

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Olja J. Stanojević

IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA
***Bacillus* spp. IZOLATA SA**
POTENCIJALOM ZA BIOKONTROLU
FUNGALNIH PATOGENA ŠAMPINJONA

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Olja J. Stanojević

**IDENTIFICATION AND
CHARACTERIZATION OF *Bacillus* spp.
ISOLATES WITH POTENTIAL FOR
BIOCONTROL OF WHITE BUTTON
MUSHROOM FUNGAL PATHOGENS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentori:

Dr Tanja Berić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Svetlana Milijašević-Marčić, viši naučni saradnik,
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Ivana Potočnik, viši naučni saradnik,
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu

Dr Slaviša Stanković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Ivica Dimkić, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u Laboratoriji za fitopatologiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu i laboratorijama Katedre za mikrobiologiju i Katedre za biohemiju i molekularnu biologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije sprovedena su zahvaljujući nacionalnim projektima OI 173026 „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova Bacillus i Pseudomonas kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“ i TR 31043 „Proučavanje biljnih patogena, artropoda, korova i pesticida u cilju razvoja metoda bioracionalne zaštite bilja i proizvodnje bezbedne hrane“ koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Tanji Berić za svo preneto teorijsko i praktično znanje i priliku da započnem naučnu karijeru. Hvala na ukazanom poverenju, savesnom vođstvu, velikoj stručnosti, požrtvovanosti i neprocenjivim savetima. Hvala za konstantnu podršku tokom saradnje.

Posebnu zahvalnost dugujem mentorki dr Svetlani Milijašević-Marčić na svemu što me je naučila o eksperimentalnom radu i pisanju naučnih radova, na ukazanom poverenju, razumevanju, stpljenju, nesebično podeljenom iskustvu, korisnim savetima, diskusijama i podsticajima. Hvala za besprekornu saradnju.

Srdačno se zahvaljujem dr Ivani Potočnik za upoznavanje sa eksperimentalnom mikologijom i metodama rada sa gljivama. Hvala na saradnji, svim savetima i podršci, neprocenjivoj pomoći prilikom izvođenja eksperimentata i tumačenja rezultata, kao i vremenu izdvojenom za sve to.

Duboku zahvalnost dugujem prof. dr Slaviši Stankoviću na prenetom znanju, svim stvorenim i pruženim prilikama, ukazanom poverenju, stručnim savetima i sugestijama. Hvala za pomoć prilikom pisanja teze i njenu kritičku ocenu, uloženo vreme i trud, za savršenu saradnju i svaki dati podstrek.

Veliku zahvalnost dugujem dr Ivici Dimkiću za preneseno znanje, strpljenje za moje neiskustvo na početku saradnje i razumevanje. Hvala na ukazanom poverenju,

stručnosti, korisnim savetima, kvalitetnim diskusijama i vremenu uloženom u kritičku ocenu teze.

Hvala profesorima i saradnicima Katedre za mikrobiologiju dr Jeleni Knežević-Vukčević, dr Branki Vuković-Gačić, dr Biljani Nikolić i dr Dragani Mitić-Ćulafić na svom prenetom znanju iz oblasti mikrobiologije, kao i odličnoj profesionalnoj saradnji i svakodnevnom razumevanju.

Hvala profesorima Katedre za biohemiju i molekularnu biologiju dr Đorđu Firi i dr Jeleni Lozo na besprekornoj saradnji i stručnosti, kao i mlađim saradnicima za pomoć u laboratorijskom radu.

Ogromnu zahvalnost dugujem dragim kolegama sa Katedre za mikrobiologiju dr Stoimiru Kolareviću, dr Karolini Sunjog, Bojani Vasilijević, dr Jovani Kostić-Vuković, dr Ivanu Nikoliću, Tamari Janakiev, Marini Rajić-Jovanović, Stefani Cvetković, Aleksandri Jelušić, Jovani Jovanović Marić, Jeleni Đorđević, Stefani Đukanović i Tamari Pavlović za svu pruženu pomoć, kolegijalnost, prijateljsku atmosferu tokom rada i druženje van posla.

Zahvaljujem članovima Laboratorije za fitopatologiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine dr Emilu Rekanoviću, dr Bojanu Duduku, dr Biljani Todorović, dr Brankici Tanović, dr Milošu Stepanoviću, dr Jeleni Stepanović, dr Jovani Hrustić, dr Milici Mihajlović, Marini Mrkeli i Jeleni Luković, na prijateljskom ophođenju, razumevanju, strpljenju, nesebičnoj pomoći i besprekornoj saradnji.

Zahvaljujem Draganu Novakoviću, vlasniku kompostare "Uča & co.", Vranovo, Smederevo, za obezbeđen supstrat za gajenje šampinjona korišćen u eksperimentima.

Veliko hvala svim mojim prijateljima na ljubavi, podršci i razumevanju.

Veliko hvala mom Mariu, za безусловnu ljubav i čvrst oslonac koji mi pruža, za razumevanje, strpljenje i što me čini boljom osobom.

Veliko hvala mojoj porodici, koja je uvek tu za mene, koja me voli i bodri i kojoj dugujem svaki moj uspeh i sve što jesam.

Ovaj rad posvećujem mojim roditeljima Snežani i Jovanu

Identifikacija i karakterizacija *Bacillus* spp. izolata sa potencijalom za biokontrolu fungalnih patogena šampinjona

Sažetak

Najštetniji patogeni šampinjona čija pojava u gajilištima izaziva velike gubitke u prinosu su gljive *Trichoderma* spp., prouzrokovajući zelene plesni i *Lecanicillium fungicola*, prouzrokovatelj suve truleži šampinjona. Zbog smanjenja efikasnosti sintetičkih fungicida u suzbijanju patogena kao i njihovog negativnog uticaja na životnu sredinu, danas se izučavaju prirodni i bezbedni načini zaštite šampinjona, kao što je biološko suzbijanje antagonističkim bakterijama. Iz kompostnog materijala (slame i stajnjaka), komposta i pokrivke korišćenih za gajenje šampinjona izolovano je 284 *Bacillus* spp. izolata. Ukupno 33 izolata pokazalo je antagonističko dejstvo prema patogenim gljivama *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* T77, *Trichoderma harzianum* T54 i *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 *in vitro*. Filogenetska analiza na osnovu sekvence hipervarijabilnog regiona gena za 16S rRNK svrstala je antagonističke izolate među sojeve vrsta *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* i *Bacillus licheniformis*, dok sekvenca *tuf* gena nije omogućila pouzdanu identifikaciju do nivoa vrste. U ispitivanju aktivnosti bezćelijskih supernatanata prema patogenim gljivama *in vitro*, najveću osetljivost pokazala je *T. harzianum* T54, zatim *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6. Bezćelijski supernatant soja *B. amyloliquefaciens* B-241 jedini je imao antifungalno dejstvo prema sva tri ispitivana patogena. Molekularnom detekcijom gena odgovornih za proizvodnju lipopeptida pokazano je da najveći broj *Bacillus* spp. sojeva nosi gene kurstakinskog operona (32), zatim gen za surfaktin sintetazu (15), gen za fengicin sintetazu (10), gen za bacilomicin D sintetazu (9) i deo iturinskog operona (6), pri čemu je većina sojeva pokazala potencijal za sintezu bar dva lipopeptidna jedinjenja. Ispitivanjem uticaja etil-acetatnog ekstrakta lipopeptida soja *B. amyloliquefaciens* B-241 (pozitivnog na iturine, bacilomicin D i kurstakine) na rast micelije patogena *in vitro*, potvrđena je uloga ovih jedinjenja u antagonizmu i antibioza kao mehanizam delovanja njihovog producenta. U eksperimentalnom gajilištu, najveću efikasnost u suzbijanju patogena *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 postigli su fungicid prochloraz-Mn i

biofungicid na bazi *B. velezensis* QST 713, dok se od antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva odabranih za *in vivo* ispitivanja najefikasnijim pokazao soj *B. amyloliquefaciens* B-241. Dodatno, nijedan od tretmana nije negativno uticao na ukupan prinos šampinjona. Dobijeni rezultati ukazuju na potencijal soja *B. amyloliquefaciens* B-241 za suzbijanje prouzrokovaca zelene plesni i suve truleži i mogućnost njegove primene u gajilištima šampinjona, umesto štetnih sintetičkih fungicida.

Ključne reči: *Bacillus*, lipopeptidi, antagonizam, biološko suzbijanje, *Trichoderma*, zelena plesan, *Lecanicillium fungicola*, suva trulež, *Agaricus bisporus*

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

Identification and characterization of *Bacillus* spp. isolates with potential for biocontrol of white button mushroom fungal pathogens

Abstract

The most devastating fungal pathogens of the white button mushroom that induce the greatest yield losses are *Trichoderma* spp. and *Lecanicillium fungicola*, causal agents of green mould and dry bubble disease. Given the reduced efficacy of synthetic fungicides used for disease control and the negative impact they have on the environment, the need for safer means of protection such as biological control by antagonistic bacteria has emerged. A total of 284 *Bacillus* spp. isolates were obtained from compost material (straw and manure), compost and casing soil used in mushroom cultivation. Thirty-three *Bacillus* spp. isolates exhibited *in vitro* antagonistic activity towards *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* T77, *Trichoderma harzianum* T54 and *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* Ša2V6. Based on the sequence of the 16S rRNA gene, antagonistic *Bacillus* spp. strains were identified as *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis*, while the *tuf* gene sequence showed unsatisfactory discrimination between *Bacillus* species. The antifungal activity of cell-free supernatants of *Bacillus* spp. strains examined *in vitro* proved *T. harzianum* T54 to be the most sensitive pathogen, followed by *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 and *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6. Only *B. amyloliquefaciens* B-241 supernatant showed the antifungal activity towards all three examined pathogens. Molecular detection of lipopeptide genes showed that the majority of *Bacillus* spp. strains were positive for kurstakin genes (32), followed by surfactin synthetase gene (15), fengycine synthetase gene (10), bacillomycin D synthetase gene (9) and part of the iturin operon (6), while most strains had the potential for producing at least two lipopeptide compounds. The role of lipopeptides in the antagonism of *B. amyloliquefaciens* B-241 (positive for iturin, bacillomycin D and kurstakin operons) was confirmed by testing the impact of the ethyl-acetate extract on the growth of pathogenic fungi *in vitro*, and antibiosis was determined as the mode of its action. In mushroom growing room trials, the best efficacy in the suppression of both pathogens was achieved by the fungicide prochloraz-Mn and biofungicide based on *B. velezensis* QST 713, while *B.*

amyloliquefaciens B-241 showed the greatest biocontrol efficacy among the antagonistic *Bacillus* spp. strains selected for *in vivo* experiments. Additionally, none of the treatments had any negative impact on the white button mushroom yield. Strain *B. amyloliquefaciens* B-241 showed the greatest potential for the control of both green mould and dry bubble disease and could therefore be used during mushroom production, as a substitute for harmful synthetic fungicides.

