/ili ISP1 agaru na 4 °C do daljeg testiranja. Sve izolovane čiste kulture uskladištene su na temperaturi od -20 °C u tečnoj podlozi (TS i ISP1) u koju je dodato 10 % sterilnog glicerola i pridružene jedinstvenoj kolekciji mikroorganizama Katedre za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju, Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Radne kulture bakterijskih izolata pripremljene su na sledeći način: Sterilnom ezom sa čvrstih hranljivih podloga (TSA i/ili ISP1A) pokupljeno je nekoliko kolonija svakog od izolata, zasejano u ISP1 bujon i inkubirano na 30 °C na tresilici pri 150 obrtaja/min u trajanju od 24 h.

## 4.2 Izolacija bakterija stimulatora biljnog rasta

Odabir potencijalnih stimulatora biljnog rasta, odnosno PGP (engl. - *Plant Growth Promoting*) bakterija, među izolovanim sojevima izvršena je ispitivanjem prisustva odabranih direktnih i indirektnih mehanizama stimulacije biljnog rasta.

### 4.2.1 Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta

#### 4.2.1.1 Biološka fiksacija atmosferskog azota

Sposobnost izolata da fiksiraju atmosferski N<sub>2</sub> ispitana je zasejavanjem ćelijske suspenzije radne kulture svakog od izolovanih bakterija (20 µL) na čvrstu podlogu koja ne sadrži izvor azota i inkubiranjem na 30 °C u trajanju od 10 dana [39]. Prisustvo bakterijskog rasta nakon inkubacije, indikacija je sposobnosti fiksiranja N<sub>2</sub>. Korišćena je Jensenova podloga za identifikaciju azotofiksirajućih bakterija sledećeg sastava (g/L):

Saharoza	20,0
Dikalijum fosfat	1,00
Magnezijum sulfat	0,50
Natrijum hlorid	0,50
Fvožđe sulfat	0,10
Natrijum molibdat	0,005
Kalcijum karbonat	2,00
Agar	15,0

#### 4.2.1.2 Sposobnost rastvaranja fosfata

Sposobnost izolata morskog sedimenta da rastvaraju neorganske fosfate je utvrđena kvalitativno, zasejavanjem bakterijskih kultura na hranljivu podlogu obogaćenu neorganskim fosfatom. Korišćen je Pikovskaja agar (PA) sledećeg sastava (g/L):

Kvašćev ekstrakt	0,5
Glukoza	10,0
Kalcijum fosfat	5,0
Amonijum sulfat	0,5
Kalijum hlorid	0,2
Magnezijum sulfat	0,1
Mangan sulfat	0,0001
Fvožđe sulfat	0,0001
Agar	15,0

Od svake pojedinačne radne kulture izolata, 20 µL zasejano je u vidu kapi na centar PA podloge. Inkubacija je trajala 7 dana na 30 °C. Pojava svetlih zona oko izraslih kolonija indikacija je pozitivne reakcije, odnosno sposobnosti bakterija da rastvaraju neorganske fosfate. Indeks rastvaranja fosfata (SI, engl. - *Solubilization Index*) utvrđen je pomoću sledeće formule [139].

$$SI = \frac{\text{prečnik izrasle kolonije} + \text{prečnik svetle zone}}{\text{prečnik izrasle kolonije}} \quad (4.1)$$

## 4.2.2 Indirektni mehanizmi stimulacije biljnog rasta

### 4.2.2.1 Antifungalna aktivnost

Sposobnost bakterijskih izolata da smanje i/ili spreče rast biljnih patogena testirana je konfrontacijskim testom sa biljnim patogenim plesnima: *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria* sp., *Mucor* sp. (iz kolekcije kultura Instituta za kukuruz, Zemun Polje, Srbija). Plesni su gajene na krompir-dekstroznom agaru (PDA, engl. - *Potato Dextrose Agar*, proizvođača HiMedia Laboratories, Indija), sedam dana na 25 °C. Kao radna kultura patogena korišćena je suspenzija spora koja je pripremana po metodi koju su predložili Kim i saradnici [140]. Naime, nakon inkubacije plesni 7 dana na čvrstoj PDA podlozi, sterilnom ezom pokupljene su konidije sa površine izraslih micelijuma i uronjene u 5 mL fiziološkog rastvora u koji je dodato dve kapi sterilnog glicerola. Rastvori su snažno promešani kako bi se spore oslobodile, a zatim je rastvor filtriran kroz nekoliko slojeva sterilne gaze. Broj spora u svakoj suspenziji sveden je na 10<sup>5</sup> spora po mL, razblaživanjem uzorka odgovarajućom količinom fiziološkog rastvora i prebrojavanjem u hemocitometarskoj komori uz pomoć svetlosnog mikroskopa. Radna kultura bakterije pripremljena je na način kao što je opisano u 4.1 odeljku ove disertacije.

Spore plesni su zasejane u vidu kapi (20 µL) na centar PDA podloge, dok su bakterije (takođe u vidu kapi) zasejane u dve tačke na udaljenosti od 2,5 cm od mesta inokulacije patogenom plesni. Podloga zasejana samo sporama plesni predstavljala je kontrolu. Inkubacija je trajala 5 dana na 25 °C u mraku, nakon čega je zabeležen rast plesni u kontroli i na Petri kutijama koje su osim plesni sadržale i bakteriju. Na osnovu prečnika rasta plesni u kontroli (R<sub>0</sub>) i prečnika rasta plesni u prisustvu bakterijskih izolata (R<sub>1</sub>), izračunat je stepen inhibicije rasta patogena (PGI, engl.-*Percentage of Growth Inhibition*):

$$PGI, \% = \frac{R_0 - R_1}{R_0} * 100 \quad (4.2)$$

Antifungalna aktivnost izolata je procenjena na osnovu dobijenih vrednosti PGI, a izolati su klasifikovani na one sa: veoma visokom (PGI > 75 %), visokom (PGI = 61-75 %), umerenom (PGI = 51-60 %) i niskom (PGI < 51 %) antifungalnom aktivnošću [141].

### 4.2.2.2 Sposobnost proizvodnje hidrolitičkih enzima

Sposobnost bakterijskih izolata iz morskog sedimenta da proizvode hidrolitičke enzime: proteaze, celulaze, hitinaze i amilaze, određena je kvalitativno, gajenjem na podlogama obogaćenim supstratima datih enzima.

Izolati su gajeni na osnovnoj podlozi sledećeg sastava: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/L, kvašćev ekstrakt 3 g/L i agar 15 g/L. Za ispitivanje proteolitičke aktivnosti u osnovnu podlogu dodato je obrano mleko (finalne koncentracije 1%), odnosno mikrokristalna celuloza (CMC) finalne koncentracije 0,5 % za ispitivanje celulolitičke aktivnosti. Za ispitivanje amilolitičke aktivnosti u osnovnu podlogu dodat je rastvorljivi skrob finalne koncentracije 1 %, a za utvrđivanje hitinolitičke aktivnosti dodat je koloidni hitin finalne koncentracije 0,5 %. Koloidni hitin je

pripremljen od hitina iz oklopa kraba upotrebom koncentrovane hlorovodonične kiseline po metodi koju su opisali Hsu i Lokvud [142].

Sveže bakterijske kulture su zasejane u vidu kapi (20  $\mu$ l) na površinu pripremljenih čvrstih podloga sa odgovarajućim supstratom i inkubirane na 30 °C u trajanju od 48-72 sata. Pojava svetlih zona oko izraslih kolonija je smatrana pozitivnom reakcijom i indikacijom hidrolitičke aktivnosti bakterije. Radi bolje vizuelizacije zona, sve ploče prelivene su malom količinom Lugolovog rastvora (2 g KI, 1 g I<sub>2</sub> u 300 mL destilovane vode).

### **4.3 Karakterizacija i identifikacija odabranog izolata PPM3**

#### **4.3.1 Određivanje morfoloških i fizioloških karakteristika izolata PPM3**

Makromorfološke karakteristike (oblik i izgled kolonija, boja i tip rasta kolonija) ispitane su posmatranjem izraslih kolonija na površini čvrstih hranjivih podloga.

Mikromorfološka svojstva kultura (oblik i veličina ćelija, bojenje po Gramu, prisustvo i oblik spora) ispitana su mikroskopskim pregledom preparata na svetlosnom mikroskopu, koristeći uljanu imerziju, pri uveličanju objektiva od 100x. Za bojenje mikrobioloških preparata korišćeni su standardni reagensi za bojenje po Gramu: kristal violet, Lugolov rastvor, 95 % etanol i safranin.

Biohemijske karakteristike odabranog izolata PPM3 određene su izvođenjem standardnih oksido-fermentacionih testova: katalaza test, oksidaza test, redukcija nitrata, produkcija indola, korišćenje citrata, Metil red i Vog-Prosker test (MR/VP) i drugi, prateći standardne metode opisane u Berdžijevom priručniku sistematske bakteriologije (engl.-*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*) [143]. Za određivanje sposobnosti fermentacije šećera korišćen je API50 CHB sistem (BioMérieux, France) prateći uputstva proizvođača. Enzimatski profil odabranog izolata PPM3 određen je upotrebom gotovog paketa API ZYM (BioMérieux, France) prateći uputstva proizvođača. Za sve testove korišćena je radna kultura izolata PPM3 pripremljena na način kao što je opisano u odeljku 4.1 ove disertacije.

#### **4.3.2 Određivanje ekoloških karakteristika izolata PPM3**

##### **4.3.2.1 Temperaturni opseg i optimum rasta bakterije**

Sposobnost rasta na različitim temperaturama ispitana je u ISP1 tečnoj podlozi. Nekoliko kolonija prekončne kulture sa ISP1 agara, pokupljeno je sterilnom ezom i zasejano u 10 mL ISP1 bujona. Inkubacija je trajala 24 h na 30 °C. Nakon inkubacije, izrasle kulture su korišćene za zasejavanje novog ISP1 bujona koji je potom inkubiran na različitim temperaturama: 4 °C, 15 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C i 55 °C. Početni broj ćelija iznosio je 10<sup>5</sup> CFU (engl – *Colony Forming Units*) po mL. Rezultati su očitani nakon 3 dana. Sposobnost rasta na testiranoj temperaturi procenjena je spektrofotometrijski, mereći stepen zamućenja bujona na talasnoj dužini od 600 nm na uređaju Shimadzu UV 1800 (Shimadzu, Kjoto, Japan). Slepu probu predstavljala je sterilna ISP1 tečna podloga.

##### **4.3.2.2 pH opseg i optimum rasta bakterije**

Za ispitivanje tolerancije izolata PPM3 na različite pH uslove sredine kulture su zasejane u ISP1 tečnu podlogu čija je pH vrednost pre sterilizacije podešena na: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 i 11. Podešavanje pH podloge postignuto je dodavanjem 1M rastvora HCl ili 1M rastvora NaOH. Kao kontrolni uzorak korišćen je ISP1 bujon pripremljen po standardnoj proceduri sa destilovanom vodom čija je pH iznosila 6. Sposobnost rasta je procenjena analogno proceduri opisanoj u odeljku 4.3.2.1. spektrofotometrijski, poređenjem optičkih gustina merenih na 600 nm na uređaju Shimadzu UV 1800. Kao slepa proba upotrebljena je sterilna ISP1 tečna podloga.

#### 4.3.2.3 Tolerancija soli

Za ispitivanje tolerancije izolata PPM3 na prisustvo različitih koncentracija soli u sredini, bakterija je gajena u ISP1 tečnoj podlozi, koja je sadržala sledeće koncentracije NaCl: 2 %, 5 %, 7 % i 10 %. Kao kontrolni uzorak korišćena je ISP1 tečna podloga bez dodate soli. Procedura je analogna proceduri opisanoj u odeljku 4.3.2.1. a inkubacija je trajala 48 h na 30 °C. Sposobnost rasta je procenjena spektrofotometrijski, poređenjem optičkih gustina merenih na 600 nm na uređaju Shimadzu UV 1800. Za slepu probu upotrebljena je sterilna ISP1 tečna podloga.

### 4.3.3 Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata PPM3

#### Materijal:

Bakterijske kulture:

-Izolat iz morskog sedimenta oznake PPM3

-Referentni soj *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350T

Potrebni rastvori:

- 1M TRIS-HCl pufer pH 8,8: 60,57 g Tris (hidroksimetil)-aminometana je rastvoreno u 500 mL destilovane vode, pH rastvora je podešen na 8,8 dodatkom 1M HCl.
- 0,5M EDTA: 18,6g di-natrijum-etilendiamintetraacetata je rastvoreno u 100 mL destilovane vode uz neprestano mešanje. pH rastvora je podešen na 8 dodatkom 1M NaOH.
- 3M NaCl: 17,4 g natrijum hlorida je rastvoreno u 100 mL destilovane vode. Rastvor je filtriran a zatim sterilisan u autoklavu i čuvan na sobnoj temperaturi do dalje upotrebe.
- 3M Na-acetat: 24,6 g natrijum acetata je rastvoreno u 100 mL destilovane vode, pH rastvora je podešen na 8. Rastvor je filtriran, a zatim sterilisan u autoklavu i čuvan na sobnoj temperaturi do dalje upotrebe.
- TEN pufer: 4 mL 1M Tris-HCl pufera (pH 8,8) pomešano je sa 800 µL 0,5M EDTA (pH 8) i 40 mL 3M NaCl. Zatim je dodata destilovana voda do konačne zapremine od 400 mL. Rastvor je filtriran a zatim sterilisan u autoklavu i čuvan na sobnoj temperaturi do dalje upotrebe.
- Kiseli fenol-hloroform: Rastvor je pripremljen otapanjem fenola i mešanjem sa hloroformom i destilovanom vodom u zapreminskom odnosu 1:1:0,2 u sudu zagrejanom na 42 °C. U ovako pripremljen rastvor dodat je hinolin do razvijanja intenzivne žute boje. Rastvor je potom ostavljen u frižideru na +4 °C, preko noći.
- Neutralni fenol-hloroform: Rastvor je pripremljen mešanjem kiseliog fenol-hloroforma i 1M Tris-HCl pufera (pH 8,8) u zapreminskom odnosu 1:0,5. Rastvor je potom snažno promućkan i ostavljen u frižideru preko noći na +4 °C. Gornja faza je odbačena a u donju fazu dodat je 0,1 M HCl u zapreminskom odnosu 1:0,5. Rastvor je snažno promućkan i ostavljen u frižideru preko noći na 4 °C. Rastvor je čuvan u tamnoj boci u frižideru na +4 °C. Za potrebe eksperimenta korišćena je donja obojena faza.
- 1M MgCl<sub>2</sub> pripremljen je rastvaranjem 0,95 g magnezijum-hlorida u 5 mL destilovane vode.
- TAE koncentrovani pufer: 24,2 g Tris (hidroksimetil)-aminometana rastvoreno je u 60 mL destilovane vode mešanjem na magnetnoj mešalici. Zatim je u ovaj rastvor dodato 10 mL 0,5 M EDTA (pH 8), 5,71 mL sirćetne kiseline i destilovana voda do konačne zapremine od 100 mL. Kao radni rastvor korišćen je rastvor TAE pufera razblažen 50 puta.

#### 4.3.3.1 Izolacija hromozomalne DNK

DNK je izolovana iz čistih kultura metodom sa fenol-hloroformom [144] uz određene modifikacije:

Jedna do dve kolonije čiste bakterijske kulture, sterilnom ezom pokupljene su sa čvrste TSA hranljive podloge i suspendovane u 900  $\mu$ L TEN pufera snažnim mešanjem na vorteksu. Čelijska suspenzija je zatim centrifugirana 5 minuta na 10000 obrtaja/min, nakon čega je čelijski talog resuspendovan u istoj količini TEN pufera i centrifugiran dodatnih 5 min, na 13000 obrtaja/min. Korak je ponovljen dva puta. U suspenziju je zatim dodato 200  $\mu$ L natrijum dodecil sulfata (SDS, engl.-*Sodium Dodecyl Sulfate*) i mala količina mikrostaklenih kuglica i uzorak je promešan vorteksiranjem 30 sekundi, čime se obezbedilo mehaničko razaranje ćelija. Nakon mehaničkog razaranja ćelija dodato je 100  $\mu$ L rastvora neutralnog fenol-hloroforma i uzorak je snažno izmešan, vorteksiranjem 30 s. Uzorak je zatim centrifugiran 5 min na 13000 obrtaja/min i odvojena je gornja providna faza. Gornja providna faza, preneti je u čistu ependorf tubu i postupak sa fenol-hloroformom ponavljan je sve do nestanka interfaze bele boje. U uzorak je potom dodata 1/10 zapremine 3M Na-acetata i u odnosu 1:1 izopropanol. Uzorak je ostavljen da stoji 5 min na sobnoj temperaturi, a zatim je centrifugiran 5 min na 13000 obrtaja/min. Nakon odbacivanja supernatanta, uzorak je još jednom kratko centrifugiran i sva tečnost je odstranjena. Talog, u kome se nalazi DNK ispitivanog mikroorganizma, je zatim resuspendovan u rastvoru dobijenom mešanjem 100  $\mu$ L 3M Na-acetata, 10  $\mu$ L  $MgCl_2$  i 890  $\mu$ L ultra čiste vode. U ovaj rastvor je dodato 700  $\mu$ L 96 % etanola ohlađenog na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  i uzorak je ostavljen na sobnoj temperaturi preko noći, a zatim centrifugiran 5 minuta na 13000 obrtaja/min. Supernatant je odstranjen a zatim je uzorak dodatno dehidratiran suspendovanjem u 700  $\mu$ L 75 % etanola i ponovo centrifugiran 5 min na 13000 obrtaja/min. Supernatant je odstranjen, a DNK talog ostavljen da se potpuno osuši.

Nakon sušenja DNK uzorak je suspendovan u 50  $\mu$ L ultra čiste destilovane dejonizovane vode i proveren elektroforezom na agaroznom gelu nanošenjem 5  $\mu$ L uzorka, odnosno DNK matrice, na 1 % agarozni gel (50 mL) i posmatranjem traka na UV svetlu. Za vizualizaciju DNK trake korišćen je etidijum bromid (1,2  $\mu$ L) koji je dodat direktnim umešavanjem u agarozni gel pre očvršćivanja.

#### 4.3.3.2 Lančana reakcija polimerizacije

Dobijena DNK je korišćena kao obrazac za umnožavanje (amplifikaciju) gena metodom lančane reakcije polimerizacije DNK (Polymerase Chain Reaction, PCR). Za umnožavanje DNK sekvence koja kodira 16S ribozomalnu RNK (16S rRNK) male subjediniće ribozoma korišćeni su univerzalni bakterijski prajmeri: 27 FOR 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' i 1492 REV 5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC-3' [145]. Za umnožavanje *gyr A* gena koji kodira subjedincu A DNK giraze korišćeni su sledeći prajmeri: *gyrA*-FOR5'-CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT-3' i *gyrA*-REV 5'-CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT-3' [146]. PCR reakciona zapremina iznosila je 50  $\mu$ L i sadržala je: 25  $\mu$ L GoTaq Green PCR Master Mix smeše (Promega, USA), po 1  $\mu$ L svakog prajmera, 22  $\mu$ L ultračiste destilovane dejonizovane vode i 1  $\mu$ L izolovane genomske DNK. Svaka PCR reakcija izvedena je uz negativnu kontrolu koju je činila smeša svih reagenasa, a umesto DNK dodata je ultračista dejonizovana destilovana voda.

PCR reakcija je izvedena u automatizovanom termalnom uređaju QB-24 (LKB, Austria) upotrebom programa koji je sadržao sledeće parametre: inicijalnu denaturaciju od 4 min na  $95\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 ciklusa denaturacije na  $95\text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 30 s, vezivanje prajmera na  $55\text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 1 min i elongaciju na  $72\text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 3 minuta, dok je konačna elongacija izvedena na  $72\text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 10 min, za obe PCR reakcije.

Dobijeni PCR produkti su detektovani horizontalnom elektroforezom na 1 % agaroznom gelu, i posmatrani na UV svetlu. Za vizualizaciju fragmenata, korišćen je etidijum bromid dodat direktno u 1 % agarozni gel pre očvršćavanja i izlivanja (1,2  $\mu$ L na 50 mL gela). Veličine dobijenih fragmenata su određivane poređenjem sa DNK markerom poznate dužine (1 kb, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD). PCR produkti su zatim prečišćeni korišćenjem gotovog paketa QiaquickPCR

Purification Kit (Qiagen, USA) prema uputstvu proizvođača. Umnožena DNK je sekvencionirana automatizovanim DNA analyzer 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, USA) korišćenjem BigDye™ cycle sequencing kit (Applied Biosystems, FosterCity, CA) u MacroGen Europe Inc. (Amsterdam, Holandija). Obrada sekvenci je izvršena uz pomoć ClustalW softvera dostupnom na GenomeNet platformi. Analiza sličnosti dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka, određena je putem Basic Local Alignment Tool (BLAST) algoritma na NCBI serveru (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA). Konsenzus sekvence su deponovane u GenBank bazu podataka i dodeljeni su im pristupni brojevi (GenBank Accession Number).

#### **4.4 Utvrđivanje mehanizama biološke kontrole i potencijala primene metabolita odabranog izolata *Bacillus* sp. PPM3**

##### **4.4.1 Ispitivanje antifungalne aktivnosti ekstraćelijskog filtrata izolata *Bacillus* sp. PPM3**

Antifungalna aktivnost ispitana je određivanjem procenta inhibicije rasta patogena, poređenjem prečnika rasta plesni izraslih na podlozi koja sadrži ekstraćelijski filtrat (EF) odabranog izolata PPM3, sa kontrolnim pločama bez bakterijskog EF. Radna kultura izolata *Bacillus* sp. PPM3, pripremljena je kao što je opisano u odeljku 4.1 ove disertacije. Kultura je zasejana u 50 mL sterilne ISP1 tečne podloge, tako da je krajnja količina inokuluma iznosila približno  $2 \times 10^8$  CFU/mL ( $OD_{660nm} = 0,1$ ) i inkubirana 48 h na 30 °C uz konstantno mešanje. Nakon inkubacije suspenzija je centrifugirana 15 min pri brzini od 9000 obrtaja/minuti, ćelije su odbačene, a ekstraćelijska tečnost je sakupljena i filtrirana kroz sterilni filter promera pora 0,22 µm (LLG, PES). Na ovaj način dobijen je ekstraćelijski filtrat izolata (EF) *Bacillus* sp. PPM3.

Sterilna PDA čvrsta podloga otopljena je zagrevanjem u vodenom kupatilu, a zatim je temperatura podloge snižena na 45 °C i u nju je sterilno dodat EF *Bacillus* sp. PPM3 krajnje koncentracije 10 zapreminskih %. Podloga sa EF snažno je promešana vorteksiranjem i po 5 mL odmah je izliveno u Petri kutije prečnika 45 mm. Podloge su zatim ostavljene da se stegnu na sobnoj temperaturi. Nakon očvršćavanja, podloge su ostavljene u termostatu na 37 °C preko noći, radi provere sterilnosti.

Antifungalna aktivnost ispitana je na sledeći način: Po 5 µL suspenzije spora ( $1 \times 10^5$  spora u mL) svake od ispitivanih plesni pojedinačno, zasejano je u vidu kapi na centar prethodno pripremljenih PDA podloga koje su sadržale EF *Bacillus* sp. PPM3, kao i na kontrolne ploče koje su sadržale samo sterilnu PDA podlogu. Rast plesni zabeležen je nakon 5 dana inkubacije na 25 °C u mraku. Step en inhibicije rasta plesni (PGI) je izračunat prema formuli 4.2 kao što je navedeno u odeljku 4.2.2.1 ove disertacije. Eksperiment je izveden u tri ponavljanja a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti uz standardnu devijaciju.

##### **4.4.2 Ispitivanje uticaja ekstraćelijskog filtrata *Bacillus* sp. PPM3 na germinaciju spora patogenih plesni**

Efekat EF *Bacillus* sp. PPM3 na germinaciju spora patogenih plesni je ispitano u tečnoj kulturi. Naime, određena zapremina bakterijskog EF pomešana je sa suspenzijom spora svake od plesni pojedinačno ( $1 \times 10^5$  spora u mL) u odnosu 1:1, suspenzije su snažno promešane i inkubirane tokom 24 h na 25 °C u statičkim uslovima. U kontroli, EF zamenjen je sterilnom ISP1 tečnom podlogom. Nakon inkubacije, izračunata je stopa germinacije spora uzoraka i kontrole, brojanjem germiniranih spora u hemocitometarskoj komori na svetlosnom mikroskopu, prateći metodu Drobija i saradnika [147]. Eksperiment je izveden u tri ponavljanja i rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti uz standardnu devijaciju.

#### 4.4.3 Ispitivanje uticaja ekstraćelijskog filtrata *Bacillus* sp. PPM3 na strukturu ćelija plesni

Antagonistički efekat odabranog izolata *Bacillus* sp. PPM3 ispitan je na nivou mikrostrukture plesni. Sa ivice aktivno rastućeg micelijuma plesni gajenih na PDA podlozi koja je sadržala EF *Bacillus* sp. PPM3, kao i kontrolnih ploča, sterilnim skalpelom uzet je deo micelijuma i pripremljen je nativni preprat koji je posmatran na svetlosnom mikroskopu (Zeiss, Axio imager. A1) pri uveličanju objektivima od 20x i 40x. Fotografije su automatski zabeležene uz pomoć kamere AxioCamMRC Camera i softvera Axio Vision Software (Zeiss).

#### 4.4.4 Ispitivanje stabilnosti ekstraćelijskog filtrata izolata *Bacillus* sp. PPM3

Ispitana je stabilnost EF *Bacillus* sp. PPM3 nakon sledećih tretmana prateći metodu koju su opisali Romero i saradnici [55]:

- pH tretman- pH vrednost ekstraćelijskog filtrata podešena je na 3, 7 i 10 upotrebom 1N NaOH ili 1N HCl u trajanju od 20 min;
- temperaturni tretman- ekstraćelijski filtrat izolata PPM3 inkubiran je na temperaturama: 50, 70 i 121 °C u trajanju od 20 minuta;
- enzimski tretman-ekstraćelijski filtrat tretiran je enzimom proteinazom K (20 mg/mL, Sigma Aldrich, USA) 60 min na 45 °C.

Nakon svih tretmana, ispitana je antifungalna aktivnost tretiranog EF *Bacillus* sp. PPM3 na isti način kao što je opisano u odeljku 4.2.2.1 ove disertacije. Netretirani EF *Bacillus* sp. PPM3 je predstavljao kontrolu. Rezultati stabilnosti su prikazani kao rezidualna antifungalna aktivnost (RAA, %) EF nakon svakog od tretmana, prema sledećoj formuli:

$$RAA, \% = Rt/R * 100 \quad (4.3),$$

gde je RAA rezidualna antifungalna aktivnost EF; Rt-poluprečnik izrasle micelije na pločama sa tretiranim EF; R- poluprečnik izrasle micelije na kontrolnim pločama.

Eksperiment je izveden u tri ponavljanja i rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti uz standardnu devijaciju.

#### 4.4.5 Detekcija gena za sintezu lipopeptida

Genomska DNK je izolovana iz prekonocne kulture izolata *Bacillus* sp. PPM3 i referentnog soja *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350T kao što je opisano u 4.3.3.1 odeljku ove disertacije. PCR reakcija obavljena je upotrebom specifičnih parova prajmera uključenih u biosintezu antifungalnih metabolita iz grupe lipopeptida i to:

- ITUD-F1 (5'-TTG AAY GTC AGY GCS CCT TT-3') i ITUD-R1 (5'-TGC GMA AAT AAT GGS GTC GT-3') za detekciju gena odgovornih za biosintezu iturina, bacilomicina D i mikosubtilina;
- SRFA-F1 (5'-AAA GGA TCC AGC CGA AGG GTG-3') i SRFA-R1 (5'-AAA AAG CTT GTT TTT CTC AAA GAA C-3') za detekciju gena odgovornih za biosintezu surfaktina;
- FENB-F1 (5'-CCT GGA GAA AGA ATA TAC CGT ACC Y-3') i FENB-R1 (5'-GCT GGT TCA GTT KGA TCA CAT-3'), za detekciju gena odgovornih za biosintezu fengicina B [148].

Sve PCR reakcije izvršene su prateći metodu koju su opisali Čung i saradnici [148]. Dobijeni PCR produkti su detektovani horizontalnom elektroforezom na 1 % agaroznom gelu i posmatrani na UV svetlu. PCR produkti su zatim prečišćeni korišćenjem gotovog paketa QiaquickPCR Purification Kit prema uputstvu proizvođača. Umnožena DNK je sekvencionirana u Macrogen Europe Inc. Obrada sekvenci je izvršena uz pomoć ClustalW sofvera. Analiza sličnosti dobijenih sekvenci je

obavljena putem BLAST algoritma, poređenjem sa dostupnim sekvencama u GenBank bazi podataka na NCBI serveru.

#### 4.4.6 Ekstrakcija lipopeptida iz ekstraćelijskog filtrata izolata *Bacillus* sp. PPM3

Ekstrakcija lipopeptida iz ekstraćelijskog filtrata *Bacillus* sp. PPM3 vršena je metanolom, nakon taloženja u kiseloj sredini, prateći metodu koju su opisali Čen i saradnici [52]. Taloženje lipopeptida izvršeno je dodavanjem 6M HCl u 1 L ekstraćelijskog filtrata *Bacillus* sp. PPM3, dobijenog na način kao što je opisano u odeljku 4.4.1 ove disertacije, do dostizanja pH vrednosti 2. Ovakva suspenzija ostavljena je u frižideru na 4 °C preko noći, radi pospešivanja taloženja, a nakon toga je centrifugirana pri brzini od 10000 obrtaja/minuti, tokom 15 minuta. Nakon centrifugiranja, gornja faza je odbačena, a talog žute boje, koji sadrži lipopeptide, ekstrahovan je metanolom, u odnosu 1:5, u 3 uzastopna ciklusa. Dobijeni metanolni ekstrakt lipopeptida uparavan je do suvog, na rotirajućem uparivaču (BÜCHI Rotavapor R-210, Švajcarska) na temperaturi od 35 °C i pritisku od 200 mbara. Dobijeni prah je zatim rastvoren u 10 mL Tris-HCl pufera (pH=7,5) i filtriran kroz sterilni filter promera pora 0,22 µm (LLG, PES). Krajnja koncentracija sirovog lipopeptidnog ekstrakta iznosila je 65 mg/mL.

#### 4.4.7 Ispitivanje antifungalne aktivnosti lipopeptidnog ekstrakta *Bacillus* sp. PPM3

Antifungalna aktivnost lipopeptidnog ekstrakta (LE) *Bacillus* sp. PPM3 ispitana je u testu inhibicije rasta plesni. Na površinu sterilnih PDA podloga naneto je po 100 µl lipopeptidnog ekstrakta (koncentracije 5 mg/mL) utrljavanjem sterilnim staklenim štapićem po Drigalskom. Na centar podloga je zatim naneto po 5 µL suspenzije spora ( $10^5$  spora/mL) svake od ispitivanih plesni, pojedinačno, i ploče su inkubirane na 25 °C, 5 dana. Kontrole su sadržale samo PDA podlogu. Nakon inkubacije meren je prečnik micelije svake od plesni, izrasle u kontroli i uzorcima, i izračunat je procenat inhibicije rasta (PGI, %) po formuli 4.2. Kao pozitivna kontrola korišćen je antimikotik nistatin (5 mg/mL) rastvoren u Tris-HCl puferu pH vrednosti 7,5. Eksperiment je urađen u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti uz standardnu devijaciju.

### 4.5 Ispitivanje mogućnosti primene morskog soja *Bacillus* sp. PPM3

#### 4.5.1 Ispitivanje fitotoksičnosti *Bacillus* sp. PPM3

Fitotoksičnost morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 određena je ispitivanjem indeksa klijavosti (GI) semena dve biljke poreklom iz organske proizvodnje: mungo pasulja (*Vigna radiata*, (L.) Wilczek); proizvođača Beyond Niš, Srbija; poreklo Kina i kukuruza kokičara (*Zea mays* var. *everta*, L.); proizvođača Alnatura GmbH, Nemačka. Najpre su semena sterilisana potapanjem u vodeni rastvor etanola, koncentracije 70 zapreminskih % u trajanju od 5 minuta, uz povremeno mešanje. Zatim je etanol odliven i u isti sud dodata je dovoljna zapremina natrijum-hipohlorita (NaClO) krajnje koncentracije 6 zapreminskih %. Semena su tretirana rastvorom NaClO još 10 minuta uz povremeno mešanje, nakon čega je rastvor odliven, a semena ispirana sterilnom destilovanom vodom najmanje tri puta. Semena su zatim osušena u laminarnoj komori na sobnoj temperaturi. Pripremljena je radna kultura i EF *Bacillus* sp PPM3 kao što je opisano u odeljcima 4.1 i 4.4.1 ove disertacije.

Stepen klijavosti ispitan je na sledeći način: Po 15 sterilnih semena raspoređeno je na dno staklene Petri kutije (prečnika 85 mm) koja je sadržala sterilan filter papir, pridržavajući se tehnike aseptičkog rada. Semena su zatim tretirana sa 1 mL ćelijske suspenzije krajnje koncentracije  $10^5$  CFU/mL, odnosno sa 1 mL EF *Bacillus* sp. PPM3, dok su semena u kontrolnim pločama tretirana sa 1 mL sterilne destilovane vode. Petri kutije sa semenima ostavljene su u mraku na 25 °C u trajanju od 7 dana.

Fitotoksični efekat ćelija i metabolita, odnosno EF morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 je određen izračunavanjem procenta relativne klijavosti (RK), relativnog rasta korenka (RRK) i indeksa klijavosti (GI) upotrebom sledećih jednačina:



$$RK, \% = \frac{\text{broj proklijalih semena uzorka}}{\text{broj proklijalih semena u kontroli}} * 100 \quad (4.4)$$

$$RRK, \% = \frac{\text{srednja vrednost dužine korenka uzorka}}{\text{srednja vrednost dužine korenka kontrole}} * 100 \quad (4.5)$$

$$GI, \% = \frac{RK * RRK}{100} \quad (4.6)$$

Na osnovu dobijenih vrednosti GI izvršena je karakterizacija upotrebljene formulacije. Naime, ukoliko je  $GI < 25$ , formulacija je okarakterisana kao vrlo fitotoksična; ako je  $26 < GI < 65$ , formulacija se smatra fitotoksičnom i ako je vrednost  $66 < GI < 100$  formulacija nije fitotoksična i smatra se pogodnom za primenu u poljoprivredi. Ukoliko su vrednosti indeksa klijavosti  $GI > 101$ , takva formulacija se karakteriše kao fitonutrijent, odnosno fitostimulant i pogodna je za upotrebu u poljoprivredi u vidu fertilizatora [149].

#### 4.5.2 Ispitivanje uticaja primene *Bacillus* sp. PPM3 *in vivo* na rast kukuruza

Eksperiment je obavljen sa biljkom kukuruza (*Zea mays* var. *everta*, L.) gajenom u supstratu, odnosno zemljištu sledećih karakteristika: pH 7,08; 1,23 %  $\text{CaCO}_3$ ; 13 % humusa; 0,65 % N; 219 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$  i 244 mg  $\text{K}_2\text{O}$  na 100 g supstrata, koje je sterilisano u autoklavu na 120 °C u trajanju od 20 minuta. Sterilizacija semena, priprema inokuluma i ekstraćelijskog filtrata *Bacillus* sp. PPM3 izvršena je kao što je opisano u odeljku 4.4.1 ove disertacije. Uticaj soja *Bacillus* sp. PPM3 na parametre rasta kukuruza ispitan je u nekoliko tretmana. Naime, ogled je sadržao bikontrolni (I) i tretman stimulacije (II) rasta biljke, primenom ćelijske suspenzije (S) i EF *Bacillus* sp. PPM3 na zemljište ili seme.

Biokontrolni tretmani (I) obuhvatali su sledeće:

- Tretman patogenom (P), odnosno pozitivna kontrola, u kome su netretirana semena zasađena u supstrat, veštački zaražen suspenzijom spora biljnog patogena *F. graminearum* ( $10^6$  spora u mL) finalne koncentracije od 50 mL/kg supstrata.
- Tretman zemljišta ćelijskom suspenzijom (I-zS), odnosno ekstraćelijskim filtratom *Bacillus* sp. PPM3 (I-zEF). Zemljište prethodno zaraženo sporama biljnog patogena *F. graminearum*, tretirano je ćelijskom suspenzijom odnosno EF (finalne koncentraciji 40 mL na kg supstrata), ubrizgavanjem odgovarajuće zapremine inokuluma, odnosno EF, na dubini na kojoj se nalazilo i samo seme;
- Tretman semena ćelijskom suspenzijom (I-sS), odnosno EF (I-sEF). Sterilisana i suva semena su potopljena u suspenziju ćelija, odnosno ekstraćelijski filtrat *Bacillus* sp. PPM3 (40 mL na kg semena) u trajanju od 1 h, nakon čega su semena osušena u aseptičnim uslovima na sobnoj temperaturi, a zatim zasađena na dubini od 1 cm u saksije koje su sadržale 1 kg supstrata koji je pethodno zaražen sporama biljnog patogena *F. graminearum*;

Tretmani stimulacije (II) obuhvatali su sledeće:

- Tretman zemljišta ćelijskom suspenzijom (II-zS), odnosno EF *Bacillus* sp. PPM3 (II-zEF). Sterilno zemljište inokulisano je ćelijskom suspenzijom, odnosno EF *Bacillus* sp. PPM3 (finalne koncentracije 40 mL na kg supstrata), ubrizgavanjem odgovarajuće zapremine inokuluma, odnosno EF, na dubini na kojoj se nalazilo i samo seme;
- Tretman semena ćelijskom suspenzijom (II-sS), odnosno EF *Bacillus* sp. PPM3 (II-sEF). Sterilna semena su potopljena u suspenziju ćelija, odnosno EF *Bacillus* sp. PPM3 (40 mL na kg semena) u trajanju od 1 h, nakon čega su semena osušena u aseptičnim uslovima na sobnoj temperaturi, a zatim zasađena na dubini od 1 cm u saksije koje su sadržale 1 kg supstrata.
- Kontrolni tretman (K) u kome su netretirana semena zasađena u zemljište tretirano samo sterilnom destilovanom vodom.

Nakon primene svih tretmana biljke su gajene u uslovima relativne vlažnosti od 60 %, temperature od 25 °C, i dnevno/noćnog ciklusa od 16 h/8 h. Biljke su gajene do stadijuma dva lista, odnosno 14 dana.

Efekat tretmana na izgled biljke (učestalost oboljevanja biljaka) i parametre rasta (ukupnu dužinu korena, visinu izdanka, sirovu i suhu masu izdanka) zabeležen je nakon 14 dana. Učestalost oboljevanja biljke određena je na osnovu procenta izraslih biljaka sa znacima infekcije iz tretmana (I) u odnosu na biljke iz pozitivne kontrole (P). Za izračunavanje ukupne suve mase klijanaca, cele biljke sušene su u sušnici na 60 °C do konstantne mase. Eksperiment je urađen u tri ponavljanja, sa pet biljaka po tretmanu, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ponavljanja uz standardnu devijaciju.

#### 4.6 Sinteza i funkcionalizacija filmova na bazi polisaharida iz morskih algi

Sinteza filmova na bazi polisaharida iz morskih algi (agara i alginata) vršena je metodom izlivanja filmova iz polimernog rastvora i otparavanja rastvarača.

##### Materijali

Korišćeni su agar-agar (Torlak, Srbija), alginat (natrijum-alginat srednjeg viskoziteta, Sigma Aldrich, MO, SAD), glicerol (99 % čistoće, LACHEMA, Češka Republika), bakar-sulfatpentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , Zorka Pharma, Srbija), natrijum-karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), dinatrijumhidrogenfosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), proizvođača CENTROHEM iz Srbije. Ekstraćelijski filtrat izolata *Bacillus* sp. PPM3 (EF) dobijen po metodi opisanoj u odeljku 4.4.1 ove disertacije.

##### 4.6.1 Sinteza agarnih filmova

Filmovi na bazi agara pripremljeni su rastvaranjem agara u odgovarajućoj zapremini destilovane vode uz zagrevanje do 100 °C i neprestano mešanje na magnetnoj mešalici kako bi se dobio rastvor finalne koncentracije 2 %. Nakon potpunog rastvaranja agara temperatura rastvora je snižena na 60 °C, a zatim je dodat glicerol do finalne koncentracije od 30 % (u odnosu na masu agara) uz konstantno mešanje još najmanje 1 h. Na ovaj način dobijen je osnovni rastvor polimera. Nakon mešanja, 20 mL pripremljenog rastvora polimera polako je izliveno u plastične Petri kutije (prečnika 85 mm) izbegavajući formiranje mehurića, a zatim su kutije ostavljene da se suše 48 h na 37 °C. Ovako pripremljeni filmovi predstavljali su kontrolne uzorke i dodeljena im je oznaka AG. Funkcionalizacija filmova, odnosno dobijanje filmova sa potencijalnim PGP svojstvom izvršena je dodavanjem EF izolata *Bacillus* sp. PPM3, direktnim umešavanjem u osnovni rastvor polimera nakon dodatka glicerola (60 °C) do finalne koncentracije 10 % (računato na zapreminu rastvora). Filmogeni rastvori (AG-EF) su mešani na magnetnoj mešalici 30 min, a zatim izliveni u Petri kutije (prečnika 85 mm) i sušeni na isti način kao i kontrolni filmovi.

Za pripremu agarnih filmova sa izmenjenim mehaničkim i barijernim svojstvima za potencijalnu primenu u poljoprivredi, korišćen je metod *in situ* mineralizacije, odnosno istovremene sinteze polimera i mineralnih faza [130]. Obrazovanje mineralne faze obavljeno je u dva koraka. Najpre je  $\text{CuSO}_4$ , finalne koncentracije 5 mM, direktno dodat u osnovni rastvor polimera (AG), kao i rastvor suplementiran EF *Bacillus* sp. PPM3 (AG-EF), i rastvori su mešani na magnetnoj mešalici na temperaturi od 60 °C, 15 minuta. Nakon toga, u rastvor su dodati mineralni prekursori u formi 5 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , za sintezu Cu-karbonatne, odnosno 5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , za sintezu Cu-fosfatne mineralne faze. Rastvori su mešani još 30 min, nakon čega su izliveni i sušeni na identičan način kao i kontrolni filmogeni rastvori. Nakon sušenja, dobijeni su mineralizovani filmovi sa bakar-karbonatnom fazom, oznaka AG-CuC i AG-EFCuC, kao i filmovi mineralizovani Cu-fosfatnom fazom, oznaka AG-CuP i AG-EFCuP. Svi sintetisani filmovi, čuvani su u uslovima temperature od 25 °C i relativne vlažnosti vazduha od 50 % do daljih analiza.