Key words: *Bacillus*, lipopeptides, antagonism, biological control, *Trichoderma*, green mould, *Lecanicillium fungicola*, dry bubble, *Agaricus bisporus*

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Microbiology

SADRŽAJ:

1.	UVOD	1
1.1.	Komercijalna proizvodnja šampinjona (<i>Agaricus bisporus</i> L.).....	1
1.2.	Bolesti šampinjona – zelena plesan i suva trulež.....	4
1.2.1.	Prouzrokovaci zelene plesni šampinjona	4
1.2.2.	Prouzrokovaci suve truleži šampinjona	8
1.3.	Sprečavanje širenja i hemijsko suzbijanje prouzrokovaca zelene plesni i suve truleži šampinjona.....	10
1.3.1.	Sprečavanje širenja prouzrokovaca zelene plesni i suve truleži šampinjona	10
1.3.2.	Hemijsko suzbijanje prouzrokovaca zelene plesni i suve truleži šampinjona.....	11
1.4.	Biološko suzbijanje patogena u proizvodnji šampinjona.....	12
1.4.1.	Biološko suzbijanje i biopesticidi	12
1.4.2.	Vrste roda <i>Bacillus</i> u biološkom suzbijanju.....	13
1.4.3.	Biološko suzbijanje zelene plesni i suve truleži šampinjona	17
1.5.	Ograničenja i izgledi biološkog suzbijanja patogena.....	18
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	21
3.	MATERIJAL I METODE	22
3.1.	Materijal.....	22
3.1.1.	Bakterijski sojevi.....	22
3.1.2.	Izolati gljiva	22
3.1.3.	Materijal za izolaciju bakterija.....	23
3.1.4.	Medijumi za gajenje bakterija i gljiva.....	23
3.2.	Metode	24
3.2.1.	Izolacija <i>Bacillus</i> spp.	24
3.2.2.	Ispitivanja antagonističkog dejstva <i>Bacillus</i> spp. sojeva prema fungalnim patogenima šampinjona <i>in vitro</i>	25
3.2.3.	Identifikacija antagonističkih <i>Bacillus</i> spp. izolata.....	25
3.2.4.	Ispitivanje mehanizama antagonističkog delovanja <i>Bacillus</i> spp. sojeva	29
3.2.4.1.	Molekularna detekcija gena za lipopeptide	29
3.2.4.2.	Ispitivanje antifungalne aktivnosti supernatanata <i>in vitro</i>	31
3.2.4.3.	Etil-acetatna ekstrakcija lipopeptida	31
3.2.4.4.	Ispitivanje antifungalne aktivnosti lipopeptidnog ekstrakta <i>in vitro</i>	32
3.2.5.	Ispitivanje efekta <i>Bacillus</i> spp. sojeva na miceliju šampinjona <i>in situ</i>	33
3.2.6.	Efikasnost <i>Bacillus</i> spp. sojeva za suzbijanje patogena i uticaj na prinos šampinjona <i>in vivo</i>	33
3.2.6.1.	Postavka <i>in vivo</i> eksperimenata.....	33

3.2.6.2.	Veštačka inokulacija patogena	34
3.2.6.3.	Tretmani bio/fungicidima.....	35
3.2.7.	Statističke analize.....	36
4.	REZULTATI	37
4.1.	Izolacija i formiranje kolekcije <i>Bacillus</i> spp.	37
4.2.	Ispitivanje antagonističkog dejstva <i>Bacillus</i> spp. sojeva prema fungalnim patogenima šampinjona <i>in vitro</i>	39
4.3.	Identifikacija antagonističkih <i>Bacillus</i> spp.	43
4.4.	Ispitivanje mehanizama antagonističkog delovanja <i>Bacillus</i> spp. sojeva.....	48
4.4.1.	Molekularna detekcija gena za lipopeptide	48
4.4.2.	Ispitivanje antifungalne aktivnosti supernatanata <i>in vitro</i>	53
4.4.3.	Uticaj lipopeptidnog ekstrakta na rast patogenih gljiva šampinjona.....	56
4.5.	Ispitivanje efekta <i>Bacillus</i> spp. sojeva na rast micelije šampinjona <i>in situ</i>	58
4.6.	Efikasnost <i>Bacillus</i> spp. sojeva u suzbijanju patogena i uticaj na prinos šampinjona <i>in vivo</i>	58
4.6.1.	Efikasnost tretmana za suzbijanje prouzrokovala zelene plesni i suve truleži šampinjona	60
4.6.2.	Uticaj tretmana na prinos šampinjona.....	63
5.	DISKUSIJA	66
6.	ZAKLJUČCI	79
7.	LITERATURA	82
8.	PRILOZI	103

1. UVOD

1. UVOD

1.1. Komercijalna proizvodnja šampinjona (*Agaricus bisporus* L.)

Jestive gljive su još od davnina cenjene i gajene zbog privlačnog ukusa, hranljivosti i lekovitosti (Savoie and Mata, 2016). Šampinjoni, *Agaricus bisporus*, su najčešće komercijalno gajene gljive sa udelom od 30% u svetskoj proizvodnji jestivih gljiva (Royse, 2014). Predstavljajući važan izvor hrane, sa rastom ljudske populacije razvijala se i napredovala komercijalna proizvodnja šampinjona. Intenzivna istraživanja i nova saznanja o biologiji, ekologiji i genetici šampinjona omogućavaju stalno unošenje novina u proces komercijalnog gajenja, sa ciljem postizanja održive proizvodnje.

Agaricus bisporus je saprobna gljiva koja u prirodi raste na delimično razgrađenom biljnom materijalu i učestvuje u njegovoj daljoj razgradnji kao sekundarni razlagač, usled čega ima bitnu ulogu u kruženju ugljenika u prirodi (Savoie et al., 2016). Tačan mehanizam razgradnje supstrata u toku životnog ciklusa šampinjona nije dovoljno istražen, mada je dokazana uloga enzima za razgradnju celuloze, hemiceluloze i lignina (Patyshakuliyeva et al., 2015). Uzimajući u obzir ekologiju šampinjona, komercijalni uzgoj šampinjona zahteva upotrebu posebne podloge za rast, bogate hranljivim materijama, odgovarajuće konzistencije, sadržaja kiseonika i vode (Agrawal, 2014). Supstrat koji se koristi za gajenje šampinjona čine životinjski stajnjak i biljni materijal, najčešće slama, koji moraju proći kroz složen proces kompostiranja kako bi se obezbedile lako iskoristive hranjive materije za efikasan rast šampinjona.

Kompostiranje je proces aerobne razgradnje organske materije aktivnošću različitih grupa mikroorganizama prirodno prisutnih u kompostnom materijalu (slami i stajnjaku) (Miller, 1993). Za ovaj proces karakteristično je uzastopno smenjivanje mikrobijalnih zajednica sa različitim funkcijama u razgradnji organske materije, usled stalnih fizičkih i hemijskih promena izazvanih njihovom aktivnošću (Toumela et al., 2000).

Proces kompostiranja može da se podeli na dve faze (Maheshwari et al., 2014):

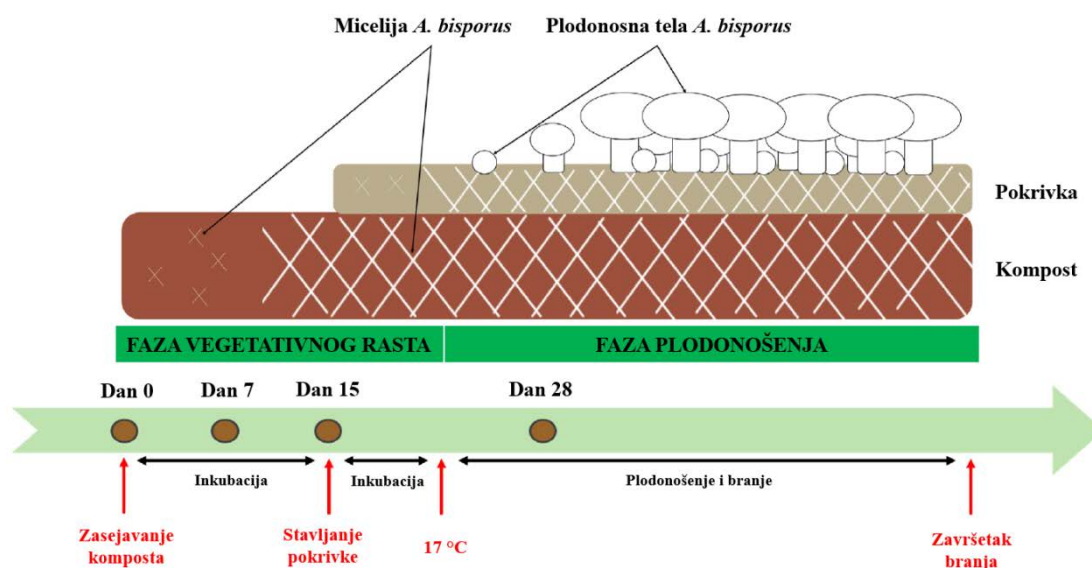
- I faza – fermentacija (rana mezofilna, termofilna i kasna mezofilna faza)
- II faza – pasterizacija i kondicioniranje.

Prva faza tokom koje dolazi do delimične razgradnje početnih sirovina vrši se na otvorenom, uz povremeno mešanje i vlaženje slame i stajnjaka kako bi se održavali aerobni uslovi u smeši. Na početku ove faze mikroorganizmi intenzivno iskorišćavaju lako dostupne šećere i skrob što uzrokuje brz porast temperature od početnih 20 °C do 40 °C i smenu mezofilnih vrsta termotolerantnim i termofilnim (Ryckeboer et al., 2003). U termofilnoj fazi, nazvanoj faza stabilizacije, povišena temperatura komposta (40–60 °C) ubrzava razgradnju složenih molekula proteina, masti, celuloze i hemiceluloze i istovremeno doprinosi eliminaciji potencijalnih kompetitora i patogena šampinjona (Zhang et al., 2014). Usled visokih temperatura ova faza se odlikuje smanjenim diverzitetom mikroorganizama, pri čemu dominiraju termofilne Actinobacteria, vrste roda *Bacillus* i *Thermus*, i termotolerantne gljive roda *Aspergillus* i *Penicillium* (Agrawal, 2014; Siyoum et al., 2016). Iscrpljivanjem supstrata i smanjenjem metaboličke aktivnosti mikroorganizama, temperatura smeše postepeno opada i nastupa kasna mezofilna faza (faza maturacije). U ovoj fazi dominantne su gljive i Actinobacteria za koje se smatra da vrše konačnu razgradnju preostalih teško razgradivih materija, uključujući i lignin (Toumela et al., 2000).

Druga faza kompostiranja podrazumeva unošenje komposta u zatvoren prostor gde podleže pasterizaciji i kondicioniranju (Zhang et al., 2014). Temperatura vazduha i samog komposta se postepeno povećava i održava na 56–58 °C 12 do 20 časova kako bi se obezbedila sterilizacija komposta. Postepenim spuštanjem temperature na 46–48 °C omogućava se eliminacija amonijaka tokom faze kondicioniranja i kolonizacija komposta mikroorganizmima koji će u toku gajenja vršiti dalju razgradnju komposta zajedno sa *A. bisporus*.

Ovako pripremljen kompost se hladi do sobne temperature i ravnomerno zasejava „semenima“, koja predstavljaju sterilisana zrna pšenice, prosa ili ječma obavijena micelijom šampinjona (Van Griensven and Van Roestel, 2004). Uzgoj šampinjona traje oko dva meseca i odvija se u klimatskim jedinicama uz kontrolisanje temperature, vlažnosti, sadržaja ugljen dioksida i provetrenosti (Pandini et al., 2018a). Sam proces gajenja šampinjona može se podeliti na fazu vegetativnog rasta i fazu plodonošenja (**Slika 1**). Tokom vegetativne faze micelija šampinjona raste kroz kompost pri temperaturi od 25 °C, vlažnosti vazduha 90–100%, visokom sadržaju ugljen dioksida i slaboj provetrenosti. Nakon inkubacionog perioda od 14 do 20 dana, kompost potpuno prorastao

micelijom šampinjona (III faza) prekriva se slojem crnog treseta (tzv. pokrivkom) i temperatura se spušta na 17 °C (uz vlažnost vazduha 85–95%, nizak sadržaj ugljen dioksida i intenzivnu provetrenost) (Maheshwari, 2013). Pokrivka predstavlja treset pomešan sa krečom kao regulatorom kiselosti, i ima funkciju u zaštiti komposta od isušivanja i stvaranju povoljnih uslova za brzo obrazovanje primordija šampinjona (Kertesz and Thai, 2018). Pokazano je da plodonošenje izostaje ukoliko se pokrivka prethodno sterilise, što ukazuje na ulogu mikroorganizama iz treseta na rast i razviće šampinjona (Wood, 1976; Noble et al., 2003; Cai et al., 2009). Prorastanje micelije kroz pokrivku traje oko sedam dana nakon čega sledi faza plodonošenja, tokom koje se od primordija obrazuju zrela plodonosna tela šampinjona koja rastu u dva do tri talasa plodonošenja, sve do kraja ciklusa gajenja šampinjona (Pandin et al., 2018a).



Slika 1. Šematski prikaz procesa gajenja šampinjona *Agaricus bisporus* (adaptirano iz Pandin et al., 2018a).

Iako je uzgoj šampinjona moguć i na nekompostiranom materijalu, razvoj tehnologije kompostiranja omogućio je znatno veće prinose i održivu proizvodnju (Mamiro et al., 2007; Kertesz and Thai, 2018). Međutim, s obzirom da uspeh procesa kompostiranja zavisi od sastava mikrobijalne zajednice slame i stajnjaka, česta su variranja u pogledu kvaliteta komposta što dovodi do nedoslednosti u dobijenom prinosu šampinjona, uprkost standardizovanom i kontrolisanom procesu gajenja (Cai et al., 2009; Kertesz and Thai, 2018).

1.2. Bolesti šampinjona – zelena plesan i suva trulež

Pored korisnih mikroorganizama koji pomažu rast šampinjona, u pokrivci i kompostu su često prisutni prouzrokovaci bolesti koji mogu naneti velike štete u proizvodnji (Savoie et al., 2016). Uslovi u gajilištima optimalni za rast šampinjona takođe pogoduju i rastu patogenih gljiva, bakterija i virusa koji narušavaju kvalitet i količinu plodonosnih tela šampinjona (Staunton et al., 1999). Najčešći patogeni šampinjona su gljive: *Trichoderma* spp., *Lecanicillium fungicola*, *Mycogone perniciosa*, *Cladobotryum dendroides*; bakterije (*Burkholderia gladioli*, *Pseudomonas* spp.) i neki virusi (Fletcher and Gaze, 2008; Largeteau and Savoie, 2010). Najštetnije fungalne bolesti šampinjona su zelena plesan prouzrokovana vrstama roda *Trichoderma* i suva trulež prouzrokovana gljivom *Lecanicillium fungicola*, koje su zajedno sa patogenom bakterijom *Pseudomonas tolaasii* i La France virusom odgovorne za 25% gubitaka u proizvodnji šampinjona na godišnjem nivou (Soković and Van Griensven, 2006).

1.2.1. Prouzrokovaci zelene plesni šampinjona

Vrste roda *Trichoderma* su zemljišne filamentozne gljive razdela Ascomycota, čiji teleomorfni stadijum pripada rodu *Hypocrea*. Vrste roda *Trichoderma* su saprobi kosmopolitskog rasprostranjenja, izolovane iz najrazličitijih sredina, zemljišta, kore drveta i sa drugih gljiva, što ukazuje na sposobnost izuzetne prilagodljivosti na različite životne uslove. Uprkos velikoj raznovrsnosti, za vrste roda *Trichoderma* mikoparazitizam predstavlja osnovni način života (Druzhinina et al., 2011). Mikoparazitizam odnosno sposobnost razgradnje komponenti ćelijskih zidova gljiva, odgovoran je za antagonističko dejstvo vrsta roda *Trichoderma* prema mnogim fitopatogenim gljivama ali i za patogenost prema drugim pripadnicima istog carstva. Do danas je na osnovu kombinacije morfoloških, fizioloških i molekularnih podataka identifikovano 300 antagonističkih i patogenih vrsta ovog roda (Druzhinina et al., 2011). Među patogenim predstavnicima nalaze se i prouzrokovaci bolesti komercijalno gajenih jestivih gljiva, šampinjona *A. bisporus*, bukovače *Pleurotus ostreatus* i šitake gljiva *Lentinula edodes* (Samuels et al., 2002; Hatvani et al., 2008; Wang et al., 2016).

Prouzrokovajući zelene plesni šampinjona isprva su smatrani kompetitorima šampinjona i indikatorima lošeg kvaliteta komposta (Geels et al., 1988). Vrste *Trichoderma viride* i *Trichoderma koningii* su u gajilištima povremeno izazivale gubitke u prinosu. Uprkos tome, njihova pojava se nije smatrala ozbiljnim problemom i pripisivana je nekvalitetnom kompostu i lošem održavanju higijene u gajilištu. Krajem XX veka, 1985. godine zabeležena je prva epidemija zelene plesni u Velikoj Britaniji (Seaby, 1987) praćena epidemijom u Republici Irskoj 1990. godine (Doyle, 1991). Tokom devedesetih godina zelena plesan zahvatila je i gajilišta u Holandiji (Geels, 1997), Severnoj Americi (Rinker, 1993; Romaine et al., 1996), Španiji (Hermosa et al., 1999) i Francuskoj (Mamoun et al., 2000), izazivajući velike novčane gubitke. Dalje se bolest proširila na Mađarsku (Hatvani et al., 2007), Poljsku (Szczec et al., 2008), Meksiko (Romero-Arenas et al., 2009), Australiju (Clift and Shamshad, 2009), Hrvatsku (Hatvani et al., 2012) i Srbiju (Kosanović et al., 2013). U Srbiji je prva pojava prouzrokovача zelene plesni šampinjona zabeležena između 2006. i 2010. godine, kada je iz plodonosnih tela i komposta dobijeno 20 visoko virulentnih izolata vrsta roda *Trichoderma* (Kosanović et al., 2013).

Dugo se smatralo da je vrsta *Trichoderma harzianum* Rifai jedina odgovorna za nastale štete u gajilištima šampinjona (Seaby, 1987; Seaby, 1996). Međutim, izolati *T. harzianum* iz Velike Britanije razlikovali su se po stopama rasta, obrascima sporulacije, sposobnosti kolonizacije komposta i mikro- i makromorfološkim osobinama, usled čega su označeni kao tri različita biotipa jedne vrste (Seaby, 1987). Biotip Th2 ključno se razlikovao od Th1 i Th3 biotipa po sposobnosti agresivne kolonizacije komposta. U Severnoj Americi pokazano je da su sojevi odgovorni za epidemije činili novi biotip Th4 koji je po karakteristikama bio sličan biotipu Th2 (Castle et al., 1998). Molekularna analiza ITS1 sekvence pokazala je da se dva agresivna biotipa razlikuju u pet baznih parova i da su filogenetski veoma bliski biotipu Th1 (Muthumeenakshi et al., 1998). Konačno, biotip Th1 identifikovan je kao *T. harzianum sensu stricto*, Th3 biotip kao *Trichoderma atroviride* P. Karsten, a Th2 i Th4 su na osnovu filogenetske analize *tefl* gena preimenovani u *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* Samuels & W. Gams i *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* Samuels & W. Gams, redom (Samuels et al., 2002).

Najveće štete u proizvodnji šampinjona u Evropi izaziva vrsta *T. aggressivum* f. *europaeum* Samuels & W. Gams (Samuels et al., 2002). Zbog sposobnosti kolonizacije komposta, patogen ulazi u kompeticiju za hranljive materije sa micelijom *A. bisporus* i usporava ili potpuno sprečava vegetativni rast šampinjona, što rezultuje smanjenim prinomom. Smanjenje prinosa obično je srazmerno površini komposta zahvaćenog patogenom, pri čemu u slučaju intenzivne infekcije gubici mogu iznositi i do 100% (Kredics et al., 2010). Micelija *T. aggressivum* f. *europaeum* je bele boje, nalik vegetativnoj miceliji šampinjona, pa se ne može uočiti u zaraženom kompostu, sve dok ne dođe do obilne sporulacije patogena. Tada kolonije postaju uočljive, smaragdno zelene boje i suzbijanje bolesti nije više izvodljivo (**Slika 2**).



Slika 2. *Trichoderma aggressivum* u kompostu (foto I. Potočnik).

Ukoliko se plodnosna tela formiraju, ona se odlikuju smeđim nekrotičnim lezijama (**Slika 3**) nakon čega dolazi do njihovog truljenja (**Slika 4**). U slučaju infekcije manje virulentnim vrstama (*T. harzianum* Rifai, *Trichoderma koningii* Oudem, *T. atroviride* P. Karsten, *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) Arx., koje ne pogađaju vegetativnu fazu rasta šampinjona, na plodnosnim telima šampinjona javljaju se lezije što indirektno smanjuje prinos, jer simptomatična iskrivljena plodnosna tela prekrivena micelijom patogena i grinjama *Pygmephorus* spp. nisu pogodna za tržište (Krupke et al., 2003).



Slika 3. Simptomi zelene plesni na plodonosnim telima šampinjona (foto O. Stanojević).



Slika 4. *Trichoderma harzianum* na pokrivci (foto I. Potočnik).