#### 4.6.2 Sinteza alginatnih filmova

Osnovni rastvor polimera pripremljen je rastvaranjem odgovarajuće količine alginata (finalne koncentracije 2 %) u destilovanoj vodi uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici na 50 °C. Zatim je dodat plastifikator u formi glicerola (30 %, u odnosu na masu alginata) i mešanje je nastavljeno još najmanje 1 h, odnosno do potpunog rastvaranja alginata. Rastvor je potom polako izliven u plastične Petri kutije (prečnika 85 mm) izbegavajući formiranje mehurića, i ostavljen da se suši 48 h na 25 °C. Ovako pripremljeni filmovi predstavljali su kontrolne uzorke (AL). Funkcionalizacija filmova, odnosno dobijanje filmova sa potencijalnim PGP svojstvom izvršena je dodavanjem EF izolata *Bacillus* sp. PPM3, direktnim umešavanjem EF u rastvor polimera nakon dodavanja glicerola, do finalne koncentracije 10 zapreminskih %. Filmogeni rastvori (AL-EF) su mešani na magnetnoj mešalici 30 min, a zatim izliveni u Petri kutije (prečnika 85 mm) i sušeni na isti način kao i kontrolni filmovi.

Za dobijanje filmova izmenjenih mehaničkih i barijernih svojstava i sa potencijalnom primenom u poljoprivredi, korišćen je metod eksternog umrežavanja [114], potapanjem suvih formiranih kontrolnih (AL) i funkcionalizovanih (AL-EF) filmova u 2 % rastvor CuSO<sub>4</sub> u trajanju od 30 minuta. Nakon isteka vremena filmovi su isprani destilovanom vodom kako bi se odstranio višak nevezanih soli, a potom sušeni na sobnoj temperaturi (25 °C) tokom 48 h. Umreženim filmovima dodeljene su sledeće oznake: AL-Cu, označavajući alginatne filmove bez EF i AL-EFCu, označavajući filmove sa EF *Bacillus* sp. PPM3. Potpuno suvi filmovi čuvani su u uslovima temperature od 25 °C i relativne vlažnosti vazduha od 50 % do daljih analiza.

#### 4.6.3 Sinteza agarno-alginatnih filmova

Kopolimerni filmovi na bazi agara i alginata dobijeni su mešanjem prethodno pripremljenih osnovnih rastvora polimera alginata i agara u odnosu 1:1, tako da je krajnja koncentracija polimera u rastvoru iznosila 2 %. Osnovni rastvor polimera agara pripremljen je po metodi opisanoj u 4.6.1 odeljku ove disertacije. Osnovni rastvor polimera alginata pripremljen je na isti način kao što je opisano u 4.6.2 odeljku ove disertacije. Rastvor kopolimera je mešan na magnetnoj mešalici na temperaturi od 50 °C sat vremena. Koncentracija dodatog plastifikatora (glicerola) iznosila je 30 % (u odnosu na krajnju masu polimera). Osnovni rastvor polimera je potom izliven u plastične Petri kutije (prečnika 85 mm) izbegavajući formiranje mehurića i ploče su ostavljene da se suše 48 h na 25 °C. Ovako pripremljeni filmovi predstavljali su kontrolne uzorke (AA).

Funkcionalizacija filmova, odnosno dobijanje filmova sa potencijalnim PGP svojstvom dodavanjem EF izolata *Bacillus* sp. PPM3 (AA-EF), izvršena je na isti način kao što je opisano u 4.6.2 odeljku disertacije. Za pripremu agarno-alginatnih filmova izmenjenih mehaničkih i barijernih svojstava za potencijalnu primenu u poljoprivredi, korišćen je metod eksternog umrežavanja, kao što je opisano u 4.6.2 odeljku ove disertacije. Suvi, neumreženi (AA i AA-EF) i umreženi kopolimerni agarno-alginatni filmovi (AA-Cu i AA-EFCu) čuvani su u uslovima temperature od 25 °C i relativne vlažnosti vazduha od 50 % do daljih analiza..

### 4.7 Karakterizacija filmova na bazi polisaharida iz morskih algi

#### 4.7.1 Morfološka svojstva filmova

Površinska morfologija filmova ispitana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) na uređaju JEOL JSM-6390LV SEM (JEOL, Japan) koristeći napon od 10 kV. Pre vizualizacije uzorci su potpuno osušeni na sobnoj temperaturi i prekriveni tankim slojem zlata koristeći uređaj Bal-Tec SCD Sputter Coater (Nemačka). Fotografski snimci površine filmova zabeleženi su pri uveličanju od 230 puta.

#### 4.7.2 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

FT-IR spektri sintetisanih filmova snimani su na uređaju IRRaffinity-1 (Shimadzu, Japan). Svi uzorci su analizirani na sobnoj temperaturi (25 °C) u opsegu talasnih brojeva 500-4000 cm<sup>-1</sup>, sa rezolucijom od 4 cm<sup>-1</sup>. Pre analize uzorci su spraseni, pomešani sa KBr i tabletirani uz pomoć hidraulične prese na 350 MPa i osušeni na 110 °C.

#### 4.7.3 Optička svojstva filmova

Optička svojstva sintetisanih filmova određena su spektrofotometrijski, merenjem transmisije svetlosti kroz površinu filmova u ultra ljubičastom i vidljivom (UV-Vis, engl.-*Ultra Violet and Visible*) regionu u opsegu talasnih dužina od 200 do 800 nm, koristeći uređaj Shimadzu UV 1800. Filmovi su sečeni u pravougane trake i smešteni u kvarcne kivete. Prazna kiveta služila je kao slepa proba. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti 3 individualna merenja. Za sve uzorke filmova, na osnovu snimljenih spektara određeni su koeficijenti transmisije (k<sub>TPAR</sub>) fotosintetički aktivnog regiona (PAR, engl.- *Photosynthetically Active Region*) izračunavanjem srednjih vrednosti transmitanci u regionu talasnih dužina od 400-700 nm, po metodi koju su opisali Voks i Šetini [96].

#### 4.7.4 Mehanička svojstva filmova

Mehanička svojstva filmova određena su prema ASTM (American Society for Testing and Materials) standardnoj metodi D882-10 [150] na dinamometru Instron M1185 (Instron Canton, USA) pri brzini istezanja od 2 mm/min. Osnovni parametri kao što su: zatezna čvrstoća (σ, MPa), izduženje pri kidanju (ε, %) i Jungov modul elastičnosti (EM, MPa) ispitani su na uzorcima isečenim u pravougaone trake dužine 30 mm i širine 5 mm. Pre merenja debljina svakog filma izmerena je u pet nasumičnih tačaka uz pomoć mikrometra (Festa 14040, Nanjing Sulang Ltd., Kina), a za izračunavanje parametara korišćena je srednja vrednost debljine svakog filma. Pre svakog merenja, uzorci su kondicionirani najmanje 24 h u uslovima temperature od 25 °C i vlažnosti vazduha od 50 %.

#### 4.7.5 Barijerna svojstva filmova

Barijerna svojstva filmova određena su merenjem propustljivost vodene pare (engl. *Water Vapor Permeability*, WVP) kroz površinu filmova, prema ASTM E96-95 metodi [151]. Metalne čaše sa otvorom prečnika 35 mm su napunjene destilovanom vodom (obezbeđujući relativnu vlažnost od 100 % unutar čaše), a uzorci filmova isečeni na diskove odgovarajućeg prečnika, postavljeni su na otvor svake čaše i fiksirani uz pomoć metalnog rama. Čaše su zatim izmerene na analitičkoj vagi i stavljene u komoru sa konstantnim uslovima temperature (25 °C) i relativne vlažnosti (50 %). Mase uzoraka su merene na svakih sat vremena u toku 8 h. Iz linearnog grafika zavisnosti promene mase od vremena, određene su vrednosti brzine prenosa vodene pare (engl.-*Water Vapor Transmission Rate*- WVTR) prema jednačini :

$$WVTR = \frac{\Delta G}{t \cdot A} \quad (4.8),$$

gde je ΔG promena mase (g), t vreme (h) u kome je došlo do gubitka mase, A površina otvora čaše (m<sup>2</sup>), a ΔG/t nagib linearne grafičke zavisnosti G od t.

Propustljivost vodene pare (WVP) izračunata je prema sledećoj jednačini:

$$WVP = \frac{WVTR \cdot L}{\Delta p} \quad (4.9),$$

gde je L srednja vrednost debljine filmova (m), a Δp razlika pritiska vode između unutrašnje i spoljašnje strane filma (Pa).

## 4.8 Ispitivanje bioloških svojstava filmova

### 4.8.1 Ispitivanje antifungalnog svojstva funkcionalizovanih alginatnih filmova

Antifungalna svojstva funkcionalizovanih filmova na bazi alginata, ispitana su u testu sa patogenim plesnima iz roda *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. verticillioides* i *F. proliferatum*). Sposobnost plesni da rastu i prodru kroz površinu filma ispitana je na sledeći način. Najpre su filmovi isečeni na kvadrate površine 1x1 cm<sup>2</sup>, a zatim postavljeni na površinu sterilnih PDA podloga (prečnika 45 mm). Po 5 µl suspenzije spora plesni (10<sup>6</sup> spora po mL) naneto je pipetom na površinu svakog filma, pojedinačno. PDA podloge bez filmova, zasejane samo suspenzijom spora ispitivane plesni, služile su kao kontrola. Sve ploče su inkubirane 5 dana na 25 °C u mraku. Nakon inkubacije filmovi koji su ispoljili antifungalno svojstvo su uklonjeni sa površine podloge koja je ispitana na rast plesni, nakon inkubacije dodatnih 48 h na temperaturi od 25 °C.

### 4.8.2 Ispitivanje uticaja prevlaka na bazi alginata namenjenih malčiranju, na rast biljke *in vivo*

Ispitivanje uticaja odabranih formulacija alginatnih filmova na rast biljke, izvršeno je korišćenjem sprej-tehnike formiranja prevlaka, odnosno filmova na površini zemljišta. Naime, 100 g zemlje (pH 7,08; 1,83 % CaCO<sub>3</sub>; 13 % humusa; 0,65 % N; 209 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i 104 mg K<sub>2</sub>O na 100 g supstrata), raspoređeno je u plastične saksije, perforiranog dna, prečnika 85 mm, i po 5 semena mungo pasulja (*Vigna radiata*, (L) Wilczek) zasađena su na dubini od približno 1 cm. Površina zemlje tretirana je sa po 20 mL filmogenog rastvora na bazi alginata (AL) i alginata koji je sadržao ekstraćelijski filtrat *Bacillus* sp. PPM3 (AL-EF), pojedinačno, raspršivanjem celokupne zapremine uz pomoć sprej raspršivača. Nakon raspršivanja, saksije su ostavljene da se osuše do obrazovanja tankog filma na površini. Nakon sušenja, površine saksija sa formiranim filmovima prelivene su sa 100 mL 2 % rastvora CuSO<sub>4</sub> kako bi se iniciralo umrežavanje. Nakon 30 minuta, višak tečnosti je odliven, a saksije su prebačene u staklenik. Površina zemlje tretirana samo destilovanom vodom, poslužila je kao kontrola. Sve biljke iz tretmana i kontrola, gajene su 21 dan u stakleniku u uslovima temperature od 25 °C, pri relativnoj vlažnosti od 60 %, i dnevno/noćnim ciklusom od 16 h/8 h. Sve saksije postavljene su u sud sa vodom. Nivo vode od približno 3 cm, održavan je konstantnim dodavanjem odgovarajuće zapremine vode po potrebi.

Parametri rasta biljke mereni su na svakih sedam dana tokom 21 dana, i poređeni sa kontrolom gajenom u odsustvu prevlaka, odnosno malča. Zabeleženi su visina svake biljke, ukupna širina listova i suva masa biljaka iz pojedinačnih tretmana i kontrole. Suva masa biljaka određena je nakon sušenja u sušnici na 60 °C do konstantne mase. Ogled je urađen u tri ponavljanja, sa pet biljaka po tretmanu, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ponavljanja uz standardnu devijaciju.

## 4.9 Statistička obrada podataka

Svi rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti uz standardnu devijaciju (SD). Svi eksperimenti su rađeni u tri ponavljanja. Statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti ± SD određena je sa 95 % verovatnoće (p < 0,05) primenom jednofaktorske analize varijanse (One way ANOVA) i Tukey-evog testa korišćenjem Origin Pro 9.0 programa.

## 5 REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1 Izolacija bakterija iz obalskog sedimenta Crvenog mora

Polazna hipoteza u okviru ovog istraživanja zasnovana je na tome da je morska sredina bogat izvor različitih grupa mikroorganizama koji poseduju jedinstvena morfo-fiziološka svojstva i da se među njima mogu naći i oni koji će ispoljiti biostimulativno, odnosno PGP dejstvo na rast biljke. Iz uzorka morskog sedimenta Crvenog mora, nakon inkubacije na čvrstim hranjivim podlogama: TSA, ISP1 agaru i siromašnoj hranjivim materijama, modifikovanoj R2A podlozi (dodavanjem NaCl krajnje koncentraciji 2 % za izolaciju mikroorganizama iz morske vode) izolovano je ukupno 32 bakterijske kulture različitih morfoloških karakteristika (tabela 5.1). Najobilniji rast zabeležen je na ISP1 podlozi pa je ova podloga odabrana za dalju kultivaciju izolovanih bakterija. Mikroskopskim posmatranjem izolovanih kultura, ustanovljeno je da je većina izolata štapićastog oblika (23 izolata), Gram pozitivne reakcije (18 izolata), sa sposobnošću obrazovanja endospora (20 izolata, tabela 5.1).

**Tabela 5.1.** Bakterije izolovane iz morskog obalskog sedimenta Crvenog mora i njihove osnovne morfološke karakteristike

Oznaka izolata	Rast na čvrstoj hranljivoj podlozi			Oblik ćelije	Bojenje po Gramu*	Prisustvo endospora
	TSA	ISP1A	R2A			
PPH1	+	+	+	štapić	+	da
PPH1-1	+	+	+	štapić	+	da
PPT1	+	++	++	štapić	+	da
PPT1-Z	+	++	++	štapić	+	da
PPT1-B	+	+	+	štapić	+	da
PPM3	+	++	+	štapić	+	da
PPM4	+	+	+	koka	-	ne
PPM5	+	+	+	koka	-	ne
PPM6	+	+	+	koka	-	ne
PPM7	+	+	+	koka	-	ne
PPM8	+	+	+	koka	+	ne
PBH1	+	++	+	koka	+	ne
KH1	+	++	+	štapić	+	ne
DC1-4	+	++	+	štapić	+	da
DCHA-2	+	+	+	koka	-	ne
DCHI	+	+	+	štapić	+	da
DCHI-I	+	++	+	štapić	+	da
DCHI-V	+	++	+	štapić	+	da
2.16	+	++	+	koka	-	ne
2.17	+	++	+	štapić	+	da
2.31	+	++	+	štapić	+	ne
OT	+	++	++	štapić	+	da
OT-T	+	++	++	štapić	+	da
OC	+	++	++	koka	-	ne
Z2	+	++	+	štapić	+	da
Z2-E	++	++	++	štapić	+	da
Z5	++	++	++	štapić	+	da
Z9	+	+	+	štapić	+	da
Z10	++	++	+	štapić	+	da
KH1	++	++	+	štapić	+	ne
KMS1	+	+	+	štapić	-	ne
M6	+	+	+	koka	-	ne

(++) veoma obilan rast; (+) obilan rast; (+/-) slab rast; (-) nema rasta; \*Bojenje po Gramu: (+)-pozitivna reakcija; (-)-negativna reakcija

## 5.2 Utvrđivanje prisustva mehanizama stimulacije biljnog rasta

Izolacija i karakterizacija novih bakterijskih sojeva iz različitih niša životne sredine, kao i uvrđivanje njihovih PGP svojstava od velike je važnosti, pre svega sa aspekta razumevanja ekološkog značaja svih korisnih svojstava koja oni mogu ispoljiti. Izolacija mikroorganizama sa PGP svojstvima i razumevanje mehanizama kojim ostvaruju pozitivan uticaj na rast biljke čine osnovu za njihovu buduću komercijalizaciju i efikasnu upotrebu u praksi [4,7]. Kako je jedan od osnovnih ciljeva ove doktorske disertacije bio izolacija i odabir bakterijskih sojeva sa potencijalnom primenom u agroindustriji kao stimulatora biljnog rasta, izolovane čiste kulture su ispitane na prisustvo nekih od osnovnih PGP mehanizama. Detaljna karakterizacija i identifikacija izolata sa poželjnim PGP svojstvima biće obrađena u narednim poglavljima ove disertacije.

Direktni mehanizmi podrazumevaju stimulaciju biljnog rasta prvenstveno snabdevanjem biljke osnovnim hranljivim materijama, a utvrđivanje ovih mehanizama smatra se ključnim u odabiru sojeva za potencijalnu upotrebu u održivoj poljoprivredi. Kako azot i fosfor predstavljaju najvažnije elemente koji ograničavaju rast i razvoj biljaka, u okviru ove faze istraživanja, ispitana je sposobnost izolovanih bakterijskih sojeva da fiksiraju atmosferski azot i rastvaraju neorganski fosfat. Od ukupnog broja izolata iz morskog sedimenta, udeo onih koji su posedovali ova svojstva je iznosio 37,5 %, odnosno 12 izolata (tabela 5.2). Sve izolate koji su ispoljili neki od dva ispitivana mehanizma, karakterisale su osobine tipične za predstavnike *Bacillus* roda (štapiceaste, Gram-pozitivne, sporogene bakterije) [143].

Sposobnost PGP bakterija da indirektno stimulišu rast biljaka odnosi se pre svega na njihov biokontrolni potencijal, odnosno sposobnost zaštite biljke, smanjivanjem ili sprečavanjem negativnih efekata patogenih organizama, najčešće gljiva [3,7]. Imajući u vidu da biokontrolna aktivnost bakterija može biti posledica više interakcija, ispoljenih u isto vreme, ispitana je antifungalna aktivnost izolata, merenjem sposobnosti sprečavanja rasta patogenih plesni, kao i njihova sposobnost da proizvode različite hidrolitičke enzime. Od ukupno 32 izolata iz morskog sedimenta Crvenog mora, sposobnost inhibicije rasta patogenih plesni zabeležena je kod 18 izolata (56,2 %). Sposobnost produkcije različitih hidrolitičkih enzima utvrđena je kvalitativno, gajenjem izolata na čvrstim podlogama koje su sadržale supstrate za određene enzime: proteaze, hitinaze, celulaze i amilaze. Od ukupnog broja izolovanih bakterija, hidrolitička aktivnost zabeležena je kod 22 izolata (68,7 %) (tabela 5.2).

**Tabela 5.2.** Prisustvo mehanizama stimulacije biljnog rasta kod bakterija izolovanih iz obalskog sedimenta Crvenog mora

Oznaka izolata	Mehanizmi stimulacije biljnog rasta			
	Direktni mehanizmi		Indirektni mehanizmi	
	Biološka fiksacija N <sub>2</sub>	Rastvaranje fosfata	Inhibicija rasta patogenih plesni	Proizvodnja hidrolitičkih enzima
PPH1	-	-	-	+
PPH1-1	-	-	-	+
PPT1	-	-	+	+
PPT1-Z	-	-	+	+
PPT1-B	-	-	+	+
PPM3	+	+	+	+
PPM4	-	-	-	-
PPM5	-	-	-	-
PPM6	-	-	-	-
PPM7	-	-	-	-
PPM8	-	-	-	-
PBH1	-	-	-	-
KH1	+	-	-	+
DC1-4	+	+	+	+
DCHA-2	-	-	+	-
DCHI	+	+	+	+
DCHI-I	+	+	+	+
DCHI-V	+	+	+	+
2.16	-	-	+	+
2.17	-	+	+	+
2.31	+	-	+	+
OT	+	-	+	+
OT-T	+	-	+	+
OC	-	-	-	+
Z2	-	-	+	+
Z2-E	-	-	+	+
Z5	+	-	+	+
Z9	+	-	+	+
Z10	+	+	+	+
KH1	-	-	-	-
KMS1	-	-	-	-
M6	-	-	-	-

(+) pozitivna reakcija/prisustvo svojstva;

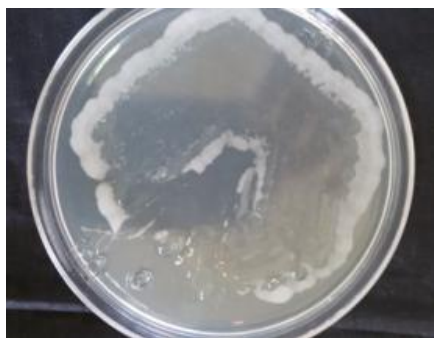
(-) negativna reakcija/odsustvo svojstva

## 5.2.1 Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta

### 5.2.1.1 Biološka fiksacija azota

Biološka fiksacija azota, kao jedan od osnovnih direktnih mehanizama stimulacije biljnog rasta, ispitana je gajenjem bakterijskih izolata na Jensenovoj podlozi bez izvora azota. U okviru ovog istraživanja, od 32 izolata iz morskog sedimenta, 12 izolata pokazalo je sposobnost rasta na datoj podlozi ukazujući na sposobnost fiksiranja atmosferskog N<sub>2</sub> (tabela 5.2). Svi izolati koji su pokazali sposobnost fiksiranja atmosferskog azota, rasli su u vidu bezbojnih, ispupčenih, sluzavih kolonija. Izolat sa oznakom PPM3 pokazao je najobilniji rast, sa izraženom sluzavošću kolonija koje su se karakterisale i specifičnom „gumastom” strukturom ivica (slika 5.1).





**Slika 5.1.** Rast izolata PPM3 na Jensenovoj hranljivoj podlozi bez izvora azota

Literaturni podaci ukazuju da se među azotofiksatorima nalaze brojni rodovi bakterija, od kojih je većina izolovana iz rizosfere različitih biljnih kultura [4]. Ove bakterije su dobro istražene, njihov potencijal fiksiranja atmosferskog azota dobro dokumentovan, a komercijalni proizvodi na bazi ovih korisnih bakterija postoje na tržištu već više od tri decenije [4,24]. Međutim, podaci o raznovrsnosti i potencijalu morskih azotofiksatora su oskudni. Uopšteno, mali broj istraživanja posvećen je azotofiksirajućem potencijalu mikrobiote morskih ekosistema, a zbog poteškoća u gajenju ovih mikroorganizama u laboratorijskim uslovima, identifikacija novih sojeva sa ovom sposobnošću uglavnom uključuje molekularne metode detekcije *nifH* gena odgovornog za sintezu enzima nitrogenaze prisutnog kod svih diazotrofa [30]. Međutim, nedavna istraživanja koja su objavili Jusuf i saradnici ukazuju da je najveća nitrogenazna aktivnost izmerena upravo kod sojeva kod kojih nije amplifikovan *nifH* gen [31]. Takođe, Zer i saradnici [27] su pokazali da nukleotidna sekvenca ovog gena može znatno varirati, kako među različitim vrstama, tako i u okviru iste vrste, pa je jasno da prisustvo, odnosno odsustvo ovog gena ne znači nužno da konkretni organizam proizvodi enzim i vrši azotofiksaciju. Ispoljavanje ovog svojstva je u velikoj meri uslovljeno složenim ekološkim faktorima date sredine. Stoga, mnogi autori ističu da su metode zasnovane na kultivaciji azotofiksirajućih morskih mikroorganizama u ovom slučaju opravdanije od molekularnih metoda i *in-situ* merenja, jer omogućavaju povezivanje azotofiksacije sa konkretnom vrstom u konkretnoj sredini [28,31,152].

U okviru ovog istraživanja uspešno je kultivisano 12 izolata sa sposobnošću azotofiksacije. Specifična viskozna morfologija izraslih kolonija, uočena kod svih izolata, smatra se jednim od zaštitnih mehanizama kojima se bakterije prilagođavaju specifičnim uslovima morske sredine. Obrazovanje „sluzavog omotača” ima ulogu i u regulaciji stope transfera kiseonika u vodenoj sredini, štiteći tako enzim nitrogenazu uključenu u proces azotofiksacije [153]. Slična morfološka svojstva primećena su i kod drugih morskih heterotrofnih azotofiksatora koji su uspešno gajeni u laboratoriji na podlozi bez izvora azota. Nedavno su Džon i Salim [154], ispitiujući prisustvo PGP svojstava kod mikrobiote obalskog sedimenta Indijskog okeana, izolovali 26 sojeva bakterija, a od toga 18 sa sposobnošću azotofiksacije i sličnih morfoloških karakteristika, dok je iz sedimenta Arapskog mora izolovano 20 azotofiksatora, koji su na podlozi bez azota rasli u vidu sluzavih, gumastih kolonija [31]. Poredeći rezultate ovog istraživanja sa dostupnom literaturom, može se zaključiti da su bakterije azotofiksatori dobro distribuirane unutar morskih obalskih ekosistema. Udeo azotofiksirajućih sojeva, izolovanih u ovom istraživanju, iznosio je 37,5 % što je skoro dvostruko više u odnosu na nalaze navedenih skorašnjih istraživanja. Kvantifikacija stepena azotofiksacije nije obuhvaćena ovim istraživanjem, međutim izolacija i uspešna kultivacija sojeva iz manje istraženih staništa, kao što je morska sredina, sa sposobnošću azotofiksacije ima višestruki značaj, pre svega sa aspekta razumevanja njihove ekološke uloge i doprinosa u procesu kruženja azota u prirodi. Sa druge strane, imajući u vidu značaj azotofiksacije kao PGP mehanizma u održivoj poljoprivredi, izolacija i identifikacija novih sojeva sa azotofiksirajućim potencijalom otvara niz mogućnosti za njihovu potencijalnu primenu.

### 5.2.1.2 Rastvaranje fosfata

Sposobnost rastvaranja fosfata ispitana je gajenjem bakterijskih izolata na podlozi sa trikalcijum fosfatom, kao izvorom neorganskog fosfora. Od ukupnog broja izolovanih bakterija u okviru ovog istraživanja, sposobnost rastvaranja neorganskog fosfata zabeležena je kod 7 izolata (tabela 5.2). Efikasnost izolovanih sojeva da nerastvorne forme fosfata prevedu u forme dostupne biljkama, određena je na osnovu izračunavanja indeksa rastvaranja fosfata (SI) prema jednačini 4.1. SI izolata koji su pokazali prisustvo ovog mehanizma kretao se u opsegu od  $1,5\pm 0,09$  do  $5,6\pm 0,01$ . Najefikasnijim se pokazao izolat sa oznakom PPM3, čiji je SI iznosio  $5,6\pm 0,01$  (tabela 5.3).

**Tabela 5.3.** Efikasnost bakterija poreklom iz obalskog sedimenta Crvenog mora u rastvaranju nerorganskog fosfata, određena merenjem indeksa rastvaranja fosfata (SI)

Oznaka izolata	Indeks rastvaranja fosfata, SI
PPM3	$5,60\pm 0,01$
DC1-4	$4,41\pm 0,01$
DCHI	$1,58\pm 0,02$
DCHI-I	$1,80\pm 0,01$
DCHI-V	$4,15\pm 0,04$
2.17	$2,50\pm 0,03$
Z10	$3,98\pm 0,02$

Upotreba zemljišnih mikroorganizama sa sposobnošću rastvaranja fosfata (PSM) kao biofertilizatora je već godinama unazad predmet mnogobrojnih istraživanja [35,36]. Korisni efekti primene PSM odavno su prepoznati, i veliki je broj literaturnih podataka koji pokazuju da inokulacija zemljišnim sojevima PSM iz rodova: *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Azotobacter* znatno utiče na povećanje pinosa, kao i stepena usvajanja fosfora kod šećerne trske, pšenice, kukuruza, krompira, paradajza, kikirikija i mnogih drugih kultivara [35,40,41]. Razvoj korena, izdanka i stabla, formiranje semena i cveta, sazrevanje plodova, fiksacija azota, kao i otpornost biljaka na različite bolesti, takođe se dovode u vezu sa sposobnošću biljke da usvaja fosfor [34].

Od svih izolata iz obalskog sedimenta Crvenog mora ispitanih u okviru ovog istraživanja, udeo sojeva sa potencijalom rastvaranja fosfata, iznosio je 21 %, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima o rasprostranjenosti PSM unutar mikrobiote morskih obalskih ekosistema [155,156]. Naime, Džejedev i saradnici [156] su zabeležili udeo PSM izolovanih iz obalskog područja Indijskog okeana od 16 %, dok su De Souza i saradnici [155] ispitujući grupu mikroorganizama izolovanih iz različitih morskih niša Indijskog zaliva, uključujući ostrvske obale i pučinu, utvrdili udeo PSM od 14 %. Takođe, isti autori utvrdili su da su ovi mikroorganizmi u većem broju, i znatno češće izolovani iz obalskih i plažnih područja nego iz „slobodne“ vode. Među izolovanim PSM dominirali su pripadnici roda *Bacillus* i *Pseudomonas*, a svi izolovani sojevi pokazali su sposobnost rastvaranja trikalcijum fosfata u *in vitro* eksperimentima [155,156]. Bakterije stanovnici morskih ekosistema, značajni su činioци u procesu kruženja fosfora, a aktivno doprinose i primarnoj produkciji, učestvujući u ciklusu ugljenika. Rasprostranjenost i brojnost PSM unutar morskih ekosistema varira značajno, i uslovljena je složenim biotičkim interakcijama kao i specifičnim uslovima spoljašnje sredine [156].

Poredeći efikasnost rastvaranja fosfata kroz SI (tabela 5.3), uočava se da neki od izolata u ovom istraživanju (PPM3, DC1-4 i DCHI-V) pokazuju veće indekse rastvorljivosti fosfata od PSM soja *Pseudomonas* spp. 54RB izolovanog iz zemljišta ( $SI=4,10\pm 0,07$ ), a čije je stimulatívno dejstvo na prinos i rast pšenice potvrđeno i u *in vivo* eksperimentima [37]. Maksimalna vrednost SI među bakterijskim sojevima izolovanim u ovom istraživanju, zabeležena je kod izolata PPM3 ( $5,60\pm 0,01$ ) i značajno je viša nego kod spomenutog PGP zemljišnog soja [37], ali niža od vrednosti koju su zabeležili Džon i Salim [154] kod morskog izolata *Serratia marcescens* MB-9 ( $6,19\pm 0,04$ ).

Rezultati dobijeni u ovoj fazi istraživanja ukazuju na bogatstvo i potencijal specifičnog morskog sedimenta Crvenog mora bakterijama koje ispoljavaju dva osnovna direktna mehanizma stimulacije rasta biljaka. Visok SI sojeva PPM3, DC1-4 i DCHI-V ukazuje na potencijal za upotrebu ovih sojeva u stimulaciji rasta biljaka, naročito na poljoprivrednim površinama sa niskim sadržajem fosfora.

## 5.2.2 Indirektni mehanizmi stimulacije biljnog rasta

### 5.2.2.1 Antifungalna aktivnost izolata obalskog sedimenta Crvenog mora

Antifungalna aktivnost izolata ispitana je u konfrontacijskom testu sa nekim od tipičnih biljnih patogenih plesni: *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Mucor* sp., i *Alternaria* sp.. Rezultati pokazuju da je 18 izolata pokazalo sposobnost inhibicije rasta barem jednog od 4 testirana biljna patogena. Najveći broj izolata (16) redukovalo je rast plesni *A. flavus*, 10 izolata je redukovalo rast *F. graminearum*, 7 izolata redukovalo je rast plesni *Alternaria* sp., dok je inhibitorno dejstvo na rast plesni *Mucor* sp. ispoljilo svega 3 izolata (PPM3, Z2 i Z2-E, tabela 5.4). Stepent antifungalne aktivnosti, izražen preko procenta inhibicije rasta (PGI), varirao je među samim izolatima, kao i u zavisnosti od ispitivane plesni. Većina izolata ispoljila je nisku (PGI < 51 %) do umerenu antifungalnu aktivnost (PGI = 51-61 %), dok je manji broj izolata (PPM3, DC1-4, DCHI-V, Z2-E i Z10) pokazao visoku antifungalnu aktivnost (PGI > 61 %) [141].

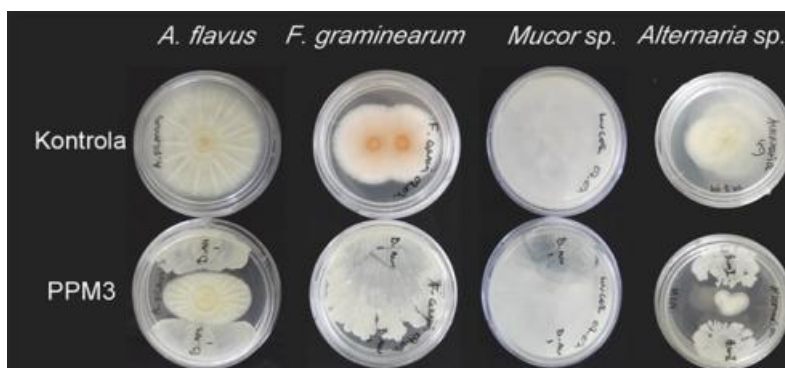
**Tabela 5.4.** Antifungalna aktivnost izolata morskog sedimenta Crvenog mora u konfrontacijskom testu sa plesnima: *A.flavus*, *F.graminearum*, *Alternaria* sp. i *Mucor* sp. prikazana kao procenat inhibicije rasta patogena (PGI, %).

Oznaka izolata	Procenat inhibicije rasta patogena, PGI (%)			
	<i>A. flavus</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.
PPT1	51±0,75	47±1,20	43±1,17	-
PPT1-Z	53±1,52	49±1,25	44±1,54	-
PPT1-B	52±1,75	45±1,28	45±1,21	-
PPM3	69±1,52	99,9±0,00	87±1,20	99,9±0,00
DC1-4	65±1,53	75±2,01	-	-
DCHA-2	45±1,81	-	-	-
DCHI	52±2,01	-	56±1,25	-
DCHI-I	55±2,14	-	56±1,47	-
DCHI-V	55±2,18	-	65±2,57	-
2.17	39±2,43	-	-	-
2.31	51±2,15	-	-	-
OT	43±2,17	42±1,02	-	-
OT-T	35±1,54	47±1,25	-	-
Z2	-	57±1,48	-	50±1,20
Z2-E	68±1,14	-	-	53±2,47
Z5	-	54±1,78	-	-
Z9	57±1,26	54±2,14	-	-
Z10	68±2,01	-	-	-

(-) negativna reakcija/odsustvo svojstva

Izolat sa oznakom PPM3, izdvojio se kao najefikasniji među 18 izolata sa ovom sposobnošću, inhibirajući rast svih ispitivanih patogena (tabela 5.4). Procenat inhibicije rasta plesni varirao je u zavisnosti od vrste plesni sa kojom je izolat PPM3 bio u kontaktu, krećući se od 69±1,52 % u slučaju *A. flavus*, 87±1,20 % u slučaju plesni *Alternaria* sp., do potpune inhibicije rasta (99,9 %) u slučaju plesni *F. graminearum* i *Mucor* sp. (slika 5.2). Na osnovu dobijenih rezultata i prema klasifikaciji bakterija sa antagonističkim potencijalom koju su predložili Raman i saradnici [141], izolat PPM3 se

može okarakterisati kao soj sa visokom (PGI=61-75 %) i veoma visokom (PGI >75 %) antagonističkom aktivnošću.



**Slika 5.2.** Prikaz antifungalne aktivnosti izolata PPM3 u konfrontacijskom testu sa patogenim plesnima: *A. flavus*, *F. graminearum*, *Mucor* sp. i *Aternaria* sp. gajenim na PDA hranljivoj podlozi tokom 5 dana na 25 °C.

Plesni iz rodova: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* i *Mucor*, predstavljaju široko rasprostranjene biljne patogene koji uzrokuju veliki broj oboljenja poljoprivrednih biljnih kultura.

Prosečno 25 % globalne proizvodnje useva biva izgubljeno kao posledica infekcije biljaka patogenim plesnima [46,157]. *A. flavus* je uobičajeni patogen kukuruza, kikirikija, i badema, a kontaminacija ovom plesni izaziva ogromne gubitke u prinosu osnovnih žitarica prehrambene industrije (pšenice, raži, ovsa, ječma i drugih). Ova plesan proizvodi aflatoksine, grupu jako toksičnih mikotoksina, koji ispoljavaju kancerogeno, mutageno, imunosupresivno i teratogeno dejstvo [59,158]. Filamentozne gljive iz roda *Fusarium* široko su rasprostranjene u zemljištu, a izazivaju niz oboljenja, takozvane fuzarioze, listova, stabala, korena i semena velikog broja kultivara (žitarica, voćarskih i povrtarskih kultura). Veoma su otporne na različite uslove sredine, te mogu preživljavati iz sezone u sezonu saprobno na raspadajućem biljnom materijalu, dok u zemljištu mogu opstati i do 16 godina. Proizvode niz mikotoksina parazitirajući na velikom broju žitarica, mahom pšenici, kukuruzu i ječmu, a u povoljnim uslovima za rast, vrste roda *Fusarium* mogu uzrokovati gubitke u prinosu pšenice, koji prevazilaze i 50 % [159]. Gljivice iz roda *Alternaria*, su oportunističke gljivice uglavnom saprofitskog načina života ali se mogu naći i u zemljištu i tkivima biljaka. Uzrokuju oboljenja u vidu hloroza i nekroza na listovima i stabljikama, uglavnom mladih biljaka, ali mogu inficirati i plodove [160]. Vrste roda *Mucor* nastanjuju zemljište i biljke, a veliku štetu nanose u postžetvenom periodu, naročito uskladištenim plodovima (krastavcu i paradajzu) kao i semenima. Truljenje usled infekcije izazvane plesnima iz roda *Mucor* može izazvati značajne gubitke u voćarstvu, pogotovo kada vodno-sanitarni uslovi skladištenja nisu adekvatni [159,161].

Tradicionalne metode koje se koriste u suzbijanju biljnih patogena, kao što su rotacija useva, uzgoj rezistentnih kultura, i primena hemijskih pesticida, iako uglavnom pouzdane, pokazale su se nedovoljno efikasnim u kontroli mnogih bolesti važnih biljnih kultura. Upotreba fungicida, fumiganata i drugih hemijskih sredstava, takođe negativno utiče na ekonomski aspekt proizvodnje, kao i na sve veću pojavu rezistentnosti kod patogena. Takođe, primena ovih hemijskih sredstava ima ozbiljne negativne posledice na stanje ekosistema i na zdravlje ljudi. Stoga istraživanje i razvoj alternativnih mera, kao što su biološke mere suzbijanja biljnih patogena imaju globalni značaj [5,24,157].

Jedan od potencijalnih mehanizama kojim se može objasniti antagonistički efekat morskih izolata dobijen u konfrontacijskom testu sa patogenim plesnima u okviru ovog istraživanja, jeste postojanje kompeticije između patogena i biokontrolnog agensa. Biokontrolni agens i plesan, nalazeći se u bliskom kontaktu, bore se za slobodan prostor i dostupne hranljive materije. U ovom slučaju biokontrolni agens kao kompetitivniji, onemogućava nastanjanje plesni i njen dalji razvoj i rast, oduzimajući joj osnovne uslove za opstanak [5]. Kako mnogi autori ističu, prisustvo samog

biokontrolnog agensa predstavlja značajan faktor u biokontroli, a zasnovan je pre svega na brznoj kolonizaciji prostora i/ili formiranju biofilмова koji predstavljaju fizičku prepreku za rast patogenih plesni [1,5]. U literaturi postoji dosta podataka koji ukazuju na veliki biokontrolni potencijal zemljišnih PGP sojeva predstavnika rodova *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Paenibacillus*, sposobnih da u određenom stepenu spreče rast biljnih patogena [3,56,162,163]. Poredeći rezultate o stepenu antagonističkog dejstva izolata iz ovog istraživanja sa dostupnim literaturnim podacima o zemljišnim biokontrolnim agensima, može se zaključiti da obalski sediment Crvenog mora predstavlja bogat izvor organizama sa zavidnim antagonističkim potencijalom, čime je potvrđena jedna od osnovnih hipoteza ovog doktorskog rada. Takođe, inhibicija rasta različitih grupa biljnih patogenih plesni, ostvarena samo jednim biokontrolnim agensom, kao što je to slučaj sa izolatom PPM3, predstavlja dodatnu poželjnu karakteristiku kod odabira kandidata za pripremu biopesticida i njihovu primenu u polju [4].

#### 5.2.2.2 Proizvodnja hidrolitičkih enzima

Sposobnost proizvodnje različitih hidrolitičkih enzima (proteaza, hitinaza, celulaza i amilaza) utvrđena je kvalitativno, merenjem prečnika svetlih zona (zona hidrolize) oko izraslih kolonija gajenih na podlogama sa supstratima za navedene enzime.

**Tabela 5.5.** Sposobnost bakterijskih izolata iz obalskog sedimenta Crvenog mora da proizvode hidrolitičke enzime, izražena kao zona hidrolize

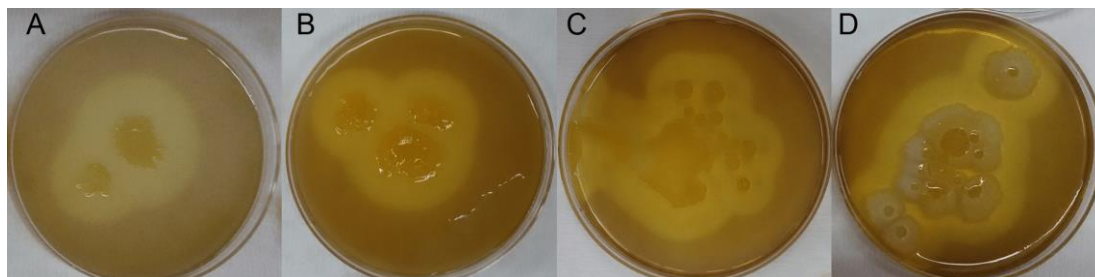
Oznaka izolata	Zona hidrolize, mm			
	Proteaze	Hitinaze	Celulaze	Amilaze
PPH1	15±0,04	-	-	+
PPH1-1	15±0,02	-	-	-
PPT1	-	-	15±0,01	13±0,01
PPT1-Z	-	-	15±0,05	12±0,05
PPT1-B	-	-	15±0,03	14±0,04
PPM3	35±0,07	32±0,07	35±0,01	30±0,06
KH1	-	-	-	13±0,04
DC1-4	18±0,09	-	16±0,01	15±0,01
DCHI	19±0,01	-	-	-
DCHI-I	19±0,09	-	-	-
DCHI-V	20±0,17	-	-	-
2.16	13±0,08	-	-	-
2.17	-	-	11±0,03	11±0,01
2.31	-	-	13±0,07	-
OT	-	-	12±0,04	9±0,10
OT-T	-	-	12±0,01	8±0,07
Z2	-	-	10±0,10	15±0,02
Z2-E	-	-	10±0,09	13±0,07
Z5	-	-	8±0,06	11±0,09
Z9	-	-	9±0,09	11±0,07
Z10	-	-	15±0,10	19±0,07

(-) negativna reakcija/odustvo svojstva

Od ukupno 21 izolata koji su pokazali pozitivnu reakciju za proizvodnju nekog od ispitivanih enzima, najveći broj izolata (14) pokazao je sposobnost hidrolize skroba u podlozi, odnosno produkcije amilaza, a isti broj izolata pokazao je sposobnost produkcije celulaze. Pozitivna reakcija za proizvodnju proteaza, zabeležena je kod 8 izolata, a samo jedan izolat (PPM3) ispoljio je sposobnost proizvodnje hitinaza (tabela 5.5).