Interakcije između vrsta roda *Trichoderma* i *A. bisporus* u kompostu nisu dovoljno istražene, i mehanizmi odgovorni za agresivnost *T. aggressivum* još uvek nisu razjašnjeni. Kompost sadrži velike količine lignina i celuloze zbog čega je na njemu moguć rast Basidiomycota koje mogu koristiti ove složene molekule kao izvor ugljenika. Agresivni biotipovi *Trichoderma* vrsta nemaju sposobnost sinteze enzima za efikasnu razgradnju ovih makromolekula i za brži rast kroz kompost im je potrebno prisustvo micelije šampinjona (Seaby, 1996). Vrste *T. aggressivum* mogu rasti i bez prisustva šampinjona, ali znatno sporije, pri čemu su njihove hife izuzetno tanke i teško uočljive, a karakteristična smaragdno zelena boja javlja se tek nakon kontakta sa micelijom

šampinjona, usled intenzivne sporulacije (Mamoun et al., 2000; Largeau and Savoie, 2010). Vrsta *T. aggressivum* može da kolonizuje veliku površinu komposta pre nego što dođe u direktan kontakt sa *A. bisporus* pa je istovremen rast ove dve gljive u kompostu moguć dokle god su hranljivi sastojci u izobilju, a sa iscrpljivanjem nutrijenata, kompetitivnija *T. aggressivum* će prevladati i inhibirati formiranje plodonosnih tela šampinjona. Još uvek nije dokazano po čemu se agresivni biotipovi razlikuju u odnosu na neagresivne vrste roda *Trichoderma* kada je u pitanju njihova interakcija sa *A. bisporus*. Pretpostavlja se da u agresivnoj kolonizaciji supstrata ulogu imaju ekstracelularni enzimi, himoelastazi- i tripsinu-slične proteaze (Williams et al., 2003), ali da oni sigurno nisu jedini odgovorni faktori. Bolja adaptacija vrsta *T. aggressivum* na kompost u odnosu na izolate *T. harzianum* se najverovatnije zasniva na toleranciji antagonističkog dejstva drugih mikroorganizama u kompostu (Savoie et al., 2001).

1.2.2. Prouzrokovaci suve truleži šampinjona

Prouzrokovac suve truleži šampinjona je gljiva iz razdela Ascomycota *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare & W. Gams, predstavljena sa dva varijeteta, *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* i *Lecanicillium fungicola* var. *aleophilum*. Pored primarnog domaćina *A. bisporus*, *L. fungicola* može prouzrokovati bolest i drugih jestivih gljiva, npr. *Agaricus bitorquis* i *P. ostreatus* (Gea et al., 2003). Varijetet *L. fungicola* var. *fungicola* pogađa gajilišta šampinjona u Evropi gde izaziva znatne gubitke u prinosu, usled smanjenja kvaliteta plodonosnih tela, dok je *L. fungicola* var. *aleophilum* odgovoran za štete u gajilištima Severne Amerike (Collopy et al., 2001; Largeau et al., 2004). Procenjeno je da gubici izazvani infekcijama šampinjona vrstom *L. fungicola* iznose 2-4% ukupnog godišnjeg prinosa (Berendsen et al., 2012).

Simptomi bolesti koji se javljaju usled infekcije ovim patogenom mogu biti različitog intenziteta, a nastaju usled uticaja patogena na diferencijaciju plodonosnih tela šampinjona (**Slika 5**) (North and Wuest, 1993; Largeau et al., 2007; Berendsen et al., 2010). Najblaži simptomi su smeđe, svetlo smeđe ili sive nekrotične lezije na plodonosnim telima šampinjona koje se javljaju kada se infekcija desi u bilo kojoj fazi razvoja šampinjona. Kada dođe do infekcije primordija i šesira plodonosnog tela simptomi se ispoljavaju kao delimično iskrivljena plodonosna tela sa uzdužnim cepanjem

drške. Najintenzivniji simptom nazvan „suva trulež“ predstavlja bezobličnu micelijalnu masu umesto diferenciranog plodonosnog tela. Takođe je pokazano da učestalost simptoma zavisi od trenutka u procesu uzgoja šampinjona kada je ostvarena infekcija (Holmes, 1971). Inokulacija patogena u vreme postavljanja pokrivke rezultuje niskom učestalošću simptoma, najverovatnije jer u tom trenutku micelija šampinjona nije prorasla kroz pokrivku pa nedostatak nutrijenata sprečava razvoj patogena. Najveća učestalost simptoma javlja se usled inokulacije patogena 14 dana posle postavljanja pokrivke, dok inokulacija 21 do 28 dana nakon postavljanja pokrivke rezultuje malim brojem plodonosnih tela sa izraženim simptomima.



Slika 5. Simptomi suve truleži šampinjona prouzrokovani patogenom *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola*. A – zdravo plodonosno telo, B – nekrotične lezije, C – uzdužno cepanje drške, D – „suva trulež“ (preuzeto od Berendsen et al., 2010).

Za razliku od *T. aggressivum*, *L. fungicola* nema uticaj na vegetativnu miceliju šampinjona (Calonje et al., 2000) već se infekcija šampinjona odvija u pokrivci u toku faze plodonošenja. Pokazano je da spore patogena ne kličaju tokom prvih sedam dana nakon postavljanja pokrivke, najverovatnije zbog odsustva micelije *A. bisporus* i metabolita koje šampinjon proizvodi. Takođe se smatra da isparljiva supstanca 1-okten-3-ol koju sintetizuje *A. bisporus* inhibira formiranje plodonosnih tela i klijanje spora *L. fungicola*, što znači da razvoj patogena počinje tek kada se koncentracija ove supstance u pokrivci smanji i time inicira formiranje primordija šampinjona (Berendsen et al., 2013a).

Prirodni izvor spora patogena može biti zemljište iz neposredne okoline gajilišta šampinjona koje putem prašine dospevaju unutar gajilišta i dolazi do razvoja bolesti suve truleži (Nair and Macauley, 1987; Grogan, 2001). Pretpostavljeno je da glavni izvor patogena predstavlja pokrivka, s obzirom na to da spore ovog patogena mogu ostati

vijabilne u zemljištu dugi vremenski period i da se u gajilištu zadržavaju sedam do osam meseci u suvim uslovima.

1.3. Sprečavanje širenja i hemijsko suzbijanje prouzrokovača zelene plesni i suve truleži šampinjona

1.3.1. Sprečavanje širenja prouzrokovača zelene plesni i suve truleži šampinjona

Prenošenje spora prouzrokovača zelene plesni i suve truleži između gajilišta pa čak i između različitih kontinenata predstavlja veliki problem u proizvodnji šampinjona. Pokazano je da su infekcije vrstom *T. aggressivum* češće u suvim vetrovitim danima što ukazuje na prenošenje spora vazduhom, ali je značajna i uloga grinja, muva i nematoda koje žive u kolonijama vrsta roda *Trichoderma* u gajilištima. Spore *L. fungicola* se u gajilištu najverovatnije prenose kapima vode i putem insekata. Međutim, širenje infekcije na veće razdaljine vrši se kontaminiranim materijalom ili opremom, kao u slučaju infekcije gajilišta u Meksiku vrstom *L. fungicola* var. *fungicola* koja nije karakteristična za Severnu Ameriku (Largeteau et al., 2004). Dodatno, na osnovu RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) obrazaca pokazano je da su izolati *T. aggressivum* f. *europaeum* odgovorni za epidemiju zelene plesni u Mađarskoj slični izolatima iz Engleske i Irske, što ukazuje na mogućnost širenja zelene plesni na velike razdaljine (Hatvani et al., 2007).

Kako bi se sprečilo širenje infekcija patogenima u i između gajilišta neophodno je pridržavati se određenih pravila ponašanja tokom procesa kompostiranja i uzgoja šampinjona. Strogo održavanje higijene u gajilištima sprečava prodor spora patogena u prostorije za kompostiranje i gajenje iz spoljašnje sredine, ali i njihovo širenje iz kontaminiranog gajilišta. Preventiva pojave najštetnijih bolesti šampinjona može se postići redovnom i temeljnom sterilizacijom supstrata za gajenje šampinjona, vazduha u gajilištu, svih površina, alata, opreme, mašina, ruku radnika i njihove odeće pre i nakon svakog ciklusa gajenja šampinjona (Staunton and Dunne, 2001; Maheshwari, 2013;

Savoie et al., 2016). Pošto je praksa pokazala da ove mere nisu dovoljno efikasne neophodna je i primena metoda za suzbijanje i eliminaciju patogena.

1.3.2. Hemijsko suzbijanje prouzrokovala zelene plesni i suve truleži šampinjona

Uprkos pridržavanju navedenih preventivnih mera, infekcije patogenima i razvoj bolesti šampinjona su česta pojava, pa je neophodno primeniti i efikasne metode suzbijanja u toku uzgoja. Industrijska proizvodnja šampinjona najviše se oslanja na hemijske metode suzbijanja bolesti. U Evropi su zvanično u upotrebi samo dva fungicida u proizvodnji šampinjona, prochloraz i metrafenon, dok se u Severnoj Americi koriste hlorotalonil, tiabendazol i tiofanat-metil (Grogan and Gaze, 2000; Romaine et al., 2005; EFSA, 2013), a u Australiji prochloraz, karbendazim i tiabendazol (Allan et al., 2008). U Srbiji nijedan od njih nije zvanično registrovan za upotrebu u proizvodnji šampinjona mada ih uzgajivači redovno primenjuju (Potočnik et al., 2008; Kosanović et al., 2013). Jedan od razloga ograničenog broja fungicida odobrenih za tretiranje komposta, pokrivke i „semena“ *A. bisporus* (Abosriwil and Clancy, 2003) jeste česta pojava toksičnosti prema domaćinu, s obzirom na to da i patogen i domaćin pripadaju istom carstvu.

Hemijski fungicidi imaju izražene negativne efekte po životnu sredinu i živi svet (Cawoy et al., 2011). Prema Stokholmskoj konvenciji o dugotrajnim organskim zagađujućim supstancama, 10 od 12 najopasnijih hemijskih supstanci predstavljaju upravo pesticidi (Gilden et al., 2010). Hemijski pesticidi koji se primenjuju u poljoprivredi zagađuju zemljište i podzemne vode, zadržavajući se u ekosistemu dugi niz godina (Ballschmide et al., 2002; Budzinski and Couderchet, 2018; Cui et al., 2018). Čak i kada akutni štetni efekti nisu očigledni, ove supstance ispoljavaju hroničnu toksičnost i ostavljaju dugoročne posledice po živi svet, i zdravlje ljudi (Paoletti and Pimentel, 2000). Sintetička hemijska jedinjenja najčešće nemaju ciljano dejstvo i štetna su za druge organizme, uključujući i ljude. Njihov toksični efekat uvećava se kroz trofičke nivoe ishrane mehanizmima bioakumulacije i biomagnifikacije pri čemu se štetni efekti najviše ispoljavaju kod vršnih predatora (Di et al., 2017).