Mnoge antagonističke bakterije sposobne su da proizvode hidrolitičke enzime koji razgrađuju ćelijski zid gljiva i tako putem predatorstva ispolje biokontrolno svojstvo. Rezultati dobijeni u okviru ove faze istraživanja pokazuju da izolati poreklom iz sedimenta Crvenog mora poseduju značajan hidrolitički potencijal. Od svih izolovanih bakterija, izolat oznake PPM3 ponovo se istakao kao najpotentniji soj, pokazujući sposobnost proizvodnje svih enzima, a jedini je pokazao sposobnost hidrolize hitina, odnosno proizvodnje hitinaza (slika 5.3). Takođe, najveće zone hidrolize zabeležene su upravo kod ovog izolata, na podlozi za detekciju proteazne aktivnosti ( $35 \pm 0,07$  mm, tabela 5.5).



**Slika 5.3.** Prikaz proteazne (A), hitinazne (B), celulazne (C) i amilazne (D) aktivnosti morskog izolata PPM3 u *in vitro* kvalitativnom testu

Literaturni podaci pokazuju da su mnoge bakterije, naročito predstavnici *Bacillus* vrsta., koje su u određenoj meri bile sposobne da spreče rast biljnih patogena *in vitro*, takođe imale sposobnost da proizvode enzime:  $\beta$ -glukanaze, hitinaze, proteaze, celulaze i druge [60,65,164]. Kako navode Basurto-Kadena i saradnici [65], antifungalna i antimikrobna aktivnost soja *B. subtilis* 21 izolovanog iz rizosfere jagode, je upravo posledica proizvedenih hidrolitičkih enzima, odnosno proteaza, dok Gotam i saradnici [164] umereni antagonistički potencijal, zabeležen u *in vitro* eksperimentu sa dva soja *B. amyloliquefaciens* prema plesni *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, pripisuju celulolitičkoj i hitinolitičkoj aktivnosti sojeva.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj fazi, može se zaključiti da pored kompetitivne prednosti u odnosu na patogena, upravo proizvodnja enzima koji slabe ćelijski zid plesni, narušavajući tako njihov strukturni integritet, može biti odgovorna, ili doprinosi antagonističkoj aktivnosti izolata iz ovog istraživanja. Ovome u prilog ide činjenica da su izolati morskog sedimenta, kod kojih je zabeležena umerena do visoka antifungalna aktivnost, takođe bili proizvođači najmanje dva od četiri ispitana enzima (tabele 5.4 i 5.5). Takođe, najveći antagonistički potencijal prema plesnima, zabeležen je kod izolata PPM3, koji je u enzimskom testu pokazao najveći hidrolitički potencijal. Izrazita antagonistička aktivnost izolata PPM3 u ovom slučaju može biti posledica prvenstveno proizvodnje proteaza. Vezujući se za spoljašnji manoproteinski sloj ćelijskog zida gljiva, proteaze narušavaju i „otvaraju“ proteinsku strukturu zida, izlažući tako unutrašnje glukanske slojeve i hitinske mikrofibrile drugim enzimskim kompleksima (hitinaze,  $\beta$ -glukanaze) koje će dodatno oštetiti ćeliju plesni i eventualno dovesti do njene smrti [64].

Na osnovu dobijenih rezultata, odnosno utvrđivanja i zastupljenosti direktnih i indirektnih mehanizama stimulacije biljnog rasta kod izolata iz morskog sedimenta, može se zaključiti da su indirektni mehanizmi dominantniji. Na osnovu prisustva ispitivanih mehanizama, izolat sa oznakom PPM3 pokazao se kao najpotentniji za potencijalnu primenu kao PGP agens, te je stoga odabran za dalja istraživanja u okviru ove disertacije.


### 5.3 Identifikacija PGP izolata PPM3

Identifikacija i karakterizacija sojeva sa PGP svojstvima, predstavlja ključan korak za njihovu primenu u realnim uslovima, odnosno na poljoprivrednim površinama, jer osigurava odgovarajući odabir sojeva koji nisu štetni za useve, ljude i životinje, kao i životnu sredinu uopšte [1]. Kako je izolat oznake PPM3 odabran kao najpotentniji od svih izolata iz sedimenta Crvenog mora, u ovoj fazi pristupilo se njegovoj detaljnoj karakterizaciji i identifikaciji.

#### 5.3.1 Morfološka i fiziološka karakterizacija izolata PPM3

Preliminarna karakterizacija i identifikacija odabranog izolata PPM3 izvršena je izvođenjem standardnih morfoloških, fizioloških i biohemijskih testova kao što je opisano u Berdžijevom priručniku sistematske bakteriologije [143], kao i upotrebom API CH50 i API ZYM identifikacionih paketa, kao što je opisano u poglavlju 4.3.1 ove disertacije. U tabeli 5.6 prikazane su osnovne morfološke i fiziološke karakteristike izolata PPM3. Na osnovu izvršenih testova, ustanovljeno je da je izolat PPM3 Gram-pozitivna, aerobna, pokretljiva bakterija, štapićastog oblika, sposobna da produkuje ovalne spore. Na čvrstoj hranljivoj podlozi raste u vidu izdignutih, sluzavih kolonija razgranatih ivica. Proizvodi enzime katalazu i oksidazu, redukuje nitrata, a pokazuje i sposobnost hidrolize želatina. Rezultati dobijeni nakon ovih ispitivanja pokazali su da izolat PPM3 poseduje odlike karakteristične za pripadnike roda *Bacillus* [143].

**Tabela 5.6.** Osnovne morfološke i eko-fiziološke karakteristike odabranog izolata PPM3

Morfološke karakteristike izolata PPM3	
Izgled kolonije	izdignuta, sluzava, granata, bela
Izgled, oblik i veličina ćelije (µm)	 Štapići 1,6 x 3,7
Prisustvo endospora	+
Eko-fiziološke karakteristike izolata PPM3	
Temperaturni opseg	4-55 °C
Temperaturni optimum	30 °C
pH opseg	5-9
pH optimum	7
NaCl opseg	0-10 %
NaCl optimum	5
Proizvodnja katalaze	+
Proizvodnja oksidaze	+
Redukcija nitrata	+
Korišćenje citrata	+
Indol test	-
Vog-Prosker test	+
Metil-crveno test	-
Hidroliza želatina	+

(+) pozitivna reakcija/prisustvo svojstva; (-) negativna reakcija/odsustvo svojstva

Sa aspekta potencijalne primene mikroorganizama kao stimulatora biljnog rasta, određivanje biohemijskih karakteristika odabranih sojeva predstavlja jedan od ključnih koraka [7]. Upotrebom API 50CH fermentacionog i APY ZYM enzimskog identifikacionog paketa, izvršena je biohemijska karakterizacija i identifikacija izolata PPM3. Nakon obrade rezultata i poređenjem sa API Web bazom podataka, izolat PPM3 pokazao je najveći stepen sličnosti (približno 95 %) sa referentnim sojevima vrste *B. amyloliquefaciens*. U tabeli 5.7. prikazan je biohemijski profil izolata PPM3. Osnovne biohemijske karakteristike izolata su sposobnost fermentacije: glukoze, fruktoze, galaktoze, manoze, celobioze, maltoze, inulina, rafinoze, fukoze, L-arabinoze, dulcitol, ksilitola, N-acetilglukozamina i glicerola. Negativne reakcije su zabeležene u testovima sa, melibiozom, sorbozom, D-turanozom, melezitozom, amidonom i ketoglukonatima. Enzimski profil dobijen upotrebom API ZYM paketa (tabela 5.8) pokazuje da izolat PPM3 ima sposobnost proizvodnje velikog broja industrijski važnih enzima, kao što su: fosfataze i fosfohidrolaze, lipaze,  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukozidaze,  $\alpha$ -galaktozidaze i N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaze. Sposobnost proizvodnje enzima  $\beta$ -glukozidaze, kao i N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaza važna je sa aspekta ispoljavanja antifungalne aktivnosti soja PPM3, jer su se ovi enzimi pokazali efikasnim u razgradnji ćelijskog zida patogena [165,166]. Izolat PPM3 pokazao je sposobnost iskorišćavanja izuzetno velikog broja supstrata što ga sa aspekta potencijalne primene čini jako privlačnim.

**Tabela 5.7.** Fermentacioni profil odabranog izolata PPM3 određen na osnovu API 50CH gotovog paketa (Biomereux, France) nakon inkubacije na 30 °C tokom 48 h

Supstrat	Reakcija	Supstrat	Reakcija
Glicerol	+	Salicin	+/-
Eritrol	-	D-celobioza	+/-
D-arabinoza	-	D-maltoza	+/-
L-arabinoza	+	D-laktoza	+/-
Riboza	+	D-melibioza	+/-
D-ksiloza	+	D-saharoza	+
L-ksiloza	+	D-trehaloza	+
D-adonitol	+	Inulin	+
Metil- $\beta$ D-ksilopiranozid	+	D-melezitoza	-
D-galaktoza	+	Rafinoza	+
D-glukoza	+	Amidon	-
D-fruktoza	+	Glikogen	+
D-manoza	+/-	Ksilitol	+
L-ramnoza	+	Gentibioza	+
L-sorboza	-	D-turanoza	-
Dulcitol	+/-	D-ksiloza	+/-
Inositol	+	D-tagatoza	+/-
D-manitol	+	D-fukoza	+/-
D-sorbitol	+	L-fukoza	+/-
Metil- $\alpha$ D-manopiranozid	-	D-arabiol	+/-
Metil- $\alpha$ D-glukopiranozid	+	L-arabitol	+/-
N-Acetilglukozamin	+	Glukonat	+
Amigdalinalin	+	K-2-ketoglukonat	-
Arbutin	-	K-5-ketoglukonat	-
Eskulin	+		

(+) pozitivna reakcija; (-) negativna reakcija; (+/-) slabo pozitivna reakcija



**Tabela 5.8.** Enzimski profil izolata PPM3 određen na osnovu API ZYM gotovog paketa (Biomereux, France) nakon inkubacije na 30 °C tokom 48 h

Enzim	Rekcija	Enzim	Reakcija
Alkalna fosfataza	+/-	Naftol-AS-BI-fosfohidrolaza	+
Esteraza (C4)	+	$\alpha$ -galaktozidaza	+
Esteraza lipaza (C8)	+	$\beta$ -galaktozidaza	-
Lipaza (C14)	+	$\beta$ -glukuronidaza	-
Leucin arilamidaza	-	$\alpha$ -glukozidaza	+
Valin arilamidaza	+	$\beta$ -glukozidaza	+
Cistin arilamidaza	-	N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaza	+
Tripsin	-	$\alpha$ -manozidaza	-
$\alpha$ -himotripsin	+	$\alpha$ -fukozidaza	-

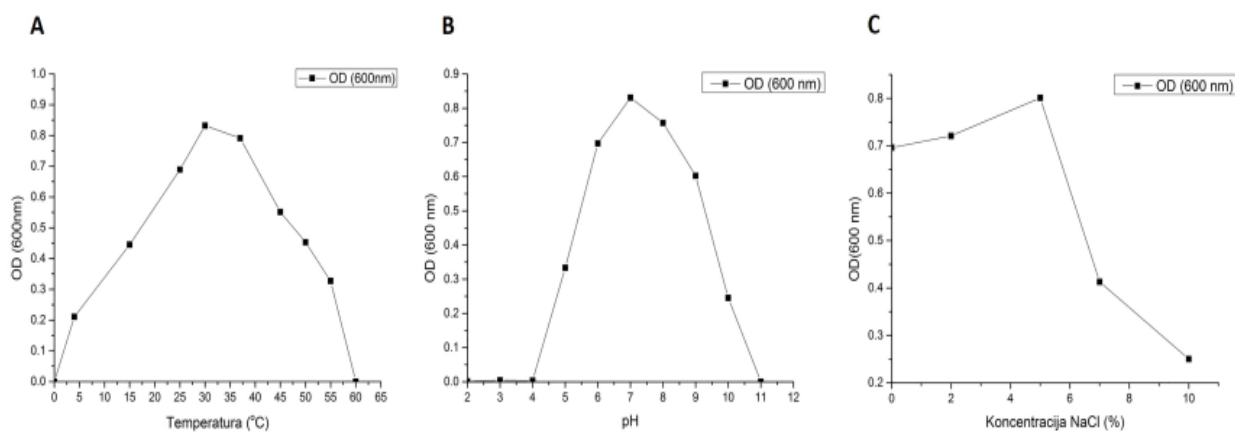
(+) pozitivna reakcija, (-) negativna reakcija, (+/-) slabo pozitivna reakcija

### 5.3.2 Eko-fiziološke karakteristike izolata PPM3

Razlike u ispoljenom efektu PGP sojeva u laboratoriji i u realnim uslovima sredine, u velikoj meri ograničavaju komercijalnu upotrebu ovih bakterija u agroindustriji [167]. Neke od ovih nedoslednosti svakako se mogu pripisati promenljivim fizičkim i hemijskim karakteristikama samih niša koje će inokulisane PGP bakterije okupirati. Zemljište je dinamična i nepredvidiva sredina, a preživljavanje inokulisanih PGP bakterija u datom staništu nekada nije uspešno, usled bolje adaptiranosti autohtone mikrobiote na date uslove. Takođe, koristan efekat koji ove bakterije ostvaruju na biljku u određenom klimatskom području ne znači da će on biti ostavaren i u drugačijim uslovima sredine [4,168]. Stoga je ispitivanje i razumevanje ekoloških osobina PGP bakterija izuzetno važno, ne samo za njihovu što efikasniju primenu u realnim uslovima sredine, već i sa aspekta tehnološke manipulacije ovim sojevima.

U ovoj fazi istraživanja, pristupilo se ispitivanju ekoloških karakteristika odabranog izolata PPM3. Imajući u vidu da temperatura, kiselost i mineralni sastav zemljišta, predstavljaju glavne faktore koji određuju sastav autohtonih mikrobnih zajednica i rasprostranjenost u određenom staništu, ispitan je uticaj temperature, pH i koncentracije soli na sposobnost rasta morskog izolata PPM3.

Izolat PPM3 pokazao je širok opseg tolerancije temperature (tabela 5.6, slika 5.4 A). Optimum rasta zabeležen je u opsegu temperatura od 15-50 °C, dok je najznačajniji rast bakterije zabeležen na temperaturi od 30 °C (OD=0,864). Najniža temperatura pri kojoj je zabeležen rast izolata PPM3 iznosila je 4 °C, dok je najviša temperatura na kojoj je bakterija rasla iznosila 55 °C. Izolat PPM3 pokazao je takođe i veliku toleranciju prema pH uslovima sredine (slika 5.4 B). Najpovoljniji uslovi za rast bakterije zabeleženi su u opsegu pH vrednosti između 6-9, dok je najveći rast ostvaren na pH vrednosti od 7, na šta ukazuju najviše vrednosti optičke gustine (OD=0,873). Značajniji rast uočen je i na pH vrednostima od 6 do 9, dok je iznad vrednosti pH od 10 i pri pH=5 rast bakterija bio znatno manji (OD<sub>pH10</sub>=0,251 i OD<sub>pH5</sub>=0,357). U uslovima pH 4 i niže nije zabeležen rast izolata PPM3. Tolerancija soja PPM3 na sadržaj mineralnih soli u podlozi ispitana je gajenjem bakterije u podlozi sa različitim sadržajem NaCl (slika 5.4 C). Soj PPM3 pokazao je sposobnost tolerancije i do 10 % soli u podlozi, dok je najobilniji rast zabeležen pri koncentraciji NaCl od 5 % (OD=0,823).



**Slika 5.4.** Rast izolata PPM3 pri različitim uslovima (A) temperature; (B) pH podloge; (C) koncentracije soli u podlozi. OD-optička gustina bakterijske suspenzije određena spektrofotometrijski, merenjem apsorbanca na 600 nm.

Temperatura je ključni faktor koji utiče na uspostavljanje kako mikrobioloških zajednica tako i vegetacijskog pokrivača. Naime, apsorpcijska moć korena biljaka zavisna je od temperaturnog režima zemljišta, a klijanje semena, razvoj klice i mlade biljke moguće je jedino pri povoljnim uslovima temperature [32]. Biljke sa druge strane, utiču na pH zemljišta. Preko korena različiti joni, voda, enzimi i drugi metaboliti, bivaju izlučeni u zemljište stvarajući specifične uslove koji će odrediti sastav mikrobne zajednice [4]. Široka temperaturna i pH tolerantnost koju je ispoljio izolat PPM3 je od velikog značaja sa aspekta njegove primene na poljoprivrednim površinama, jer upravo ukazuje na visok potencijal preživljavanja nakon inokulacije, bilo zemljišta ili same biljke. Temperaturni i pH režim zemljišta takođe utiču i na njegovu prirodnu rezistentnost, regulišući pojavu i razvoj samih patogena i proizvodnju sekundarnih metabolita [167,169]. Neke od osobina PGP bakterija u različitoj meri će se ispoljiti u različitim uslovima sredine. Biokontrolna aktivnost, pod velikim je uticajem temperature. Landa i saradnici [169] su utvrdili da je tretman zemljišta biokontrolnim sojevima *Bacillus megaterium* RGAF 51, *Paenibacillus macerans* RGA 101, *Pseudomonas fluorescens* RGAF 19 i *P. fluorescens* RG 26, uspešno smanjio rast plesni *Fusarium* sp., ali je opseg delovanja ovih bakterija znatno varirao pod uticajem temperature zemljišta. Drugi autori beleže smanjenu biokontrolnu aktivnost nekih PGP vrsta roda *Bacillus* u uslovima kiselog pH zemljišta [55,170]. Širok opseg temperature i pH na kojima je zabeležen rast morskog izolata PPM3 je i sa ovog aspekta poželjna karakteristika, jer ukazuje na potencijalnu kompetitivnu prednost ovog soja u odnosu na patogena ili druge biokontrolne agense u realnim uslovima sredine. Takođe, sposobnost izolata PPM3 da toleriše visoke temperature, ukazuje i na njegov veliki biotehnoški potencijal, čineći ga interesantnim kandidatom za primenu u industriji kao potencijalnog proizvođača termostabilnih sekundarnih metabolita.

Među sredinskim faktorima koji utiču na smanjenje produktivnosti osnovnih poljoprivrednih kultura, zaslanjenost zemljišta ima najveći uticaj, pogađajući skoro 50 % obradivih površina na svetskom nivou, čime predstavlja jedan od najzastupljenijih problema u savremenoj poljoprivredi [168]. Povećan sadržaj soli u zemljištu u znatnoj meri ograničava rast i razvoj biljaka, otežavajući usvajanje vode putem korenovog sistema, čime biljka dospeva u stanje „fiziološke suše”. Takođe, visok sadržaj jona, naročito natrijuma i hlora, deluje toksično na biljku narušavajući celokupan metabolizam [32]. Mikroorganizmi koji su sposobni da rastu u uslovima povećane koncentracije soli mogu potencijalno imati značajnu ulogu u poboljšavanju produktivnosti biljaka na zaslanjenim poljoprivrednim površinama. Literaturni podaci ukazuju da upotreba mikroorganizama sa različitim PGP svojstvima može ublažiti negativne efekte osmotskog stresa [168,171], a neki sojevi bakterija mogu i dodatno pospešiti rast biljaka u ovim uslovima [172]. Mehanizmi delovanja mikroorganizama u uslovima osmotskog stresa uključuju složenu mrežu signalnih puteva u regulaciji hormonalnog

statusa biljke; izlučivanje i akumulaciju signalnih molekula, osmoprotektanata, najčešće prolina; sekreciju egzopolisaharida; kao i uspostavljanje jonske homeostaze regulacijom  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  transporta korenovog sistema [168].

Morski izolat PPM3 pokazao je sposobnost rasta pri koncentraciji soli u podlozi od čak 10 %. Stepen tolerancije na povišene koncentracije soli kod ispitivanog izolata PPM3 je znatno viši od onog zabeleženog kod sojeva *B. amyloliquefaciens* QR9 i *B. amyloliquefaciens* SN13, a čiji je pozitivan uticaj, odnosno ublažavanje efekta osmotskog stresa kao i pospešivanje rasta biljke pririnča i kukuruza potvrđen u *in vivo* uslovima [172,173]. Značajna tolerancija kod izolata PPM3 na povišene koncentracije soli, može se objasniti specifičnošću staništa iz kojeg je soj izolovan. Takođe, pokazano je da bakterije koje proizvode egzopolisaharide ublažavaju efekte slanog stresa „zarobljavajući” katjone unutar svog matriksa čime smanjuju koncentraciju ovih jona u zoni korena biljke i onemogućavaju njihovo usvajanje [174]. Pokazano je već da soj PPM3 raste u vidu specifičnih izrazito sluzavih kolonija, što je naznaka produkcije egzopolisaharida. Prisustvo sluzavog omotača, može biti odgovorno za izrazito visoku toleranciju soli zabeleženu kod morskog izolata PPM3, što sa aspekta primene ovog soja u uslovima zaslanjenog zemljišta svakako predstavlja poželjnu karakteristiku.

### 5.3.3 Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata PPM3

Nakon izolacije hromozomalne DNK izolata PPM3 izvršena je amplifikacija gena koji kodira 16S rRNK male subjedinice ribozoma. Nakon PCR reakcije i sekvenciranja dobijena je sekvenca očekivane dužine (1502 bazna para) koja je nakon obrade analizirana poređenjem sa dostupnim 16S rRNK sekvencama iz GenBank baze podataka (Prilog 1., slika P-1.1). Konsenzus sekvenca 16S rRNK izolata PPM3 deponovana je u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojem KP715855. Utvrđen je visok stepen sličnosti nukleotidne sekvence izolata PPM3 sa sekvencama pripadnika *B. subtilis* grupe, odnosno dve vrste: *B. amyloliquefaciens* i *B. velezensis*, gde je prvih 100 poklapanja imalo stepen sličnosti od 99,87 % (Prilog 1, slika P-1.2). Sekvenca 16S rRNK gena je univerzalna i visoko konzervirana, a ovaj gen se intenzivno koristi u identifikaciji bakterija i predstavlja osnovu bakterijske klasifikacije. Međutim u slučajevima filogenetski bliskih, odnosno srodnih taksona, ovaj gen pokazao se kao nedovoljno diskriminatoran [175]. Imajući u vidu da je opšte prihvaćeni granični stepen identičnosti, odnosno podudaranja nukleotidnih sekvenci, za taksonomski nivo vrste 98,65 % [176], stepen podudaranja sekvence izolata PPM3 od 99,87 % sa velikim brojem sojeva iz *B. subtilis* grupe ukazuje na nemogućnost precizne identifikacije do nivoa vrste, ispitivanog izolata uz pomoć 16S rRNK gena.

Za razliku od 16S rRNK gena, smatra se da geni koji kodiraju sintezu proteina ispoljavaju mnogo veću genetičku varijabilnost i uspešno su primenjivani za klasifikaciju i identifikaciju filogenetski bliskih taksona [177,178]. GyrA gen kodira subjedinicu A DNK giraze, enzima koji pripada tipu II DNK topoizomeraza i ima važnu ulogu u DNK replikaciji. Upotreba GyrA gena se pokazala kao veoma efikasna u razlikovanju srodnih vrsta unutar *B. subtilis* grupe [146]. Obzirom na nemogućnost identifikacije izolata PPM3 analizom 16S rRNK gena, pristupilo se amplifikaciji GyrA gena. Upotrebom odgovarajućih parova prajmera i PCR analizom dobijen je produkt očekivane dužine (591 bp) (Prilog 1., slika P-1.3), a nakon obrade, konsenzus sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojem MF592262. Analizom i poređenjem sekvence sa dostupnim sekvencama GenBank baze podataka, dobijen je ponovo visok stepen sličnosti (99,83 % poklapanje sa prvih 100 sekvenci iz baze) sa istim predstavnicima vrsta *B. velezensis* i *B. amyloliquefaciens*. Na osnovu dobijenih rezultata sekvenciranja GyrA gena, može se zaključiti da se ni ovaj gen nije pokazao dovoljno diskriminatornim za preciznu identifikaciju izolata PPM3 do taksonomskog nivoa vrste.

Kompleksnu *B. subtilis* grupu čini veliki broj identifikovanih vrsta čiji predstavnici ispoljavaju veoma visok stepen sličnosti, a broj novoopisanih vrsta konstantno se povećava, pa je neke predstavnike gotovo nemoguće razlikovati upotrebom klasičnih taksonomskih parametara (morfo-fizioloških karakteristika, 16S rRNK sekvenciranja, određivanjem sadržaja guanozin-citozin

parova i FAME analizom) [6]. Čak i takozvani „zlatni standard bakterijske taksonomije”, odnosno eksperimentalno određivanje srodnosti na osnovu stepena hibridizacije DNK molekula (DDH, engl. - *DNK-DNK Hibridization*) često dovodi do pogrešnih zaključaka [179]. Nakon detaljne filogenomske analize, Fan i saradnici [6] predlažu uvođenje termina „operativna grupa *B. amyloliquefaciens*”, višeg taksonomskog nivoa od nivoa vrste, a koju čine: *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis* i *B. velezensis* predstavnici. Ovaj termin je predložen u pokušaju da se poboljša klasifikacija vrsta unutar predstavnika *B. subtilis* grupe, i doprinese tačnijoj i preciznijoj taksonomskoj nomenklaturi, kao i odvajanju zemljišnih, odnosno „pravih” *B. amyloliquefaciens* vrsta, od endofitnih *B. amyloliquefaciens* vrsta, odnosno *B. velezensis* vrsta. Na osnovu dobijenih rezultata i analize stepena homologije 16S rRNK i GyrA sekvence izolata PPM3 sa blisko srodnim vrstama iz „*B. amyloliquefaciens* operativne grupe”, izolat PPM3 se može smatrati pripadnikom ove predložene grupe. Ipak, imajući u vidu da je ova nova taksonomska jedinica još uvek u razmatranju, a da detaljna filogenomska analiza izolovanog morskog soja PPM3 nije postavljena kao predmet istraživanja ove disertacije, izolat PPM3 će u daljem tekstu biti označen kao *Bacillus* sp. PPM3. Uz to, važno je napomenuti da izolat *Bacillus* sp. PPM3 nije pokazao genetičku sličnost sa vrstama koje mogu biti potencijalno štetne za biljke, životinje i ljudsko zdravlje, što ga čini pogodnim za upotrebu kao PGP agensa.

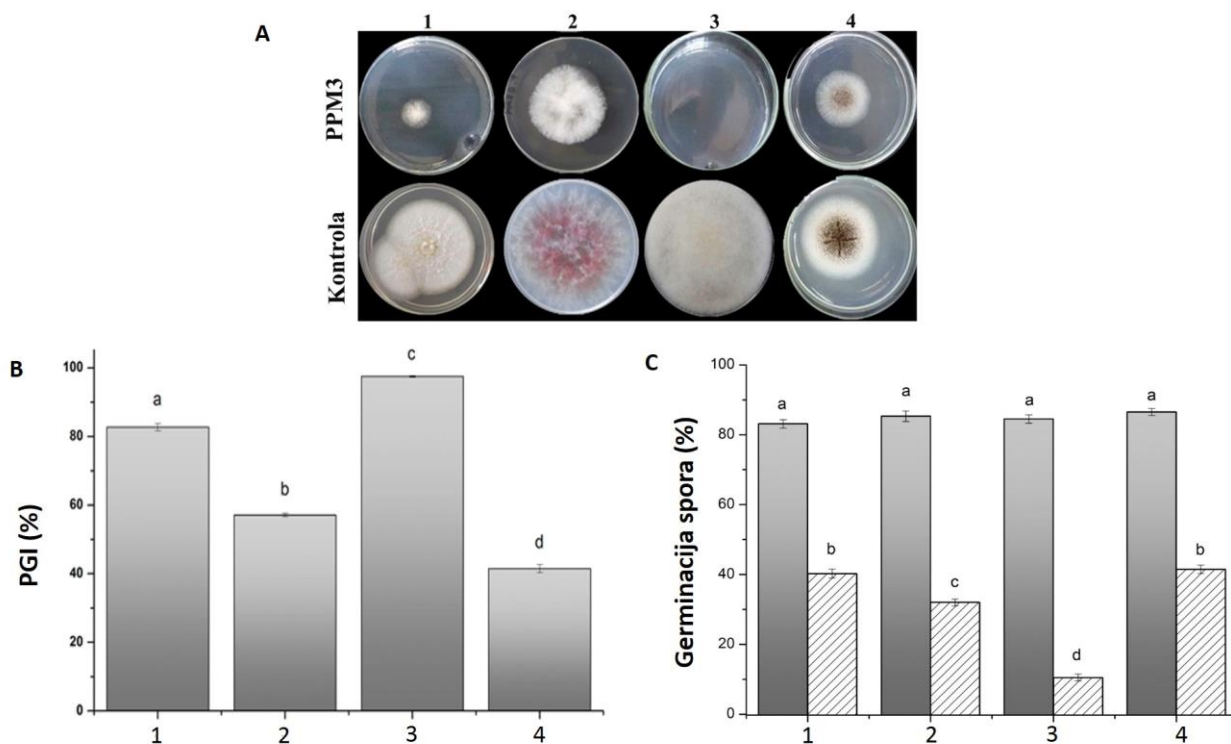
#### **5.4 Biokontrolna aktivnost i mehanizmi delovanja metabolita odabranog izolata *Bacillus* sp. PPM3**

Proizvodnja sekundarnih metabolita najrazličitijih hemijskih struktura omogućava PGP bakterijama efikasnije iskorišćavanje resursa iz okolne sredine, čime one mogu postati kompetitivnije u odnosu na patogene, ili druge biokontrolne agense prisutne u staništu [3]. Smatra se da primena formulacija na bazi metabolita, umesto živih ćelija, predstavlja bolju strategiju, koja će efikasnije doprineti kontroli biljnih patogena u polju [5]. Biokontrolna aktivnost odabranog izolata *Bacillus* sp. PPM3 može biti i posledica proizvodnje antifungalnih sekundarnih metabolita koji direktno inhibiraju rast patogena. Jedan od postavljenih ciljeva istraživanja u okviru ove disertacije bilo je i utvrđivanje potencijala primene odabranog PGP soja u agroindustriji. Imajući u vidu postavljene ciljeve istraživanja, a kako bi se procenila mogućnost primene formulacija na bazi metabolita soja *Bacillus* sp. PPM3, u narednoj fazi detaljno je ispitan biokontrolni potencijal ekstraćelijskog filtrata ovog soja.

##### **5.4.1 Efekat ekstraćelijskog filtrata *Bacillus* sp. PPM3 na strukturne karakteristike plesni, njihov rast i germinaciju spora**

Antifungalna aktivnost metabolita soja *Bacillus* sp. PPM3 ispitana je u *in vitro* eksperimentu, utvrđivanjem procenta inhibicije rasta plesni (PGI), kao i stepena germinacije spora u prisustvu EF *Bacillus* sp. PPM3. Snažno antifungalno dejstvo ćelijske suspenzije izolata *Bacillus* sp. PPM3, prethodno zabeleženo u konfrontacijskom testu, takođe je uočeno i u testu sa ekstraćelijskim filtratom ovog soja. Inhibitorna aktivnost EF *Bacillus* sp. PPM3 varirala je u zavisnosti od testiranog patogena (slika 5.5). Najveći stepen inhibicije uočen je kod plesni *Mucor* sp. čiji je rast inhibiran za čak  $97,5 \pm 0,2$  %. Veoma visok stepen inhibicije uočen je i kod *A. flavus* ( $82,7 \pm 0,5$  %), umeren stepen inhibicije rasta zabeležen je kod plesni *F. graminearum* ( $57,1 \pm 0,5$  %), dok je kod plesni *Alternaria* sp. uočen stepen inhibicije od  $41,5 \pm 1,0$  % (slika 5.5 B).

Ispitano je i dejstvo EF *Bacillus* sp. PPM3 na germinaciju spora istih patogenih plesni. Rezultati pokazuju da se EF *Bacillus* sp. PPM3 i u ovom slučaju pokazao izuzetno efikasnim, sprečavajući u značajnoj meri germinaciju spora kod svih plesni. U kontroli koja nije sadržala EF, stepen germiniranih spora kretao se u opsegu od  $82,3 \pm 0,5$  % do  $87,7 \pm 1,2$  % (slika 5.5 C). Međutim, u prisustvu EF *Bacillus* sp. PPM3, stepen germinacije spora plesni *A. flavus* i *Alternaria* sp. opao je značajno, na približno 40 %. Germinacija spora plesni *F. graminearum* je takođe značajno smanjena pod uticajem metabolita soja *Bacillus* sp. PPM3, na  $36,2 \pm 1,2$  %, dok je u slučaju plesni *Mucor* sp. zabeležen najniži stepen germinacije spora od svega 10 % (slika 5.5 C).



**Slika 5.5.** Antifungalna aktivnost ekstraćelijskog filtrata (EF) *Bacillus* sp. PPM3 u *in vitro* testu sa patogenim plesnima: 1-*A. flavus*; 2-*F. graminearum*; 3- *Mucor* sp; 4- *Alternaria* sp.; (A)- Ilustrativni prikaz inhibicije rasta plesni; (B)-Procenat inhibicije rasta plesni, PGI; (C)-Stepen germinacije spora plesni u prisustvu EF *Bacillus* sp. PPM3 (▨) i kontroli (■). Prikazane su srednje vrednosti (n=3) uz standardno odstupanje. Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey-ovom testu ( $p \geq 0,05$ )

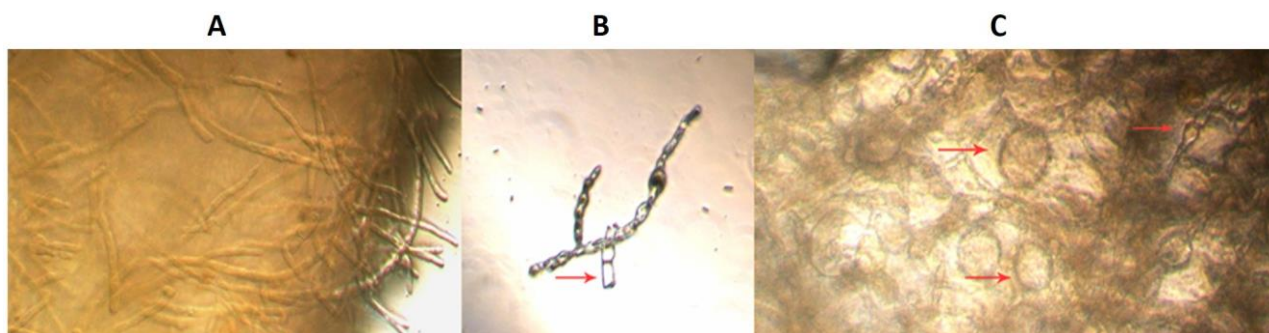
U okviru ove faze istraživanja utvrđeno je da je soj *Bacillus* sp. PPM3 sposoban da proizvede sekundarne metabolite snažnog antagonističkog dejstva, koji direktno inhibiraju rast 4 različite vrste biljnih patogenih plesni. Skorašnja istraživanja antagonističkog potencijala dva morska soja, *B. amyloliquefaciens* L3 i *B. velezensis* SH-B74, ukazuju na potencijal sekundarnih metabolita ovih mikroorganizama u redukciji rasta plesni *Magnaporthe oryzae*, veoma invazivnog patogena žitarica [61,180]. Čen i saradnici takođe beleže smanjenje rasta plesni iz roda *Fusarium* od 50 %, usled dejstva antifungalnih metabolita morskog soja *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10 [52]. Ako se uporedi antifungalna aktivnost EF *Bacillus* sp. PPM3, izražena kroz procenat inhibicije rasta patogena, sa dostupnim literaturnim podacima o drugim morskim *Bacillus* sojevima, može se reći da su one izražene u sličnoj meri. Zabeležen stepen antagonističkog dejstva EF *Bacillus* sp. PPM3 prema plesni *A. flavus* znatno je veći od one koju su zabeležili Kong i saradnici [181] sa metabolitima morskog soja *B. megaterium* ( $35,1 \pm 4,8$  %). Takođe, važno je napomenuti i da, prema dosadašnjim saznanjima, nema podataka o biokontrolnom svojstvu morskih vrsta *Bacillus* prema plesnima iz rodova *Alternaria* i *Mucor*, a čiji je rast u značajnoj meri inhibiran metabolitima soja *Bacillus* sp. PPM3 (slika 5.5).

EF *Bacillus* sp. PPM3 pokazao je i izuzetnu efikasnost u sprečavanju germinacije spora svih ispitivanih patogenih plesni. Kada je koncentracija EF *Bacillus* sp. PPM3 u suspenziji sa sporama patogenih plesni iznosila 50 %, došlo je do značajne inhibicije germinacije spora. Drugi autori zabeležili su inhibitorno dejstvo ekstraćelijskih tečnosti različitih sojeva *Bacillus* na germinaciju spora biljnih plesni kao što su *Coleotrichum destructans* i *F. graminearum* [60,140,182]. Inhibicija spora patogenih plesni igra važnu ulogu u biokontroli, posebno u početnim stadijumima infekcije. Produkcija spora predstavlja najrasprostranjeniji vid razmnožavanja plesni, a takođe i prvi korak u razvoju bolesti, a imajući u vidu veliku moć preživljavanja i brzog rasprostiranja u spoljašnjoj sredini, spore plesni imaju najveći potencijal u inficiranju i širenju bolesti kod biljaka [60,183]. U ovoj fazi



istraživanja potvrđena je sposobnost soja *Bacillus* sp. PPM3 da proizvodi metabolite koji, pored direktne inhibicije rasta micelije, inhibiraju i razvoj spora patogenih plesni. Ova karakteristika je veoma poželjna sa aspekta razvoja formulacija koje će se primeniti u polju, jer ukazuje da bi formulacije, bazirane na ekstraćelijskom filtratu soja *Bacillus* sp. PPM3, mogle obezbediti zaštitu biljaka u svim fazama razvoja bolesti izazvanih patogenim plesnima. Takođe, širok spektar dejstva je dodatna poželjna osobina, jer podrazumeva mogućnost primene samo jednog proizvoda koji bi dejstvo ispoljio na više različitih patogena. Ipak, ove pretpostavke morale bi se potvrditi primenom formulacija u realnim uslovima, odnosno na samom polju.

Nakon utvrđivanja visoke antifungalne aktivnosti EF soja *Bacillus* sp. PPM3, nastojalo se da se detaljnije ispita način delovanja metabolita koje proizvodi ova bakterija. Mikroskopskim pregledom micelija koje su rasle u prisustvu i odsustvu EF *Bacillus* sp. PPM3 ispitivana je struktura hifa plesni, a uočene promene zabeležene su kamerom. Na slici 5.6. prikazana je struktura hifa plesni *F. graminearum* nakon 5 dana inkubacije u prisustvu i odsustvu EF *Bacillus* sp. PPM3. Antagonistički potencijal EF *Bacillus* sp. PPM3 potvrđen je i na nivou struktura hifa. Naime, morfologiju plesni koje su rasle u odsustvu bakterijskog EF odlikovali su dobro organizovan micelijum sa normalnom strukturom hifa. Hife su bile jedre i prave, bez vidljivih oštećenja, tipične stubaste strukture i sa izraženim septama (slika 5.6 A). U prisustvu EF *Bacillus* sp. PPM3 uočene su značajne strukturne promene hifa. Hife su se odlikovale nepravilnim oblikom sa uvećanim i izobličenim formacijama, nalik na balon. Uočeno je i prisustvo ćelija razorenog zida, izražene vakuolizacije, kao i ćelija bez citoplazme (slika. 5.6 B i C).



**Slika 5.6.** Prikaz strukturnih i morfoloških promena hifa plesni *F.graminearum* u odsustvu (A, uveličanje 200x) i prisustvu EF *Bacillus* sp. PPM3 (B, uveličanje 200x i C, uveličanje 400x). Strelicama su označene oštećene ćelije bez citoplazme (B), kao i izobličene formacije hifa (C)

Rezultati ukazuju da je jedan od mehanizama delovanja sekundarnih metabolita morskog izolata *Bacillus* sp. PPM3 narušavanje integriteta ćelijskog zida plesni. U poglavlju 5.2.2.2 ove disertacije pokazano je da izolat *Bacillus* sp. PPM3 ima sposobnost proizvodnje proteaza, hitinaza i celulaza, na čvrstoj podlozi sa supstratima za ove enzime. Za ove hidrolitičke enzime je poznato da mogu razoriti ćelijski zid plesni i tako inhibirati njihov dalji razvoj. Uočene promene u strukturi hifa ispitivanih plesni pod uticajem EF *Bacillus* sp. PPM3 u ovom ogledu, mogu biti posledica dejstva ovih hidrolitičkih enzima. Slične promene na nivou strukture hifa zabeležili su i drugi autori pod dejstvom metabolita različitih sojeva *Bacillus* vrsta, proizvođača enzima hitinaza i proteaza [60,64]. Takođe, ne treba isključiti mogućnost proizvodnje drugih tipova jedinjenja, koja utiču na propustljivost i osmotski balans ćelijskih membrana plesni, na šta ukazuju promene u vidu izobličenih „balonastih” formi hifa i ćelija bez citoplazme. Reaktivne kiseonične vrste (ROS, engl.-*Reactive Oxygen Species*), neki biosurfaktanti i lipopeptidi koje proizvode vrste roda *Bacillus*, imaju sposobnost da izazovu slične abnormalnosti u strukturi kod različitih plesni [52,184].

## 5.4.2 Stabilnost ekstraćelijskog filtrata izolata *Bacillus* sp. PPM3

Kako bi se dobio uvid u hemijsku prirodu antifungalnih metabolita koje proizvodi morski izolat *Bacillus* sp. PPM3, kao i mogućnost tehnološke manipulacije, ekstraćelijski filtrat podvrgnut je različitim tretmanima. Naime, ispitan je efekat temperature, pH i enzimskog tretmana na stabilnost EF *Bacillus* sp. PPM3, utvrđivanjem rezidualne antifungalne aktivnosti nakon svakog od navedenih tretmana.

Antagonistički potencijal EF morskog izolata *Bacillus* sp. PPM3 još jednom je potvrđen kroz proizvodnju stabilnih sekundarnih metabolita, koji su pokazali izrazitu otpornost na visoke temperature, uključujući i sterilizaciju u autoklavu (temperatura 121°C), pH tretman u opsegu od 3-10, kao i tretman proteinazom K. Svi tretirani EF zadržali su više od 97 % antifungalnog potencijala u poređenju sa netretiranim kontrolama (tabela 5.9).

**Tabela 5.9.** Stabilnost ekstraćelijskog filtrata izolata *Bacillus* sp. PPM3 nakon termičkog, pH i enzimskog tretmana

	Rezidualna antifungalna aktivnost (RAA, %)			
	<i>A. flavus</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
<b>Termički tretman</b>				
50 °C	97,5±0,5 <sup>a*</sup>	97,9±1,2 <sup>a</sup>	97,6±0,8 <sup>a</sup>	97,9±0,6 <sup>a</sup>
70 °C	97,3±0,9 <sup>a</sup>	98,0±0,7 <sup>a</sup>	97,9±0,6 <sup>a</sup>	97,7±0,8 <sup>a</sup>
121 °C	97,3±0,4 <sup>a</sup>	97,9±0,3 <sup>a</sup>	97,7±1,2 <sup>a</sup>	97,7±1,2 <sup>a</sup>
<b>pH tretman</b>				
3	97,6±1,3 <sup>a</sup>	97,7±0,5 <sup>a</sup>	97,8±0,5 <sup>a</sup>	97,9±0,3 <sup>a</sup>
7	97,8±1,0 <sup>a</sup>	98,0±0,2 <sup>a</sup>	97,9±0,5 <sup>a</sup>	98,0±0,1 <sup>a</sup>
10	97,7±0,9 <sup>a</sup>	97,9±0,5 <sup>a</sup>	97,9±0,7 <sup>a</sup>	97,9±0,3 <sup>a</sup>
<b>Enzimski tretman</b>				
Proteinaza K	97,8±0,5 <sup>a</sup>	98,0±0,7 <sup>a</sup>	97,9±0,3 <sup>a</sup>	97,6±1,2 <sup>a</sup>

Prikazane su srednje vrednosti (n=3) uz standardno odstupanje.