Pored toga, razvoj rezistentnosti patogenih gljiva na fungicide, usled neadekvatne i prekomerne primene ovih supstanci predstavlja veliki problem u savremenoj proizvodnji šampinjona (Grogan, 2008). Nedavno je pokazana otpornost patogena *T. aggressivum* na

fungicide iz grupe benzimidazola pa je za suzbijanje rezistentnih izolata preporučena upotreba imazalil sulfata (grupa imidazola) (Romaine et al., 2005). Ustanovljeno je da su različite vrste roda *Trichoderma*, izuzev agresivnog biotipa, osetljive na primenu tiabendazola, benomila, i tiofanat-metila *in vitro* i *in vivo*, a rezistentne na hlorotalonil (Rinker and Alm, 2008). Izolati *Trichoderma* spp. iz Srbije i Bosne i Hercegovine su pokazali osetljivost na prohloraz-Mn (Kosanović et al., 2013), hlorotalonil, karbendazim i iprodion, smanjenu osetljivost na tiofanatmetil, dok je sedam izolata bilo otporno na trifloksistrobin (Kosanović et al., 2015). Što se tiče suzbijanja prouzrokovača suve truleži šampinjona, usled intenzivne upotrebe fungicida karbendazima pojavili su se rezistentni izolati *L. fungicola* (Bollen and Van Zaayen, 1975; Bonnen and Hopkins, 1997; Potočnik et al., 2008), a zabeležena je i visoka otpornost patogena na tiabendazol i benomil (Grogan and Gaze, 2000). Potočnik et al. (2008) ustanovili su otpornost izolata *L. fungicola* iz Srbije na benomil, umerenu osetljivost na iprodion i osetljivost na prohloraz-Mn. S druge strane, u Španiji su izolati *L. fungicola* pokazali otpornost na iprodion (Gea et al., 1996), dok se u Velikoj Britaniji i Španiji 70% izolata odlikovalo smanjenom osetljivošću na prohloraz-Mn (Grogan et al., 2000; Gea et al., 2003; Gea et al., 2005).

Zbog neizbežnog razvoja rezistentnosti patogena na sintetičke fungicide, kao i zabrinutosti zbog mogućih štetnih efekata ovih supstanci na životnu sredinu i zdravlje ljudi, javila se potreba za drugim načinima zaštite šampinjona, sigurnim i ekološki prihvatljivim, kakvo je biološko suzbijanje patogena.

1.4. Biološko suzbijanje patogena u proizvodnji šampinjona

1.4.1. Biološko suzbijanje i biopesticidi

Biološko suzbijanje (biološka kontrola) je termin koji se prvi put našao u upotrebi u oblasti entomologije i fitopatologije, kao opis prirodnog načina zaštite biljaka od štetočina zasnovan na antagonističkom odnosu između organizama. U užem smislu, biološko suzbijanje može se definisati kao primena živih organizama ili njihovih produkata za supresiju biljnih patogena i sprečavanje razvoja infekcije i bolesti biljaka i

jestivih gljiva (Pal and McSpadden Gardener, 2006). Organizmi sa potencijalom za biološko suzbijanje označavaju se kao biološki kontrolni agensi (BKA) (Pal and McSpadden Gardener, 2006), a komercijalno dostupni preparati zasnovani na njima nazivaju se biopesticidi (Kiewnick, 2007; Chandler et al., 2011; Glare et al., 2012).

Prema glavnom aktivnom sastojku, mogu se razlikovati mikrobijalni (bazirani na gljivama, bakterijama, virusima i protozoama), biohemijski (bazirani na sekundarnim metabolitima živih organizama, npr. biljnim etarskim uljima) i poluhemijski biopesticidi (bazirani na signalnim molekulima prirodnog porekla koji vrše modifikaciju fizioloških odgovora ciljanih organizama) (Chandler et al., 2011). Nekada se u grupu biopesticida svrstavaju i genetički modifikovane biljke (npr. otporne na bolesti) mada je njihova upotreba loše prihvaćena od strane javnosti, i ne spada u okvire biološkog suzbijanja u najužem smislu. Preparati bazirani na mikroorganizmima sa ciljem zaštite useva od patogena i štetočina zastupljeni su sa 30% na tržištu biopesticida, a među njima su najbrojniji bakterijski biopesticidi (Fravel, 2005; Thakore, 2006).

Kada se govori o uticaju na životnu sredinu i bezbednosti, primena biopesticida ima značajne prednosti u odnosu na tradicionalnu primenu sintetičkih pesticida. Biopesticidi su aktivni u niskim koncentracijama, lako se razlažu i ne dovode do kontaminacije životne sredine. Pored toga, usmereno deluju na ciljane grupe organizama i nisu toksični za drugi živi svet. Njihova primena sporije dovodi do razvoja rezistentnosti patogena jer ispoljavaju aktivnost kroz raznovrsne mehanizme delovanja koji se suštinski razlikuju od načina delovanja hemijskih pesticida (Cawoy et al., 2011). Primena biopesticida omogućava smanjenje populacije patogena na nivo koji neće imati značajni negativni efekat na domaćina, što sa ekološke strane gledišta predstavlja značajnu prednost u odnosu na hemijske pesticide koji dovode do iskorenjivanja patogena iz ekosistema.

1.4.2. Vrste roda *Bacillus* u biološkom suzbijanju

Rod *Bacillus* je fenotipski i genotipski raznovrsna i brojna grupa bakterija sa širokim rasprostranjenjem i zajedničkim svojstvom sposobnosti formiranja endospora otpornih na nepovoljne uslove u životnoj sredini. Vrste ovog roda izolovane su iz raznih sredina, uključujući i ekstremne kao što su hidrotermalni izvori (Takami et al., 2004) i

geotermalna zemljišta Antarktika (Nicolaus et al., 2000), ali najčešće nastanjuju zemljište gde su najzastupljenije u zoni rizosfere. Predstavnici roda poznati su kao dobri kompetitori zahvaljujući mogućnosti sinteze mnogobrojnih hidrolitičkih enzima, antimikrobnih supstanci, siderofora i formiranja biofilmova, zbog čega imaju biotehnološki značaj u medicinskoj, farmaceutskoj, poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji (Schallmey et al., 2004; Pérez-García et al., 2011; Contesini et al., 2018). U poljoprivredi se vrste roda *Bacillus* primenjuju radi podsticanja rasta biljaka, obogaćivanjem rizosfere hranljivim materijama (Borriss, 2011) ili sintezom molekula sličnih biljnim hormonima (Francis et al., 2010). Pored toga, vrste ovog roda uspešno se koriste kao sredstva za biološko suzbijanje biljnih bolesti i zaštitu poljoprivredno značajnih povrtarskih i voćarskih kultura. Danas je na tržištu prisutan veliki broj komercijalnih preparata na bazi *Bacillus* spp. sojeva sa namenom suzbijanja biljnih patogena i štetočina (Cawoy et al., 2011). Skoro 90% tržišta biopestidica čine preparati na bazi sojeva *Bacillus thuringiensis* sa insekticidnim dejstvom dok ostatak čine preparati bazirani na vrstama *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis* i *Bacillus pumilus* (Cawoy et al., 2011; Kumar and Singh, 2015). Pored izraženog antagonističkog dejstva i kompetitivnosti, vrste roda *Bacillus* poseduju i neke karakteristike koje pogoduju njihovoj industrijskoj proizvodnji, što je razlog velike zastupljenosti komercijalnih *Bacillus* spp. sojeva na tržištu. To su dobro proučeni mikroorganizmi koji imaju sposobnost formiranja rezistentnih endospora što omogućava preživljavanje nepovoljnih uslova sredine i perzistentnost u zemljištu, što ide u prilog njihovoj efikasnosti. Ovaj fenomen takođe može da se iskoristi u industrijskoj proizvodnji jer se sporulacija može indukovati na kraju kultivacije bakterija (Monteiro et al., 2005) i bakterijske suspenzije se mogu pretvoriti u praškaste formulacije kojima se lako rukuje, bez dolaska do značajne smrti bakterija (Lolloo et al., 2010).

Vrste roda *Bacillus* doprinose suzbijanju patogena putem različitih mehanizama delovanja, pri čemu oni nisu međusobno isključivi ni jasno razgraničeni.

Antibioza je najčešće izučavan mehanizam biološkog suzbijanja patogena zasnovan na sintezi sekundarnih metabolita male molekulske mase koji mogu inhibirati rast ili dovesti do smrti kompetitivnih mikroorganizama. Pripadnici roda *Bacillus* imaju sposobnost sinteze velikog broja raznovrsnih antimikrobnih jedinjenja (Stein, 2005). Kao ilustracija njihovog antimikrobnog potencijala može poslužiti činjenica da je čak 10%

genoma (13 genskih klastera) biokontrolnog soja *B. velezensis* FZB42 podređeno sintezi antimikrobnih jedinjenja (Fan et al., 2018). Nedavno je sekvenciran i čitav genom komercijalno korišćenog biokontrolnog soja *B. velezensis* QST 713, u kom je identifikovano 15 biosintetskih klastera što ukazuje na to da je 12% genoma ovog soja uključeno u biosintezu, regulaciju biosinteze i transport antimikrobnih supstanci (Pandin et al., 2018b). Veliki broj i raznovrsnost antimikrobnih supstanci omogućavaju vrstama roda *Bacillus* efikasan odgovor na aktivnost mikroorganizama i brzu adaptaciju na promene u životnoj sredini, što im pruža kompetitivnu prednost u odnosu na druge članove mikrobijalne zajednice.

Neribozomalno sintetisani lipopeptidi su naročito zanimljiva grupa sekundarnih metabolita, čija su biosinteza i funkcije intenzivno proučavane kod vrsta roda *Bacillus* (Ongena et al., 2007; Berić et al., 2012; Dimkić et al., 2013; Zerouh et al., 2014; Cawoy et al., 2015; Mora et al., 2015; Dimkić et al., 2017; Fira et al., 2018). Ova grupa strukturno heterogenih jedinjenja ima bitnu ulogu u biološkom suzbijanju fitopatogena i mikopatogena. Četiri glavne familije lipopeptidnih jedinjenja čine surfaktini, iturini, fengicini i kurstakini (Hathout et al., 2000; Ongena and Jacques, 2007). U mnogim istraživanjima dokazano je njihovo antifungalno, antibakterijsko i antivirusno dejstvo (Raaijmakers et al., 2010). Surfaktini *B. subtilis* sojeva imaju izraženo inhibitorno dejstvo na rast bakterijskih fitopatogena *Xanthomonas campestris* (Etcheagaray et al., 2008) i *Pseudomonas syringae* (Bais et al., 2004), dok se fengicini i iturini odlikuju jakim fungitoksičnim efektom prema patogenima *Fusarium graminearum* (Wang et al., 2007) i *Colletotrichum dematium* (Hiradate et al., 2002), redom. Neretko jedan soj može proizvoditi više lipopeptidnih jedinjenja (Kim et al., 2010; Dunlap et al., 2011; Berić et al., 2012; Dimkić et al., 2013; Dimkić et al., 2017), što je poželjna karakteristika potencijalnih agenasa za biološko suzbijanje jer omogućava dejstvo prema različitim patogenima i temeljnu zaštitu. Pokazana je i mogućnost sinergističkog delovanja dva lipopeptida kao u slučaju soja *B. subtilis* 916 gde bacilomicin L i surfaktin zajednički dovode do suzbijanja patogene gljive *Rhizoctonia solanii* (Luo et al., 2015). Osim u direktnom antagonizmu, lipopeptidi imaju ulogu i u indukciji sistemske otpornosti biljaka (Ongena et al., 2007; Chandler et al., 2015; Debois et al., 2015) i formiranju biofilmova (Xu et al., 2013) koji indirektno štite biljke od patogena, pri čemu jedna grupa jedinjenja može doprineti biološkom suzbijanju bolesti na više od jednog načina (Ongena and

Jacques, 2007; Raaijmakers et al., 2010). Na primer, pokazano je da su surfaktini *B. subtilis* soja, inače poznatih po jakom antibakterijskom dejstvu, neophodni za formiranje biofilmova koji omogućavaju kolonizaciju biljnog korena i predstavljaju fizičku barijeru za infekciju fitopatogenima (Zerrouh et al., 2014).