\*Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey-vom testu ( $p \geq 0,05$ )

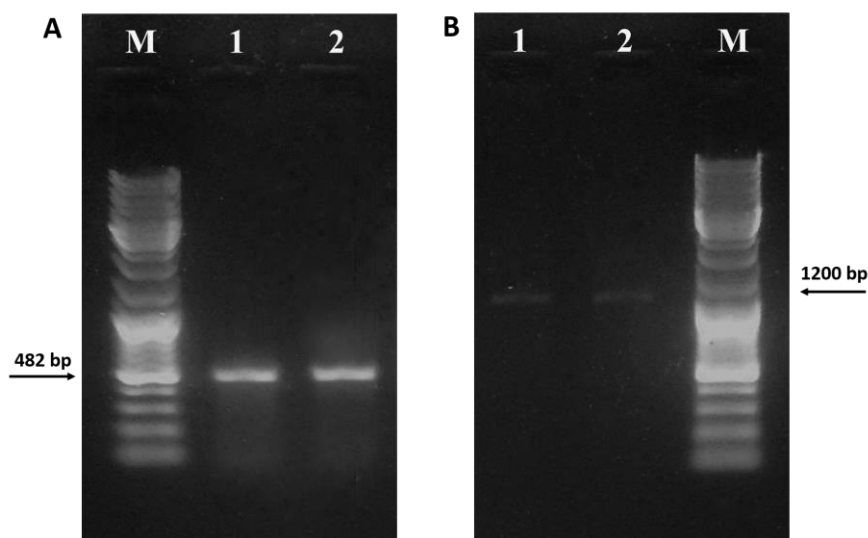
Literaturni podaci ukazuju da određene bakterije, stimulatori biljnog rasta, imaju sposobnost da produkuju niz različitih jedinjenja sa biokontrolnim efektom koja pokazuju izrazitu stabilnost u odnosu na promenu pH sredine, visoku temperaturu i enzimsku degradaciju [55,185]. Ova stabilna jedinjenja, pripadaju grupi lipopeptida i utvrđeno je da ih u velikoj meri proizvode različiti predstavnici *Bacillus* roda. Ovo svojstvo, zajedno sa skoro potpuno očuvanom antifungalnom aktivnošću EF *Bacillus* sp. PPM3 nakon proteolize, sterilizacije i izlaganja ekstremnim vrednostima pH, pokazatelj je da morski soj *Bacillus* sp. PPM3 zaista može da proizvodi neke od ovih komponenti iz grupe lipopeptida. Slične osobine koje se dovode u vezu sa produkcijom lipopeptida zabeležili su i drugi autori [55,56,140].

## 5.4.3 Detekcija gena za proizvodnju lipopeptida izolata *Bacillus* sp. PPM3

Uzimajući u obzir visoku antifungalnu aktivnost i stabilnost EF izolata *Bacillus* sp. PPM3, pristupilo se detaljnijoj identifikaciji antifungalnih jedinjenja. Najpre je ispitan genetički potencijal izolata *Bacillus* sp. PPM3 da proizvodi neke od antifungalnih metabolita iz grupe lipopeptida.

Upotrebom specifičnih parova prajmera nakon PCR reakcije, kod izolata *Bacillus* sp. PPM3 detektovana su tri gena odgovorna za biosintezu antifungalnih metabolita iz grupe lipopeptida. Naime geni: ituD, bamD i fenF detektovani su upotrebom para prajmera ITU-F1/R1 (slika 5.7 A) i predstavljaju gene koji kodiraju enzim malonil-CoA-transacilazu odgovornu za biosintezu antifungalnih lipopeptida: iturina, bacilomicina D i mikosubtilina [51]. Upotrebom prajmerskog para SRFA-F1/R1 detektovan je još jedan gen, uključen u biosintezu lipopeptida surfaktina (Slika 5.7 B).

Rezultati PCR eksperimenta ukazuju da izolat *Bacillus* sp. PPM3 ima genetički potencijal produkcije najmanje četiri vrste antifungalnih jedinjenja iz grupe lipopeptida.



**Slika 5.7.** Prikaz agaroznog gela sa proizvodima PCR reakcije amplifikacije gena za biosintezu lipopeptida: iturina, bacilomicina D i mikosubtilina (A) i surfaktina (B). Traka 1 -*Bacillus* sp. PPM3; Traka 2- pozitivna kontrola (*B. amyloliquefaciens* ATCC 23350T); Traka M-DNK marker (1kb GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific)

Upotreba genetičkih markera, kao što su geni za sintezu lipopeptida, pokazala se kao veoma uspešna u identifikaciji novih biokontrolnih agenasa iz životne sredine [186–188]. Poznato je da genom vrsta *Bacillus*, a naročito *B. subtilis* kompleksa, sadrži ogromne genske klustere koji se dovode u vezu sa produkcijom sekundarnih metabolita sa antimikrobnim, odnosno antifungalnim svojstvom [51,187]. Broj gena koji poseduju i tip gena odgovornih za sintezu ovih jedinjenja može znatno da varira [55,189,190]. U svom istraživanju, Kim i saradnici [140] su kod zemljišnog PGP soja *B. amyloliquefaciens* AK-O detektovali četiri gena, uključena u sintezu antifungalnih jedinjenja iz klase lipopeptida: iturina, surfaktina, bacilomicina i dificidina. Autori ističu da je snažno antagonističko dejstvo soja AK-O prema patogenoj plesni *Cylindrocarpon destructans*, upravo posledica produkcije lipopeptida. U istraživanju koje su obavili Jang i saradnici ispitujući PGP potencijal zemljišnog soja *B. subtilis* YB-05, detektovano je četiri gena (fenB, ituA, hag i tas) koja učestvuju u sintezi antifungalnih supstanci, čije je prisustvo u ćelijskoj suspenziji naknadno i potvrđeno masenom spektrometrijom [188]. Prisustvo gena za sintezu lipopeptida fengicina A i surfaktina zabeležena je i kod morskih predstavnika roda *Bacillus* [22,180].

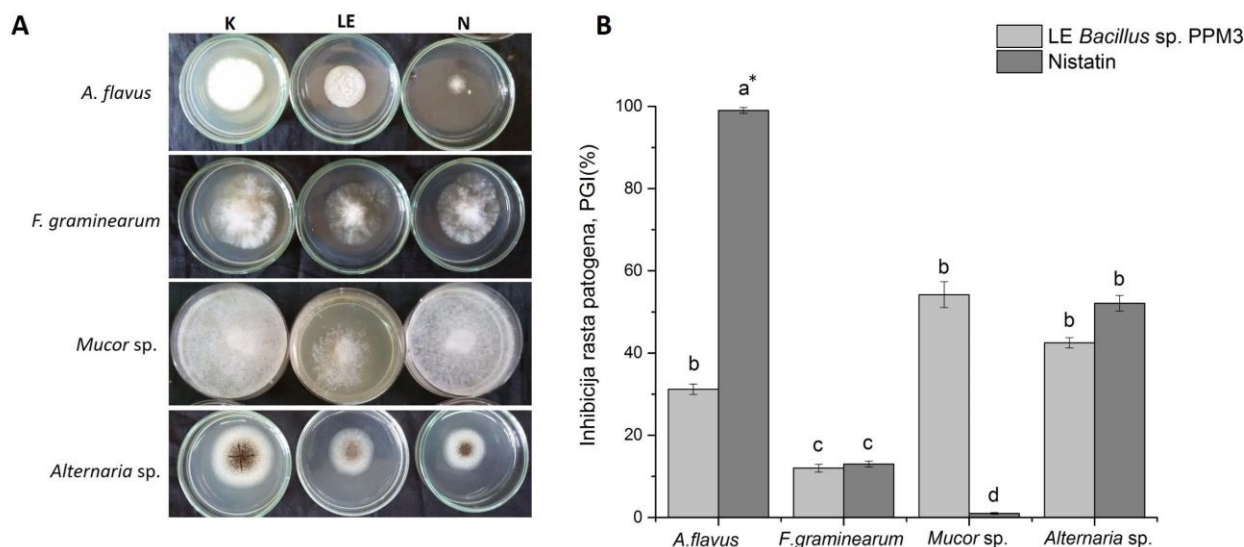
U poređenju sa literaturnim podacima, može se zaključiti da morski izolat *Bacillus* sp. PPM3, poseduje značajan genetički potencijal za produkciju antifungalnih lipopeptidnih jedinjenja. Važno je međutim napomenuti, da je postojanje i drugih tipova antifungalnih gena kod izolata *Bacillus* sp. PPM3 takođe moguće, ali da oni jednostavno nisu mogli biti detektovani prajmerima upotrebljenim u ovom istraživanju.

#### 5.4.4 Antifungalna aktivnost lipopeptidnog ekstrakta *Bacillus* sp. PPM3

Uzimajući u obzir dobijene rezultate molekularne analize, kao i rezultate opisane u prethodnim poglavljima disertacije, može se pretpostaviti da je antibioza dominantni PGP mehanizam delovanja izolata *Bacillus* sp. PPM3, a da su lipopeptidi najverovatnije glavni nosioci njegovog antagonističkog potencijala. Međutim, prisustvo gena za sintezu lipopeptida u genomu mikroorganizma, ne znači zasigurno i njihovu produkciju. Kako bi se potvrdila pretpostavka da je antagonistički potencijal soja posledica produkcije lipopeptida, izvršena je njihova ekstrakcija iz EF



*Bacillus* sp. PPM3, a zatim je u *in vitro* eksperimentu sa patogenim plesnima, ispitana antifungalna aktivnost sirovog lipopeptidnog ekstrakta (LE), izračunavanjem procenta inhibicije rasta plesni (PGI). Dobijene vrednosti poređene su sa vrednostima PGI dobijenim nakon primene komercijalnog antimikotika nistatina.



**Slika 5.8.** Uticaj lipopeptidnog ekstrakta izolata *Bacillus* sp. PPM3 (LE) na rast patogenih plesni *in vitro*. (A)- Ilustrativni prikaz inhibicije rasta patogena: K-kontrola; LE-lipopeptidni ekstrakt *Bacillus* sp. PPM3 (15 mg/mL); N-antimikotik nistatin (15 mg/mL). (B)-Procenat inhibicije rasta plesni (PGI,%). Prikazane su srednje vrednosti (n=3) uz standardno odstupanje. \* Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey-ovom testu ( $p \geq 0,05$ )

Lipopeptidni ekstrakt izolata *Bacillus* sp. PPM3 (LE) inhibirao je rast plesni *A. flavus* za  $32,50 \pm 1,24$  %, dok je antimikotik nistatin, upotrebljen kao pozitivna kontrola, u potpunosti sprečio rast ove plesni (slika 5.8). U slučaju plesni *F. graminearum* i *Alternaria* sp., nije uočena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ) između ostvarenog inhibitornog dejstva LE i antimikotika nistatina. Međutim, plesan *F. graminearum* je pokazala manju osetljivost na dejstvo upotrebljenih antifungalnih jedinjenja. Dejstvom LE njen rast je inhibiran za svega  $12,20 \pm 0,98$  %, dok je nistatin inhibirao rast ove plesni za  $13,57 \pm 0,70$  %. Rast plesni *Alternaria* sp. inhibiran je za  $42,5 \pm 1,24$  % dejstvom LE, odnosno  $50,1 \pm 1,78$  % dejstvom nistatina. Plesan *Mucor* sp. pokazala je najveću osetljivost na dejstvo LE *Bacillus* sp. PPM3 ( $55,40 \pm 1,90$  %), dok nistatin nije pokazao inhibitorno dejstvo na ovu plesan (slika 5.8). Rezultati dobijeni u okviru ove faze istraživanja u skladu su sa rezultatima dobijenim o osetljivosti ispitivanih plesni na antifungalno dejstvo EF soja *Bacillus* sp. PPM3, koji su detaljno opisani i prodiskutovani u odeljku 5.4.1 ove disertacije. Međutim, treba napomenuti da je ostvareni antagonistički efekat sirovog lipopeptidnog ekstrakta *Bacillus* sp. PPM3, izražen kroz procenat inhibicije rasta plesni, u ovom slučaju znatno niži od efekta ostvarenog nakon upotrebe ekstraćelijskog filtrata ovog soja.

Ekspresija gena i produkcija lipopeptida zavisi kako od faktora sredine, tako i od složenih odnosa koji se uspostavljaju između biokontrolnih agenasa i autohtone mikrobiote datog staništa, kao i interakcija sa samom biljkom [3,54]. Takođe, proizvodnja lipopeptida odvija se u različitim fazama rasta mikroorganizama. Eksperimentalno je utvrđeno da je kod različitih predstavnika *Bacillus*, proizvođača lipopeptida, u toku početne (ekponencijalne) faze rasta, produkcija surfaktina najintenzivnija, dok se maksimalna produkcija fengicina i iturina odvija na kraju stacionarne faze rasta mikroorganizama [56,57]. Slabiji antifungalni efekat lipopeptidnog ekstrakta *Bacillus* sp. PPM3 u odnosu na EF, zabeležen u ovom ogledu, može se objasniti niskom koncentracijom ovih jedinjenja u EF iz kog se vršila njihova ekstrakcija. Naime, lipopeptidi su ekstrahovani iz ekstraćelijskog filtrata *Bacillus* sp. PPM3 nakon 48 h kultivacije, pa se pretpostavlja da u datoj fazi rasta bakterije, produkcija

lipopeptida nije dostigla svoj maksimum. Jače inhibitorno dejstvo EF u odnosu na LE može biti i posledica udruženog dejstva više bioaktivnih jedinjenja sa antifungalnim svojstvom (hidrolitičkih enzima, lipopeptida, egzopolisaharida i drugih) koji su prisutni u EF.

Pokazano je da većina biokontrolnih *Bacillus* vrsta predstavlja „kontaktne antagoniste”, odnosno da se povećanje antagonističke aktivnosti i produkcije sekundarnih metabolita može očekivati nakon direktnog kontakta biokontrolnog agensa i patogena [3,185]. U tom smislu efikasnija antagonistička aktivnost LE *Bacillus* sp. PPM3 mogla bi se očekivati nakon stimulacije sinteze lipopeptida, ekstrakcijom iz ćelijske suspenzije bakterije koja je gajena u prisustvu patogena.

Iako je u ovom eksperimentu potvrđeno antifungalno dejstvo LE, na osnovu svih rezultata do sada, može se zaključiti da lipopeptidi nisu jedini nosioci biokontrolnog svojstva soja *Bacillus* sp. PPM3. Rezultati ukazuju da je visoka antifungalna aktivnost posledica sinergističkog dejstva različitih jedinjenja, na primer hidrolitičkih enzima (proteaza, hitinaza i celulaza) i lipopeptida iturina i surfaktina, na šta ukazuju rezultati dobijeni sa EF soja PPM3. Takođe, ne može se isključiti ni kompeticija za prostor i hranljive materije kao mehanizam delovanja, na šta ukazuju rezultati dobijeni u konfrontacijskom testu sa celokupnom ćelijskom suspenzijom soja *Bacillus* sp. PPM3 (slika 5.2).

## 5.5 Uticaj *Bacillus* sp. PPM3 na parametre rasta biljaka

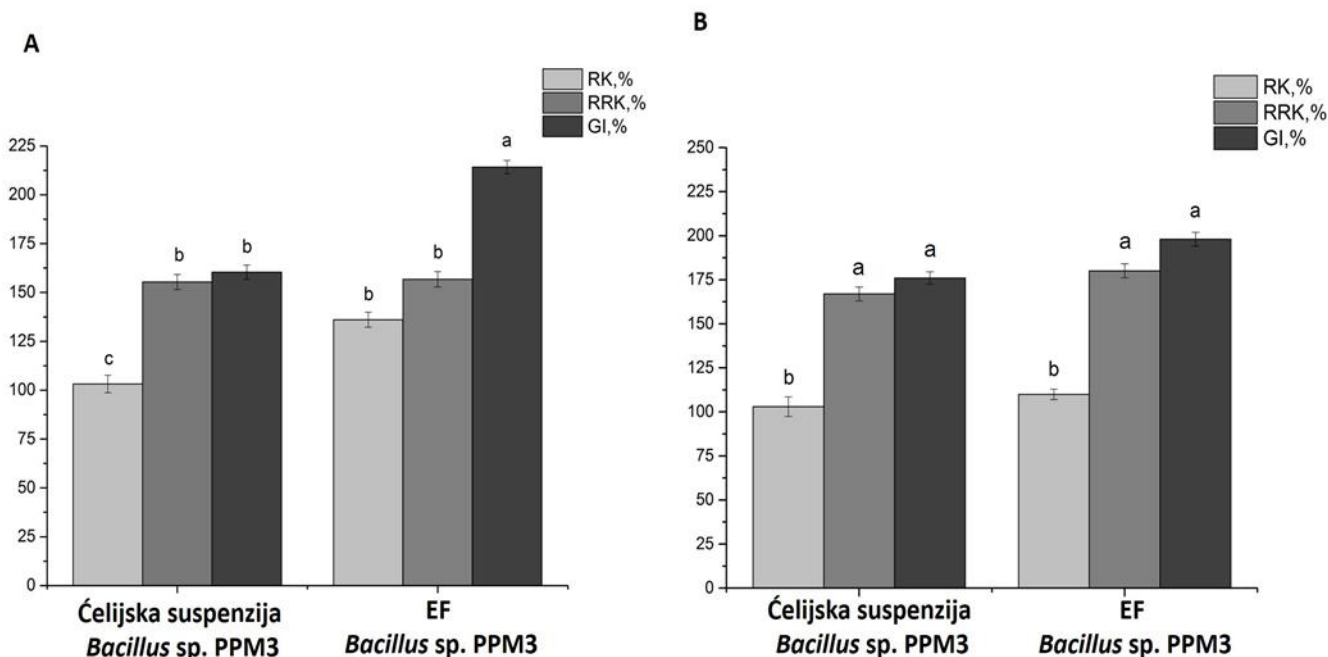
Korisni PGP efekat bakterijskih sojeva ostvaren u *in vitro* uslovima, ne znači nužno i efikasnost u realnim uslovima. Usled složenih biotičkih i abiotičkih faktora sredine, koristan efekat PGP sojeva može biti znatno izmenjen, a u nekim slučajevima i u potpunosti izostati [7]. Takođe, efekat koji će inokulisani PGP sojevi ostvariti u velikoj meri zavisi i od načina njihove primene [1,4]. Stoga je potvrđivanje efikasnosti odabranih PGP sojeva u ogledu sa samom biljkom, ključno za utvrđivanje mogućnosti njihove primene i eventualne komercijalizacije.

U ovoj fazi istraživanja pristupilo se validaciji rezultata iz *in vitro* oglada o PGP svojstvima izolata *Bacillus* sp. PPM3 u *in vivo* ogledu sa biljkom. Najpre je ispitan potencijalni fitotoksični efekat ćelijske suspenzije kao i ekstraćelijskog filtrata odabranog soja, a zatim je utvrđen i njihov uticaj na različite parametre rasta biljke.

### 5.5.1 Utvrđivanje fitotoksičnosti *Bacillus* sp. PPM3

Testovi fitotoksičnosti zasnivaju se na utvrđivanju uticaja specifičnih supstrata na ispoljavanje bilo kakvih štetnih efekata u različitim fazama rasta i razvoja biljke. Kako klijavost semena predstavlja ključnu i početnu fazu u razvoju biljke, a od koje će zavisiti i uspešnost njenog daljeg razvoja, u ovoj fazi istraživanja ispitan je efekat ćelijske suspenzije i EF *Bacillus* sp. PPM3 na klijavost semena kukuruza kokičara (kao predstavnika žitarica) i mungo pasulja (kao predstavnika mahunarki). Fitotoksičnost je utvrđena izračunavanjem indeksa klijavosti (GI) oba semena, merenjem osnovnih germinacionih parametara: relativne klijavosti (RK) i relativnog rasta korenka (RRK).

Tretman semena kukuruza kokičara ćelijskom suspenzijom, kao i EF soja *Bacillus* sp. PPM3 nije pokazao štetan efekat na klijavost (slika 5.9 A). Relativna klijavost semena (RK) iznosila je  $102,20 \pm 4,45$  % nakon tretiranja semena ćelijskom suspenzijom *Bacillus* sp. PPM3, što je iznad propisane fitotoksične granice od 90 %, prema Međunarodnom standardu ISO:18763:2016 [191]. Fitotoksični efekat nije zabeležen ni sa EF soja *Bacillus* sp. PPM3. Naime, produkovani metaboliti pokazali su statistički značajno pozitivan uticaj na relativnu klijavost kukuruza ( $p < 0,05$ ), dostižući vrednosti od  $136,06 \pm 3,87$  %. Zabeležene vrednosti RRK bile su iznad 100 % nakon oba tretmana, a statistički značajna razlika u efektu ćelijske suspenzije i EF *Bacillus* sp. PPM3 na ovaj parametar nije uočena. Ipak zabeležene su značajno veće vrednosti indeksa klijavosti kod semena tretiranih ekstraćelijskim filtratom ( $214,16 \pm 3,41$  %) u odnosu na tretman celokupnom bakterijskom suspenzijom ( $160,37 \pm 3,65$  %).



**Slika 5.9.** Uticaj ćelijske suspenzije i ekstraćelijskog filtrata (EF) *Bacillus* sp. PPM3 na stepen klijavosti semena kukuruza kokičara (*Zea mays* var. *everta*, L.) (A) i mungo pasulja (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) (B). RK-relativna klijavost semena (%); RRK-relativni rast korenka (%); GI-indeks klijavosti semena (%). Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey-ovom testu ( $p \geq 0,05$ )

Germinacioni parametri mungo pasulja pokazali su sličan trend kao i kod semena kukuruza. Veće vrednosti RK i RRK zabeležene su nakon tretmana sa EF u odnosu na ćelijsku suspenziju, ali uočene razlike nisu bile statistički značajne (slika 5.9 B). Indeks klijavosti mungo pasulja nakon tretmana ćelijskom suspenzijom iznosio je  $176,06 \pm 3,57$  %, a nakon primene EF zabeležena vrednost GI bila je  $198,11 \pm 3,91$  %.

Ako se uporede indeksi klijavosti nakon oba tretmana, može se reći da je ekstraćelijski filtrat *Bacillus* sp. PPM3 imao bolji uticaj na klijavost oba semena, ali je taj uticaj bio statistički značajno različit ( $p < 0,05$ ) samo kod semena kukuruza. Klijavost semena zavisi pre svega od vijabilnosti samog embriona, kao i od prekidanja dormancije izazvane abiotičkim i biotičkim faktorima. Voda predstavlja ključan faktor koji utiče na sve faze u procesu klijanja počevši od imbibicije, odnosno intenzivnog usvajanja vode i pucanja semenjače, preko pokretanja metaboličkih procesa, odnosno sinteze enzima i ćelijske deobe [32]. Od ključnog je značaja, da u svim stadijumima klijanja, seme ima dovoljnu količinu vode. Međutim, količina vode potrebna za klijanje, kao i osetljivost semena na nedostatak vode, varira u zavisnosti od biljne vrste. Niže vrednosti GI nakon tretmana semena ćelijskom suspenzijom, u odnosu na EF *Bacillus* sp. PPM3, mogu se objasniti upravo nedostatkom vode u datoj fazi klijanja. Naime, pretpostavlja se da je u ovom slučaju odmah nakon tretmana semena ćelijskom suspenzijom, deo dostupne vode utrošen za sam rast i metabolizam bakterije, pa uslovi za klijanje semena nisu bili optimalni. Sa druge strane, EF *Bacillus* sp. PPM3 ne sadrži žive ćelije koje bi svojom aktivnošću smanjivale količinu vode. Takođe, prisustvo enzima amilaze, za koju je poznato da ima ključnu funkciju u razvoju klice [192], a čija je produkcija kod soja *Bacillus* sp. PPM3 pokazana u poglavlju 5.2.2.2 ove disertacije, može dodatno doprineti ostvarenom pozitivnom efektu EF na klijavost semena. Iako su zabeležene vrednosti GI bile nešto više kod semena kukuruza, između stepena klijavosti oba semena, nije uočena statistički značajna razlika.

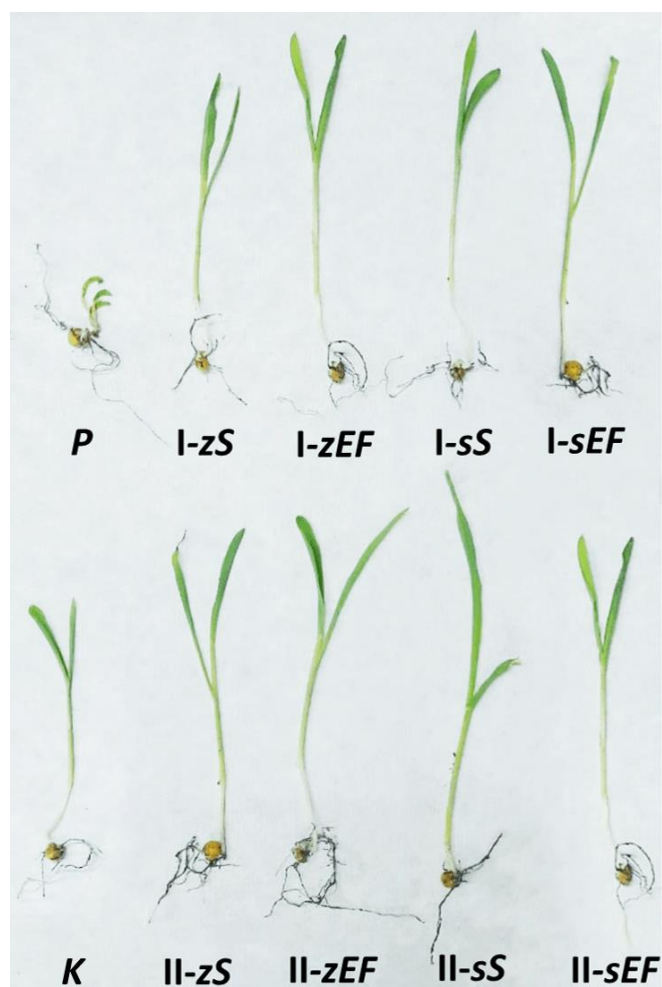
Uticaj različitih grupa PGP mikroorganizama na klijanje semena dosta istraživano, podaci o efektima koje ovi mikroorganizmi ispoljavaju nisu jednoznačni. Luna-Martinez i saradnici [193] su utvrdili da tretman semena paradajza i paprike ćelijskom suspenzijom četiri rizosferna soja pripadnika

*Bacillus* roda, pozitivno utiče na relativnu klijavost semena, povećavajući je za 6 %, dok Sendales i saradnici u svom istraživanju navode da soj *Bacillus subtilis* GIBI200 izolovan iz biljke *Ricinus communis* ispoljava granično toksično dejstvo na seme paradajza [194]. U istraživanju Dimitrijević i saradnika utvrđeno je da obogaćivanje komposta mešanom kulturom *Bacillus* i *Streptomyces* sojeva utiče pozitivno na klijavost semena 4 lekovite biljke (*Thymus vulgaris*, *Lavandula officinalis*, *Cynara scolimus* i *Fagopyrum esculentum*), a zabeleženi indeksi klijavosti bili su u opsegu od 106 % do 190 % [195]. Ako se uporede rezultati dobijeni u okviru ovog istraživanja sa literaturnim podacima, a imajući u vidu propise o pogodnosti supstrata za upotrebu u agroindustriji, može se zaključiti da ćelije i metaboliti morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 ne ispoljavaju fitotoksični efekat, što ih čini bezbednim za upotrebu na polju. Takođe, na osnovu visokih vrednosti indeksa klijavosti koji su se kretali u opsegu od 160-214 %, i klasifikacije koju su predložili Rašad i saradnici [149], ćelije i metaboliti soja *Bacillus* sp. PPM3 mogu se okarakterisati kao fitonutrijenti. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da bi formulacije bazirane kako na aktivnim ćelijama, tako i na metabolitima morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 bile ne samo bezbedne za primenu, već bi mogle ispoljiti biofertilizatorski efekat i pospešiti rast biljke u poljskim uslovima.

### 5.5.2 Uticaj *Bacillus* sp. PPM3 na rast biljke *in vivo*

U cilju validacije rezultata dobijenih u *in vitro* uslovima, o PGP dejstvu izolata *Bacillus* sp. PPM3, u ovoj fazi izveden je i ogled sa formiranom biljkom. S obzirom da je nešto izrazitiji efekat soja *Bacillus* sp. PPM3 u testu klijavosti, uočen kod semena kukuruza kokičara, u ovom ogledu klijanci kukuruza kokičara upotrebljeni su kao model biljka. Naime, ispitan je efekat tretmana ćelijskom suspenzijom (S) i EF izolata *Bacillus* sp. PPM3 (EF) na parametre rasta kukuruza kokičara, u prisustvu patogena (biokontrolni efekat-I) i u odsustvu patogena (stimulatorni efekat-II). Ispitan je i uticaj načina primene oba tretmana tretiranjem semena (s), odnosno zemljišta (z). Svi parametri rasta biljke utvrđeni su nakon 14 dana gajenja klijanaca kukuruza.

Značajne razlike u sveukupnom izgledu klijanaca kukuruza uočene su između biljaka iz tretmana i kontrola (slika 5.10). U ogledu u kome je ispitan biokontrolni efekat (I) ćelijske suspenzije i EF izolata *Bacillus* sp. PPM3, ustanovljeno je da su oba načina primene tretmana, i tretman zemljišta (I-zS i I-zEF) i tretman semena (I-sS i I-sEF), pokazali apsolutno zaštitno dejstvo na klijance kukuruza u prisustvu patogena (slika 5.10 i tabela 5.10). Biljke iz spomenutih tretmana nisu pokazale znake oboljenja, dok su se netretirane biljke, koje su rasle u prisustvu patogene plesni *F. graminearum* (P), odlikovale visokom učestalošću oboljevanja ( $81,50 \pm 1,10$  %), izrazito smanjenim rastom i znacima truljenja (slika 5.10 i tabela 5.10).



**Slika 5.10.** Izgled klijanaca kukuruza kokičara (*Zea mays* var. *everta*, L.) nakon: (I)-biokontrolnog tretmana, odnosno primene ćelijske suspenzije (S) i ekstraćelijskog filtrata *Bacillus* sp. PPM3 (EF) na zemljište (I-zS i I-zEF) ili seme (I-sS i I-sEF); (II)- tretmana stimulacije primenom ćelijske suspenzije, odnosno EF *Bacillus* sp. PPM3 na zemljište (II-zS i II-zEF) ili seme (II-sS i II-sEF) kukuruza. K-netretirana kontrola; P-kontrola zaražena sporama plesni *F. graminearum*

Biokontrolni tretman semena pokazao se neznatno efikasnijim od tretmana zemljišta. Nakon tretmana semena ćelijskom suspenzijom (I-sS), odnosno EF *Bacillus* sp. PPM3 (I-sEF) učestalost oboljevanja smanjena je sa  $81,50 \pm 3,10$  % na svega  $2,50 \pm 0,03$  %, odnosno  $2,00 \pm 0,03$  %, dok je tretman zemljišta bakterijskom suspenzijom (I-zS) smanjio učestalost oboljevanja na  $3,52 \pm 0,05$  %, a tretman EF *Bacillus* sp. PPM3 (I-zEF) na  $3,00 \pm 0,04$  % (tabela 5.10). Uočen je značajno pozitivan uticaj tretmana ćelijskom suspenzijom, kao i EF izolata *Bacillus* sp. PPM3 na sve parametre rasta biljke. I u ovom slučaju, tretman semena se pokazao neznatno boljim od tretmana zemljišta. Naime, nakon tretmana semena (I-sS i I-sEF), ukupna dužina korena i visina izdanaka povećala se skoro četiri puta, dok se sirova i suva masa utrostručila u poređenju sa netretiranim kontrolnim biljkama koje su rasle u zaraženom zemljištu (P, tabela 5.10).



**Tabela 5.10.** Uticaj tretmana zemljišta (z) i semena (s) sa ćelijskom suspenzijom (S), odnosno ekstraćelijskim filtratom *Bacillus* sp. PPM3 (EF) na učestalost oboljevanja biljke uzrokovane infekcijom *F. graminearum*, kao i na parametre rasta kukuruza kokičara (*Zea mays* var. *everta*, L.) nakon 14 dana gajenja

Tretman	Učestalost oboljevanja biljke, %	Parametri rasta biljke			
		Ukupna dužina korena, mm	Visina izdanka, mm	Sirova masa biljke, g	Suva masa biljke, g
<b>K</b>	/	21,0±1,3 <sup>bc</sup>	120,0±2,4 <sup>b</sup>	0,50±0,03 <sup>b</sup>	0,20±0,03 <sup>b</sup>
<b>P</b>	81,50±3,10 <sup>a*</sup>	15,5±1,7 <sup>c</sup>	40,0±1,3 <sup>c</sup>	0,20±0,04 <sup>c</sup>	0,11±0,02 <sup>c</sup>
<b>I-zS</b>	3,52±0,05 <sup>b</sup>	31,3±1,6 <sup>b</sup>	143,0±2,7 <sup>ab</sup>	0,59±0,03 <sup>a</sup>	0,30±0,01 <sup>a</sup>
<b>I-zEF</b>	3,00±0,04 <sup>b</sup>	53,1±1,8 <sup>a</sup>	165,0±2,5 <sup>a</sup>	0,61±0,01 <sup>a</sup>	0,30±0,02 <sup>a</sup>
<b>I-sS</b>	2,50±0,03 <sup>b</sup>	59,0±1,3 <sup>a</sup>	165,0±3,1 <sup>a</sup>	0,61±0,01 <sup>a</sup>	0,30±0,02 <sup>a</sup>
<b>I-sEF</b>	2,00±0,03 <sup>b</sup>	59,2±1,9 <sup>a</sup>	165,4±3,1 <sup>a</sup>	0,62±0,03 <sup>a</sup>	0,31±0,05 <sup>a</sup>
<b>II-zS</b>	/	58,7±0,7 <sup>a</sup>	166,5±2,8 <sup>a</sup>	0,61±0,07 <sup>a</sup>	0,31±0,03 <sup>a</sup>
<b>II-zEF</b>	/	62,1±1,2 <sup>a</sup>	169,6±1,9 <sup>a</sup>	0,62±0,03 <sup>a</sup>	0,31±0,01 <sup>a</sup>
<b>II-sS</b>	/	59,5±1,3 <sup>a</sup>	167,5±3,1 <sup>a</sup>	0,61±0,03 <sup>a</sup>	0,32±0,01 <sup>a</sup>
<b>II-sEF</b>	/	61,3±1,7 <sup>a</sup>	169,0±3,9 <sup>a</sup>	0,62±0,03 <sup>a</sup>	0,33±0,01 <sup>a</sup>

Prikazane su srednje vrednosti (n=5) uz standardno odstupanje iz tri nezavisna eksperimenta.

\* Vrednosti obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey-ovom testu ( $p \geq 0,05$ )

U ogledu (II) u kome je ispitivan biostimulativni efekat ćelijske suspenzije, odnosno EF *Bacillus* sp. PPM3, u odsustvu patogena, uočeno je pozitivno dejstvo oba tretmana na sve ispitivane parametre rasta biljke (tabela 5.10). U poređenju sa kontrolnim biljkama tretiranim vodom (K), svi ispitivani parametri: ukupna dužina korena, visina izdanaka, kao i sirova i suva masa klijanaca kukuruza, značajno su povećani nakon svih tretmana. Za razliku od rezultata dobijenih u biokontrolnom ogledu, u ovom ogledu nije uočena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ) u efikasnosti između tretmana zemljišta i tretmana semena. Približno trostruko povećanje ukupne dužine korena klijanaca, i povećanje visine izdanaka za približno 40 % postignuto je nakon primene oba tretmana. Iako je efekat ostvaren tretmanom sa EF *Bacillus* sp. PPM3 (II-zEF i II-sEF) bio bolji od efekta ostvarenog tretmanom ćelijskom suspenzijom (II-zS i II-sS), razlika nije bila statistički značajna. Svi primenjeni tretmani, uticali su na povećanje sirove mase klijanaca za približno 20 %, dok je suva masa porasla za 50 % (tabela 5.10).

Rezultati dobijeni u ogledu sa biljkom još jednom potvrđuju snažno antifungalno dejstvo morskog izolata *Bacillus* sp. PPM3 pokazano u *in vitro* ogledima. Inokulacija semena ćelijskim suspenzijama različitih PGP bakterija se u praksi pokazala kao efikasna metoda biokontrole, jer mikroorganizmi pokazuju visoku sposobnost brzog rasta na površini semena, štiteći na taj način biljku od zemljišnih patogena [185,188]. Kulimuši i saradnici [185] su pokazali da je predtretman semena ćelijskom suspenzijom soja *Bacillus* sp. S499 doveo do smanjenja učestalosti oboljevanja klijanaca kukuruza od infekcija uzrokovanih patogenim plesnima *Fusarium verticillioides*, *Rhizopus stolonifer* i *Penicillium variable* u polju za 60 %, dok su Jang i saradnici [188] u svom istraživanju pokazali da je tretman semena pšenice metabolitima *B. subtilis* YB-05 efikasnije zaštitio biljku od patogena, u poređenju sa tretmanom zemljišta. Drugi autori beleže stimulaciju biljnog rasta i klijavosti kod biljaka tretiranih ćelijskim suspenzijama različitih sojeva *Bacillus* vrste [196,197]. Rezultati dobijeni u okviru ove faze disertacije su u saglasnosti sa literaturnim podacima i potvrđuju izrazito visok biokontrolni potencijal morskog soja *Bacillus* sp. PPM3, na šta ukazuju smanjene učestalosti oboljevanja za približno 80 %. Biokontrolno svojstvo *Bacillus* sp. PPM3, ogledalo se u kurativnom efektu ćelija i produkovanih metabolita ovog soja. Iako u ovom istraživanju nije ispitivan potencijalni preventivni efekat formulacija na bazi soja *Bacillus* sp. PPM3, njihovom primenom pre zaražavanja patogenom, literaturni podaci ukazuju da je u većini slučajeva taj postupak manje delotvoran

[185,198]. Veća delotvornost kurativne primene biokontrolnih agenasa *in vivo*, može biti posledica njihovog direktnog toksičnog dejstva, odnosno inhibicije germinacije spora ili rasta micelije patogena [198], što je i pokazano u *in vitro* ogledima opisanim u odeljku 5.4 ove disertacije. Važno je takođe napomenuti da je biostimulacioni efekat ćelija i metabolita morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 ostvaren i u uslovima infekcije patogenom plesni *F. graminearum*. Ako se uporede vrednosti svih ispitivanih parametara nakon oba tretmana kod biljaka koje su rasle u zaraženom zemljištu, sa biljkama iz kontrola sa nezaraženog zemljišta, uočava se slično i značajno povećanje svih parametara rasta biljke u odnosu na kontrolu (tabela 5.10). Ova karakteristika je vrlo poželjna pri razmatranju kandidata za upotrebu kao bioloških inokulanata u agroindustriji, jer ukazuje da bi se biostimulacioni, odnosno biofertilizatorski efekat formulacija na bazi *Bacillus* sp. PPM3 mogao očekivati kako u uslovima povoljnim za rast biljke, tako i u uslovima pojave infekcije uzrokovane biljnim plesnima.

Nekoliko značajnih svojstava za pospešivanje biljnog rasta zabeleženo je kod soja *Bacillus* sp. PPM3. Ostvareni koristan efekat izolata *Bacillus* sp. PPM3 na rast biljke može biti kombinacija direktnih mehanizama, odnosno snabdevanja biljke osnovnim hranljivim materijama, putem rastvaranja fosfata i biološke fiksacije azota, kao i indirektnih mehanizama, ispoljenih kroz kompeticiju za prostor i hranu, direktnu inhibiciju patogena produkcijom sekundarnih metabolita (lipopeptida i hidrolitičkih enzima), ili aktivaciju imunog odgovora biljke, proizvodnjom surfaktina kao aktivatora [54,199]. Prisustvo različitih mehanizama stimulacije biljnog rasta kod samo jednog bakterijskog soja ukazuje na to da se on može primeniti kao bolji inokulant u poređenju sa konzorcijumom ili mešanom kulturom više mikroorganizama sa pojedinačnim PGP svojstvima. Na osnovu svih rezultata opisanih do sada, zaključuje se da postoji veliki potencijal za praktičnu i jednostavnu upotrebu morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 u održivoj poljoprivredi.

## **5.6 Funkcionalizovani filmovi na bazi polisaharida iz morskih algi za primenu u agroindustriji**

Imajući u vidu višestruke pozitivne efekte primene morskih algi na rast i razvoj biljaka, u ovoj fazi istraživanja, pristupilo se sintezi filmova na bazi agara i alginata, polisaharida poreklom iz morskih algi, u cilju dobijanja materijala koji će posedovati poželjna optička, mehanička i barijerna svojstva, sa aspekta njihove upotrebe u agroindustriji. Nastojalo se da se dodatkom određenih bioaktivnih komponenti, dobiju materijali sa dodatnom funkcijom u zaštiti biljaka od patogena, odnosno pospešivanju njenog rasta. Imajući u vidu dobijene rezultate o korisnom PGP dejstvu morskog soja *Bacillus* sp. PPM3, koji su detaljno opisani i diskutovani u prethodnim poglavljima ove disertacije, polimerni filmovi funkcionalizovani su dodavanjem ekstraćelijskog filtrata *Bacillus* sp. PPM3 u rastvor polimera, kao primer ekološke, netoksične, bioaktivne komponente. Dodatna funkcionalizacija polisaharidnih filmova, sa ciljem dobijanja materijala poboljšanih optičkih, mehaničkih i barijernih svojstava, izvršena je umrežavanjem polimera posredstvom soli bakar sulfata. Bakar sulfat odabran je kao umrežavajući agens, prvenstveno zbog dokumentovanog dobrog umrežavajućeg dejstva, kao i tradicionalne upotrebe ove soli kao fungicida u poljoprivrednoj praksi, i važne uloge koje bakarni joni imaju u osnovnim fiziološkim procesima viših biljaka [200].

### **5.6.1 Sinteza funkcionalizovanih filmova na bazi polisaharida iz morskih algi i njihova morfološka svojstva**

Sinteza filmova na bazi polisaharida iz morskih algi vršena je metodom izlivanja iz polimernog rastvora i otparavanja rastvarača. Nakon izlivanja i sušenja polimernih rastvora, formirani su filmovi koji su se odlikovali homogenom strukturom, bez vidljivih pukotina ili oštećenja. Svi filmovi su bili kompaktni i dovoljno fleksibilni da su se lako mogli odvojiti od kalupa bez lomljenja. Kontrolni agarni (AG), alginatni (AL) i kopolimerni agarno-alginatni filmovi (AA), kao i filmovi koji su sadržali ekstraćelijski filtrat *Bacillus* sp. PPM3 (AG-EF, AL-EF i AA-EF) odlikovali su se izrazitom providnošću (slika 5.11). Intenzivnija, žuta boja uočena je kod filmova sa bakterijskim ekstraćelijskim filtratom (AG-EF, AL-EF i AA-EF).

Na osnovu detaljnog pregleda literature o pogodnostima i manama različitih tehnika modifikacije i funkcionalizacije polisaharidnih filmova, a u cilju dobijanja materijala što homogenije strukture, odabrana su dva različita pristupa: *in situ* mineralizacija polimera i eksterno umrežavanje.



**Slika 5.11.** Prikaz makromorfoloških svojstava kontrolnih i funkcionalizovanih filmova na bazi polisaharida iz morskih algi

Funkcionalizacija agarnih filmova vršena je metodom *in situ* mineralizacije, odnosno istovremenim formiranjem mineralne faze i polimernog gela, direktnim umešavanjem soli, u ovom slučaju  $\text{CuSO}_4$ , u prisustvu mineralnih prekursora  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Ova tehnika pokazala se kao jednostavna, ekonomična i pogodna za dobijanje antimikrobnih Zn-mineralizovanih, Cu-mineralizovanih i bimetalčnih Ag-Cu kompozitnih agarnih filmova nenarušenog strukturnog integriteta, a sa poboljšanim mehaničkim i barijernim svojstvima [121,122,129]. U okviru ovog istraživanja, umrežavanjem agarnog polimera odabranom metodom, uspešno su sintetisani filmovi čiji je stuktorni integritet očuvan. Svi mineralizovani agarni filmovi su bili homogeni, fleksibilni i lako odvojivi od kalupa. Ipak, određene promene u morfologiji mineralizovanih filmova su uočene. Naime, nakon izlivanja i sušenja, svi mineralizovani agarni filmovi (AG-CuC, AG-CuP), kao i mineralizovani filmovi koji su sadržali bakterijski EF (AG-EFCuC i AG-EFCuP) odlikovali su se promenjenom bojom, što je posledica formiranja Cu-karbonata i Cu-fosfatne faze u agarnom matriksu. Filmovi mineralizovani Cu-fosfatnom fazom odlikovali su se smanjenom providnošću u poređenju sa kontrolnim filmovima (slika 5.11).

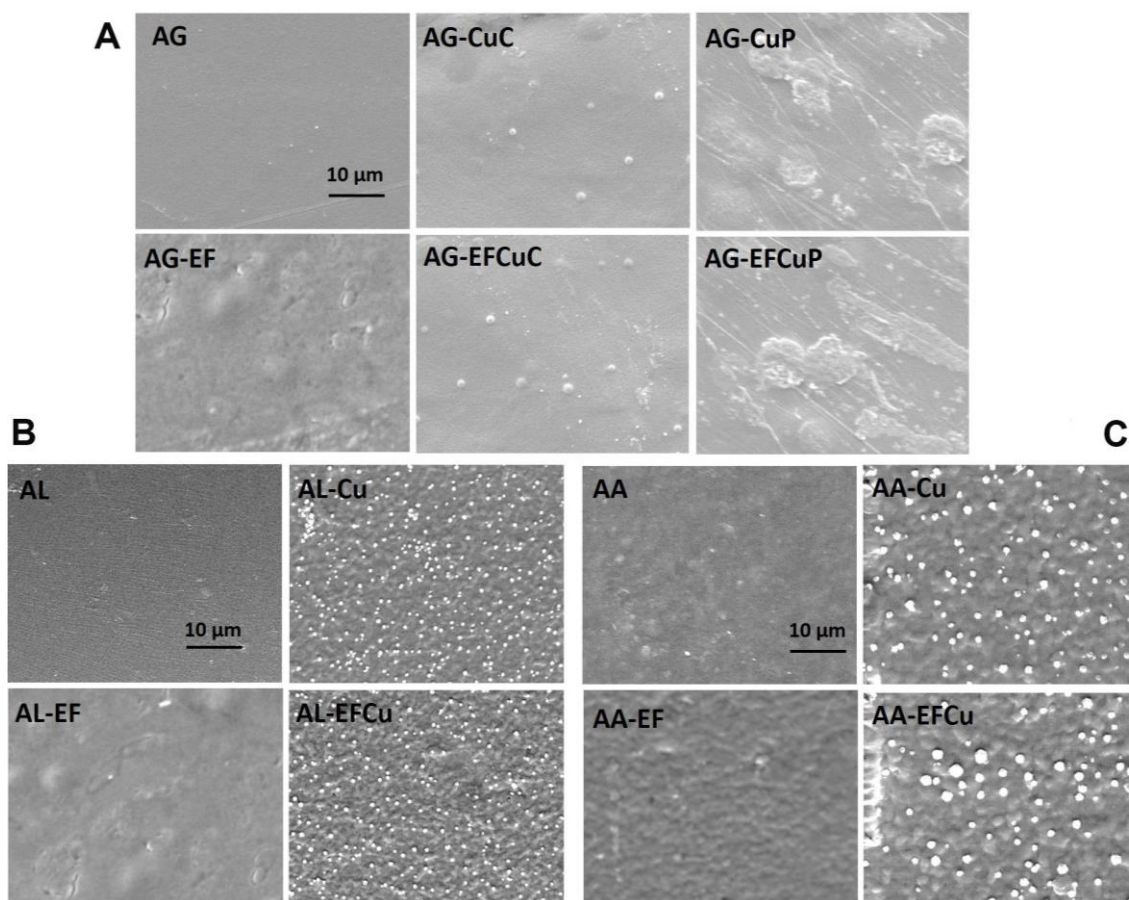
U cilju poboljšanja mehaničkih i barijernih svojstava alginatnih i agarno-alginatnih filmova, upotrebljen je metod eksternog umrežavanja, odnosno geliranja, potapanjem formiranih suvih filmova u rastvor bakar-sulfata. Joni  $\text{Cu}^{2+}$  u ovom slučaju služili su kao umrežavajući agensi. Nakon, umrežavanja i sušenja, funkcionalizovani alginatni (AL-Cu i AL-EFCu) i kopolimerni agarno-alginatni flmovi (AA-Cu i AA-EFCu) odlikovali su se promenjenom bojom, od bezbojne, odnosno blago žute, do zelene. Filmovi umreženi na ovaj način bili su homogene strukture i bez vidljivih oštećenja i izrazito providni (slika 5.11).

Kako bi se detaljnije ispitala površinska morfologija sintetisanih polisaharidnih filmova upotrebljena je skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM). Sa slike 5.12 može se uočiti da se svi kontrolni filmovi (AG, AL i AA) odlikuju glatkom i kompaktnom strukturom, bez pukotina i neravnina. Dodatkom EF *Bacillus* sp. PPM3 u polimer dolazi do neznatnih promena u homogenosti površinske strukture kod svih filmova (slika 5.12; AG-EF, AL-EF i AA-EF). Uočene promene bile su najizraženije kod agarno-alginatnih filmova (AA-EF).

Funkcionalizacijom agarnih filmova, metodom *in situ* mineralizacije, došlo je do značajnih promena u površinskoj strukturi filmova. Agarne filmove sa formiranom bakar-karbonatnom (AG-CuC), odnosno bakar-fosfatnom fazom (AG-CuP), odlikovala je neravna površina sa vidljivim



aglomeracijama čestica mineralne faze (slika 5.12 A). Sa SEM mikrografija može se uočiti da je karbonatna mineralna faza bolje dispergovana i uniformnije raspoređena u agarnom polimeru od fosfatne faze (slika 5.12). Prosečna veličina aglomerata Cu-fosfatne faze kretala se u opsegu od 1-10  $\mu\text{m}$ , dok je prosečna veličina aglomerata Cu-karbonatne faze bila između 0,5 i 1  $\mu\text{m}$ . Ovi rezultati ukazuju na bolju kompatibilnost karbonatne faze sa agarnim polimerom i u saglasnosti su sa literaturnim podacima Malagurski i saradnika [130] koji su zabeležili sličnu površinsku morfologiju agarnih filmova sa cinkovim mineralnim fazama. Drugi autori zabeležili su slične strukture i površinsku morfologiju, nakon ojačavanja agarnog polimera punilima na bazi metala bakra, srebra i cinka [122,123,201]. Na mikrografijama mineralizovanih filmova koji sadrže EF (AG-EFCuC i AG-EFCuP), mogu se uočiti neznatne promene u raspodeli čestica kod filmova sa Cu-karbonatnom fazom (AG-EFCuC), dok je ovaj efekat izraženiji kod AG-EFCuP filmova. Kod filmova mineralizovanih Cu-fosfatom, uočena je i promena disperzije čestica i tendencija ka obrazovanju aglomerata većih dimenzija u odnosu na iste filmove bez bakterijskog EF (slika 5.12 A).



**Slika 5.12.** SEM mikrografije površine agarnih (A); alginatnih (B) i agarno-alginatnih filmova (C)

Nakon funkcionalizacije alginatnih filmova, metodom eksternog umrežavanja u prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$  jona, površinska morfologija filmova znatno je izmenjena (slika 5.12 B). Čestice bakarne soli, prosečne veličine 0,5  $\mu\text{m}$ , fino su dispergovane i uniformno raspoređene na celoj površini AL-Cu filma, a kod umreženih filmova sa EF *Bacillus* sp. PPM3 (AL-EFCu) nije uočena promena u morfologiji, raspodeli i disperziji Cu-čestica. Na osnovu SEM mikrografija kopolimernih agarno-alginatnih filmova (slika 5.12 C) može se uočiti nešto lošija disperzija Cu-čestica na površini filmova, sa neznatnom aglomeracijom čestica, dok je raspodela čestica ostala poprilično ujednačena (AA-Cu). Međutim, kod umreženih agarno-alginatnih filmova sa bakterijskim EF (AA-EFCu), može se uočiti pojava većeg broja aglomerata, odnosno nagomilavanje čestica znatno većih dimenzija, i uopšteno pogoršanje njihove disperzije u polimeru u odnosu na AA-Cu filmove. Takođe, u prisustvu

ekstraćelijskog filtrata, kod umreženih agarno-alginatnih filmova može se uočiti neujednačena raspodela čestica. Ovi rezultati ukazuju na ne tako dobru kompatibilnost između sastavnih komponenti kod kopolimernih agarno-alginatnih filmova.

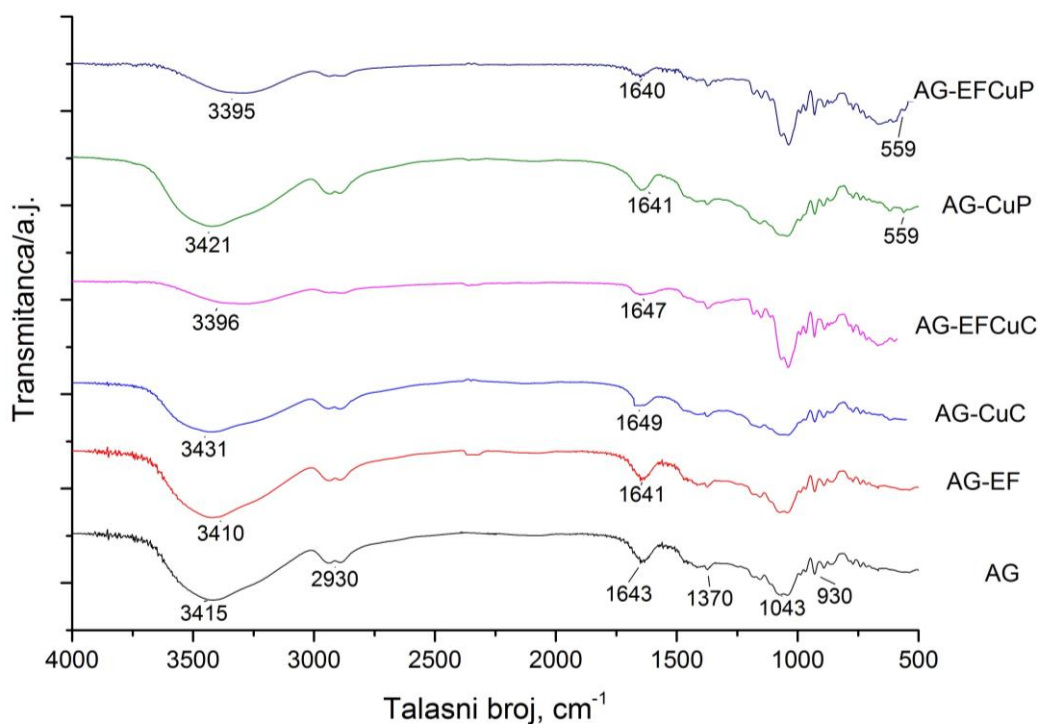
Može se pretpostaviti da u prisustvu EF nakon umrežavanja, dolazi do povećanja slobodne zapremine unutar polimera, usled nekompatibilnosti sastavnih komponenti, što utiče na disperziju i morfologiju čestica. Upotreba druge tehnike snimanja bolje rezolucije, ili analiza poprečnih preseka filmova omogućila bi bolji uvid u fenomene koji se odvijaju u ovom slučaju.

### 5.6.2 FT-IR analiza

FT-IR analiza filmova na bazi polisaharida iz morskih algi, izvršena je radi utvrđivanja prisustva inkorporiranih bioaktivnih komponenti u polimernoj mreži, kao i mogućih hemijskih promena koje su nastale usled njihovih međusobnih interakcija. Na spektrima svih filmova u regionu od 3600-500  $\text{cm}^{-1}$  uočeni su signali karakteristični za polisaharide izolovane iz morskih algi [200] (slika 5.13, slika 5.14 i slika 5.15).

Na slici 5.13 prikazani su FT-IR spektri čistih agarnih filmova (AG), agarnih filmova suplementiranih EF *Bacillus* sp. PPM3 (AG-EF), kao i agarnih filmova nakon mineralizacije Cu-karbonatnom (AG-CuC i AG-EFCuC) i Cu-fosfatnom fazom (AG-CuP i AG-EFCuP). Radi boljeg poređenja i utvrđivanja prisustva EF i mineralnih faza unutar agarnog polimera snimljeni su i FT-IR spektri čistog EF *Bacillus* sp. PPM3, kao i slobodnih mineralnih precipitata Cu-karbonata (Cu-C) i Cu-fosfata (Cu-P). Spektar slobodne karbonatne mineralne faze (prilog 1, slika P-1.4) pokazuje intenzivne trake na 3404  $\text{cm}^{-1}$  poreklom od valencionih vibracija O-H veza i signal na 1400  $\text{cm}^{-1}$  (poreklom od valencionih vibracija  $\text{CO}_3^{2-}$ ) [202]. FT-IR spektar slobodne fosfatne mineralne faze (prilog 1, slika P-1.5) pokazuje široku traku na 3400  $\text{cm}^{-1}$  (OH valencione vibracije) kao i signal na 1630  $\text{cm}^{-1}$  koji potiče od deformacionih vibracija -OH grupe. Uočava se i signal na 1100  $\text{cm}^{-1}$  koji odgovara simetričnim valencionim vibracijama  $(\text{PO}_4)^{3-}$  grupa, dok valencione vibracije u regionu između 1040-993  $\text{cm}^{-1}$  odgovaraju P=O vezama. Karakteristični signali koji se javljaju u regionu između talasnih brojeva 500 i 700  $\text{cm}^{-1}$  na spektrima oba mineralna precipitata odgovaraju valencionim vibracijama Cu-O veze [202,203]. Spektar čistog EF *Bacillus* sp. PPM3 (prilog 1, slika P-1.6) pokazuje karakteristične signale za -OH i -NH grupe koje se pojavljuju na 3220  $\text{cm}^{-1}$ ; CO-NH peptidne veze na 1616  $\text{cm}^{-1}$ , kao i signale na 1410  $\text{cm}^{-1}$  i 2928–2872  $\text{cm}^{-1}$  koji mogu poticati od alifatičnih C-H veza lipopeptida [105].

Na spektrima agarnih filmova se mogu uočiti neki od karakterističnih signala koji se javljaju kod svih polisaharida (slika 5.13). Najdominantniji signali koji se uočavaju kod svih filmova, javljaju se u regionu između 3200-3600  $\text{cm}^{-1}$  i odgovaraju valencionim vibracijama -OH veza, koje su posledica formiranja inter- i intramolekulskih vodoničnih veza. Signali umerenog intenziteta, zabeleženi u regionu između 3000-2500  $\text{cm}^{-1}$ , karakteristični su za valencione i deformacione vibracije CH,  $\text{CH}_2$ , i  $\text{CH}_3$  grupa [124,204]. Na spektrima čistih agarnih filmova (AG) uočava se signal na 1370  $\text{cm}^{-1}$ , karakterističan za valencione vibracije sulfitnih grupa estara, kao i signali na 1043  $\text{cm}^{-1}$  i 930  $\text{cm}^{-1}$  poreklom od valencionih vibracija C-O veza 3,6-D-galaktoze [201,205]. Takođe uočava se i izražen signal na talasnom broju 1643  $\text{cm}^{-1}$ , koji potiče od valencionih vibracija konjugovanih peptidnih veza [124,205].

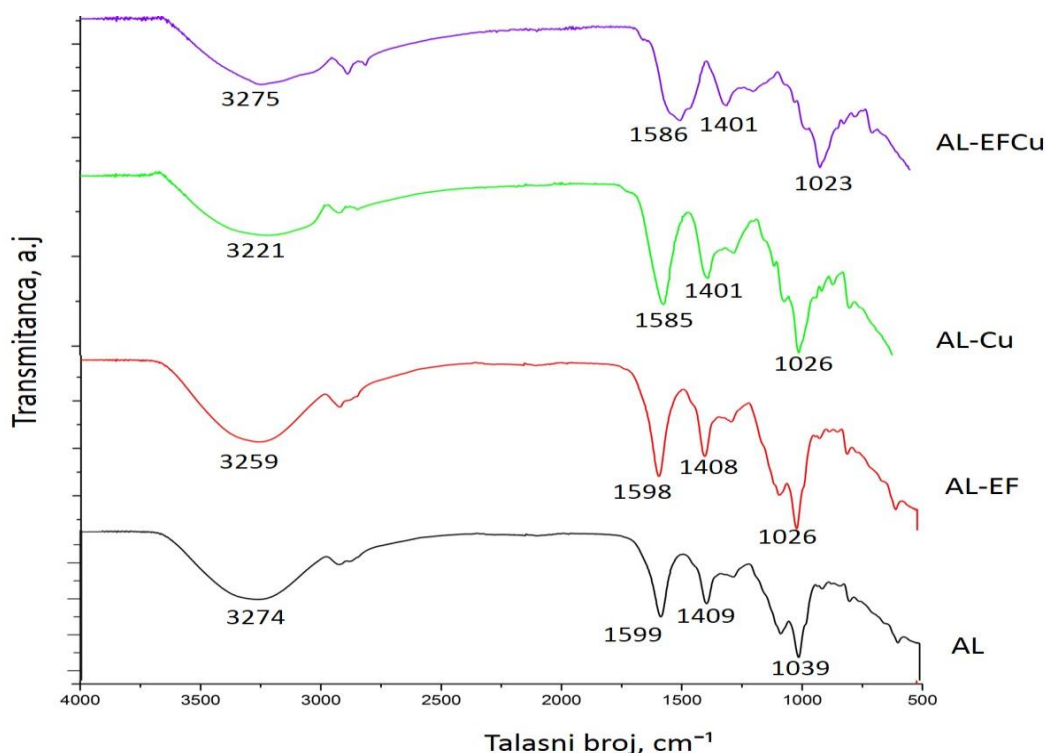


**Slika 5.13.** FT-IR spektri agarnih i agarnih filmova suplementiranih EF *Bacillus* sp. PPM3 pre i posle formiranja bakarnih mineralnih faza

Inkorporacijom EF *Bacillus* sp. PPM3 u agarni polimer (AG-EF) ne uočavaju se novi signali, što ukazuje da ne dolazi do značajnijih promena, odnosno narušavanja hemijske strukture agarnog polimera. Međutim dolazi do promene intenziteta i proširenja traka u regionu karakterističnom za valencione vibracije -OH veza, kao i njihovog pomeranja ka nižim frekvencijama, što ukazuje da dolazi do obrazovanja vodoničnih veza između funkcionalnih grupa bakterijskog EF i agarnog polimera. Takođe uočava se i pomeranje pozicije signala, karakterističnog za peptidne veze ka nižim frekvencijama, sa  $1643\text{ cm}^{-1}$  na  $1641\text{ cm}^{-1}$ , što može biti posledica interakcije amino grupa ekstraćelijskog filtrata *Bacillus* sp. PPM3 sa agarnim polimerom [105,206]. Nakon mineralizacije filmova, u spektru filmova mineralizovanih Cu-karbonatnom fazom (slika 5.13, AG-CuC i AG-EFCuC) mogu se uočiti samo trake karakteristične za agar, dok se signali koji potiču od mineralnih faza preklapaju. Ipak, pomeranje signala karakterističnih za vibracije -OH veza agarnog polimera, sa  $3415\text{ cm}^{-1}$  na  $3431\text{ cm}^{-1}$ , ukazuje da ove grupe učestvuju u formiranju vodoničnih veza između agara i mineralne karbonatne faze [124]. Prisustvo fosfata u strukturi agarnih filmova mineralizovanih Cu-fosfatnom fazom (AG-CuP i AG-EFCuP) može se potvrditi pojavom signala karakterističnih za fosfate na oko  $559\text{ cm}^{-1}$ .

Glavna strukturalna svojstva alginatnih filmova predstavljena su na slici 5.14. Spektri filmova osnovnog polimera, odnosno čistih alginatnih filmova (AL) pored karakterističnih signala -OH ( $3274\text{ cm}^{-1}$ ) i C-H veza ( $2932\text{ cm}^{-1}$ ), pokazuju intenzivne signale na  $1599\text{ cm}^{-1}$  i  $1409\text{ cm}^{-1}$  poreklom od asimetričnih i simetričnih valencionih vibracija karakterističnih za karboksilne ( $\text{COO}^-$ ) grupe alginata [124,205]. Valencione vibracije C-O-C i C-C veza detektovane su u regionu između  $1360$  i  $800\text{ cm}^{-1}$  [205,207]. Kao i u slučaju agarnih filmova, nakon inkorporacije EF *Bacillus* sp. PPM3 u alginatnu mrežu (slika 5.14, AL-EF), najveće promene se uočavaju u regionu između  $3200$ - $3600\text{ cm}^{-1}$  karakterističnom za valencione vibracije -OH grupa i valencione vibracije amino grupa [208]. Prisustvo ekstraćelijskog filtrata u alginatnoj mreži, uzrokuje značajno pomeranje pozicije signala -OH grupa ka nižim frekvencijama, sa  $3274\text{ cm}^{-1}$  na  $3259\text{ cm}^{-1}$ . Pomeranje ovih signala ka nižim frekvencijama indicacija je formiranja vodoničnih veza između alginata i funkcionalnih grupa bakterijskog EF. Izvesno je da EF izolata *Bacillus* sp. PPM3 sadrži određenu količinu proteina i

peptida, pre svega poreklom od komponenata mikrobiološke podloge, ostataka biomase, kao i produkata bakterijskog metabolizma (enzima, lipopeptida) čija je produkcija pokazana u prethodnim poglavljima disertacije. Promene u intenzitetu signala u ovom regionu mogu se objasniti upravo interakcijama hidroksilnih i amino grupa EF sa alginatom i potvrđuju njegovo prisustvo unutar alginatne mreže [105].

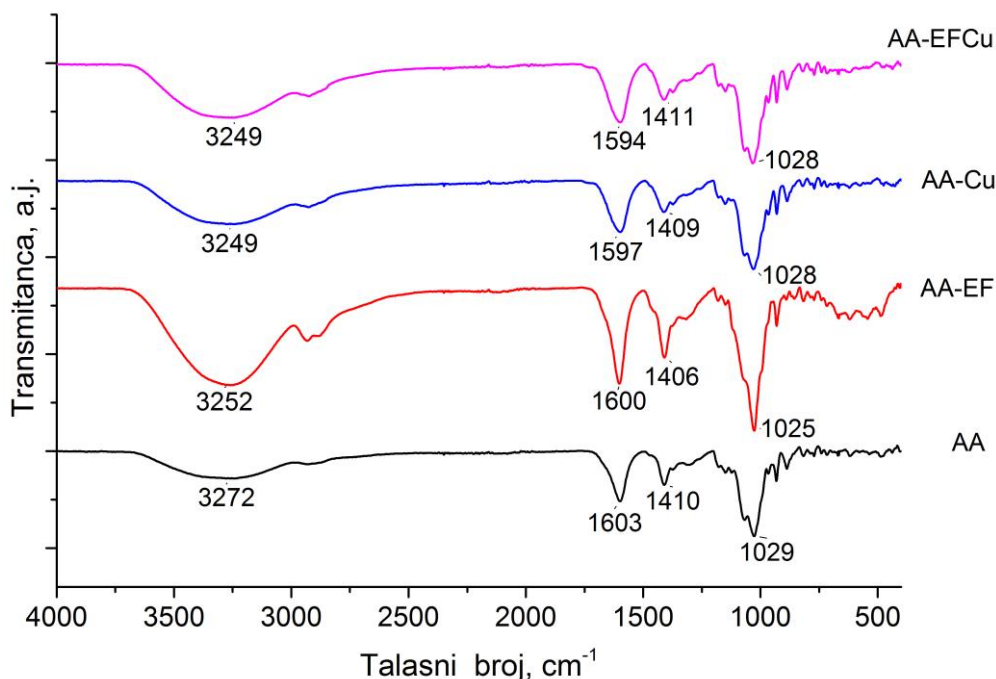


**Slika 5.14.** FT-IR spektri alginatnih filmova (AL) i alginatnih filmova suplementiranih EF *Bacillus* sp. PPM3 (AL-EF) pre umrežavanja, i nakon eksternog umrežavanja jonima bakra (AL-Cu; AL-EFCu)

Nakon eksternog umrežavanja alginatnih filmova bakarnim jonima (AL-Cu), najveće promene mogu se uočiti u regionu između 3600 i 3000  $\text{cm}^{-1}$ , gde se valencione vibracije -OH grupa pomeraju ka nižim frekvencijama (signal na 3221  $\text{cm}^{-1}$ ), dok se valencione vibracije -OH grupe kod umreženih filmova sa EF (AL-EFCu) neznatno pomeraju (signal na 3275  $\text{cm}^{-1}$ ). Ove promene ukazuju na to da je u prisustvu bakterijskog EF kod umreženih filmova, obrazovanje vodoničnih veza između samih alginatnih lanaca dominantnije, od interakcija polimera sa jonima  $\text{Cu}^{2+}$  [209]. Sa FT-IR spektara se takođe može uočiti da nakon umrežavanja AL i AL-EF filmova jonima  $\text{Cu}^{2+}$  dolazi do pomeranja signala asimetričnih (signali na talasnim brojevima 1585  $\text{cm}^{-1}$  i 1586  $\text{cm}^{-1}$ ) i simetričnih (signali na 1401  $\text{cm}^{-1}$ ) valencionih vibracija  $\text{COO}^-$  grupa ka nižim frekvencijama. Na osnovu dobijenih rezultata može se reći da u prisustvu EF *Bacillus* sp. PPM3 i  $\text{Cu}^{2+}$  jona, samo karboksilne grupe alginata učestvuju u obrazovanju vodoničnih veza [210]. Uočene promene u oblasti spektra karakterističnog za vibracije  $\text{COO}^-$  grupa, mogu se objasniti zamenom jona  $\text{Na}^+$  u Na-alginatu, jonima  $\text{Cu}^{2+}$ , odnosno obrazovanjem tipične „egg-box” strukture, u kome metalni jon interaguje sa molekulom kiseonika svake od okolnih karboksilnih grupa, kako bi stabilizovao strukturu [209]. Takođe, primećuje se pomeranje signala u regionu između 1150 i 1000  $\text{cm}^{-1}$ , poreklom od valencionih vibracija C-C i C-O veza. Pomeranje ovih signala ka nižim frekvencijama može biti posledica slabljenja spomenutih veza, i njihovog deljenja sa dvovalentnim jonima bakra [211].



Strukturne karakteristike agarno-alginatnih filmova prikazane su na slici 5.15. Na spektrima svih filmova se mogu uočiti karakteristične trake za ova dva polisaharida: region između 3500 i 3000  $\text{cm}^{-1}$  (-OH valencione vibracije); 2500-2900  $\text{cm}^{-1}$  (asimetrične i simetrične valencione vibracije C-H veza); izraženi signali na oko 1600  $\text{cm}^{-1}$  i 1400  $\text{cm}^{-1}$  (asimetrične i simetrične valencione vibracije  $\text{COO}^-$  grupa ili deformacione vibracije C-H grupa). Slabiji signali na oko 1060  $\text{cm}^{-1}$  i izraženi signali na oko 1030  $\text{cm}^{-1}$  mogu se pripisati C-O i C-C valencionim vibracijama i C-C-O i C-O-H deformacionim vibracijama piranoznog prstena prisutnog kod svih polisaharida [204,205,207].



**Slika 5.15.** FT-IR spektri agarno-alginatnih filmova (AA) i agarno-alginatnih filmova suplementiranih EF *Bacillus* sp. PPM3 (AA-EF) pre umrežavanja, i nakon eksternog umrežavanja jonima bakra (AA-Cu; AA-EFCu)

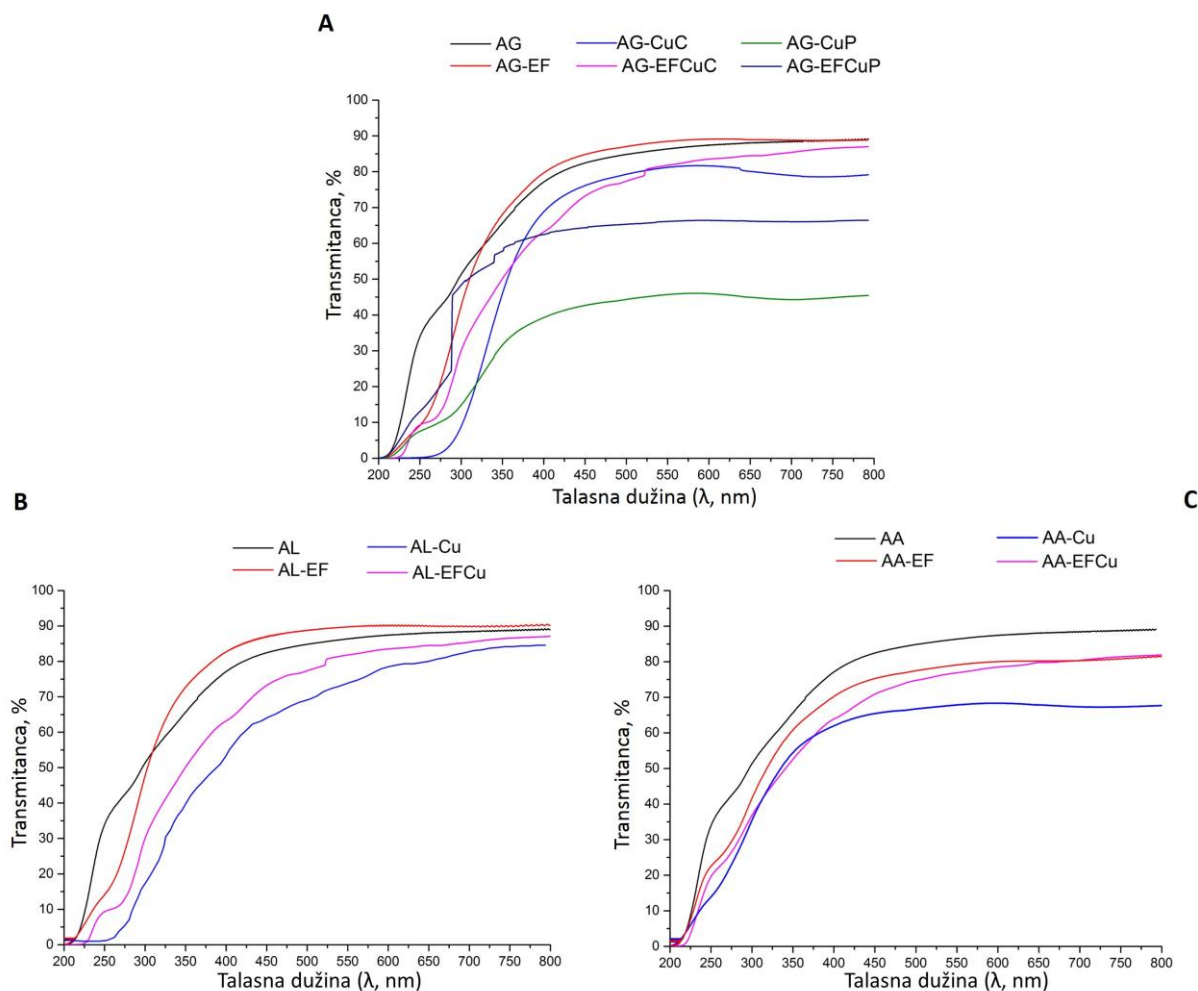
Nakon umrežavanja filmova jonima bakra (AA-Cu i AA-EFCu) najuočljivije su promene intenziteta signala karakterističnih za -OH i -NH grupe, kao i njihovo pomeranje ka nižim frekvencijama (sa 3272 na 3249  $\text{cm}^{-1}$ ), dok je pomeranje signala karakterističnih za asimetrične i simetrične valencione vibracije  $\text{COO}^-$  grupe (signali na oko 1600 i 1400  $\text{cm}^{-1}$ ) neznatno. Ova pomeranja signala ukazuju da u slučaju agarno-alginatnih filmova, -OH grupe imaju dominantnu ulogu u interakcijama konstituenata filmova [124,210].

Rezultati FT-IR analize pokazuju da upotrebljenim metodama funkcionalizacije polimernih filmova nije došlo do značajnijih promena ili nastanka novih funkcionalnih grupa kompozita, što je naznaka da hemijska struktura polimera nije narušena.

### 5.6.3 Optička svojstva filmova na bazi polisaharida poreklom iz morskih algi

Ukoliko su potrebe biljke, u smislu dovoljne količine vode i hranjivih materija, kao i odgovarajuće temperature zemljišta zadovoljene, onda dalji rast biljaka isključivo zavisi od primljene količine sunčeve svetlosti [32]. Imajući u vidu značaj filmova za malčiranje u regulaciji količine i kvaliteta svetlosti koja je dostupna biljci, u ovoj fazi pristupilo se ispitivanju optičkih svojstava sintetisanih agarnih, alginatnih i agarno-alginatnih filmova. Uticaj dodate bioaktivne komponente (EF *Bacillus* sp. PPM3) unutar filmova, odnosno mineralnih faza i načina umrežavanja filmova na njihova optička svojstva, ispitan je merenjem stepena propuštanja svetlosti (transmitance) kroz površinu filma

u regionu talasnih dužina od 200 do 800 nm (slika 5.16). Na osnovu vrednosti transmitanci u regionu spektra od 400-700 nm, izračunati su koeficijenti transmisije sintetisanih filmova unutar fotosintetički aktivnog regiona ( $k_{T_{PAR}}$ ). Vrednosti  $k_{T_{PAR}}$  upotrebljene su za karakterizaciju performansi filmova namenjenih za poboljšanje rasta useva. Stepen propuštanja UV zračenja prikazan je vrednostima transmitanci izmerenih na 280 nm, dok je propustljivost zračenja vidljivog dela spektra, kao mera transparentnosti filmova, prikazana vrednostima transmitanci izmerenih na 660 nm (tabela 5.11).



**Slika 5.16.** Stepen transmisije (%) zračenja UV-VIS regiona kroz površinu agarnih (A), alginatnih (B) i agarno-alginatnih filmova (C)

Na osnovu vrednosti prikazanih na slici 5.16, može se uočiti da se svi kontrolni filmovi (AG, AL i AA) odlikuju velikom transparentnošću, što je indikovano visokim vrednostima transmitance ( $> 80\%$ ) u vidljivom delu spektra (400-800 nm), dok su zabeležene vrednosti transmitance u UV regionu (200-400 nm) znatno niže. Određivanjem koeficijenta transmisije unutar vidljivog dela spektra značajnog za fotosintetičku aktivnost biljaka ( $k_{T_{PAR}}$ ), utvrđeno je da su najveće vrednosti ovog koeficijenta (84,40 %) dobijene kod kontrolnih agarnih filmova (AG), nešto niže vrednosti (83,41 %) zabeležene su kod kontrolnih alginatnih filmova (AL), dok su najniže vrednosti ovog koeficijenta (82,61 %) zabeležene kod agarno-alginatnih (AA) filmova (tabela 5.10). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima o optičkim svojstvima većine polisaharidnih filmova [96,114,115]. Polisaharidni filmovi se inače odlikuju velikom transparentnošću i ograničenim UV barijernim svojstvima [124], a u literaturi se mogu naći podaci koji ukazuju da dodatak nekih metalnih čestica i nanočestica, različitih esencijalnih ulja, biljnih ekstrakata i fermentacionih produkata mikroorganizama u polisaharidnu mrežu, može znatno uticati na njihova optička svojstva [105,120,121,130].

**Tabela 5.11.** Prikaz vrednosti transmitanci (%) agarnih, alginatnih i agarno-alginatnih filmova zabeleženih u UV (280 nm) i vidljivom (660 nm) regionu spektra, i vrednosti transmitacionog koeficijenta fotosintetički aktivnog regiona ( $kT_{PAR}$ ).

	Oznaka filma	Transmitanca, %		
		280 nm	660 nm	$kT_{PAR}$
AGARNI FILMOVI	<b>AG</b>	48,81	85,35	84,40
	<b>AG-EF</b>	35,15	85,20	82,51
	<b>AG-CuC</b>	2,18	76,50	76,20
	<b>AG-EFCuC</b>	19,05	80,20	78,28
	<b>AG-CuP</b>	10,75	45,25	44,29
	<b>AG-EFCuP</b>	40,25	65,12	61,49
ALGINATNI FILMOVI	<b>AL</b>	50,10	85,10	83,41
	<b>AL-EF</b>	49,01	86,03	85,03
	<b>AL-Cu</b>	8,35	77,50	74,87
	<b>AL-EFCu</b>	16,25	80,20	75,97
AGARNO- ALGINATNI FILMOVI	<b>AA</b>	52,17	84,12	82,61
	<b>AA-EF</b>	41,51	75,62	79,20
	<b>AA-Cu</b>	21,09	64,20	63,16
	<b>AA-EFCu</b>	25,87	75,65	73,68

Dodatak ekstraćelijskog filtrata *Bacillus* sp. PPM3 nije značajno uticao na vrednosti transmitance u vidljivom delu spektra, kao i  $kT_{PAR}$  kod agarnih i alginatnih filmova, u poređenju sa kontrolama. Filmovi koji su sadržali bakterijski ekstraćelijski filtrat (AG-EF i AL-EF) zadržali su visoku transparentnost, što se ogleda u izmerenim vrednostima transmitance na 660 nm, većim od 80 % (tabela 5.11). Slabije propuštanje zračenja vidljivog dela spektra, uočeno je kod agarno-alginatnih filmova koji su sadržali EF *Bacillus* sp. PPM3 (AA-EF), što ukazuje na određen stepen nekompatibilnosti sastavnih komponenti ovih filmova. Rezultati su u skladu sa rezultatima SEM analize, gde je uočena blago narušena homogenost površinske strukture AA-EF filmova (slika 5.12). Ipak, i ovi filmovi bili su izrazito transparentni, što je indikovano vrednostima transmitanci izmerenih na 660 nm, od 75,62 %. Stepem propušteneog UV zračenja kroz površinu svih filmova sa EF (AG-EF, AL-EF i AA-EF) smanjio se u odnosu na kontrolne filmove. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim nakon analize morfoloških karakteristika filmova (slika 5.11) i SEM analize (slika 5.12).

Funkcionalizacijom agarnih filmova metodom istovremene sinteze mineralnih faza i polimerne mreže, dobijeni su filmovi znatno izmenjenih optičkih svojstava. Formiranjem Cu-karbonatne faze i Cu-fosfatne faze u agarnom polimeru, dobijeni su filmovi koji efikasnije mogu blokirati UV zrake od čistih agarnih filmova (tabela 5.11). Agarni filmovi sa Cu-karbonatnom fazom (AG-CuC i AG-EFCuC) pokazali su se efikasnijim od agarnih filmova sa Cu-fosfatnom fazom (AG-CuP, AG-EFCuP), što je indikovano nižim vrednostima transmitance izmerenim na 280 nm (tabela 5.11). Rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim nakon SEM analize (slika 5.12), gde se uočava znatno veća aglomeracija čestica Cu-fosfatne faze na površini filma. Veća aglomeracija, odnosno lošija disperzija i neujednačena raspodela Cu-fosfatne faze, a samim tim i manja specifična površina čestica koja će apsorbovati UV zrake, imala je za rezultat lošija UV barijerna svojstva ovih filmova. Visoke vrednosti transmitance u vidljivom delu spektra, kao i  $kT_{PAR}$  (približno 80 %) zabeležene su kod svih filmova mineralizovanih Cu-karbonatnom fazom (AG-CuC i AG-EFCuC). Ovi rezultati posledica su finije disperzije i ujednačenije raspodele Cu-karbonatne faze u agarnoj mreži, što je dovelo do obrazovanja filmova velike transparentnosti [96,124]. Značajno niže vrednosti transmitance i  $kT_{PAR}$  filmova mineralizovanih Cu-fosfatnom fazom (AG-CuP i AG-EFCuP) zabeležene u vidljivom regionu, još jednom potvrđuju visok stepen aglomeracije Cu-fosfatne faze i njenu nehomogenu raspodelu, što je negativno uticalo i na transparentnost filmova (slika 5.11). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora o optičkim svojstvima agarnih filmova inkorporiranih česticama cinka, srebra ili bimetalničnim Ag-Cu nanočesticama [122,124,130]. U prisustvu EF *Bacillus* sp. PPM3 došlo je do smanjenja UV barijernih kapaciteta mineralizovanih

filmova, što ukazuje na to da EF u određenoj meri utiče na proces obrazovanja mineralnih faza u agarnom polimeru. U vidljivom delu spektra nisu uočene značajne promene u vrednostima transmitance između mineralizovanih filmova sa i bez bakterijskog EF.

Funkcionalizacija alginatnih filmova, metodom eksternog umrežavanja jonima  $\text{Cu}^{2+}$ , znatno je uticala na optička svojstva filmova. Stepenu propuštanja zračenja vidljivog dela spektra kroz površinu filmova (AL-Cu) kao i filmova sa ekstraćelijskim filtratom *Bacillus* sp. PPM3 (AL-EFCu) neznatno je smanjen nakon umrežavanja (slika 5.16 B). Vrednosti  $k_{\text{TPAR}}$  AL-Cu filmova smanjile su se sa 83 % na 75 %, ali filmovi su zadržali relativno visoke vrednosti transmitance. Takođe, stepen propušenog zračenja u UV oblasti, značajno je opao nakon umrežavanja, sa 50,10 % na svega 8,35 % kod AL-Cu, odnosno 16,25 % kod AL-EFCu, što se može objasniti apsorpcijom UV zračenja od strane bakarnih čestica dispergovanih u polimernoj mreži [124]. Ovi rezultati još jednom potvrđuju uniformnost strukture alginatnih filmova i u skladu su sa dobijenim rezultatima SEM analize koji pokazuju uniformnu disperziju i raspodelu čestica bakra na površini alginatne mreže (slika 5.12). Slične promene u optičkim svojstvima kod alginatnih filmova zabeležili su drugi autori nakon eksternog umrežavanja alginata jonima kalcijuma, cinka, aluminijuma i magnezijuma [94,112,114].