Pored antibiotika, vrste roda *Bacillus* imaju sposobnost produkcije antifungalnih isparljivih organskih supstanci koje doprinose biološkom suzbijanju biljnih patogena (Yuan et al., 2012; Zhang et al., 2013; Lim et al., 2017). Takođe, poznato svojstvo pripadnika ovog roda je sinteza i izlučivanje enzima hitinaza i β -1,3-glukanaza koji vrše razgradnju glavnih komponenti ćelijskih zidova patogenih gljiva (Li et al., 2008; Manjula and Podile, 2005; Bhattacharya et al., 2016).

Kompeticija za ograničene resurse kao što su prostor i nutrijenti predstavlja prirodan fenomen koji može imati i indirektnu ulogu u suzbijanju fitopatogena. Kompeticija za nutrijente nastaje kada biološki kontrolni agens efikasnijim unošenjem i iskorišćavanjem nutrijenata smanji njihovu dostupnost u životnoj sredini i indirektno ograniči rast patogena. Pored kompeticije za ugljenik (Alabouvette et al., 2006) u zemljištu je česta kompeticija za esencijalne i retke mikronutrijente kao što su gvožđe, bakar, cink i mangan (Pal and McSpadden Gardener, 2006). Gvožđe je glavni ograničavajući faktor koji se u zemljištu nalazi u za mnoge organizme većinom neiskoristivom feri obliku (Fe^{3+}) (Hider and Kong, 2010). Vrste roda *Bacillus* imaju sposobnost sinteze siderofora, na primer bacilibaktina (Arguelles-Arias et al., 2009; Patil et al., 2014; Chen et al., 2018) koje sa visokim afinitetom vezuju gvožđe, čak i kada je ono prisutno u niskim koncentracijama, što im pruža kompetitivnu prednost u odnosu na druge mikroorganizme (Liu et al., 2017; Ferreira et al., 2019). Kompeticija za prostor predstavlja još jedan mehanizam biološkog suzbijanja fitopatogena i mikopatogena. Biološki kontrolni agensi koji imaju sposobnost formiranja biofilmova i brze kolonizacije biljnih korenova fizički sprečavaju kontakt patogena i domaćina čime omogućavaju zaštitu od infekcije (Lo, 1998). Pokazano je da *B. subtilis* soj ima sposobnost stvaranja biofilma čime sprečava infekciju *Arabidopsis thaliana* patogenom *P. syringae* (Bais et al., 2004), dok drugi soj istim mehanizmom doprinosi suzbijanju bakterijskog uvenuća paradajza prouzrokovanog bakterijom *Ralstonia solanacearum* (Chen et al., 2013). Formiranje biofilmova *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens* sojeva ima ulogu i u zaštiti biljaka od fungalnih patogena kao što su *Rhizoctonia solani* (Mousivand et al., 2012) i

Botrytis cinerea (Salvatierra-Martinez et al., 2018). Što se tiče efikasnosti ovog mehanizma za suzbijanje patogena šampinjona, skoro je pokazano da komercijalni biofungicid *B. velezensis* FZB42 u kontaktu sa micelijom *A. bisporus* formira biofilm (Pandini et al., 2017). Kod soja *B. velezensis* QST 713, koji se koristi kao biofungicid za efikasno suzbijanje zelene plesni šampinjona, otkriven je genetski potencijal za formiranje biofilмова, kasnije potvrđen eksperimentima *in vitro* (Pandini et al., 2018b).

Prisustvo korisnih mikroorganizama u rizosferi i njihovi produkti mogu izazvati stanje povećane otpornosti biljke na infekcije patogenima pre nego što se dogode (Choudhary et al., 2007; Cawoy et al., 2011). Sojevi vrsta *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Bacillus pasteurii*, *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *Bacillus mycoides* i *Bacillus sphaericus* pokazali su sposobnost zaštite mnogobrojnih biljnih vrsta mehanizmom indukcije sistemske otpornosti (Kloepper et al., 2004). Pokazano je da prečišćeni lipopeptidi surfaktin i fengicin koje proizvodi soj *B. subtilis* mogu aktivirati odbrambene mehanizme pasulja i paradajza protiv fungalnog patogena *B. cinerea* (Ongena et al., 2007), a identifikovane su i isparljive organske supstance sa tom funkcijom (Ryu et al., 2004). Kod makromiceta kao što je *A. bisporus* još uvek nije ustanovljeno postojanje mehanizma sličnih indukciji sistemske otpornosti biljaka. Jedini pokušaj ispitivanja indukcije otpornosti šampinjona uticajem nepatogenih izolata roda *Pseudomonas* nije pokazao pozitivne rezultate (Berendsen et al., 2013b).

1.4.3. Biološko suzbijanje zelene plesni i suve truleži šampinjona

Suzbijanje fungalnih patogena šampinjona je u poređenju sa suzbijanjem biljnih patogena još uvek slabo istražena oblast istraživanja, a primeri uspešnih istraživanja su malobrojni. Savoie et al. (2001) su ustanovili antagonističku aktivnost dva bakterijska soja iz komposta prema izolatima *T. aggressivum* iz gajilišta u Francuskoj. Jedan neidentifikovan soj BI III iz pokrivke za gajenje šampinjona efikasno je inhibirao rast *T. harzianum* u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Bhatt and Singh, 2002), a dva *Bacillus* spp. soja su efikasno suzbila rast *T. aggressivum* f. *europaeum* i *T. aggressivum* f. *aggressivum* *in vivo* uz povećanje prinosa šampinjona (Györfi and Geösel, 2008). Biofungicid na bazi soja *B. velezensis* QST 713 (SerenadeMax[®], Bayer CropScience) je pre 11 godina zvanično registrovan za upotrebu u proizvodnji šampinjona u Francuskoj, pokazavši

dobru efikasnost za suzbijanje patogena nakon tretmana „semena“ *A. bisporus* (Védie and Rousseau, 2008). Primenom ovog biofungicida na pokrivku efikasno su suzbijeni i izolati *T. harzianum* i *T. aggressivum* iz srpskih gajilišta (Kosanović et al., 2013; Milijašević-Marčić et al., 2017), a jedan novoizolovani *B. subtilis* soj je značajno smanjio učestalost zelene plesni u eksperimentalnom gajilištu (Milijašević-Marčić et al., 2017).

Pokušaji efikasnog biološkog suzbijanja prouzrokovala suve truleži šampinjona sve do danas bili su neuspešni. Još 1976. godine ispitivana je mogućnost suzbijanja *L. fungicola* prskanjem pokrivke sporama gljive *Trichoderma viride* (De Trogoff and Ricard, 1976). Bhatt and Singh (2000) su testirali uticaj neidentifikovanih bakterijskih izolata na suzbijanje *L. fungicola* i prinos šampinjona, pri čemu je pet izolata pokazalo inhibitorni efekat na rast i klijanje spora *L. fungicola in vitro* (Bhat et al., 2010). Ispitivana je i efikasnost *Pseudomonas* sp. izolata dobijenih iz pokrivke kolonizovane hifama *A. bisporus* u suzbijanju prouzrokovala suve truleži, ali nije zabeleženo zadovoljavajuće antagonističko dejstvo u *in vivo* uslovima (Berendsen et al., 2012).

1.5. Ograničenja i izgledi biološkog suzbijanja patogena

Biološko suzbijanje kao zvanična akademska oblast razvila se još sedamdesetih godina XX veka (Pal and McSpadden Gardener, 2006). Do danas je objavljen veliki broj naučnih radova sa ciljem pronalaska novih agenasa za biološko suzbijanje bolesti značajnih poljoprivrednih useva, kako bi se smanjila, ako ne i potpuno eliminisala upotreba štetnih hemijskih sredstava. Manje od 1% potencijalnih kandidata za biološko suzbijanje je uspešno komercijalizovano. Glavni razlog za to je nepredvidiva efikasnost agenasa za biološko suzbijanje patogena i bolesti. Kandidati koji su pokazali izuzetan *in vitro* potencijal za suzbijanje patogena često ne postižu zadovoljavajući nivo efikasnosti u *in vivo* uslovima jer njihova aktivnost zavisi od interakcije sa abiotičkim i biotičkim faktorima sredine. Pored toga, neekonomična masovna proizvodnja, ograničen rok trajanja i zahtevan i dugotrajan proces registracije preparata doprinose maloj zastupljenosti biopesticida na svetskom tržištu. Još jedna mana biopesticida jeste dosta sporije ispoljavanje dejstva u odnosu na hemijske pesticide što umanjuje njihov doprinos u biološkom suzbijanju iznenadnih, široko rasprostranjenih i razornih bolesti, kada je

neophodno brzo delovanje (Leng et al., 2011). U ovakvim situacijama, moguće rešenje bi bilo kombinovanje hemijskih i bioloških metoda suzbijanja, gde bi sintetički pesticid oslabio populaciju patogena i učinio je osetljivijom na dejstvo biopesticida. Dodatno, mnogi biokontrolni agensi imaju ciljano dejstvo prema određenom patogenu, što sa stanovišta komercijalizacije predstavlja veliki nedostatak, jer je time ograničena veličina potencijalnog tržišta. Kombinovanje različitih sojeva, predloženo kao rešenje ovog problema, može dovesti do još manje predvidivosti efikasnosti takvog preparata, ali bi zato upotreba jednog soja sa različitim mehanizmima delovanja obezbedila zaštitu useva od većeg broja patogena.