U poređenju sa filmovima pojedinačnih polimera, umreženi kopolimerni agarno-alginatni filmovi (AA-Cu i AA-EFCu) odlikovali su se znatno nižim stepenom propušenog zračenja vidljivog dela spektra (660 nm) i kod ovih filmova zabeležene su najniže vrednosti  $k_{\text{TPAR}}$  (63,16 % i 73,68 %). Umrežavanjem filmova  $\text{Cu}^{2+}$  jonima, stepen propuštanja UV zračenja je smanjen u odnosu na kontrolne, neumrežene filmove, a vrednosti transmitance u ovom delu spektra iznosile su 21,09 % za AA-Cu, odnosno 25,87 % za AA-EFCu filmove. Više vrednosti transmitance UV regiona, odnosno slabije blokiranje UV zračenja, u odnosu na umrežene alginatne filmove, posledica je neuniformnije raspodele čestica i njihovih većih dimenzija. Takođe, kod umreženih agarno-alginatnih filmova koji su sadržali bakterijske metabolite (AA-EFCu) na SEM mikrofografijama se mogla uočiti veća aglomeracija čestica, što je za posledicu imalo i manje efikasno blokiranje UV zraka (slika 5.12). Ovi rezultati još jednom ukazuju na postojanje lošije kompatibilnosti sastavnih komponenti kopolimernih AA filmova, kao i izražen efekat EF na disperziju i raspodelu čestica u polimeru.

Sa povećanjem uniformnosti strukture filma, raste i stepen transmisije sunčevog zračenja kroz njihovu površinu [96]. Velika propustljivost sunčevog zračenja, naročito vidljivog dela spektra, kroz površinu filmova može značajno poboljšati termička svojstva zemljišta, što će dalje imati pozitivan efekat na povećanje produktivnosti biljaka, njihov brži rast, ranije cvetanje i plodonošenje [88]. Sunčevo zračenje propušteno u okviru PAR regiona utiče na fotosintezu koja je osnovni proces odgovoran za rast biljaka. Stepenu propuštanja zračenja vidljivog regiona spektra, kao i  $k_{\text{TPAR}}$  agarnih, alginatnih i agarno-alginatnih filmova ispitivanih u okviru ovog istraživanja, uporedive su sa konvencionalnim LDPE malčirajućim filmovima korišćenim u agroindustriji, čiji  $k_{\text{TPAR}}$  iznosi približno 87 % [89]. Rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima i o drugim biopolimernim filmovima namenjenim malčiranju [94,96,114]. Vrednosti  $k_{\text{TPAR}}$  funkcionalizovanih alginatnih filmova (AL-Cu i AL-EFCu) bile su slične onim koje su zabeležili Šetini i saradnici [94] za biopolimerni transparentni film na bazi skroba ( $k_{\text{TPAR}}$  od 74,30 %). Vrednosti ovog koeficijenta nemineralizovanih i mineralizovanih agarnih filmova iz ovog istraživanja bili su veći, i u saglasnosti sa vrednostima dobijenim za biopolimerni, komercijalno dostupan Mater-Bi [212] malčirajući film [96]. Takođe, važno je napomenuti i da su odabranim metodama funkcionalizacije, *in situ* mineralizacijom i eksternim umrežavanjem polimera jonima bakra, dobijeni materijali poboljšanih UV barijernih svojstava. Ovaj efekat najizraženiji je bio kod agarnih filmova mineralizovanih Cu-karbonatnom mineralnom fazom i umreženih alginatnih filmova.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su među svim formulacijama funkcionalizovanih filmova, filmovi na bazi pojedinačnih polimera, i to agarni filmovi sa Cu-karbonatnom mineralnom fazom (AG-CuC i AG-EFCuC), kao i umreženi alginatni filmovi (AL-Cu i AL-EFCu) najpogodniji za potencijalnu primenu kao filmovi za malčiranje. Pogodnost ovih filmova ogleda se u dvojakom efektu. Naime, zahvaljujući velikoj transparentnosti, odnosno značajnom propuštanju zračenja PAR regiona, ovi filmovi imaju najveći potencijal da direktno pospeše rast i produktivnost biljke, omogućavanjem nesmetanog odvijanja fotosinteze. Sa druge strane, uspešnim



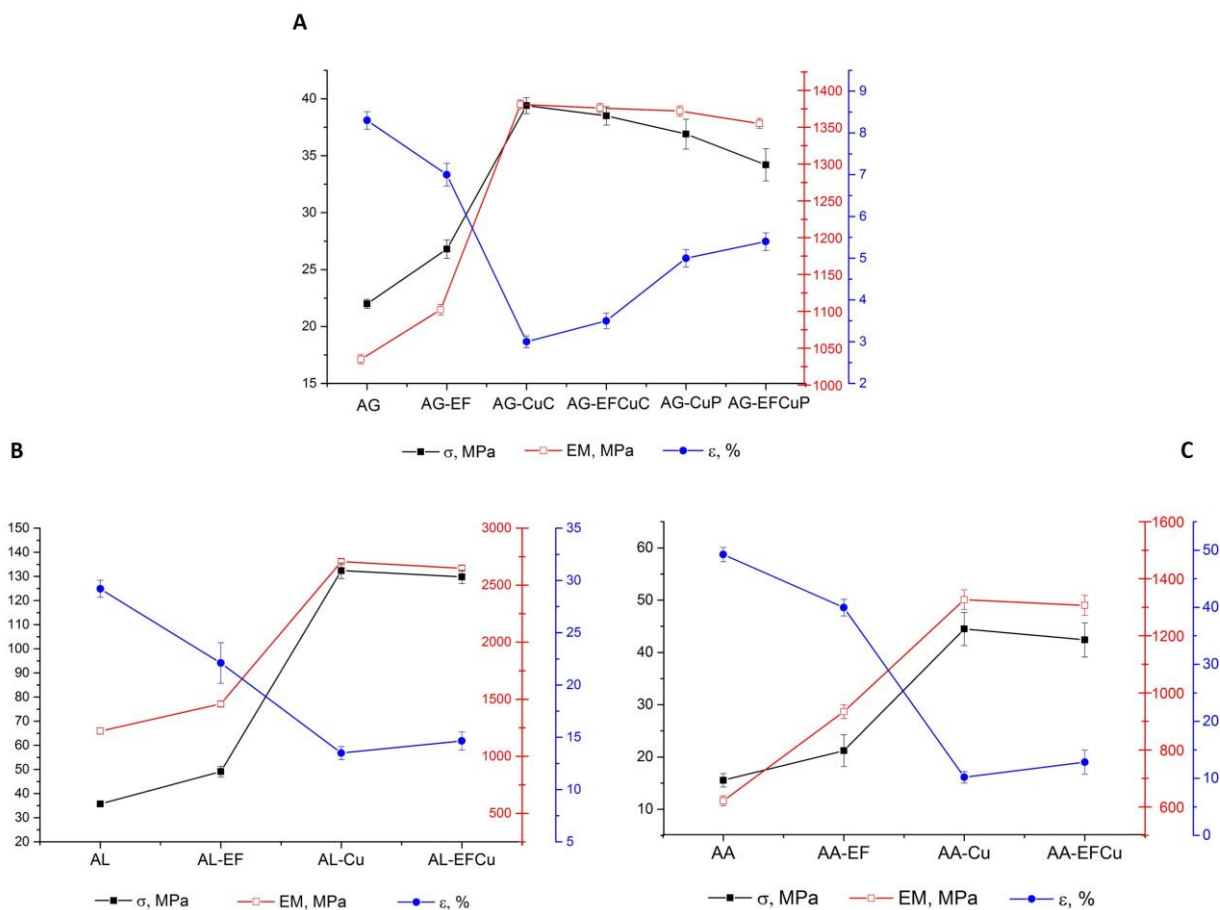
blokiranjem UV zračenja, koje je ključno za sporulaciju nekih patogenih plesni, kao i orijentaciju insekata, ovi filmovi bi mogli ispoljiti pozitivan efekat sa stanovišta zaštite poljoprivrednih kultura od patogena, odnosno biokontrolni efekat.

#### 5.6.4 Mehanička svojstva filmova na bazi polisaharida poreklom iz morskih algi

Adekvatnost biopolimernih filmova, odnosno njihovu specifičnu primenu u oblasti agroindustrije, u velikoj meri će odrediti njihove mehaničke osobine. Mehanička svojstva sintetisanih agarnih, alginatnih i agarno-alginatnih filmova, određena su utvrđivanjem osnovnih parametara koji su mera jačine i otpornosti, odnosno zatezne čvrstoće ( $\sigma$ ) i Jungovog modula elastičnosti (EM), dok je elastičnost utvrđena merenjem izduženja pri kidanju ( $\epsilon$ ).

Među formulacijama kontrolnih polisaharidnih filmova, najviše vrednosti zatezne čvrstoće ( $35,70 \pm 1,25$  MPa) zabeležene su kod čistih alginatnih filmova (AL), niže vrednosti ovog parametra zabeležene su kod agarnih filmova (AG,  $22,01 \pm 0,41$  MPa), dok je zatezna čvrstoća kopolimernih agarno-alginatnih filmova (AA) bila najniža i iznosila je  $15,55 \pm 1,08$  MPa (slika 5.17). Dodatkom ekstraćelijskog filtrata *Bacillus* sp. PPM3 u polimer, došlo je do povećanja vrednosti zatezne čvrstoće ( $\sigma$ ) i elastičnog modula (EM), odnosno do povećanja jačine i rigidnosti strukture formiranih filmova. Dodatak EF, doveo je i do smanjenja elastičnosti filmova, na šta ukazuju niže vrednosti izduženja pri kidanju ( $\epsilon$ ) u poređenju sa kontrolnim polimernim filmovima. Uočene promene u mehaničkim svojstvima nakon dodavanja EF u polimernu mrežu, najizraženije su bile kod alginatnih filmova (AL-EF, slika 5.17 B). Rezultati ukazuju da se između bakterijskog EF i molekula u polimeru ostvaruje značajan stepen interakcija, koje za posledicu imaju ograničavanje pokretljivosti lanaca polimera, što dalje uzrokuje rigidniju, manje fleksibilnu strukturu filmova.

Postupkom *in situ* mineralizacije agarnih filmova, odnosno formiranjem bakar-karbonatne i bakar-fosfatne faze u polimeru, dolazi do značajnih promena u ispitivanim mehaničkim osobinama. Naime, nakon formiranja obe mineralne faze u agarnom polimeru, uočava se značajno povećanje vrednosti zatezne čvrstoće ( $\sigma$ ) i Jungovog modula elastičnosti (EM) filmova, u poređenju sa nemineralizovanim agarnim filmovima (slika 5.17 A). Najveće vrednosti zatezne čvrstoće iznosile su 39,4 MPa za Cu-karbonatne filmove (AG-CuC) i 36,9 MPa za Cu-fosfatne filmove (AG-CuP). Očekivano, vrednosti izduženja pri kidanju ( $\epsilon$ ) smanjile su se nakon mineralizacije filmova sa  $8,3 \pm 0,71$  %, zabeleženih kod kontrolnih agarnih filmova (AG), na svega  $3,0 \pm 0,14$  % kod AG-CuC, odnosno  $5,0 \pm 0,21$  % kod AG-CuP filmova. U slučaju mineralizovanih filmova koji sadrže bakterijski EF, vrednosti  $\sigma$  i  $\epsilon$  iznosile su  $38,5 \pm 0,81$  MPa i  $3,50 \pm 0,19$  % za Cu-karbonatne (AG-EFCuC), odnosno  $34,2 \pm 1,41$  MPa i  $5,4 \pm 0,20$  % za Cu-fosfatne (AG-EFCuP) filmove. Iako je kod svih mineralizovanih filmova uočeno poboljšanje čvrstine i otpornosti filmova, u odnosu na nemineralizovane filmove, ojačavajući efekat Cu-mineralnih faza bio je slabiji kod filmova sa EF, što je indikovano neznatno nižim izmerenim vrednostima  $\sigma$  i EM kod ovih filmova u poređenju sa istim bez dodatog EF. Može se pretpostaviti da u prisustvu EF *Bacillus* sp. PPM3 dolazi do određenog ograničavanja interakcija polimera i čestica obrazovanih Cu-mineralnih faza, što za posledicu ima slabiji efekat punila na mehanička svojstva ovih filmova. Ovi rezultati su saglasni sa rezultatima SEM analize, gde je uočena manje homogena struktura AG-EF filmova kao i nešto lošija disperzija čestica mineralnih faza u uzorcima sa EF naročito kod AG-EFCuP filmova (slika 5.11 A).



**Slika 5.17.** Mehanička svojstva funkcionalizovanih agarnih (A), alginatnih (B) i agarno-alginatnih filmova (C);  $\sigma$ -zatezna čvrstoća (MPa); EM-Jungov modul elastičnosti (MPa);  $\epsilon$ -izduženje pri kidanju (%)

Mehanička svojstva polimernih filmova zavise od stepena i raspodele unutar- i međumolekulskih interakcija između samih polimernih lanaca [126]. Tako će i interakcije, koje će se ostvariti između polimerne mreže i punila, odnosno efikasnost prenosa napona sa polimerne mreže na punilo uticati na jačinu kompozitnih filmova [207]. Povećanje vrednosti  $\sigma$  i EM mineralizovanih bakar-karbonatnih (AG-CuC i AG-EFCuC) i bakar-fosfatnih (AG-CuP i AG-EFCuP) agarnih filmova može biti posledica postojanja interfacijalne adhezije, odnosno obrazovanja molekulskih interakcija između agarnog polimera i bakarnih čestica mineralnih faza [124,126]. Veće vrednosti izduženja pri kidanju i Jungovog modula elastičnosti zabeležene su kod Cu-karbonatnih filmova, odnosno bakar-karbonatna faza pokazala je bolju kompatibilnost sa agarnim polimerom od bakar-fosfatne faze, obrazujući čvršće i otpornije filmove. Ovi rezultati mogu se objasniti boljom interfacijalnom adhezijom Cu-karbonatne faze sa agarom, usled njene bolje disperzije i ujednačenije raspodele u agarnoj mreži, što je u skladu sa rezultatima SEM analize i analizom UV-VIS spektara ovih filmova. Usled finije disperzije i raspodele Cu-karbonatnih čestica manjih dimenzija, specifična površina koja će stupati u interakcije sa polimerom je veća nego u slučaju agarnih filmova mineralizovanih Cu-fosfatnom fazom. U tom slučaju Cu-karbonatna faza ima mogućnost ostvarivanja više kontakata sa polimernim lancima, što za posledicu ima obrazovanje gušće mreže i kompaktnijih i jačih struktura. Sa druge strane, na izduženje pri kidanju ( $\epsilon$ ) kompozitnih materijala, utiče priroda i zapreminski udeo punila, odnosno ojačivača, kao i njegova disperzija u polimernoj mreži [126]. Uopšteno, ubacivanje punila koja su po strukturi rigidnija, kao što su čestice i nanočestice metala, ima za posledicu smanjivanje izduženja pri kidanju kompozitnih materijala [115,201]. Vrednosti zatezne čvrstoće i elastičnog modula, kao mere jačine i otpornosti filmova, dobijene za mineralizovane Cu-karbonatne

i Cu-fosfatne agarne filmove, u opsegu su vrednosti dobijenih za druge kompozitne agarne filmove inkorporirane metalnim nanočesticama Ag, Zn i Cu [122–124]. Međutim, dobijene vrednosti izduženja pri kidanju kod svih filmova na bazi agara, niže su od onih opisanih u literaturi za druge agarne kompozitne filmove [122,124].

Mehanička svojstva alginatnih i agarno-alginatnih filmova prikazana su na slici 5.17 (B i C). Eksternim umrežavanjem alginata i kopolimernih agarno-alginatnih filmova posredstvom jona  $\text{Cu}^{2+}$ , došlo je do poboljšanja mehaničkih svojstava filmova, odnosno do povećanja njihove otpornosti i jačine. Vrednosti zatezne čvrstoće ( $\sigma$ ) umreženih alginatnih filmova (AL-Cu) povećale su se skoro 4 puta, u odnosu na kontrolne (AL) filmove, sa  $35,7 \pm 1,25$  MPa na  $132,09 \pm 3,27$  MPa (slika 5.17 B), dok su kod agarno-alginatnih filmova vrednosti  $\sigma$  povećane sa  $15,54 \pm 1,58$  MPa (AA) na  $44,48 \pm 3,16$  MPa (AA-Cu, slika 5.17 C). Isti trend povećanja modula elastičnosti (EM) nakon umrežavanja, zabeležen je kod AL-Cu i AA-Cu filmova. Umrežavanje  $\text{Cu}^{2+}$  jonima rezultiralo je i u značajnom smanjenju vrednosti  $\varepsilon$  kod oba polimera u odnosu na neumrežene filmove, a ovo smanjenje bilo je izraženije kod AA-Cu filmova (slika 5.17 C). Vrednosti izduženja pri kidanju AA-Cu filmova smanjile su se 5 puta u poređenju sa neumreženim AA filmovima (sa 50,1 % na 10,2 %). Dobijene vrednosti ispitivanih mehaničkih parametara mogu se objasniti pre svega snažnim interakcijama između karboksilnih grupa alginata i jona  $\text{Cu}^{2+}$  i formiranjem tzv. „egg-box” strukture, što podržavaju rezultati dobijeni nakon FT-IR analize, odnosno specifično pomeranje signala traka karakterističnih za  $\text{COO}^-$  grupe alginata nakon umrežavanja (slika 5.14). Inkorporacija dvovalentnih katjona može delimično da zameni slabije međumolekulske interakcije između lanaca polimera, formiranjem jačih katjon-polimer-katjon kompleksa [113]. Obzirom da se kao posledica obrazovanja ovih kompleksa i smanjenja slobodne zapremine unutar polimera prilikom umrežavanja, formiraju kompaktnije strukture, povećanje jačine filmova i smanjenje elastičnosti je očekivano. Uopšteno, jonsko umrežavanje dovodi do snižavanja vrednosti izduženja pri kidanju, usled smanjenja pokretljivosti polimernih lanaca kao posledice obrazovanja velikog broja zona povezivanja polimera sa katjonima [112,114].

Umrežavanjem filmova koji sadrže EF *Bacillus* sp. PPM3 (AL-EFCu i AA-EFCu), zatezna čvrstoća i modul elastičnosti se povećavaju u odnosu na neumrežene filmove (AL-EF i AA-EF), ali su dobijene vrednosti niže od onih zabeleženih za umrežene alginatne (AL-Cu), odnosno agarno-alginatne filmove bez EF (AA-Cu, slika 5.17 B i C). Može se reći da i u ovom slučaju bakterijski EF u određenoj meri inhibira umrežavajući efekat  $\text{Cu}^{2+}$  čestica, odnosno da postoji određena nekompatibilnost između EF i čestica bakarnih soli, na šta ukazuju manje homogene površinske strukture uočene na SEM mikrofografijama, naročito u slučaju agarno-alginatnih filmova (slika 5.12 B i C). Kao posledica slabije kompatibilnosti sastavnih komponenti kompozita, može doći do povećanja slobodne zapremine unutar polimerne mreže, slabljenja međumolekulskih interakcija, i samim tim smanjenja ojačavajućeg efekta umreživača [126,213]. Uočava se da je u prisustvu EF slabljenje ojačavajućeg efekta bakarnih čestica, više izraženo kod agarno-alginatnih filmova (AA-EFCu) u poređenju sa AL-EFCu filmovima, što je posledica lošije disperzije i raspodele čestica (slika 5.12 B i C). Čestice bakra kod AA-EFCu filmova teže aglomeraciji, odnosno većih su dimenzija od onih kod AA-Cu filmova, njihova specifična površina je manja, a samim tim i površina koja će interagovati sa polimernom mrežom. U ovom slučaju prilikom primenjene sile (sile istezanja) prenos stresa sa polimerne mreže na punilo neće biti tako efikasan kao što bi to bio slučaj sa umreženim filmovima bez EF, i stoga umrežene filmove sa EF odlikuje manja jačina. Drugi autori pokazali su inhibitoran efekat bioaktivnih komponenti poreklom od bakterijskog metabolizma, na umrežavajući efekat  $\text{Ca}^{2+}$  jona kod alginatnih filmova [105,121], kao i slabiji ojačavajući efekat nanočestica srebra u agarnoj mreži u prisustvu biljnih ekstrakata [120].

Vrednosti mehaničkih parametara, zatezne čvrstoće i modula elastičnosti, dobijenih za alginatne i agarno-alginatne filmove u opsegu su vrednosti koje su zabeležili drugi autori, za ove polisaharidne filmove [112,114,115,205]. U svom istraživanju, ispitujući efekat eksternog umrežavanja jonima  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Al}^{3+}$  na mehanička svojstva alginatnih filmova namenjenih za malčiranje zemljišta, Liling i saradnici [114] beleže povećanje zatezne čvrstoće filmova u opsegu od 72-134 MPa i smanjenje vrednosti izduženja pri kidanju sa 4 % na svega 1 %. Rim i saradnici

[112] beleže povećanje jačine alginatnih filmova sa 33,5 MPa na 74,5 MPa nakon eksternog umrežavanja jonima  $\text{Ca}^{2+}$  i smanjenu elastičnost filmova, sa izduženjem pri kidanju od 3 %.

Više vrednosti izduženja pri kidanju umreženih alginatnih i agarno-alginatnih filmova, dobijenih u okviru ovog istraživanja, u poređenju sa literaturnim nalazima drugih autora za ove polisaharide [112–114], mogu biti posledica izbora, kao i krajnje koncentracije plastifikatora koji je dodat u polimer. Plastifikatori smanjuju međumolekulske sile između polimernih lanaca, povećavaju njihovu pokretljivost, samim tim i slobodnu zapreminu unutar polimera, što utiče na povećanje kapaciteta materijala da dostigne trajnu deformaciju, odnosno utiču na povećanje fleksibilnosti i otpornosti filmova na lom [136,213,214].

Vrednosti zatezne čvrstoće svih filmova dobijene u okviru ovog istraživanja, uporedive su sa konvencionalnim plastičnim filmovima koji se upotrebljavaju u agroindustriji: poletilenskim HDPE (engl.-*High Density Polyethylen*, 22–23 MPa) i LDPE (19–44 MPa) i polipropilenskim (31–38 MPa) filmovima [90], kao i sa nekim, komercijalno dostupnim biorazgradivim polimerima na bazi polisaharida: Ecovio M12 (30 MPa) [215] i MaterBi M15 (40 MPa) [212]. Dobijene vrednosti izduženja pri kidanju filmova iz ovog istraživanja, kretale su se u opsegu od 5-50 %, u zavisnosti od formulacije i načina umrežavanja. Ove vrednosti su značajno niže od onih koje se smatraju zadovoljavajućim (najmanje 180 %) za biopolimere namenjene malčiranju zemljišta [89]. Manja fleksibilnost filmova dobijenih u ovom istraživanju može ograničiti njihovu potencijalnu upotrebu, najviše sa stanovišta njihovog postavljanja standardnim metodama koje se koriste u poljoprivrednoj praksi, za plastične filmove sintetisane ekstruzijom. U ovom slučaju drugačiji pristup postavljanja, odnosno primena u vidu prevlaka putem raspršivanja filmogenih rastvora po površini zemljišta, umesto postavljanja prethodno formiranih filmova bio bi poželjniji. Voks i saradnici [96], a kasnije Imirzi i saradnici [14] pokazali su funkcionalnost biopolimernih filmova na bazi skroba, tokom celog vegetacijskog perioda gajenih biljaka u trajanju od mesec dana, iako su njihova zatezna čvrstoća i elastičnost bile znatno ispod standardnih preporučenih. Na osnovu vrednosti zatezne čvrstoće, koje su kod funkcionalizovanih alginatnih i agarno-alginatnih filmova iz ovog istraživanja, bile znatno veće nego kod konvencionalnih plastičnih malčeva [91], može se reći da bi filmovi dobijeni u okviru ovog istraživanja mogli ispoljiti funkcionalnost i trajnost u uslovima gajenja u stakleniku ili na polju.

Imajući u vidu zahteve koje biopolimerni materijali moraju da ispune sa stanovišta njihovih mehaničkih osobina, i rezultate dobijene u okviru ove faze istraživanja, može se zaključiti da su među svim ispitivanim formulacijama, umreženi filmovi na bazi alginata (AL-Cu), kao i alginata sa ekstraćelijskim filtratom *Bacillus* sp. PPM3 (AL-EFCu) najpogodniji za potencijalnu primenu u vidu prevlaka odnosno filmova za malčiranje zemljišta.

### 5.6.5 Barijerna svojstva filmova na bazi polisaharida poreklom iz morskih algi

Malčevi sa dobrim barijernim svojstvima, koji će efikasno sprečiti transfer vlage, obezbediće bolju vlažnost zemljišta, a samim tim i bolje uslove za rast useva [100,216]. Stoga je ispitivanje stepena transfera, odnosno isparavanja vode kroz materijale namenjene malčiranju ključno pri odabiru formulacija za primenu na poljoprivrednim površinama. Kako bi se detaljnije utvrdila mogućnost upotrebe sintetisanih agarnih, alginatnih i agarno-alginatnih filmova za malčiranje, u ovoj fazi istraživanja ispitana su njihova barijerna svojstva, merenjem propustljivosti vodene pare kroz površinu filmova, prateći standardnu metodu ASTM E96-95 kao što je navedeno u odeljku 4.7.5 ove disertacije.

Vrednosti propustljivosti vodene pare (WVP) kontrolnih i funkcionalizovanih agarnih, alginatnih i agarno-alginatnih filmova prikazane su u tabeli 5.12. WVP kontrolnih filmova (AG, AL i AA) kretala se između  $2,50 \pm 0,01 \times 10^{-10}$  i  $3,27 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  u zavisnosti od polimera. Dodatak bakterijskog EF polimernoj mreži neznatno je uticao na poboljšanje barijernih svojstava filmova, nezavisno od sastava, odnosno upotrebljenog polisaharida. Kod svih filmova koji su sadržali EF *Bacillus* sp. PPM3 (AG-EF, AL-EF i AA-EF) propustljivost vodene pare smanjila se za približno 8 % u poređenju sa kontrolnim filmovima (tabela 5.12). Uspostavljanje jakih međumolekulskih interakcija u polimeru vodi stvaranju jačih i kompaktnijih struktura, što će rezultovati i u smanjenju

migracije vlage kroz film [216]. Povećanje jačine i otpornosti filmova sa EF *Bacillus* sp. PPM3, zabeleženo nakon ispitivanja njihovih mehaničkih svojstava, posledica je uspostavljenih međumolekulskih interakcija polimera i EF. Prolazak molekula vode kroz nastale kompaktnije strukture je otežan, pa je smanjenje WVP kod ovih filmova očekivano.

Funkcionalizacijom agarnih filmova, obrazovanjem Cu-karbonatne i Cu-fosfatne faze u agarnom polimeru, dobijeni su filmovi kod kojih je zabeleženo značajno smanjenje propustljivosti vodene pare ( $p < 0,05$ ). Filmovi sa inkorporiranom Cu-karbonatnom fazom odlikovali su se smanjenjem WVP za 40 % (AG-CuC) i 34 % (AG-EFCuC) u odnosu na kontrolne agarne filmove, dok je formiranje Cu-fosfatne faze uticalo na smanjenje WVP agarnih filmova za 32 % (AG-CuP) i 24 % (AG-EFCuP).

**Tabela 5.12.** Barijerna svojstva kontrolnih i funkcionalizovanih agarnih, alginatnih i agarno-alginatnih filmova izražena preko stepena propustljivosti vodene pare (WVP)

	Oznaka filma	WVP ( $\times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ )
AGARNI FILMOVI	AG	3,17 $\pm$ 0,07 <sup>a*</sup>
	AF-EF	2,89 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
	AG-CuC	1,94 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
	AG-EFCuC	2,10 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
	AG-CuP	2,15 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
	AG-EFCuP	2,20 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
ALGINATNI FILMOVI	AL	2,50 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	AL-EF	2,30 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
	AL-Cu	1,41 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
	AL-EFCu	1,50 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
AGARNO- ALGINATNI FILMOVI	AA	3,27 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
	AA-EF	3,00 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
	AA-Cu	2,59 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
	AA-EFCu	2,71 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>

Prikazane su srednje vrednosti ( $n=3$ ) uz standardno odstupanje.\*Vrednosti dobijene za svaki od polimera obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey-ovom testu ( $p \geq 0,05$ )

Značajno smanjenje vrednosti WVP u ovom slučaju, može se objasniti smanjenom pokretljivošću polimernih lanaca, koja je rezultat obrazovanja interfacijalne adhezije između Cu-mineralnih faza i samog agarnog polimera [124,130]. Cu-karbonatna faza se pokazala kao efikasnija barijera, što je u skladu sa rezultatima dobijenim nakon SEM analize, kao i rezultatima ispitanih mehaničkih svojstava ovih filmova. Bolja barijerna svojstva ovih filmova posledica su bolje disperzije i uniformnije raspodele bakar-karbonatne faze. Prisustvo nepropusne karbonatne mineralne faze, koja ostvaruje brojne interakcije sa agarom, dovodi do stvaranja gušće polimerne mreže značajnog smanjenja slobodne zapremine, ograničava pokretljivost polimernih lanaca i na taj način otežava difuziju molekula vode kroz polimerni film. Rezultati su u skladu sa literaturnim podacima drugih autora, koji navode da dodatak različitih vodo-nepropusnih punila, kao što su: čestice i nanočestice različitih metala, nanoglina, kao i celulozna vlakna, može značajno uticati na poboljšanje barijernih svojstava polisaharidnih filmova [122,124,217].

Barijerna svojstva alginatnih i agarno-alginatnih filmova poboljšana su nakon eksternog umrežavanja jonima  $\text{Cu}^{2+}$ , a efekat je bio izraženiji kod alginatnih filmova (AL-Cu). Smanjenje vrednosti WVP od približno 44 %, zabeleženo je kod AL-Cu filmova, dok je propustljivost vodene pare kroz površinu kopolimernih agarno-alginatnih filmova (AA-Cu) smanjena za 20 % (tabela 5.12). Poboljšanje barijernih svojstava umreženih filmova, odnosno smanjenje vrednosti WVP, može se objasniti interakcijama koje se ostvaruju između vodoničnih veza polimera i čestica bakra kao i

formiranjem „egg-box” struktura [136], što je u skladu i sa rezultatima FT-IR analize dobijenim u ovoj disertaciji. Usled vezivanja COO<sup>-</sup> grupa alginata sa jonima Cu<sup>2+</sup>, alginatni lanci gube sposobnost vezivanja molekula vode, smanjujući hidrofilitnost struktura [205]. Formiranjem „egg-box” struktura filmovi postaju kompaktniji, smanjene pokretljivosti lanaca i slobodne zapremine, što za posledicu ima otežano kretanje molekula vode kroz polimernu mrežu [112]. Bolja barijerna svojstva zabeležena su kod AL-Cu i AL-EFCu filmova, što se može objasniti boljom disperzijom i raspodelom čestica u poređenju sa AA-Cu i AA-EFCu filmovima. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima SEM analize, gde se jasno mogla uočiti aglomeracija Cu-čestica kod umreženih agarno-alginatnih filmova. Obrazovanje aglomerata stvara mesta, odnosno puteve za lakši i brži prolazak molekula vode, što za posledicu ima povećanje stepena transfera vlage, odnosno povećanje WVP, što je i uočeno u ovom istraživanju. Dobijeni rezultati u saglasnosti su i sa rezultatima opisanim u prethodnim poglavljima ovog rada koja se tiču optičkih i mehaničkih svojstava ovih filmova.

Stepen propuštanja vodene pare kroz površinu svih filmova, odnosno vrednosti WVP dobijenih u okviru ovog istraživanja su za jedan red veličine manje od onih opisanih u literaturi, za ove polisaharide (tipičnog reda veličine od 10<sup>-9</sup> g m<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>Pa<sup>-1</sup>) [124,130,205,207]. Ovi rezultati potvrđuju da je izbor metoda sinteze, kao i funkcionalizacije filmova u ovom istraživanju adekvatan za dobijanje filmova, koji će obezbediti odlična barijerna svojstva prema vodenoj pari. Od svih formulacija, filmovi na bazi alginata eksterno umrežavani jonima Cu<sup>2+</sup> (AL-Cu i AL-EFCu), pokazali su najbolja barijerna svojstva, i sa stanovišta njihove primene u vidu prevlaka, odnosno filmova za malčiranje, imaju najveći potencijal u sprečavanju gubitka vlage sa poljoprivrednih površina.

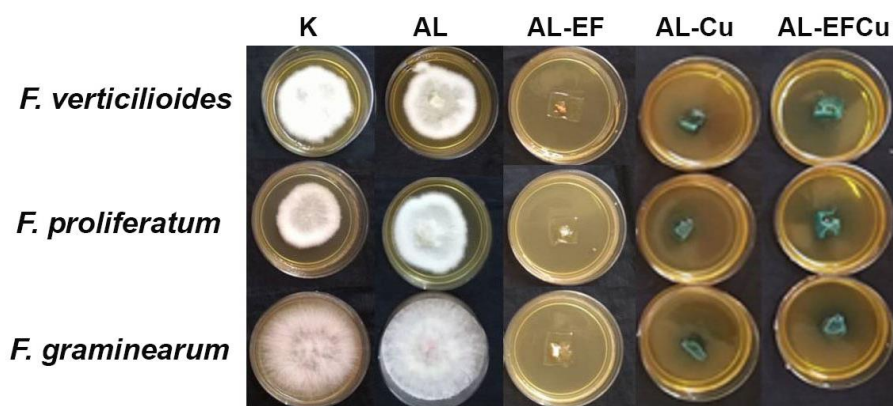
## 5.7 Biološka svojstva filmova

Uzimajući u obzir rezultate dobijene nakon karakterizacije svih sintetisanih filmova u okviru ovog istraživanja, može se zaključiti da filmove na bazi alginata odlikuju najbolje performanse. Sintezom i funkcionalizacijom filmova na bazi alginata, dobijeni su filmovi najveće jačine, otpornosti i fleksibilnosti, sa izuzetnim barijernim svojstvima prema vodenoj pari, kao i poželjnim optičkim svojstvima sa stanovišta njihovog potencijalnog uticaja na pospešivanje rasta biljaka i zaštite od patogena. Iz tog razloga su filmovi na bazi alginata odabrani za dalja ispitivanja u okviru ovog istraživanja.

### 5.7.1 Antifungalno svojstvo funkcionalizovanih alginatnih filmova

Biljne patogene plesni predstavljaju jedan od glavnih izazova i pretnji u održivoj poljoprivredi i stoga je jedno od važnih svojstava koje filmovi namenjeni upotrebi u poljoprivredi treba da poseduju, zaštita od patogena. U ovoj fazi istraživanja ispitano je antifungalno svojstvo kontrolnih i funkcionalizovanih alginatnih filmova u *in vitro* ogledu sa plesnima iz roda *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. proliferatum* i *F. verticillioides*). Ispitana je mogućnost biljnih plesni da rastu na površini ili prođu kroz površinu filma tokom 5 dana gajenja u uslovima optimalnim za rast patogena. Rezultati su pokazali da kontrolni alginatni filmovi (AL) ne poseduju antifungalno svojstvo, odnosno nemaju sposobnost sprečavanja rasta testiranih plesni. Šta više, plesni su obilno rasle, prerastajući površinu inokulisanih filmova, kao i celu površinu hranljive podloge (slika 5.18, AL). Ovaj rezultat je bio očekivan, a rast plesni posledica je samog hemijskog sastava filmova, koji su u ovom slučaju poslužili kao izvor hrane patogenu.





**Slika 5.18.** Prikaz rasta biljnih plesni: *F. verticillioides*, *F. proliferatum* i *F. graminearum* na površini kontrolnih i funkcionalizovanih alginatnih filmova nakon 5 dana na 25 °C. K-kontrola; AL-alginatni film; AL-EF-alginatni film sa EF; AL-Cu-alginatni film umrežen jonima Cu<sup>2+</sup>; AL-EFCu-alginatni film sa EF umrežen jonima Cu<sup>2+</sup>; EF-ekstraćelijski filtrat *Bacillus* sp. PPM3

Alginatni filmovi koji su kao aktivnu komponentu sadržali ekstraćelijski filtrat morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 (AL-EF), ispoljili su snažno antifungalno dejstvo prema svim ispitivanim plesnima, značajno smanjujući njihov rast (slika 5.18). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u okviru ove disertacije, a koji su detaljno diskutovani u odeljku 5.4, i još jednom potvrđuju izuzetan antifungalni potencijal sekundarnih metabolita morskog izolata *Bacillus* sp. PPM3. U ovom ogledu uočena inhibicija rasta patogenih plesni bila je veća nego što je to zabeleženo u antifungalnom testu opisanom u odeljku 5.4.1, kada su plesni gajene na agarnoj podlozi sa EF *Bacillus* sp. PPM3 u istoj koncentraciji. Ovakvi rezultati mogu se objasniti samom prirodom alginatnog polimera. Kako su alginati potpuno rastvorljivi u vodi i na sobnoj temperaturi, u kontaktu sa vlagom iz hranljive podloge i tokom inkubacije, došlo je do njihovog delimičnog rastvaranja, što je za posledicu imalo lakše otpuštanje EF iz polimera i njegov direktan kontakt sa plesnima.

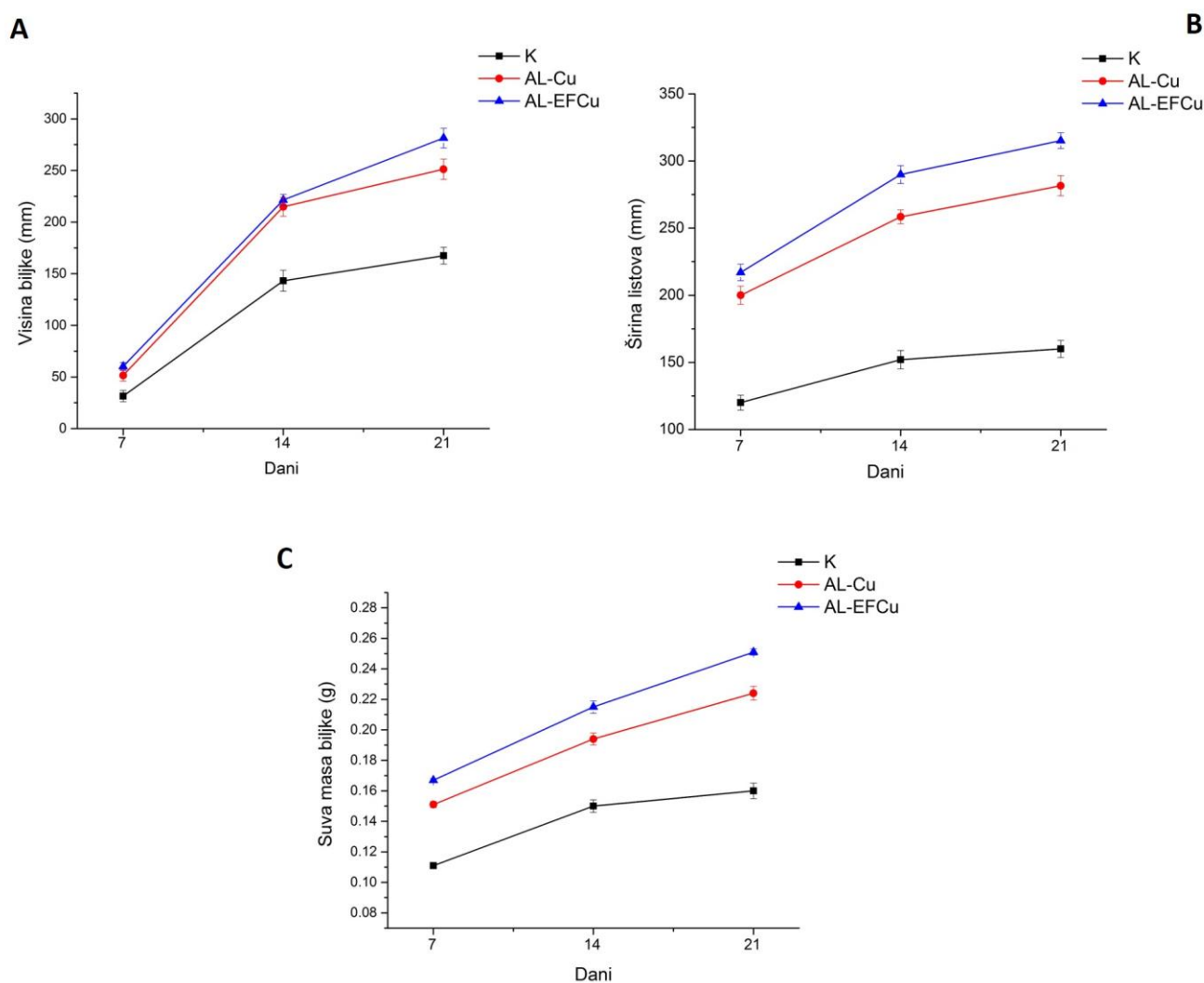
U slučaju umreženih filmova (AL-Cu i AL-EFCu), bakar je funkcionisao kao potentan antifungalni agens, u potpunosti inhibirajući rast svih ispitivanih plesni (slika 5.18). Antibakterijsko, antifungalno i antiviralno dejstvo bakarnih jona i bakarnih jedinjenja, od davnina je poznato [218]. Načini na koje joni bakra ispoljavaju toksično dejstvo prema živim sistemima su raznovrsni, a uglavnom uključuju: narušavanje strukture ćelijskih membrana uzrokujući ćelijsku smrt, stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), kao i interakciju sa enzimskim sistemima, što dovodi do poremećaja u celokupnom metabolizmu ćelija [219]. Reagujući sa fosfatnim grupama unutar DNK molekula, bakarni joni takođe destabilizuju strukturu DNK zavojnice i inhibiraju replikaciju [210]. Rezultati ogleada ukazuju da se Cu<sup>2+</sup> joni u određenoj meri mogu otpustiti iz alginatnih filmova u okolnu sredinu, i reagovati sa patogenom, na šta takođe ukazuje i blago obojenje hranljive PDA podloge u zeleno (slika 5.18). Količina otpuštenih jona Cu<sup>2+</sup> iz polimera u ovom slučaju bila je dovoljna da u direktnom kontaktu sa sporama patogenih plesni ostvari fungicidno dejstvo. Kako bi se utvrdila sposobnost plesni da prodru kroz površinu filma, filmovi su uklonjeni i ploče inkubirane dodatnih 5 dana. Nakon inkubacije nije uočen rast plesni, ni na jednoj od ploča koje su sadržale filmove sa antifungalnim dejstvom.

Dobijeni rezultati ukazuju da alginatni filmovi koji sadrže ekstraćelijski filtrat izolata *Bacillus* sp. PPM3, kao i filmovi umreženi bakarnim jonima predstavljaju dobru barijeru patogenim plesnima, i da se potencijalno mogu koristiti kao prevlake, odnosno malčevi na poljoprivrednim površinama radi zaštite biljnih kultura koje su podložne infekcijama izazvanim plesnima iz roda *Fusarium*.