Kako bi se obezbedio što veći uspeh u oblasti biološkog suzbijanja i komercijalizacije novih biopesticida neophodno je iscrpno planiranje i izvođenje istraživanja. Prvi korak je ispitivanje potreba tržišta za određenim preparatom što podrazumeva identifikaciju ciljanog useva čija je proizvodnja ugrožena, bilo usled pojave novih patogena za koje ne postoje poznate metode suzbijanja, bilo usled smanjenja efikasnosti postojećih metoda suzbijanja. Izolovanje novih sojeva treba vršiti iz adekvatne sredine, uzimajući u obzir ekologiju patogena, epidemiologiju bolesti i karakteristike sredine u kojoj će se potencijalni agens za biološko suzbijanje primenjivati. Na primer, u slučaju zemljišnih patogena, i potencijalne antagonističke sojeve treba prikupiti iz iste sredine kako bi se obezbedila njihova optimalna efikasnost. Ispitivanje potencijala novih sojeva za biološko suzbijanje patogena je ključni korak u istraživanju koji se najčešće zasniva na *in vitro* eksperimentima. U ovoj fazi, uz ispitivanje antagonističkog potencijala poželjno je testirati i mogućnost masovne produkcije bakterijskih sojeva, kao i otpornosti kandidata na nepovoljne i varirajuće uslove sredine što bi dalo uvid u stabilnost potencijalnog komercijalnog preparata. Na ovaj način bi se u jednom koraku mogli eliminisati svi kandidati koji ne ispunjavaju minimalne zahteve za komercijalizaciju. Sledeći korak u istraživanju bila bi precizna identifikacija biokontrolnih agenasa koja omogućava isključivanje svih vrsta potencijalno štetnih po zdravlje ljudi i životnu sredinu, što se može postići sekvenciranjem i analizom genoma odabranih kandidata. Pored procene rizika, analiza genoma može pružiti i korisne informacije o mehanizmima delovanja antagonističkih sojeva i interakciji sa patogenima na osnovu kojih se mogu proceniti najbolje vreme i način primene, radi postizanja optimalne zaštite. Kao krajnja potvrda efikasnosti odabranih agenasa za biološko

suzbijanje patogena izvode se *in vivo* eksperimenti u skladu sa načinom i uslovima proizvodnje useva od interesa. U slučaju useva koji se gaje na otvorenom polju, neophodno je ispitati *in vivo* efikasnost potencijalnih biokontrolnih agenasa u različitim sezonama i pri varirajućim vremenskim uslovima, dok u slučaju kontrolisane proizvodnje šampinjona testiranje efikasnosti treba izvoditi u uslovima što sličnijim komercijalnom uzgoju (Köhl et al., 2011).

Biološko suzbijanje patogena ima bitnu ulogu u integralnoj kontroli štetočina i organskoj poljoprivredi (Cawoy et al., 2011). Integralna zaštita podrazumeva kombinaciju različitih metoda za suzbijanje bolesti useva, uključujući i hemijske metode, sa ciljem postizanja najefikasnije zaštite uz najmanji rizik po živi svet. Zahvaljujući ovom programu, a uprkos brojnim ograničenjima biološkog suzbijanja patogena i bolesti, poslednjih godina je proizvodnja hemijskih pesticida opala za 2% dok proizvodnja i upotreba biopesticida pokazuju stabilnu stopu porasta (Thakore, 2006; Leng et al., 2011). Ovi podaci su ohrabljajući i u budućnosti se može očekivati još intenzivnija primena bioloških mera zaštite značajnih poljoprivrednih useva, kao i veći broj istraživanja sa ciljem pronalaska novih agenasa za biološko suzbijanje patogena šampinjona.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

S obzirom na postojeći problem fungalnih bolesti koje izazivaju velike gubitke u prinosu šampinjona, i potrebe za pronalaskom bezbednijih načina zaštite koji bi zamenili upotrebu štetnih sintetičkih fungicida u proizvodnji šampinjona, ciljevi ovog istraživanja bili su:

- Izolacija vrsta roda *Bacillus* iz supstrata za gajenje šampinjona.
- *In vitro* ispitivanje antagonističkog potencijala *Bacillus* spp. izolata prema prouzročivačima zelene plesni i suve truleži šampinjona.
- Identifikacija antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva molekularnim metodama.
- Ispitivanje mehanizama odgovornih za antagonističko delovanje *Bacillus* spp. sojeva prema prouzročivačima zelene plesni i suve truleži šampinjona.
- Ispitivanje potencijala odabranih *Bacillus* spp. sojeva za suzbijanje prouzročivača zelene plesni i suve truleži šampinjona (*Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* i *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola*) u oglednom gajilištu *in vivo*.

3. MATERIJAL I METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Bakterijski sojevi

U istraživanju je korišćeno 284 izolata roda *Bacillus* izolovanih 2015-2016. godine iz supstrata za gajenje šampinjona (**Prilog 1**). Svi izolati su korišćeni u preliminarnom skriningu njihovog antagonističkog dejstva prema fungalnim patogenima šampinjona, a 33 antagonističkih *Bacillus* spp. izolata je odabrano za detaljnija ispitivanja potencijala za biokontrolu fungalnih patogena šampinjona (**Tabela 4**).

3.1.2. Izolati gljiva

Izolati patogenih gljiva prikupljeni su u periodu 2006–2010. godine i pripadaju kolekciji Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu (**Tabela 1**). *Trichoderma* spp. izolati su identifikovani morfološki i na osnovu ITS1 sekvence (Kosanović et al., 2013) dok je izolat *L. fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆ identifikovan na osnovu morfologije kolonija, rasta na 27 °C i patogenosti.

Tabela 1. Izolati fungalnih patogena šampinjona korišćeni u ispitivanju osetljivosti na dejstvo antagonističkih bakterija *in vitro* i *in vivo*.

Izolat	Uslovi gajenja	Izvor
<i>Trichoderma harzianum</i> T54	KDA, 25 °C	Plodonosno telo, Kula, 2008
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T77	KDA, 25 °C	Kompost, Lisovići (Barajevo), 2010
<i>Trichoderma koningii</i> T39	KDA, 25 °C	Plodonosno telo, Veliko Gradište, 2007
<i>Trichoderma atroviride</i> T33	KDA, 25 °C	Plodonosno telo, Zemun Polje, 2006
<i>Lecanicillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i> Ša ₂ V ₆	KDA, 20 °C	Plodonosno telo, Šabac, 2006

3.1.3. Materijal za izolaciju bakterija

Materijal za izolaciju bakterija, kompostni materijal (slama i pileći stajnjak) i kompost u različitim fazama kompostiranja nabavljeni su iz kompostare “Uča & Co.” d.o.o. (Vranovo kod Smedereva, Srbija) a pokrivka je spravljena od crnog treseta “Terahum” (“Treset” d.o.o., Veliko Gradište, Srbija).

3.1.4. Medijumi za gajenje bakterija i gljiva

Hranljivi bujon

Pepton	15 g
Mesni ekstrakt	3 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
dH ₂ O	1000 ml

Hranljivi agar

Pepton	15 g
Mesni ekstrakt	3 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 ml

Luria-Bertani bujon

Trypton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
dH ₂ O	1000 ml

Luria-Bertani agar

Tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 ml

Krompir dekstrozni agar

Krompir	200 g
Dekstroza	20 g
Agar	17 g
dH ₂ O	1000 ml

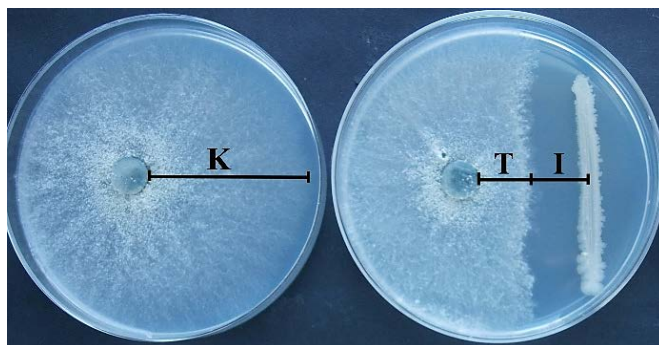
3.2. Metode

3.2.1. Izolacija *Bacillus* spp.

Vrste roda *Bacillus* izolovane su iz supstrata za gajenje šampinjona. Po 5 g svakog uzorka supstrata je mućkano u 100 ml sterilne dH₂O na horizontalnom šejkeru 10 min na 180 rpm. Nakon termalne inaktivacije na 80 °C u trajanju od 10 min serijska decimalna razređenja uzoraka su zasejavana na hranljivi agar utrljavanjem. Nakon inkubacije na 30 °C tokom 48 h, morfološki različite kolonije su presejavane do čistih kultura. Sojevi su čuvani u LB (Luria-Bertani) bujonu sa 30% glicerolom na -20 °C u kolekciji Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine.

3.2.2. Ispitivanja antagonističkog dejstva *Bacillus* spp. izolata prema fungalnim patogenima šampinjona *in vitro*

Antifungalno dejstvo *Bacillus* spp. sojeva prema patogenima šampinjona (**Tabela 1**) ispitivano je metodom dvojne kultivacije *in vitro*, u tri ponavljanja (Fokkema, 1978). Izolati patogenih gljiva i bakterijski sojevi su istovremeno zasejavani na krompir dekstrozni agar (KDA), gljive u vidu diska sa micelijom a bakterije u vidu linije. Nakon inkubacije od 72 h na 25 °C u slučaju *Trichoderma* spp., odnosno sedam dana na 20 °C za *L. fungicola* var. *fungicola*, merene su zone inhibicije rasta micelije patogenih gljiva (I), porast gljive u tretmanu (T) i kontroli (K) (izolati gljiva bez bakterijskog soja) (**Slika 6**). Na osnovu dobijenih vrednosti izračunati su procenti inhibicije rasta (PGI – *percentage of growth inhibition*) micelije patogenih gljiva prema formuli $PGI = (K - T) / K \times 100$ (Korsten and De Jager, 1995).

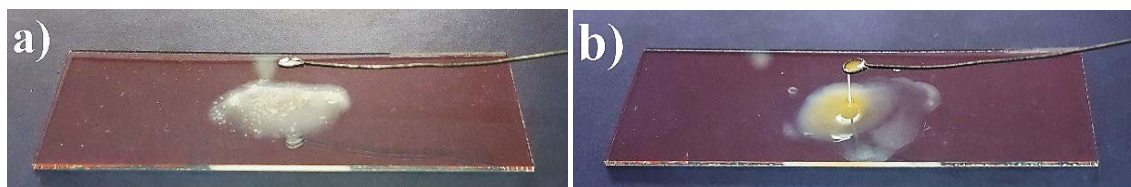


Slika 6. Dvojna kultura: K – porast gljive u kontroli, T – porast gljive u tretmanu, I – zona inhibicije rasta gljive (foto O. Stanojević).

3.2.3. Identifikacija antagonističkih *Bacillus* spp. izolata

Preliminarni testovi za identifikaciju izolata do nivoa roda obuhvatili su razlikovanje bakterija po Gramu i test sposobnosti stvaranja enzima katalaze. Karakterisanje izolata kao gram-pozitivnih ili gram-negativnih vršeno je metodom bez bojenja, resuspendovanjem kolonije stare 24 h i njenom homogenizacijom u kapi 3% (w/v) KOH na mikroskopskoj pločici. Pojava viskoznog „končića“ prilikom izdizanja eze nastaje usled razgradnje ćelijskog zida siromašnog peptidoglikanima, što ukazuje na

gram-negativne bakterije (Suslow et al, 1982) (**Slika 7**). Kao gram-pozitivna kontrola korišćen je soj *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a kao gram-negativna kontrola soj *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NCPPB 528.