## 5.7.2 Uticaj prevlaka na bazi alginata na rast biljke

Uticaj odabranih formulacija filmova na rast biljke, ispitan je sa biljkom mungo pasulja, u trajanju od 21 dana. Na osnovu detaljnog pregleda literature i uzimajući u obzir dobijene rezultate karakterizacije alginatnih filmova opisane u poglavlju 5.6 ove disertacije, u ovom ogledu odabran je pristup primene formulacija, u vidu prevlaka, njihovim formiranjem na površini zemljišta sprej-tehnikom, kao što je opisano u odeljku 4.8.2 ove disertacije. Nakon raspršivanja celokupne zapremine svakog od odabranih filmogenih rastvora (AL i AL-EF) pojedinačno, i sušenja na sobnoj temperaturi, formirane prevlake su eksterno umrežene jonima  $\text{Cu}^{2+}$  kako bi se obezbedila njihova vodonepropusnost i trajnost tokom gajenja. Formiranje tankih membrana na površini zemlje tretirane na ovaj način uočeno je nakon sušenja. U slučaju primene polisaharidnih malčeva na ovaj način, formirane tanke prevlake, odnosno filmovi zauzimaju oblik saksije, a zemljište ispod daje potporu filmu [108]. Rezultati uticaja prevlaka na bazi alginata na parametre rasta biljke: visinu biljke, širinu listova i ukupnu suhu masu, nakon 21 dana gajenja, prikazni su na slici 5.19.



**Slika 5.19.** Uticaj prevlaka na bazi alginata umreženih jonima bakra (AL-Cu) i alginatnih prevlaka sa EF *Bacillus* sp. PPM3 umreženih jonima bakra (AL-EFCu) na: (A) visinu biljke; (B) širinu listova; (C) suhu masu biljke mungo pasulja tokom 21 dana gajenja u uslovima temperature od 25 °C, relativne vlažnosti 60 % i dnevno/noćnim ciklusom od 16 h/8 h. K-kontrola, biljke gajene u odsustvu prevlaka

Prisustvo umreženih (AL-Cu i AL-EFCu) prevlaka, odnosno malčeva na površini zemljišta, pozitivno je uticalo na rast biljke, dovodeći do značajnog povećanja svih praćenih parametara rasta biljke, u poređenju sa kontrolnim biljkama gajenim u odsustvu malčeva. Bolji uticaj na rast biljaka uočen je kod biljaka gajenih u prisustvu umreženog alginata koji je sadržao ekstraćelijski filtrat *Bacillus* sp. PPM3 (AL-EFCu). Po završetku perioda gajenja visina biljaka povećala se za 65 %, dok je širina listova porasla za 97 %. Kod biljaka gajenih u prisustvu AL-Cu malča, visina izdanka povećala se za približno 50 %, a širina listova za 76 %, u odnosu na biljke iz kontrole nakon 21 dana (slika 5.19, A i B). Uočen je i pozitivan uticaj na biomasu biljaka gajenih u prisustvu malčeva u poređenju sa kontrolama. I u ovom slučaju, značajniji uticaj na povećanje ukupne suve mase biljaka, imala je prevlaka AL-EFCu povećavajući suhu masu biljke za 57 %, dok se masa biljaka gajenih u prisustvu AL-Cu povećala za 40 %.

Rezultati dobijeni u okviru ove faze istraživanja potvrđuju pozitivan uticaj prevlaka na bazi alginata na rast biljke i u skladu su sa literaturnim podacima drugih istraživača koji su ispitivali biostimulatorno svojstvo prevlaka i premaza na bazi drugih polisaharida [94,220,221]. Šetini i saradnici [94] su pokazali da primena sprej-malčeva na bazi skroba, utiče na ranije cvetanje kao i povećanje biomase ukrasne biljke *Antirrhinum majus* L., u poređenju sa biljkama gajenim u odsustvu malča, a Điakone i saradnici su u svom istraživanju pokazali da primenom hitozanskih sprej-malčeva kod gajenih viburnuma (*Viburnum lucidum* Mill.) dolazi do značajnog povećanja visine biljaka [221].

Pozitivan uticaj na rast biljke ostvaren primenom prevlaka na bazi alginata u ovom istraživanju, može biti pre svega posledica uspostavljanja povoljnijeg vodnog režima zemljišta. Kao što je i pokazano u odeljku 5.6.5 ove disertacije, funkcionalizovani filmovi na bazi alginata, odlikovali su se odličnim barijernim svojstvima prema vodenoj pari. Sprečavanjem stepena isparavanja vode sa površine zemljišta, formiranjem vodo-nepropusnih membrana, prevlake na bazi alginata umrežene bakarnim jonima, doprinose očuvanju vlažnosti u sistemu. Veća vlažnost zemljišta pogoduje razvoju korena, jer utiče na bolje usvajanje hranljivih materija iz zemljišta, što za posledicu ima pospešen rast biljke.

Pored obezbeđivanja dobre barijere prema vodenoj pari, pospešivanje rasta biljaka gajenih u prisustvu alginatnih malčeva umreženih jonima  $\text{Cu}^{2+}$  (AL-Cu i AL-EFCu), može se objasniti pozitivnim uticajem bakra. Bakar je esencijalni mikroelement svih fotosintetičkih organizama, i ima važnu ulogu u fiziološkim procesima viših biljaka, gde posreduje u održavanju hormonske ravnoteže i normalnog funkcionisanja enzimskih sistema. Kao kofaktor enzima i metaloproteina u hloroplastima, katalizuje redoks reakcije, a poznato je i njegovo pozitivno dejstvo na rast viših biljaka, zbog važne uloge u stimulaciji sinteze hlorofila [200,219]. Značajno veće vrednosti svih parametara rasta biljke, koje su uočene kod biljaka gajenih u prisustvu umreženih alginatnih malčeva, u odnosu na iste kod biljaka gajenih bez malča, ukazuju na doprinos bakra u stimulaciji rasta mungo pasulja. Rezultati dobijeni u okviru ovog istraživanja u skladu su sa podacima Saharana i saradnika [220] koji su pokazali da primena formulacija na bazi hitozana i nanočestica bakra u vidu spreja, u znatno većoj meri pospešuje klijavost, razvoj korena i visinu biljke kukuruza, u poređenju sa pojedinačnim tretmanom rastvorom  $\text{CuSO}_4$  ili rastvorom hitozana. Takođe, treba napomenuti da prisustvo EF *Bacillus* sp. PPM3 u formulacijama, čije je stimulatorno dejstvo na rast biljke pokazano i detaljno diskutovano u 5.5.2 poglavlju disertacije, svakako doprinosi sveukupnom pozitivnom efektu malčirajućih prevlaka. S obzirom da su se biljke gajene u prisustvu umreženog alginatnog malča koji je sadržao ekstraćelijski filtrat morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 (AL-EFCu) odlikovale najboljim rastom i najznačajnijim povećanjem ukupne biomase, u ovom ogledu potvrđeno je udruženo pozitivno dejstvo sastavnih komponenti ove formulacije i njena adekvatnost za primenu u vidu malča.

Rezultati dobijeni u okviru ove faze istraživanja ukazuju na to da se primenom odabranih formulacija na bazi alginata metodom raspršivanja, mogu formirati prevlake, odnosno malčevi adekvatnih prijanjajućih svojstava i postojanosti na površini zemljišta tokom 21 dana. Jednostavnim umešavanjem bioaktivnih komponenti sa stimulatornim dejstvom na rast biljke u polimerni rastvor, mogu se dobiti filmovi koji ispoljavaju poboljšano biofertilizatorsko dejstvo. Takođe, korišćenjem iste jednostavne tehnike raspršivanja umreživača, moguće je funkcionalizovati prevlake i na taj način

dodatno doprineti kako njihovoj postojanosti, obezbeđivanjem vodo-nepropusnosti, tako i pozitivnom uticaju na rast biljke.

Na osnovu rezultata ispitivanja biološke aktivnosti alginatnih filmova i prevlaka, može se zaključiti da funkcionalizovani alginatni filmovi sa metabolitima novog morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 umreženi bakarnim jonima imaju veliki potencijal za upotrebu u vidu malčirajućih filmova. Adekvatnost upotrebe ovih malčeva ispoljava se prvenstveno kroz stimulaciju biljnog rasta, a zahvaljujući antifungalnom svojstvu EF morskog izolata *Bacillus* sp. PPM3 i bakarnih jona, primenu mogu naći i u sprečavanju rasta patogenih plesni iz roda *Fusarium*, odnosno u sprečavanju razvoja infekcija izazvanih ovim plesnima kod gajenih biljaka. Pored primene u stimulaciji rasta biljke i biokontroli, ovi filmovi odnosno prevlake, primenu bi mogli naći i kod biljaka gajenih na zemljištu koje odlikuje nedostatak bakra. Dodatno korisno svojstvo upotrebe malčeva formiranih sprej-tehnikom, moglo bi se odraziti i na direktno smanjenje troškova koji se tiču angažovanja dodatnog kadra, jer ovakav način primene ne zahteva mehanizaciju za postavljanje i ukljanjanje filmova sa poljoprivrednih površina.

## 6 ZAKLJUČAK

Na osnovu analize svih dobijenih rezultata, prikazanih u prethodnom poglavlju, izvedeni su sledeći zaključci:

- Ukupno 32 nova bakterijska soja izolovana su iz obalskog morskog sedimenta Crvenog mora sa ciljem pronalazanja sojeva potencijalnih stimulatora biljnog rasta.
- Od ispitivanih mehanizama stimulacije biljnog rasta, među izolovanim sojevima, direktni mehanizmi (fiksacija atmosferskog azota i rastvaranje fosfata) bili su zastupljeni udelom od 37,5 %, dok su indirektni mehanizmi (inhibicija rasta patogenih plesni i proizvodnja hidrolitičkih enzima) dominantnije zastupljeni, sa udelom od 68,7 %.
- Morski izolat oznake PPM3 odabran je za dalja istraživanja kao najpotentniji soj, na osnovu ispoljavanja svih ispitivanih mehanizama stimulacije biljnog rasta: najobilnijeg rasta na podlozi bez izvora azota kao i najveće vrednosti indeksa rastvorljivosti fosfata (SI=5,60); visoke i izrazito visoke antifungalne aktivnosti prema patogenim plesnima: *A. flavus*, *F. graminearum*, *Mucor* sp., i *Alternaria* sp. *in vitro*, kao i najvećeg hidrolitičkog potencijala (proizvodnje enzima: proteaza, celulaza, hitinaza i amilaza, sa najvećom zonom hidrolize (35 mm) zabeleženom na podlozi za ispitivanje proteazne aktivnosti).
- Standardnim morfo-fiziološkim i biohemijskim testovima, kao i upotrebom gotovih biohemijskih identifikacionih paketa API CH50 i API ZYM, izolat PPM3 je preliminarno identifikovan kao pripadnik *Bacillus* roda, koga karakterišu sposobnost rasta na velikom broju supstrata, u širokom opsegu uslova temperature (4-50 °C) i pH (4-10) i pri visokim koncentracijama soli u podlozi (do 10 %), što ga čini pogodnim kandidatom za primenu u agroindustriji.
- Molekularnim analizama, sekvenciranjem 16S rRNK i *gyrA* gena, nije postignuta identifikacija izolata PPM3 do nivoa vrste. Izolat PPM3, identifikovan je kao *Bacillus* sp. PPM3.
- Metaboliti odnosno ekstraćelijski filtrat (EF) *Bacillus* sp. PPM3 takođe ispoljavaju snažno antifungalno dejstvo prema svim ispitivanim plesnima. Najosetljivija na dejstvo EF je plesan *Mucor* sp. čiji je rast inhibiran za 97,5±0,2 %, zatim *A. flavus* (82,7±0,5 %), *F. graminearum* (57,1±0,5 %) i na kraju *Alternaria* sp. (41,5±1,0 %). *Bacillus* sp. PPM3 proizvodi termostabilne metabolite sa visokom antifungalnom aktivnošću, čiji mehanizam delovanja uključuje narušavanje strukture hifa i sprečavanje germinacije spora plesni.
- Molekularnom analizom, kod morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 utvrđeno je prisustvo četiri gena odgovorna za sintezu antifungalnih jedinjenja iz grupe lipopeptida: iturina, bacilomicina D, mikosubtilina i surfaktina.
- Lipopeptidi su ekstrahovani iz EF *Bacillus* sp. PPM3, a njihova uloga u antibiozi kao mehanizmu biokontrole je potvrđena u *in vitro* testu sa patogenim plesnima. Lipopeptidni ekstrakt morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 inhibirao je rast svih plesni u opsegu vrednosti PGI od 12 do 55 %.
- Čelije i EF morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 ne ispoljavaju fitotoksični efekat na kukuruz kokičar i mungo pasulj i bezbedni su za primenu u agroindustriji. Na osnovu visokih vrednosti indeksa klijavosti (GI) semena kukuruza (160,37 % i 214,16 %) i mungo pasulja (176,06 % i 198,11 %), dobijenih nakon tretmana semena ćelijama i EF soja *Bacillus* sp. PPM3, i ćelije i

EF ispitivanog soja se karakterišu kao fitonutrijenti i pogodni su za upotrebu kao biofertilizatori.

- U prisustvu infekcije uzrokovane patogenom plesni *F. graminearum*, tretman semena ili zemljišta ćelijama i EF *Bacillus* sp. PPM3 smanjio je učestalost oboljevanja biljke kukuruza za 80 %, dok je rast biljke dodatno pospešen. Dužina korena i visina izdanaka povećana je skoro četiri puta, a sirova i suva masa utrostručena, u prisustvu infekcije patogenom plesni. U odsustvu patogena, tretiranjem semena ili zemljišta ćelijama ili EF *Bacillus* sp. PPM3 ukupna dužina korena kukuruza je utrostručena, visina izdanaka povećana za 40 %, sirova masa klijanaca povećana za 20 %, a suva masa za 50 %, u poređenju sa netretiranim biljkama. Formulacije na bazi ćelija i EF *Bacillus* sp. PPM3 ispoljavaju kurativno biokontrolno, kao i biostimulatorno dejstvo na rast kukuruza *in vivo*, što ukazuje na veliki potencijal za praktičnu i jednostavnu upotrebu morskog soja *Bacillus* sp. PPM3 u održivoj poljoprivredi.
- Metodom izlivanja iz polimernog rastvora uz otparavanje rastvarača uspešno su sintetisani filmovi na bazi polisaharida iz morskih algi (agara, alginata i njihove mešavine) homogene strukture.
- Funkcionalizacijom agarnih (AG), alginatnih (AL) i agarno-alginatnih (AA) filmova za primenu u agroindustriji, umešavanjem EF *Bacillus* sp. PPM3 u polimerni rastvor, nije došlo do narušavanja strukture polisaharidnih filmova, što je utvrđeno FT-IR analizom, ali je SEM analiza pokazala manje homogenu površinsku strukturu filmova.
- Prisustvo EF *Bacillus* sp. PPM3 u agarnim, alginatnim i kopolimernim agarno-alginatnim filmovima, nije uticalo na optička svojstva filmova, ali je dovelo do poboljšanja njihovih mehaničkih (povećanja jačine i otpornosti) i barijernih svojstava (smanjenja propustljivosti vodene pare), što ukazuje na uniformnost strukture, kao i dobru kompatibilnost polimera i dodate aktivne komponente (EF *Bacillus* sp. PPM3).
- Obe metode umrežavanja polimera: *in situ* mineralizacija i eksterno umrežavanje posredstvom soli bakra, dovelo je do obrazovanja filmova nenarušene strukture sa poboljšanim optičkim, mehaničkim i barijernim svojstvima, što ukazuje na adekvatnost odabranih metoda funkcionalizacije filmova.
- Svojstva i funkcionalnost umreženih agarnih filmova zavise od tipa mineralne faze. Bakar-karbonatna faza je kompatibilnija sa agarnim polimerom od bakar-fosfatne. Prisustvo EF *Bacillus* sp. PPM3 u polimernoj mreži neznatno utiče na uniformnost strukture bakar-karbonatom mineralizovanih filmova, dok kod filmova sa bakar-fosfatnom fazom utiče na pogoršanje disperzije i stvaranje aglomerata.
- Agarni filmovi sa bakar-karbonatnom fazom su kompaktniji, jači, smanjene propustljivosti za vodenu paru, efikasnije blokiraju UV zrake a propuštaju fotosintetički aktivno zračenje, i stoga su pogodniji za upotrebu u agroindustriji kao filmovi za malčiranje od agarnih filmova sa bakar-fosfatnom fazom.
- Metodom eksternog umrežavanja alginatnih i agarno-alginatnih filmova dobijeni su filmovi poboljšanih optičkih, mehaničkih i barijernih svojstava. Alginatni filmovi su se odlikovali boljom disperzijom i raspodelom čestica bakra od agarno-alginatnih filmova dajući kompaktnije i jače filmove, smanjene propustljivosti za vodenu paru i boljih optičkih svojstava, i pogodniji su za upotrebu u agroindustriji kao filmovi za malčiranje.

- Prisustvo EF *Bacillus* sp. PPM3 kod svih umreženih filmovima, smanjuje uticaj umreživača na poboljšanje optičkih, mehaničkih i barijernih svojstava filmova. Između umreživača (soli bakra) i EF postoji nekompatibilnost i ovaj uticaj je najizraženiji kod kopolimernih agarno-alginatnih filmova.
- Sa stanovišta potencijalne primene u vidu malčeva, najbolje optičke (propuštanje zračenja PAR regiona sa  $k_{\text{TPAR}}$  od približno 76 %, i UV zračenja sa transmitancama u opsegu od 8-16 %), mehaničke (zateznu čvrstoću u opsegu od 127,5-132,09 MP, izduženje pri kidanju u opsegu od 13-15 %) i barijerne osobine (propustljivost vodene pare u opsegu od 1,40-1,50 x 10<sup>-10</sup> g/smPa), imali su umreženi alginatni filmovi (AL-Cu i AL-EFCu).
- Umreženi alginatni filmovi (AL-Cu i AL-EFCu), sa stanovišta funkcionalnosti i trajnosti na polju, imaju najveći potencijal da direktno pospeše rast i produktivnost biljaka.
- Alginatni filmovi koji sadrže EF izolata *Bacillus* sp. PPM3, kao i filmovi umreženi bakarnim jonima predstavljaju odličnu barijeru patogenim plesnima: *F. graminearum*, *F. proliferatum* i *F. verticillioides*, u potpunosti sprečavajući njihov rast, što ukazuje na veliki potencijal njihove upotrebe u vidu prevlaka, odnosno malčeva na poljoprivrednim površinama.
- Metodom raspršivanja filmogenih rastvora na bazi alginata i EF *Bacillus* sp. PPM3, kao i umreživača (soli bakar sulfata), direktno na površinu zemljišta, dobijaju se funkcionalne prevlake, odnosno malčevi adekvatnih prijanjajućih svojstava i postojanosti tokom 21 dana, koje ispoljavaju pozitivan uticaj na rast biljke mungo pasulja.
- Funkcionalizovani malčevi na bazi alginata stimulišu rast biljke, a zahvaljujući antifungalnom svojstvu EF *Bacillus* sp. PPM3 i bakarnih jona, primenu mogu naći i u sprečavanju razvoja infekcija kod gajenih biljaka izazvanih plesnima. Pored primene u stimulaciji rasta biljke i biokontroli, ovi filmovi odnosno prevlake, primenu bi mogli naći i kod biljaka gajenih na zemljištu koje odlikuje nedostatak bakra.

## 7 LITERATURA

- [1] Y. Bashan, L. De-Bashan, S. Prabhu, J. Hernandez, Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013), *Plant Soil*. 378 (2014) 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>.
- [2] Markets&Markets, Agricultural Biologicals Market Research Reports & Consulting. Top Trends in the Agricultural Biologicals Market by Agricultural Biologicals, Biocontrols, Biofungicides, Bioinsecticides, Bionematicides, Biostimulants, Biofertilizers, Agricultural Inoculan, (2020). [https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/top-10-trend-agricultural-biological-market-139215554.html?gclid=Cj0KCQiAwf39BRCCARIsALXWETw6sfcJnWACiVVd3ByP9hWxHlgpOGRx8ZIS1cF-tU-VTUJBbTQp\\_4aAn2NEALw\\_wcB](https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/top-10-trend-agricultural-biological-market-139215554.html?gclid=Cj0KCQiAwf39BRCCARIsALXWETw6sfcJnWACiVVd3ByP9hWxHlgpOGRx8ZIS1cF-tU-VTUJBbTQp_4aAn2NEALw_wcB).
- [3] H. Cawoy, W. Bettiol, P. Fickers, M. Ongena, *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases, in: Margarita Stoytcheva (Ed.), *Pestic. Mod. World - Pestic. Use Manag.*, IntechOpen, 2011: pp. 273–302. <https://doi.org/10.5772/17184>.
- [4] B.R. Glick, *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*, Scientifica (Cairo). 2012 (2012) 1–15. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>.
- [5] J. Shafi, H. Tian, M. Ji, *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review, *Biotechnol. Equip.* 31 (2017) 446–459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>.
- [6] B. Fan, J. Blom, H. Klenk, R. Borriss, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>.
- [7] M. Figueiredo, A. Bonifacio, A. Rodrigues, F. Araujo, *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Key Mechanisms of Action*, in: A. Choudhary, D. K., Varma (Ed.), *Microbial-Mediated Induc. Syst. Resist. Plants*, Springer Science+Business Media Singapore, 2016: pp. 1–226. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0388-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0388-2_3).
- [8] M.A.M. Mondol, H.J. Shin, M.T. Islam, Diversity of secondary metabolites from marine bacillus species: Chemistry and biological activity, *Mar. Drugs*. 11 (2013) 2846–2872. <https://doi.org/10.3390/md11082846>.
- [9] P. Salachna, M. Grzeszczuk, E. Meller, M. Soból, Oligo-alginate with low molecular mass improves growth and physiological activity of *Eucomis autumnalis* under salinity stress, *Molecules*. 23 (2008) 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules23040812>.
- [10] W. Khan, U.P. Rayirath, S. Subramanian, M.N. Jithesh, P. Rayorath, D.M. Hodges, A.T. Critchley, J.S. Craigie, J. Norrie, B. Prithiviraj, Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development, *J. Plant Growth Regul.* 28 (2009) 386–399. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>.
- [11] J. Craigie, Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture, *J. Appl. Phycol.* 23 (2011) 371–393. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9560-4>.
- [12] K. Draget, O. Smidsrød, G. Skjåk-Bræk, Alginates from algae, in: *Polysaccharides Polyam. Food Ind. Prop. Prod. Patents.*, Wiley, Weinheim, 2005: pp. 1–30. <https://doi.org/10.1002/3527600035.bpol6008>.
- [13] I.D. Hay, Z.U. Rehman, M.F. Moradali, Y. Wang, B.H.A. Rehm, Microbial alginate production, modification and its applications, *Microb. Biotechnol.* 6 (2013) 637–650. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12076>.
- [14] B. Immirzi, M. Malinconico, G. Romano, R. Russo, G. Santagata, Biodegradable films of natural polysaccharides blends, *J. Mater. Sci. Lett.* 22 (2003) 1389–1392. <https://doi.org/10.1023/A:1025786708540>.
- [15] Y.K. Lee, D.J. Mooney, Alginate: Properties and biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 37 (2012) 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
- [16] P. García, R. Rivero, J. Ruiz, L. Romero, The role of fungicides in the physiology of higher plants: implications for defense responses, *Bot. Rev.* 69 (2003) 162–172.



- [17] S. Zhang, W. Tang, L. Jiang, Y. Hou, F. Yang, W. Chen, X. Li, Elicitor activity of alginoligosaccharide and its potential application in protection of rice plant (*Oryza sativa* L.) against *Magnaporthe grisea*, *Biotechnol. Equip.* 29 (2015) 646–652. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1039943>.
- [18] I. Bhatnagar, S. Kwon, Immense essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds, *Mar. Drugs.* 8 (2010) 2673–2701. <https://doi.org/10.3390/md8102673>.
- [19] A. Poli, G. Anzelmo, B. Nicolaus, Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities, *Mar. Drugs.* 8 (2010) 1779–1802. <https://doi.org/10.3390/md8061779>.
- [20] M.F. De Jesus Raposo, A.M.B. De Moraes, R.M.S.C. De Moraes, Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 2967–3028. <https://doi.org/10.3390/md13052967>.
- [21] J.W. Blunt, B.R. Copp, W.P. Hu, M.H.G. Munro, P.T. Northcote, M.R. Prinsep, Marine natural products, *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 170–244. <https://doi.org/10.1039/b805113p>.
- [22] X. Liu, B. Ren, M. Chen, H. Wang, C.R. Kokare, X. Zhou, J. Wang, H. Dai, F. Song, M. Liu, J. Wang, S. Wang, L. Zhang, Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2010) 1881–1893. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2653-9>.
- [23] V. Nehra, M. Choudhary, A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and their biological approach towards the production of sustainable agriculture, *J. Appl. Nat. Sci.* 7 (2015) 540–556. <https://doi.org/10.31018/jans.v7i1.642>.
- [24] M. Figueiredo, L. Seldin, F. de Araujo, M. RLR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications, in: D.K. Maheshwari (Ed.), *Plant Growth Heal. Promot. Bact.*, 1st ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, 2010: pp. 251–272. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2_2).
- [25] P.E. Courty, P. Smith, S. Koegel, D. Redecker, D. Wipf, Inorganic Nitrogen Uptake and Transport in Beneficial Plant Root-Microbe Interactions, *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 34 (2015) 4–16. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897897>.
- [26] A. Corti, M. Sudhakar, E. Chiellini, Assessment of the whole environmental degradation of oxo-biodegradable linear low density polyethylene (LLDPE) films designed for mulching applications, *J. Polym. Environ.* 20 (2012) 1007–1018. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0493-7>.
- [27] J.P. Zehr, B.D. Jenkins, S.M. Short, G.F. Steward, Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison, *Environ. Microbiol.* 5 (2003) 539–554. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00451.x>.
- [28] T.O. Delmont, C. Quince, A. Shaiber, Ö.C. Esen, S.T. Lee, M.S. Rappé, S.L. MacLellan, S. Lückner, A.M. Eren, Nitrogen-fixing populations of *Planctomycetes* and *Proteobacteria* are abundant in surface ocean metagenomes, *Nat. Microbiol.* 3 (2018) 804–813. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0176-9>.
- [29] L. Bombar, D., Paerl, R.W., Riemann, Marine non-cyanobacterial diazotrophs; Moving beyond molecular detection, *Trends Microbiol.* 24 (2016) 916–927. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.07.002>.
- [30] J. Yousuf, J. Thajudeen, M. Rahiman, S. Krishnankutty, A. Alikunju, A. Hatha, Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions, *J. Basic Microbiol.* 57 (2017) 922–932. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700072>.
- [31] J. Yousuf, J. Thajudeen, A. P.A., A. Joseph, D. P.S., A. Varghese, M.H. Mohamed, Diversity and activity of culturable nitrogen fixing heterotrophic bacteria from estuarine and coastal environments of Southeastern Arabian Sea (SEAS), *Reg. Stud. Mar. Sci.* 33 (2020) 100973. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100973>.
- [32] B. Stevanović, M. Janković, *Ekologija biljaka sa osnovama ekološke fiziologije biljaka*, Prvo izdanje, NNK International, Beograd, 2001.
- [33] S.H. Miller, P. Browne, C. Prigent-Combaret, E. Combes-Meynet, J.P. Morrissey, F. O’Gara,

Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species, *Environ. Microbiol. Rep.* 2 (2010) 403–411. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00105.x>.

- [34] N. Oteino, R.D. Lally, S. Kiwanuka, A. Lloyd, D. Ryan, K.J. Germaine, D.N. Dowling, Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00745>.
- [35] G. Kalayu, Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers, *Int. J. Agron.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>.
- [36] S.B. Sharma, R.Z. Sayyed, M.H. Trivedi, T.A. Gobi, Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils, *Springerplus.* 2 (2013) 1–14. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.
- [37] A. Afzal, A. and Bano, Rhizobium and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*), *Int. J. Agric. Biol.* 10 (2008) 85–88.
- [38] M.S. Khan, A. Zaidi, P.A. Wani, Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture, in: *Microbes Sustain. Agric.*, 2009.
- [39] N. Narula, V. Kumar, R.K. Behl, A. Deubel, A. Gransee, W. Merbach, Effect of P-solubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P, K uptake in P-responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163 (2000) 393–398. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200008\)163:4<393::AID-JPLN393>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200008)163:4<393::AID-JPLN393>3.0.CO;2-W).
- [40] H. Rodríguez, R. Fraga, Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *Biotechnol. Adv.* 17 (1999) 319–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2).
- [41] B. Charana Walpola, M.-H. Yoon, Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek), *Chil. J. Agric. Res.* 73 (2013) 275–281. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392013000300010>.
- [42] Y. Zhao, Auxin biosynthesis and its role in plant development, *Annu Rev Plant Biol.* 61 (2010) 49–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308.Auxin>.
- [43] F. Cassan, D. Perrig, V. Sgroy, O. Masciarelli, C. Penna, L. V, *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.), *Eur. J. Soil Biol Ogy.* 45 (2009) 28–35.
- [44] J. Vacheron, G. Desbrosses, M.L. Bouffaud, B. Touraine, Y. Moënne-Loccoz, D. Muller, L. Legendre, F. Wisniewski-Dyé, C. Prigent-Combaret, Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>.
- [45] B. McSpadden Gardener, A. Driks, The Nature and Application of Biocontrol Microbes : *Bacillus* spp . Overview of the Nature and Application of Biocontrol Microbes : *Bacillus* spp ., *Phytopathology.* 94 (2004) 1244. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1244>.
- [46] Thakore Yatin, The biopesticide market for global agricultural use, *Ind. Biotechnol.* 2 (2006) 194–208. <https://doi.org/10.1089/ind.2006.2.194>.
- [47] Y. Cao, Z. Zhang, N. Ling, Y. Yuan, *Bacillus subtilis* SQR 9 can control Fusarium wilt in cucumber by colonizing plant roots, *Biol. Fertil. Soils.* 47 (2011) 495–506. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0556-2>.
- [48] R. Salvatierra-Martinez, W. Arancibia, M. Araya, S. Aguilera, V. Olalde, J. Bravo, A. Stoll, Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity — An example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes, *J. Phytopathol.* (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1111/jph.12718>.
- [49] M. Mohammadipour, M. Mousivand, G.S. Jouzani, Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides*, *Can. J. Microbiol.* 55 (2009) 395–404. <https://doi.org/10.1139/W08-141>.
- [50] C. Alabouvette, C. Olivain, C. Steinberg, Biological control of plant diseases: The European

- situation, *Eur. J. Plant Pathol.* 114 (2006) 329–341. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-0233-0>.
- [51] T. Stein, *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions, *Mol. Microbiol.* 56 (2005) 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>.
- [52] L. Chen, N. Wang, X. Wang, J. Hu, S. Wang, Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 8822–8827. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.054>.
- [53] B. Fan, C. Wang, X. Song, X. Ding, L. Wu, H. Wu, X. Gao, R. Borriss, *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>.
- [54] M. Ongena, E. Jourdan, A. Adam, M. Paquot, A. Brans, B. Joris, J.L. Arpigny, P. Thonart, Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants, *Environ. Microbiol.* 9 (2007) 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>.
- [55] D. Romero, A. De Vicente, R.H. Rakotoaly, S.E. Dufour, J.W. Veening, E. Arrebola, F.M. Cazorla, O.P. Kuipers, M. Paquot, A. Pérez-García, The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospaera fusca*, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20 (2007) 430–440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>.
- [56] S.H. Ji, N.C. Paul, J.X. Deng, Y.S. Kim, B.S. Yun, S.H. Yu, Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases, *Mycobiology.* 41 (2013) 234–242. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.4.234>.
- [57] I. Dimkić, S. Živković, T. Berić, Ž. Ivanović, V. Gavrilović, S. Stanković, Đ. Fira, 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, *Biol. Control.* 65 (2013) 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.012>.
- [58] M.A. Martínez-Núñez, V.E. López y López, Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry, *Sustain. Chem. Process.* 4 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0057-6>.
- [59] Q. Gong, C. Zhang, F. Lu, H. Zhao, X. Bie, Z. Lu, Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*, *Food Control.* 36 (2014) 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.034>.
- [60] Y. Zhao, J.N. Selvaraj, F. Xing, L. Zhou, Y. Wang, H. Song, X. Tan, L. Sun, L. Sangare, Y.M.E. Folly, Y. Liu, Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*, *PLoS One.* 9 (2014) 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092486>.
- [61] Y. Wu, Y. Zhou, J. Li, C. Ma, Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*, *Microbiol. Open.* 8 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.1002/mbo3.813>.
- [62] Q. Yuan, J. Raza, W. Shen, Q. Huang, Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2012) 5942–5944. <https://doi.org/10.1128/AEM.01357-12>.
- [63] K. Gašić, A. Obradović, Induced plant resistance, *Ratar. i Povrt.* 49 (2012) 326–334. <https://doi.org/10.5937/ratpov49-1877>.
- [64] J.H. Han, H. Shim, J.H. Shin, K.S. Kim, Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea, *Plant Pathol. J.* 31 (2015) 165–175. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2015.0036>.
- [65] M.G.L. Basurto-Cadena, M. Vázquez-Arista, J. García-Jiménez, R. Salcedo-Hernández, D.K. Bideshi, J.E. Barboza-Corona, Isolation of a new Mexican strain of *Bacillus subtilis* with antifungal and antibacterial activities, *Sci. World J.* (2012) 1–7. <https://doi.org/10.1100/2012/384978>.
- [66] S. Kraan, Algal Polysaccharides, Novel Application, and Outlook, in: C.-F. Chang (Ed.), *Carbohydrates—Comprehensive Stud. Glycobiol. Glycotechnol.*, InTech, Rijeka, 2012: pp.

489–532. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812360-7.00005-7>.

- [67] T. Yu-Qing, K. Mahmood, R. Shehzadi, M.F. Ashraf, *Ulva lactuca* and its polysaccharides: Food and biomedical aspects, *J. Biol. Agric. Healthc.* 6 (2016) 140–151.
- [68] S. Kumar, G. Bhanjana, A. Sharma, M.C. Sidhu, N. Dilbaghi, Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 101 (2014) 1061–1067. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.025>.
- [69] W. Khan, R. Zhai, A. Souleimanov, A.T. Critchley, D.L. Smith, B. Prithiviraj, Commercial Extract of *Ascophyllum nodosum* Improves Root Colonization of Alfalfa by Its Bacterial Symbiont *Sinorhizobium meliloti*, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 43 (2012) 2425–2436. <https://doi.org/10.1080/00103624.2012.708079>.
- [70] A. Mzibra, A. Aasfar, H. El Arroussi, M. Khoulood, D. Dhiba, I.M. Kadmiri, A. Bamouh, Polysaccharides extracted from Moroccan seaweed: a promising source of tomato plant growth promoters, *J. Appl. Phycol.* 30 (2018) 2953–2962. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1421-6>.
- [71] G.D. Arthur, W.A. Stirk, J. Van Staden, Screening of aqueous extracts from gelling agents (Agar and Gelrite) for root-stimulating activity, *South African J. Bot.* 70 (2004) 595–601. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30197-6](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30197-6).
- [72] H.S.S. Sharma, C. Fleming, C. Selby, J.R. Rao, T. Martin, Plant biostimulants: A review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses, *J. Appl. Phycol.* 26 (2014) 465–490. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0101-9>.
- [73] A. González, J. Castro, J. Vera, A. Moenne, Seaweed Oligosaccharides Stimulate Plant Growth by Enhancing Carbon and Nitrogen Assimilation, Basal Metabolism, and Cell Division, *J. Plant Growth Regul.* 32 (2013) 443–448. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9309-1>.
- [74] L. Castaings, C. Marchive, C. Meyer, A. Krapp, Nitrogen signalling in Arabidopsis: How to obtain insights into a complex signalling network, *J. Exp. Bot.* 62 (2011) 1391–1397. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq375>.
- [75] L. Jannin, M. Arkoun, P. Etienne, P. Laîné, D. Goux, M. Garnica, M. Fuentes, S.S. Francisco, R. Baigorri, F. Cruz, F. Houdusse, J.M. Garcia-Mina, J.C. Yvin, A. Ourry, *Brassica napus* Growth is Promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Seaweed Extract: Microarray Analysis and Physiological Characterization of N, C, and S Metabolisms, *J. Plant Growth Regul.* 32 (2013) 31–52. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9273-9>.
- [76] R. Dobromilska, M. Mikiciuk, K. Gubarewicz, Evaluation of cherry tomato yielding and fruit mineral composition after using-of Bio-algeen S-90 preparation, *J. Elem.* 13 (2008) 491–499.
- [77] F. Rolland, B. Moore, J. Sheen, Sugar sensing and signaling in plants, *Plant Cell.* 14 (2002) Suppl(Suppl):S185-S205. <https://doi.org/10.1105/tpc.010455.S186>.
- [78] D. Richterová-Kučerová, K. Kollárová, I. Zelko, Z. Vatehová, D. Lišková, How do galactoglucomannan oligosaccharides regulate cell growth in epidermal and cortical tissues of mung bean seedlings?, *Plant Physiol. Biochem.* 57 (2012) 154–158. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.014>.
- [79] P. Rayorath, W. Khan, R. Palanisamy, S.L. Mackinnon, R. Stefanova, S.D. Hankins, A.T. Critchley, B. Prithiviraj, Extracts of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* induce gibberellic acid (GA3)-independent amylase activity in barley, *J. Plant Growth Regul.* 27 (2008) 370–379. <https://doi.org/10.1007/s00344-008-9063-6>.
- [80] W. Khan, D. Hiltz, A.T. Critchley, B. Prithiviraj, Bioassay to detect *Ascophyllum nodosum* extract-induced cytokinin-like activity in *Arabidopsis thaliana*, *J. Appl. Phycol.* 23 (2011) 409–414. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9583-x>.
- [81] S. Ishii, T., Kitabayashi, H., Aikawa, J., Matsumoto, I., Kadoya, K. and Kirino, Effects of Alginate Oligosaccharide and Polyamines on Hyphal Growth of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Infectivity of Citrus Roots, in: *Proc. 9th Int. Soc. Citric. Congr.*, Orlando, FL, 2000: pp. 1030–1032.
- [82] T. Kuwada K., Wamocho L.S., Utamura M., Matsushita I., Ishii, Effect of red and green algal

- extracts on hyphal growth of arbuscular fungi, and on mycorrhizal development and growth of papaya and passionfruit, *Agron. J.* 98 (2006) 1340–1344. <https://doi.org/10.2134/agronj2005.0354>.
- [83] U.F. Dixon, G.R. and Walsh, Suppressing *Pythium ultimum* induced damping-off in cabbage seedlings by biostimulation with proprietary liquid seaweed extracts managing soil-borne pathogens: a sound rhizosphere to improve productivity in intensive horticultural systems., *Acta Hortic.* 635 (2004) 103–106. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.635.13>.
- [84] J. Vera, J. Castro, R.A. Contreras, A. González, A. Moenne, Oligo-carrageenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (var . Xanthi), *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 79 (2012) 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.03.005>.
- [85] I. Ben Salah, S. Aghrouss, A. Douira, S. Aissam, Z. El, A. Filali-maltouf, C. El Modafar, Seaweed polysaccharides as bio-elicitors of natural defenses in olive trees against verticillium wilt of olive, *J. Plant Interact.* 13 (2018) 248–255. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1471528>.
- [86] S. Mancuso, E. Azzarello, S. Mugnai, X. Briand, Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants, *Adv. Hortic. Sci.* 20 (2006) 156–161. <https://doi.org/10.1400/53262>.
- [87] I. Hussain, H. Hamid, Plastics in agriculture, in: A. AL (Ed.), *Plast. Environ.*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2003: pp. 185–209.
- [88] M. Malinconico, B. Immirzi, G. Santagata, E. Schettini, G. Vox, G and Scarascia Mugnozza, Chapter 3: An overview on innovative biodegradable materials for agricultural applications, in: H.W. Moeller (Ed.), *Prog. Polym. Degrad. Stab.*, Nova Science Publishers, Inc., NY, USA., 2008: pp. 69–114.
- [89] D. Briassoulis, A. Giannoulis, Evaluation of the functionality of bio-based plastic mulching films, *Polym. Test.* 67 (2018) 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.02.019>.
- [90] G. Scarascia-Mugnozza, E. Schettini, G. Vox, M. Malinconico, B. Immirzi, S. Pagliara, Mechanical properties decay and morphological behaviour of biodegradable films for agricultural mulching in real scale experiment, *Polym. Degrad. Stab.* 91 (2006) 2801–2808. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.02.017>.
- [91] S. Kasirajan, M. Ngouajio, Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: A review, *Agron. Sustain. Dev.* 32 (2012) 501–529. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0068-3>.
- [92] D.F. Anderson, M.A. Garisto, J.C. Bourrut, M.W. Schonbeck, R. Jaye, A. Wurzberger, R. DeGregorio, Evaluation of a paper mulch made from recycled materials as an alternative to plastic film mulch for vegetables, *J. Sustain. Agric.* 7 (1996) 39–61. [https://doi.org/10.1300/J064v07n01\\_05](https://doi.org/10.1300/J064v07n01_05).
- [93] L. Sartore, E. Schettini, L. De Palma, G. Brunetti, C. Coccozza, G. Vox, Effect of hydrolyzed protein-based mulching coatings on the soil properties and productivity in a tunnel greenhouse crop system, *Sci. Total Environ.* 645 (2018) 1221–1229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.259>.
- [94] E. Schettini, G. Vox, B. De Lucia, Effects of the radiometric properties of innovative biodegradable mulching materials on snapdragon cultivation, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 112 (2007) 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.013>.
- [95] G. Papadakis, D. Briassoulis, G. Scarascia Mugnozza, G. Vox, P. Feuilloley, J.A. Stoffers, Radiometric and thermal properties of, and testing methods for, greenhouse covering materials, *J. Agric. Eng. Res.* 77 (2000) 7–38. <https://doi.org/10.1006/jaer.2000.0525>.
- [96] G. Vox, E. Schettini, Evaluation of the radiometric properties of starch-based biodegradable films for crop protection, *Polym. Test.* 26 (2007) 639–651. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2007.03.010>.
- [97] A. Gamliel, M. Austerweil, G. Kritzman, Non-chemical approach to soilborne pest management-organic amendments, *Crop Prot.* 19 (2000) 847–853.
- [98] C.G. Summers, J.J. Stapleton, Use of UV reflective mulch to delay the colonization and reduce

the severity of *Bemisia argentifolii* (Homoptera : Aleyrodidae) infestations in cucurbits, Crop Prot. 21 (2002) 921–928.

- [99] E. 13655:2002, Plastics - Mulching Thermoplastic Films for Use in Agriculture and Horticulture, European Standard, Brussels, Belgium, 2002, Accessed date: 18 April 2017., 2002. <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx/>.
- [100] J.P. Cuello, H.Y. Hwang, J. Gutierrez, S.Y. Kim, P.J. Kim, Impact of plastic film mulching on increasing greenhouse gas emissions in temperate upland soil during maize cultivation, Appl. Soil Ecol. 91 (2015) 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.02.007>.
- [101] D. Romic, M. Romic, J. Borosic, M. Poljak, Mulching decreases nitrate leaching in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivation, Agric. Water Manag. 60 (2003) 87–97.
- [102] H. Zhao, Y.C. Xiong, F.M. Li, R.Y. Wang, S.C. Qiang, T.F. Yao, F. Mo, Plastic film mulch for half growing-season maximized WUE and yield of potato via moisture-temperature improvement in a semi-arid agroecosystem, Agric. Water Manag. 104 (2012) 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2011.11.016>.
- [103] D. Chakraborty, S. Nagarajan, P. Aggarwal, V.K. Gupta, R.K. Tomar, R.N. Garg, R.N. Sahoo, A. Sarkar, U.K. Chopra, K.S.S. Sarma, N. Kalra, Effect of mulching on soil and plant water status, and the growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) in a semi-arid environment, Agric. Water Manag. 95 (2008) 1323–1334. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.06.001>.
- [104] D. Merino, V.A. Alvarez, Green microcomposites from renewable resources: Effect of seaweed (*Undaria pinnatifida*) as filler on corn starch – chitosan film properties, J. Polym. Environ. 28 (2020) 500–516. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01622-9>.
- [105] L. Xu, B. Zhang, Y. Qin, F. Li, S. Yang, P. Lu, L. Wang, J. Fan, Preparation and characterization of antifungal coating films composed of sodium alginate and cyclolipopeptides produced by *Bacillus subtilis*, Int. J. Biol. Macromol. 143 (2020) 602–609. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.051>.
- [106] B. Li, B. Xie, Synthesis and characterization of konjac glucomannan / poly (vinyl alcohol) interpenetrating polymer networks, J. Appl. Polym. Sci. 93 (2004) 2775–2780. <https://doi.org/10.1002/app.20769>.
- [107] S.S. Laxmeshwar, D.J.M. Kumar, S. Viveka, G.K. Nagaraja, Preparation and properties of biodegradable film composites using modified cellulose fibre-reinforced with PVA, ISNR Polym. Sci. 2012 (2012) 1–8. <https://doi.org/10.5402/2012/154314>.
- [108] B. Immirzi, G. Santagata, G. Vox, E. Schettini, Preparation, characterisation and field-testing of a biodegradable sodium alginate-based spray mulch, Biosyst. Eng. 102 (2009) 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2008.12.008>.
- [109] C. Delattre, T.A. Fenoradosoa, P. Michaud, Galactans: An overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides, Brazilian Arch. Biol. Technol. 54 (2011) 1075–1092. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000600002>.
- [110] M.A. Salati, J. Khazai, A.M. Tahmuri, A. Samadi, A. Taghizadeh, M. Taghizadeh, P. Zarrintaj, J.D. Ramsey, S. Habibzadeh, F. Seidi, M.R. Saeb, M. Mozafari, Agarose-Based biomaterials: Opportunities and challenges in cartilage tissue engineering, Polymers (Basel). 12 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.3390/POLYM12051150>.
- [111] M. Avella, E. Di Pace, B. Immirzi, G. Impallomeni, M. Malinconico, G. Santagata, Addition of glycerol plasticizer to seaweeds derived alginates: Influence of microstructure on chemical-physical properties, Carbohydr. Polym. 69 (2007) 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.01.011>.
- [112] J.-W. Rhim, Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films, Food Sci. Technol. 37 (2004) 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.09.008>.
- [113] M.J. Costa, A.M. Marques, L.M. Pastrana, S.M. Sillankorva, M.A. Cerqueira, Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio, Food Hydrocoll. 81 (2018) 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.014>.
- [114] G. Liling, Z. Di, X. Jiachao, G. Xin, F. Xiaoting, Z. Qing, Effects of ionic crosslinking on

- physical and mechanical properties of alginate mulching films, *Carbohydr. Polym.* 136 (2016) 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.034>.
- [115] P.K. Satriaji, C. V Garcia, G. Hyeon, G. Hwa, J. Tae, Antibacterial bionanocomposite films based on CaSO<sub>4</sub> -crosslinked alginate and zinc oxide nanoparticles, *Food Packag. Shelf Life.* 24 (2020) 100510. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100510>.
- [116] G.I. Olivas, G. V. Barbosa-Cánovas, Alginate-calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity, *LWT - Food Sci. Technol.* 41 (2008) 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.02.015>.
- [117] A. Nešić, G. Cabrera-Barjas, S. Dimitrijević-Branković, S. Davidović, N. Radovanović, C. Delattre, Prospect of Polysaccharide-Based Materials as Advanced Food Packaging, *Molecules.* 25 (2020) 1–34. <https://doi.org/10.3390/molecules25010135>.
- [118] A.K. Siddhanta, N.D. Sanandiyaa, D.R. Chejara, S. Kondaveeti, Functional modification mediated value addition of seaweed polysaccharides – a perspective, *RSC Adv.* 5 (2015) 59226–59239. <https://doi.org/10.1039/c5ra09027j>.
- [119] M. Atef, M. Rezaei, R. Behrooz, Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil, *Food Hydrocoll.* 45 (2015) 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.037>.
- [120] P. Kanmani, J. Rhim, Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 708–716. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.099>.
- [121] D. Ma, Y. Jiang, S. Ahmed, W. Qin, Y. Liu, Antilisterial and physical properties of polysaccharide-collagen films embedded with cell-free supernatant of *Lactococcus lactis*, *Int. J. Biol. Macromol.* 145 (2019) 1031–1038. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.195>.
- [122] Y.A. Arfat, J. Ahmed, H. Jacob, Preparation and characterization of agar-based nanocomposite films reinforced with bimetallic (Ag-Cu) alloy nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 155 (2017) 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.097>.
- [123] N. Radovanovic, I. Malagurski, S. Levic, A. Nestic, G. Cabrera-Barjas, A. Kalusevic, V. Nedovic, V. Pavlovic, S. Dimitrijevic-Brankovic, Influence of different concentrations of Zn-carbonate phase on physical-chemical properties of antimicrobial agar composite films, *Mater. Lett.* 255 (2019) 126572. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126572>.
- [124] S. Shankar, L. Wang, J. Rhim, Preparation and properties of carbohydrate-based composite films incorporated with CuO nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 169 (2017) 264–271.
- [125] L.F. Wang, J.W. Rhim, Functionalization of halloysite nanotubes for the preparation of carboxymethyl cellulose-based nanocomposite films, *Appl. Clay Sci.* 150 (2017) 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.09.023>.
- [126] M. Šupová, G.S. Martynková, K. Barabaszová, Effect of Nanofillers Dispersion in Polymer Matrices: A Review, *Sci. Adv. Mater.* 3 (2011) 1–25. <https://doi.org/10.1166/sam.2011.1136>.
- [127] J. Hu, Y. Zhu, H. Tong, X. Shen, L. Chen, J. Ran, A detailed study of homogeneous agarose / hydroxyapatite nanocomposites for load-bearing bone tissue, *Int. J. Biol. Macromol.* 82 (2016) 134–143.
- [128] I.S. Malagurski, Dobijanje i karakterizacija nemineralizovanih i mineralizovanih biomaterijala na bazi polisaharida morskih algi i esencijalnog metala cinka, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, 2017.
- [129] M. Xie, M.O. Olderøy, Z. Zhang, J.P. Andreassen, B.L. Strand, P. Sikorski, Biocomposites prepared by alkaline phosphatase mediated mineralization of alginate microbeads, *RSC Adv.* 2 (2012) 1457–1465. <https://doi.org/10.1039/c1ra00750e>.
- [130] I. Malagurski, S. Levic, A. Nestic, M. Mitric, V. Pavlovic, S. Dimitrijevic-Brankovic, Mineralized agar-based nanocomposite films: Potential food packaging materials with antimicrobial properties, *Carbohydr. Polym.* 175 (2017) 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.064>.
- [131] N. Radovanović, I. Malagurski, S. Lević, M. Gordić, J. Petrović, V. Pavlović, M. Mitrić, A. Nešić, S. Dimitrijević-Branković, Tailoring the physico-chemical and antimicrobial properties



- of agar-based films by in situ formation of Cu-mineral phase, *Eur. Polym. J.* 119 (2019) 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.08.004>.
- [132] C.K. Kuo, P.X. Ma, Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties, *Biomaterials*. 22 (2001) 511–521. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00201-5).
- [133] A. Haug, O. Smidsrød, B. Högdahl, H.A. Øye, S.E. Rasmussen, N. Sunde, E. & Sørensen, A., Selectivity of Some Anionic Polymers for Divalent Metal Ions., *Acta Chem. Scand.* 24 (1970) 843–854.
- [134] J. Rui Rodrigues, R. Lagoa, Copper ions binding in Cu-alginate gelation, *J. Carbohydr. Chem.* 25 (2006) 219–232. <https://doi.org/10.1080/07328300600732956>.
- [135] Y.J. Crossingham, P.G. Kerr, R.A. Kennedy, Comparison of selected physico-chemical properties of calcium alginate films prepared by two different methods, *Int. J. Pharm.* 473 (2014) 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.043>.
- [136] R. Russo, M. Malinconico, G. Santagata, Effect of Cross-Linking with Calcium Ions on the Physical Properties of Alginate Films, *Biomacromolecules*. 8 (2007) 3193–3197. <https://doi.org/10.1021/bm700565h>.
- [137] V. Hasija, K. Sharma, V. Kumar, S. Sharma, V. Sharma, Green synthesis of agar/Gum Arabic based superabsorbent as an alternative for irrigation in agriculture, *Vacuum*. 157 (2018) 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2018.09.012>.
- [138] C. Yu, C. Wanli, H. Dian, Z. Longyu, C. Minmin, L. Da, Y. Ziniu, Z. Jibin, Preparation and characterization of iturin A microcapsules in sodium alginate/poly( $\gamma$ -glutamic acid) by spray drying, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 66 (2017) 479–484. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1233417>.
- [139] P. Edi-Premono, M. Moawad, MA, Vleck, Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere, *Indones. J. Crop Sci.* 11 (1996) 13–23.
- [140] Y.S. Kim, K. Balaraju, Y.H. Jeon, Biological characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* AK-0 and suppression of ginseng root rot caused by *Cylindrocarpon destructans*, *J. Appl. Microbiol.* 122 (2017) 166–179. <https://doi.org/10.1111/jam.13325>.
- [141] M.A. Rahman, M.F. Begum, M.F. Alam, Screening of *Trichoderma* Isolates as a Biological Control Agent against *Ceratocystis paradoxa* Causing Pineapple Disease of Sugarcane, *Micobiology*. 37 (2009) 277–285.
- [142] S.C. Hsu, J.L. Lockwood, Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of *Actinomycetes* in Water and Soil, *Appl. Microbiol.* 29 (1975) 422–426. <https://doi.org/10.1128/aem.29.3.422-426.1975>.
- [143] P. Vos, G. Garrity, D. Jones, K.N. R., L. Wolfgang, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W. William, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 3: The Firmicutes, Second, Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2011. <https://doi.org/10.1007/b92997>.
- [144] J. Marmur, A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 208–218. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8).
- [145] D. Lane, 16S/23S rRNA Sequencing, in: E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Tech. Bact. Syst.*, John Wiley and Sons, New York, New York, 1991: pp. 115–175.
- [146] J. Chun, K.S. Bae, Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences, *Antonie van Leeuwenhoek*, *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 78 (2000) 123–127. <https://doi.org/10.1023/A:1026555830014>.
- [147] S. Droby, M.E. Wisniewski, L. Cohen, B. Weiss, D. Touitou, Y. Eilam, E. Chalutz, Influence of  $\text{CaCl}_2$  on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*, *Phytopathology*. 87 (1997) 310–315. <https://doi.org/10.1094/PHTO.1997.87.3.310>.
- [148] S. Chung, H. Kong, J.S. Buyer, D.K. Lakshman, J. Lydon, S.D. Kim, D.P. Roberts, Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (2008) 115–123.

<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1520-4>.

- [149] F.M. Rashad, W.D. Saleh, M.A. Moselhy, Bioconversion of rice straw and certain agro-industrial wastes to amendments for organic farming systems: 1. Composting, quality, stability and maturity indices, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 5952–5960. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.103>.
- [150] ASTM D882-10, Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, (2010). <https://doi.org/10.1520/D0882-10>.
- [151] ASTM E96-95, Standard test methods for water vapor transmission of materials (E96-95), in: *Annu. B. ASTM Stand. Vol. 4.06*, Philadelphia: American Society for Testing and Materials., 1995: pp. 699–704.
- [152] M. Bentzon-Tilia, H. Farnelid, K. Jürgens, L. Riemann, Cultivation and isolation of N<sub>2</sub>-fixing bacteria from suboxic waters in the Baltic Sea, *FEMS Microbiol. Ecol.* 88 (2014) 358–371. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12304>.
- [153] W. Sabra, A.P. Zeng, H. Lunsdorf, W.D. Deckwer, Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 4037–4044. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000>.
- [154] R. John, N and Salim, A study on major plant growth promoting traits of bacteria isolated from marine environment, *Mater. Today Proc.* (2020) 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.390>.
- [155] M. De Souza, S. Nair, D. Chandramohan, Phosphate solubilizing bacteria around Indian peninsula, *Indian J. Mar. Sci.* 29 (2000) 48–51.
- [156] A. Jayadev, M. Lekshmi, V. Sreelekshmi, S. Lakshmi, Babby, M. and Franceena, Marine bacteria: a potential bioresource for multiple applications, *Int. J. Sci. Eng. Res.* 6 (2015) 442–449.
- [157] T. Schäfer, T., and Adams, The importance of microbiology in sustainable agriculture, in: B. Lugtenberg (Ed.), *Princ. Plant-Microbe Interact. Microbes Sustain. Agric.*, Springer, Berlin, 2015: pp. 5–6. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3>.
- [158] J.D. Palumbo, J.L. Baker, N.E. Mahoney, Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds, *Microb. Ecol.* 52 (2006) 45–52. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9096-y>.
- [159] R. Early, Pathogen control in primary production: Crop foods, in: & C. de W.B., P.J. McClure (Eds.), *Foodborne Pathog. Hazards, Risk Anal. Control* Second Ed., 2nd ed., Woodhead Publishing Limited, 2009: pp. 205–279. <https://doi.org/10.1533/9781845696337.1.205>.
- [160] A. Logrieco, A. Moretti, M. Solfrizzo, *Alternaria* toxins and plant diseases: An overview of origin, occurrence and risks, *World Mycotoxin J.* 2 (2009) 129–140. <https://doi.org/10.3920/WMJ2009.1145>.
- [161] T.J. Michailides, Characterization and Comparative Studies of *Mucor* Isolates from Stone Fruits from California and Chile, *Plant Dis.* 75 (1991) 373–380. <https://doi.org/10.1094/pd-75-0373>.
- [162] S. Li, N. Zhang, Z. Zhang, J. Luo, Antagonist *Bacillus subtilis* HJ5 controls *Verticillium* wilt of cotton by root colonization and biofilm formation, *Biol. Fertil. Soils.* 49 (2013) 295–303. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0718-x>.
- [163] O. Kurniawan, K. Wilson, R. Mohamed, T.J. Avis, *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. provide antifungal activity against gray mold and *Alternaria* rot on blueberry fruit, *Biol. Control.* 126 (2018) 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.001>.
- [164] H.G. Gowtham, P. Hariprasad, S.C. Nayak, S.R. Niranjana, Application of rhizobacteria antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of *Fusarium* wilt in tomato, *Rhizosphere.* 2 (2016) 72–74. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.07.008>.
- [165] C. Wang, D. Zhao, G. Qi, Z. Mao, X. Hu, B. Du, K. Liu, Y. Ding, Effects of *Bacillus velezensis* FKM10 for promoting the growth of *Malus hupehensis* Rehd. and inhibiting *Fusarium verticillioides*, *Front. Microbiol.* 10 (2020) 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02889>.
- [166] M. Agarwal, S. Dheeman, R.C. Dubey, P. Kumar, D.K. Maheshwari, V.K. Bajpai, Differential

antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench, Microbiol. Res. 205 (2017) 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.012>.

- [167] J. Raaijmakers, M. Vlami, J. de Souza, Antibiotic production by bacterial biocontrol agents, Antonie Van Leeuwenhoek. 81 (2002) 537–547. <https://doi.org/10.1023/A:1020501420831>.
- [168] A. Príncipe, F. Alvarez, M.G. Castro, L. Zachi, S.E. Fischer, G.B. Mori, E. Jofrø, Biocontrol and PGPR features in native strains isolated from saline soils of Argentina, Curr. Microbiol. 55 (2007) 314–322. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0654-9>.
- [169] B.B. Landa, J.A. Navas-Cortés, R.M. Jiménez-Díaz, Influence of temperature on plant-rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of fusarium wilt of chickpea, Plant Pathol. 53 (2004) 341–352. <https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.01008.x>.
- [170] H. Ahlem, E. Mohammed, A. Badoc, L. Ahmed, D. De Biologie, F. Sciences, E. De Biotechnolog, M. Ii, Effect of pH , temperature and water activity on the inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefaciens* isolates, African J. Biotechnol. 11 (2012) 2210–2217. <https://doi.org/10.5897/AJB11.645>.
- [171] W. Wang, Z. Wu, Y. He, Y. Huang, X. Li, B. Ye, Plant growth promotion and alleviation of salinity stress in *Capsicum annuum* L . by *Bacillus* isolated from saline soil in Xinjiang, Ecotoxicol. Environ. Saf. 164 (2018) 520–529. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.070>.
- [172] L. Chen, Y. Liu, G. Wu, K. Veronican Njeri, Q. Shen, N. Zhang, R. Zhang, Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9, Physiol. Plant. 158 (2016) 34–44. <https://doi.org/10.1111/ppl.12441>.
- [173] C.S. Nautiyal, S. Srivastava, P.S. Chauhan, K. Seem, A. Mishra, S.K. Sopory, Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress, Plant Physiol. Biochem. 66 (2013) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.01.020>.
- [174] S.K. Upadhyay, J.S. Singh, D.P. Singh, Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition, Pedosphere. 21 (2011) 214–222. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60120-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60120-3).
- [175] G.E. Fox, J.D. Wisotzkey, P. Jurtshuk, How Close Is Close : 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity, Int. J. Syst. Bacteriol. 42 (1992) 166–170.
- [176] M. Kim, H. Oh, S. Park, J. Chun, Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes, Int. J. Syst. Amd Evol. Microbiol. 64 (2014) 346–351. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.059774-0>.
- [177] B. Kim, S. Lee, M. Lyu, S. Kim, G. Bai, S. Kim, G. Chae, E. Kim, C. Cha, Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (rpoB ), J. Clin. Microbiol. 37 (1999) 1714–1720.
- [178] S. Yamamoto, S. Bouvet, P. J.M. Harayama, Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on gyrB sequences : comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization, Int. J. Syst. Bacteriol. 49 (1999) 87–95. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-87>.
- [179] A.F. Auch, M. Von Jan, H. Klenk, M. Göker, Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison, Stand. Genomic Sci. 2 (2010) 117–134. <https://doi.org/10.4056/sigs.531120>.
- [180] Z. Ma, S. Zhang, S. Zhang, G. Wu, Y. Shao, Q. Mi, J. Liang, Isolation and characterization of a new cyclic lipopeptide surfactin from a marine-derived *Bacillus velezensis* SH-B74, J. Antibiot. (Tokyo). (2020) 9–13. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0347-9>.
- [181] Q. Kong, S. Shan, Q. Liu, X. Wang, F. Yu, Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*, Int. J. Food Microbiol. 139 (2010) 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.036>.
- [182] X. Gu, Q; Yang, Y; Yuan, Q; Shi, G; Wu, L; Lou, Z; Huo, R; Wu, H; Borriss, R; Gao, Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic

- interaction with the plantpathogenic fungus *Fusarium graminearum*, Appl. Environ. Microbiol. 83 (2017) 1–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01075-17>.
- [183] R. Ju, Y. Zhao, J. Li, H. Jiang, P. Liu, T. Yang, Z. Bao, B. Zhou, X. Zhou, X. Liu, Identification and evaluation of a potential biocontrol agent, *Bacillus subtilis*, against *Fusarium* sp. in apple seedlings, Ann. Microbiol. 64 (2014) 377–383. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0672-3>.
- [184] C.S. Shimei Wu, Ge Liu, Shengnan Zhou, Zhenxia Sha, Characterization of Antifungal Lipopeptide Biosurfactants Produced by Marine Bacterium, Mar. Drugs. 17 (2019) 1–16. <https://doi.org/10.3390/md17040199>.
- [185] P.Z. Kulimushi, G.C. Basime, G.M. Nachigera, P. Thonart, M. Ongena, Efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* as biocontrol agent to fight fungal diseases of maize under tropical climates: from lab to field assays in south Kivu, Environ. Sci. Pollut. Res. 25 (2018) 29808–29821. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9314-9>.
- [186] D. Ben Abdallah, O. Frikha-Gargouri, S. Tounsi, *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as a source of lipopeptides for biocontrol of *Agrobacterium tumefaciens* strains, J. Appl. Microbiol. 119 (2015) 196–207. <https://doi.org/10.1111/jam.12797>.
- [187] S.Y. Kim, S.Y. Lee, H.Y. Weon, M.K. Sang, J. Song, Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* M75, a biocontrol agent against fungal plant pathogens, isolated from cotton waste, J. Biotechnol. 241 (2017) 112–115. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.023>.
- [188] L. Yang, X. Quan, B. Xue, P.H. Goodwin, S. Lu, J. Wang, W. Du, C. Wu, Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, Biol. Control. 85 (2015) 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.12.010>.
- [189] I. Mora, J. Cabrefiga, E. Montesinos, Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments, Int. Microbiol. 14 (2011) 213–223. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.151>.
- [190] X.H. Chen, A. Koumoutsi, R. Scholz, K. Schneider, J. Vater, R. Süssmuth, J. Piel, R. Borriss, Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens, J. Biotechnol. 140 (2009) 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.011>.
- [191] I.I.O. for Standardization, ISO 18763:2016. Soil quality — Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants, 2016.
- [192] N. Sugimoto, G. Takeda, Y. Nagato, J. Yamaguchi, Temporal and spatial expression of the  $\alpha$ -amylase gene during seed germination in rice and barley, Plant Cell Physiol. 39 (1998) 323–333. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029373>.
- [193] P.A.J. Luna Martínez L, Martínez Peniche RA, Hernández Iturriaga M, Arvizu Medrano SM, Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Characterization of Rhizobacteria isolated from tomato and their effect on tomato and bell pepper growth, Rev. Fitotec. Mex. 36 (2013) 63–69. <https://doi.org/10.35196/rfm.2013.1.63>.
- [194] T.C. Cendales, C. Alonso, R. González, C. Patricia, V. Cuásquer, O. Alberto, T. Alzate, A.H. Rodríguez, *Bacillus* effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum*, L.) Efecto de *Bacillus* sobre la germinación y crecimiento de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.), Acta Biológica Colomb. 22 (2017) 37–44. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n1.57375>.
- [195] S.M. Dimitrijević, D.S. Radanović, S.B. Antić-Mladenović, M.D. Milutinović, Enhanced fertilization effect of a compost obtained from mixed herbs waste inoculated with novel strains of mesophilic bacteria, Hem. Ind. 71 (2017) 503–513.
- [196] W. Hassan, S. Bashir, A. Sher, A. Sattar, A. Wasaya, M. Hussain, Phosphorus solubilizing bacteria and growth and productivity of mung bean (*Vigna radiata*), Pakistan J. Bot. 49 (2017) 331–336.
- [197] K. Nagórska, M. Bikowski, M. Obuchowski, Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent,

Acta Biochim. Pol. 54 (2007) 495–508.

- [198] I. Mnif, I. Hammami, M.A. Triki, M.C. Azabou, Antifungal efficiency of a lipopeptide biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* SPB1 versus the phytopathogenic fungus, *Fusarium solani*, Environ. Sci. Pollut. Res. 22 (2015) 18137–18147. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5005-6>.
- [199] L. Bensidhoum, E. Nabti, N. Tabli, P. Kupferschmied, A. Weiss, M. Rothballer, M. Schmid, C. Keel, A. Hartmann, Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities, Eur. J. Soil Biol. 75 (2016) 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2016.04.006>.
- [200] A.L. Sommer, Copper as an essential for plant growth, Plant Physiol. 6 (1931) 339–345. <https://doi.org/10.1104/pp.6.2.339>.
- [201] S. Roy, J. Rhim, L. Jaiswal, Bioactive agar-based functional composite film incorporated with copper sulfide nanoparticles, Food Hydrocoll. 93 (2019) 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.034>.
- [202] R.L. Frost, W.N. Martens, L. Rintoul, E. Mahmutagic, J.T. Klopogge, Raman spectroscopic study of azurite and malachite at 298 and 77 K, J. Raman Spectrosc. 33 (2002) 252–259. <https://doi.org/10.1002/jrs.848>.
- [203] R. Devamani, M. Alagar, Synthesis and characterization of Copper (II) Phosphate nano particles, Elixir Nanotechnol. 61 (2013) 16917–16921.
- [204] E. Gómez-Ordóñez, P. Rupérez, FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds, Food Hydrocoll. 25 (2011) 1514–1520. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.009>.
- [205] L.F. Wang, J.W. Rhim, Preparation and application of agar/alginate/collagen ternary blend functional food packaging films, Int. J. Biol. Macromol. 80 (2015) 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.007>.
- [206] Y. Deng, Structural identification of antibacterial substances of *Paenibacillus polymyxa* JSa-9 and application of wheat biocontrol, Nanjing Agricultural University, 2012.
- [207] X. Hou, Z. Xue, Y. Xia, Y. Qin, G. Zhang, H. Liu, K. Li, Effect of SiO<sub>2</sub> nanoparticle on the physical and chemical properties of eco-friendly agar/sodium alginate nanocomposite film, Int. J. Biol. Macromol. 125 (2019) 1289–1298. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.109>.
- [208] M. Abdelhak, H. Abdelkarim, I. Barbara, Effect of Plant Fiber-Polyacrylamide Blend on Retention and Evaporation Water at Arid and Semi-Arid Soils of Algeria, J. Chem. Chem. Eng. 6 (2012) 7–17.
- [209] S. Papageorgiou, E. Kouvelos, E. Favvas, A. Sapalidis, G. Romanos, F. Katsaros, Metal-carboxylate interactions in metal-alginate complexes studied with FTIR spectroscopy, Carbohydr. Res. 345 (2010) 469–473. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.12.010>.
- [210] W. Klinkajon, P. Supaphol, Novel copper (II) alginate hydrogels and their potential for use as anti-bacterial wound dressings, Biomed. Mater. 9 (2014) 1–14. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/9/4/045008>.
- [211] C. Sartori, D.S. Finch, B. Ralph, K. Gilding, Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR spectroscopy, Polymer (Guildf). 38 (1997) 43–51. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(96\)00458-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(96)00458-2).
- [212] Novamont S.p.A., <http://www.novamont.com/eng/mater-bi.>, (n.d.).
- [213] C.S. Brazel, S.L. Rosen, Fundamental principles of polymeric materials, Third, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 1993.
- [214] M.G.A. Vieira, M.A. Da Silva, L.O. Dos Santos, M.M. Beppu, Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review, Eur. Polym. J. 47 (2011) 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>.
- [215] BASF Lampertheim GmbH., [www.plasticadditives.basf.com](http://www.plasticadditives.basf.com), (n.d.).
- [216] Z. Ma, Y. Ma, L. Qin, J. Liu, H. Su, Preparation and characteristics of biodegradable mulching films based on fermentation industry wastes, Int. Biodeterior. Biodegrad. 111 (2016) 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.024>.

- [217] D. Enescu, C. Gardrat, H. Cramail, C. Le Coz, G. Sèbe, V. Coma, Bio-inspired films based on chitosan, nanoclays and cellulose nanocrystals: structuring and properties improvement by using water-evaporation-induced self-assembly, *Cellulose*. 26 (2019) 2389–2401. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2211-7>.
- [218] J.H. Nelson, A review of: “METAL IONS IN BIOLOGICAL SYSTEMS, Vol. 20, Concepts on Metal Ion Toxicity. XXIV, Marcel Dek, Marcel Dekker, New York, 1986. <https://doi.org/10.1080/00945718608071418>.
- [219] P. Kanhed, S. Birla, S. Gaikwad, A. Gade, A.B. Seabra, O. Rubilar, N. Duran, M. Rai, In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi, *Mater. Lett.* 115 (2014) 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.10.011>.
- [220] V. Saharan, R. V. Kumaraswamy, R.C. Choudhary, S. Kumari, A. Pal, R. Raliya, P. Biswas, Cu-Chitosan nanoparticle mediated sustainable approach to enhance seedling growth in maize by mobilizing reserved food, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 6148–6155. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02239>.
- [221] M. Giaccone, C. Cirillo, P. Scognamiglio, M. Teobaldelli, A. Mataffo, A. Stinca, A. Pannico, B. Immirzi, G. Santagata, M. Malinconico, B. Basile, Biodegradable mulching spray for weed control in the cultivation of containerized ornamental shrubs, *Chem. Biol. Technol. Agric.* 5 (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40538-018-0134-z>.

## PRILOG 1

### MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA MORSKOG IZOLATA PPM3

#### Bacillus sp. PPM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KP715855.1

[GenBank](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

```
>KP715855.1 Bacillus sp. PPM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTG
CTCCCTGATGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTAC
CACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAGCGATGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCG
TAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAAAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGA
AAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACGGGGAGGGTCATT
GGAAACTGGGGAACCTTGTAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
GTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCAGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCTGGTGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTCCGC
CCCTTAGTGTGTCAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCTCTGACAATCTAGAGATAGGACGTCCTTCCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCAT
GGTGTGTCGTCAGCTGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTT
GCCAGCATTGAGTGGGCACTTAAAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGC
GAGGTAAAGCAATCCCAAACTCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTGCACTGCGTGAAGCTG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCACGAGAGTTTGAACACCCGAAAGTGGTGGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTTGGG
GCAGATGATTGGGTGAAGTCGTAACAAGTA
```

**Slika P-1.1.** Prikaz nukleotidne sekvence 16S rRNK gena (1502 bazna para, FASTA format) deponovane u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojem KP715855 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP715855.1?report=GenBank>)

The screenshot displays the NCBI BLAST interface. The query ID is KP715855.1, and the description is Bacillus sp. PPM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. The interface shows a search bar, a results table, and a 'Taxonomy' tab selected. The results table lists 100 sequences selected, with the top hit being Bacillus sp. PPM3 hits.

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Bacillus	firmicutes		100	
. unclassified Bacillus	firmicutes		5	
. Bacillus sp. PPM3	firmicutes	2774	1	Bacillus sp. PPM3 hits
. Bacillus sp. HNA3	firmicutes	2761	1	Bacillus sp. HNA3 hits
. Bacillus sp. LUNF1	firmicutes	2761	1	Bacillus sp. LUNF1 hits
. Bacillus sp. AM1(2019)	firmicutes	2761	1	Bacillus sp. AM1(2019) hits
. Bacillus sp. ZY-1-1	firmicutes	2761	1	Bacillus sp. ZY-1-1 hits
. Bacillus velezensis	firmicutes	2761	68	Bacillus velezensis hits
. Bacillus amyloliquefaciens	firmicutes	2761	15	Bacillus amyloliquefaciens hits
. Bacillus velezensis FZB42	firmicutes	2761	1	Bacillus velezensis FZB42 hits
. Bacillus subtilis	firmicutes	2761	2	Bacillus subtilis hits

**Slika P-1.2.** Prikaz poklapanja deponovane sekvence 16S rRNK sa prvih 100 sekvenci iz GenBank baze podataka sa NCBI servera (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP715855.1?report=GenBank>)



FASTA ▾

## Bacillus sp. PPM3 DNA gyrase subunit A (gyrA) gene, partial cds

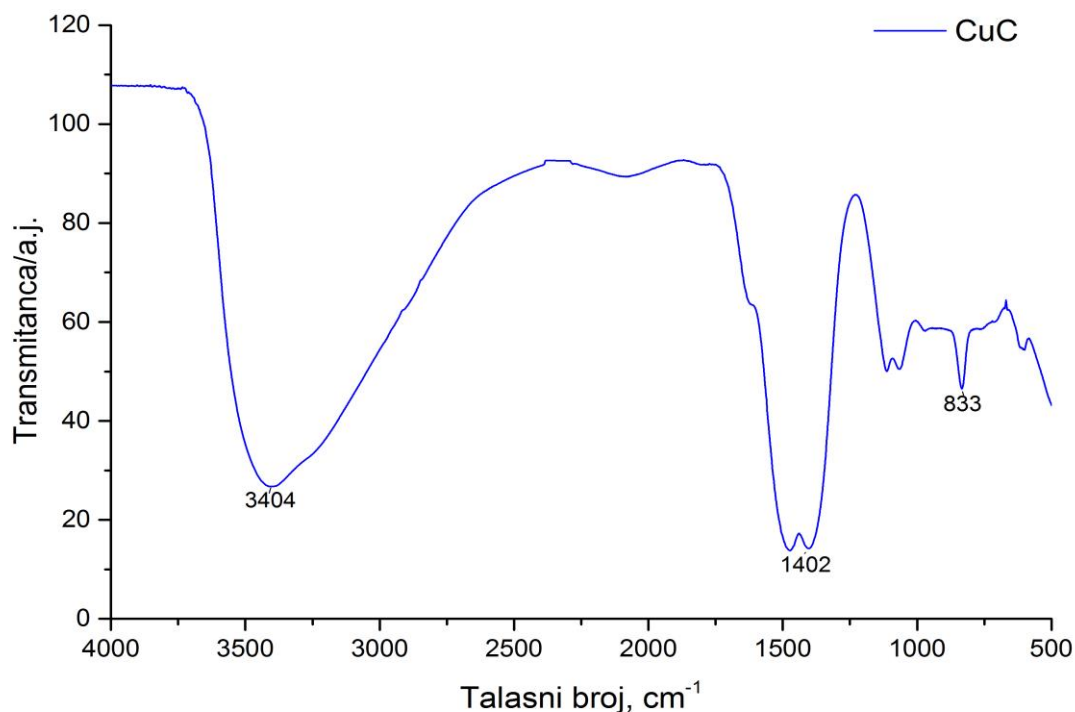
GenBank: MF592262.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>MF592262.1 Bacillus sp. PPM3 DNA gyrase subunit A (gyrA) gene, partial cds
GAGCGCCAGCAGGTTGATTCGAAAGACGTCTGCAGGGCCGTTTGTGTTACAGGTTATTCAAATGACG
TGAGCATTGGCGTCACGGCGGATCTCAATGACGATTCTCATTCCGTTACGGTCGGATTCTCTCGCAGAT
CGGTAATTCCTTCGATTTTTTGTCCCGGACAAGATCCGCGATTTTTTCAATTAATCTCGCTTTGTTTAC
CTGATAAGGAAGTTCCGTGACAATAATTCTTTCTTTTCCCGATGAAGTCTCTTCGATTTAGCCTTAGCC
CGGATCGTGATTGATCCCGTCCGGATTCATATGCCTTGCGGATGCCGCTCCGGCCAAAATCTGACCTG
CAGTCGGAAAAATCCGGGCCCGGATGTACTCCATCAGCTCCTGGTTTGAATCTCAGGATTCTCACTTAC
GGCAAGCACGCCTTCAATGACTTCCCAAGCTGATGCGGGGGAATGTTTGTCCGATTCGACCCGCAATA
CCGGCAGCCCGTTTACGAGCAGATTCGAAATCTCGAAGGCATGACGGCAGGCTCTCTTCTGAACCGT
CATAGTTATCTTGATAGTCAATCGTGCTTT
```

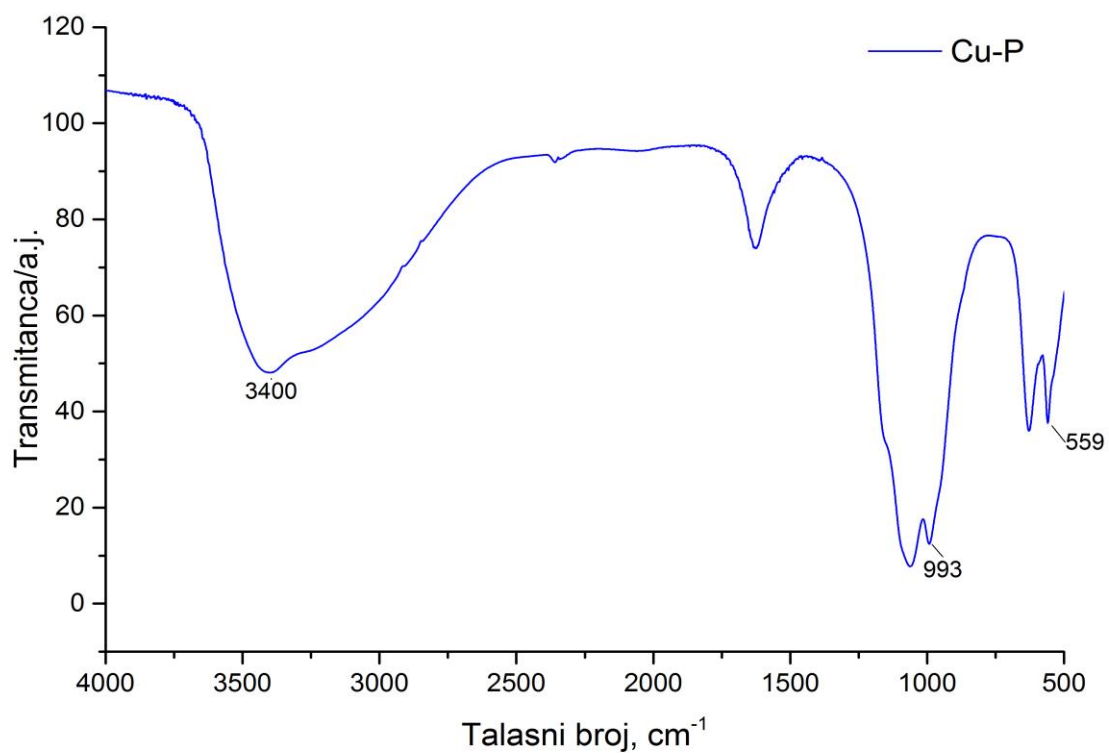
**Slika P-1.3.** Prikaz nukleotidne sekvence gyrA gena (591 bazni par, FASTA format) deponovane u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojem MF592262.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MF592262.1?report=GenBank>)

## FUNKCIONALIZOVANI FILMOVI NA BAZI POLISAHARIDA IZ MORSKIH ALGI

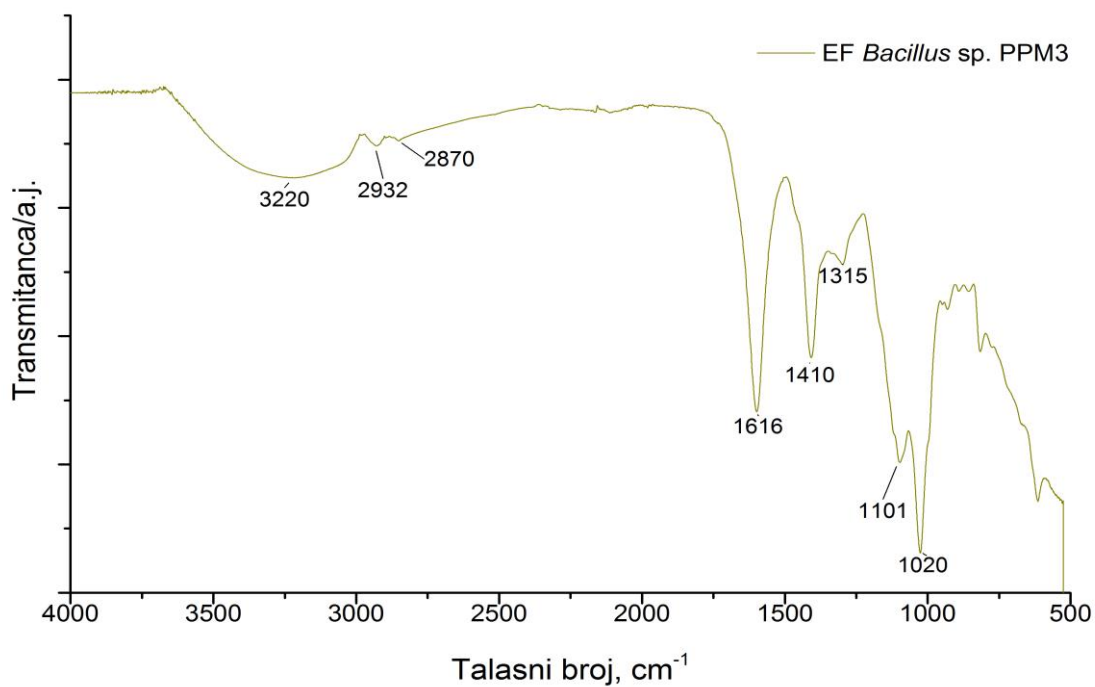


**Slika P-1.4.** FT-IR spektar mineralnog precipitata bakar-karbonata (Cu-C)





**Slika P-1.5.** FT-IR spektar mineralnog precipitata bakar-fosfata (Cu-P)



**Slika P-1.6.** FT-IR spektar ekstraćelijskog filtrata (EF) morskog soja *Bacillus sp. PPM3*

## Biografija

Neda Radovanović je rođena 7. septembra 1985. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovnu školu završila je u Beogradu, a “Zemunsku gimnaziju” prirodno-matematičkog smera u Zemunu. Školske 2004/2005. godine upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Ekologija i zaštita životne sredine. Diplomirala je 2011. godine čime je stekla zvanje Diplomirani biolog zaštite životne sredine.

Doktorske akademske studije je upisala školske 2012/2013. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Od 2013-2017 godine kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije angažovana je na projektu pod nazivom „Primena biotehnoloških metoda u održivom iskorišćenju nus-proizvoda agroindustrije“ (evidencioni broj projekta TR 31035) kojim rukovodi prof. dr Suzana Dimitrijević-Branković. Od jula 2017. godine zaposlena je na Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta, gde je angažovana kao istraživač saradnik na gore navedenom projektu. Završni ispit na doktorskim studijama pod nazivom: „Izolacija, fenotipska i molekularna karakterizacija mikroorganizama iz različitih prirodnih staništa sa potencijalom produkcije bioaktivnih jedinjenja“, odbranila je sa ocenom 10, dana 17. septembra 2014. godine. U zvanje istraživač saradnik reizabrana je 30. maja 2019. godine.

Autor ili koautor je deset radova u međunarodnim časopisima (tri rada u M21a, jednog rada u M21, četiri M22, i dva M23), dva rada u nacionalnim časopisima (M51), jednog rada u tematskom zborniku međunarodnog značaja (M14) i četiri saopštenja sa međunarodnih skupova (M33 i M34).

## **Izjava o autorstvu**

Ime i prezime autora **Neda Radovanović** \_\_\_\_\_

Broj indeksa **4024/2012** \_\_\_\_\_

### **Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom

**Biostimulatori biljnog rasta poreklom iz morske sredine za primenu u**

**agroindustriji**

---

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Neda Radovanović

Broj indeksa 4024/2012

Studijski program Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

Naslov rada **Biostimulatori biljnog rasta poreklom iz morske sredine za primenu u agroindustriji**

Mentor Dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

### **Biostimulatori biljnog rasta poreklom iz morske sredine za primenu u agroindustriji**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
- ③ Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.

## ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације **„Биостимулатори биљног раста пореклом из морске средине за примену у агроиндустрији”**, аутора **Неде Радовановић, дипломираног биолога заштите животне средине**, констатујем да утврђено подударарење текста износи **7 %**. Овај степен подударности **претежно је последица употребљених личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације** што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

24.12.2020. године

**Ментор**

---

Др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор  
Универзитет у Београду,  
Технолошко-металуршки факултет