Slika 7. Razlikovanje bakterija po Gramu putem KOH testa (foto O. Stanojević). a) odustvo „končica“ kod gram-pozitivne kontrole *Bacillus subtilis* ATCC 6633, b) prisustvo „končica“ kod gram-negativne kontrole *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NCPPB 528.

Sposobnost ispitivanih izolata da stvaraju katalazu proučena je homogenizacijom kolonije bakterije u kapi 3% vodonik peroksida. Pojava mehurića gasa ukazuje na prisustvo katalaze koja razgrađuje vodonik peroksid na kiseonik i vodu (Lelliott and Stead, 1987) (**Slika 8**).



Slika 8. Pozitivan katalaza test: oslobađanje O₂ nakon resuspendovanja kolonije *Bacillus subtilis* ATCC 6633 u kapi 3% vodonik peroksida (foto O. Stanojević).

Identifikacija 33 antagonistička *Bacillus* spp. izolata izvršena je na osnovu hipervarijabilnog regiona gena za 16S rRNK i gena za elongacioni faktor Tu (*tuf* gen).

Bakterijske kulture 22 *Bacillus* spp. izolata su gajene preko noći u hranljivom bujonu na 30 °C i 180 rpm. Nakon 5 min centrifugiranja na 13000 rpm ćelije su resuspendovane u 500 µl TE pufera (10mM TRIS; 1mM EDTA; pH 7,6) sa lizozimom (200 µg/ml) i inkubirane 30 min na 37 °C. U uzorke je dodato 100 µl 5M NaCl i 300 µl 3% CTAB + PVP pufera (CTAB; 1M TRIS; 1.4M NaCl; 20mM EDTA; pH 8,0), nakon čega su inkubirani 20 minuta na 65°C. Dodato je 900 µl hloroforma i uzorci su centrifugirani na 13000 rpm (10 min). Supernatant je prebačen u nove mikrotube i dodato je 1/10 zapremine 3M Na-acetata pH 5 i do 1,5 ml ledeno-hladnog izopropanola. Nakon centrifugiranja 15 minuta na 13000 rpm precipitirana DNK je isprana 96% ledeno-hladnim etanolom. Uzorci su centrifugirani pod istim uslovima i tečna faza je odlivena. Dodatno prečišćavanje izolovane DNK postignuto je dodavanjem 200 µl destilovane vode i 100 µl fenola i centrifugiranjem 10 minuta na 13000 rpm. U supernatant prebačen u nove mikrotube dodato je 1/10 zapremine 3M Na-acetata i 2,5 puta veća zapremina hladnog 96% etanola. Nakon inkubiranja uzoraka 10 minuta na sobnoj temperaturi, centrifugiranja na 13000 rpm (20 minuta) i odlivanja supernatanta, dodat je 1 ml hladnog 70% etanola, nakon čega je usledilo ponovno centrifugiranje u trajanju od 5 minuta na 13000 rpm. Talog je osušen na 37°C 10 minuta i rastvoren u 50 µl TE pufera sa dodatkom RNaze (200 µg/ml).

Ekstrakcija DNK 11 *Bacillus* spp. sojeva izvršena je putem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany), uz modifikacije protokola proizvođača.

Za umnožavanje hipervarijabilnog regiona gena za 16S rRNK dužine 320 bp korišćeni su prajmeri 16S-HV-F i 16S-HV-R (Goto et al., 2000) (**Tabela 2**). Reakciona smeša sastojala se od 9,5 µl vode, 12,5 µl 1×PCR Master mix (Fermentas, Litvanija) (0,625 U Taq polymerase, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM svakog dNTP), 1 µl svakog prajmera (10 µM) i 1 µl uzorka DNK. Umnožavanje fragmenta DNK je rađena po sledećem PCR (*Polymerase Chain Reaction*) programu: inicijalna denaturacija na 94°C (5 minuta), 30 ciklusa denaturacije na 94°C (30 sekundi), hibridizacije prajmera na 50°C (30 sekundi) i polimerizacije na 72°C (90 sekundi), i konačni ciklus polimerizacije na 72°C (7 minuta).

Umnožavanje *tuf* gena veličine 791 bp je postignuta upotrebom tufGPF i tufGPR prajmera (Caamaño-Antelo et al., 2015) (**Tabela 2**). Reakciona smeša je sadržala 13,9 μ l vode, 2,5 μ l 10 \times KAPA Taq pufera, 2 μ l MgCl₂ (25 mM), 0,5 μ l dNTP miksa (10 mM), 0,1 μ l KAPA Taq DNK polimeraze (5U/ μ l), 2,5 μ l svakog prajmera (10 μ M) i 1 μ l uzorka DNK. Prema PCR programu, početna denaturacija izvršena na 95 °C (8 min) praćena je sa 35 ciklusa denaturacije na 95 °C (30 sekundi), hibridizacije prajmera na 55 °C (1 min) i polimerizacije na 72 °C (30 sekundi), nakon čega je usledila konačna polimerizacija na 72 °C u trajanju od 10 minuta (Chavagnat et al., 2002).

Veličina DNK fragmenata određena je razdvajanjem putem horizontalne elektroforeze trajanja 1 h 30 min pri konstantnom naponu of 3 V/cm. Uzorci su nanošeni na 1% agarozni gel napravljen otapanjem agaroze u 0,5 \times TBE puferu (45 mM Tris, 45 mM borna kiselina, 1 mM EDTA pH 8,3) uz dodatak etidijum-bromida (0,4 μ g/ml). Isti pufer korišćen je i kao pufer za elektroforezu. Umnoženi fragmenti DNK su posmatrani na UV transiluminatoru (LKB Bromma, Švedska). Veličina DNK fragmenata određena je poređenjem njihove pozicije sa markerima koji sadrže fragmente poznate veličine. Korišćeni su markeri od 100 bp (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific SAD, Nippon Genetics, Evropa) i 1 kb (Nippon Genetics, Evropa).

Produkti PCR reakcija su poslani u Macrogen Inc. (Holandija) radi sekvenciranja. Identifikacija antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva vršena je poređenjem dobijenih sekvenci sa onim deponovanim u NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank bazi podataka korišćenjem nBLAST alata. Sekvence neidentifikovanih i referentnih sojeva su podvrgnute CLUSTAL W poravnanju i ručnoj obradi putem BioEdit 3.03 softvera. „Neighbor-joining“ filogenetska stabla su konstruisana u MEGA 6.06 programu. Pristupni brojevi sekvenci hipervarijabilnog regiona gena za 16S rRNK deponovanih u NCBI bazi podataka navedeni su u **Tabeli 4**.

Tabela 2. Nazivi i sekvence prajmera korišćenih u PCR reakcijama.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5' – 3')
16S-HV-F	TGTA AACGACGGCCAGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG
16S-HV-R	CAGGAAACAGCTATGACCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
tufGPF	ACGTTGACTGCCCAGGACAC
tufGPR	GATACCAGTTACGTCAGTTGTACGGA
P17	ATGAAGATTTACGGAATTTA
P18	TTATAAAAGCTCTTCGTACG
ITUP1-F	AGCTTAGGGAACAATTGTCATCGGGGCTTC
ITUP1-R	TCAGATAGGCCGCCATATCGGAATGATTCG
BACC1-F	GAAGGACACGGCAGAGAGTC
BACC1-R	CGCTGATGACTGTTTCATGCT
FEND1-F	TTTGGCAGCAGGAGAAGTT
FEND1-R	GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC
AKS-F	TCHACWGGRAATCCAAAGGG
TKS-R	CCACCDKTCAA AKAARKWATC

3.2.4. Ispitivanje mehanizama antagonističkog delovanja *Bacillus* spp. sojeva

3.2.4.1. Molekularna detekcija gena za lipopeptide

Umnožavanje gena koji učestvuju u sintezi surfaktina, iturina, fengicina i kurstakina izvršeno je kod 33 antagonistička *Bacillus* spp. soja. Sekvence prajmera korišćenih za umnožavanje tokom PCR reakcije prikazane su u **Tabeli 2**.

Umnožavanje *sfp* gena za surfaktin sintetazu (675 bp) je vršeno u reakcionoj smeši sa 17,15 µl vode, 2,5 µl 10×KAPA Taq pufera, 1,75 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl dNTP smeše (10 mM), 0,1 µl KAPA Taq DNK polimeraze (5U/µl), po 1 µl prajmera P17 i P18 (10 µM) i 1 µl DNK (Hsieh et al., 2004). Program za PCR je bio sledeći: početna denaturacija na 94 °C, 2 min; 10 ciklusa denaturacije na 94 °C u trajanju od 2 min, hibridizacija na 45 °C (15 sekundi) i polimerizacija na 68 °C tokom 3 min; 25 ciklusa

denaturacije, hibridizacije i polimerizacije pod istim uslovima; konačna polimerizacija na 72 °C (10 min).

Reakciona smeša za umnožavanje *ituA* i *ituB* gena sa intergenskim regionom (2000 bp) je pripremljena kao što je prethodno opisano, sa prajmerima ITUP1-F i ITUP1-R (10 µM) (Tsuge et al., 2005). Amplifikacija je izvršena prema programu: denaturacija na 96 °C (5 min); 30 ciklusa denaturacije na 96 °C (30 sekundi), hibridizacija na 60 °C (30 sekundi), polimerizacija na 72 °C (2 min 30 sekundi); 10 minuta polimerizacije na 72 °C.

Umnožavanje *bamC* gena za bacilomicin D sintetazu (875 bp) je postignuta kroz 3 minuta denaturacije na 94 °C, 35 ciklusa denaturacije (94 °C, 1 min), hibridizacije (60 °C, 30 sekundi) i polimerizacije (72 °C for 1 min 45 sekundi), i finalne polimerizacije na 72 °C u trajanju od 6 min. Reakciona smeša je pripremljena na već opisan način sa prajmerima BACC1-F i BACC1-R (20 µM) (Ramarathnam et al., 2007).

Smeša za amplifikaciju gena za fengicin sintetazu (*fenD*, 964 bp) sastojala se od 16,9 µl vode, 2,5 µl 10×KAPA Taq pufera, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl dNTP smeše (10 mM), 0,1 µl KAPA Taq DNK polimeraze (5U/µl), po 1 µl prajmera FEND1-F i FEND1-R (20 µM) i 1 µl DNK (Ramarathnam et al., 2007). PCR program je bio sledeći: početna denaturacija (94 °C, 3 min); 40 ciklusa denaturacije (94 °C, 1 min), hibridizacije prajmera (60 °C, 1 min) i polimerizacije (72 °C for 1 min); konačna polimerizacija (72 °C, 10 min).

Umnožavanje *krsA*, *krsB* i *krsC* gena kurstakinskog operona (1125, 1152, 1161, 1167, 1173 bp) je postignuto upotrebom prajmera AKS-F i TKS-R (Abderrahmani et al., 2011). PCR reakciona smeša se sastojala od: 15,9 µl of PCR vode, 2,5 µl 10×KAPA Taq pufera, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl dNTP smeše (10 mM), 0,1 µl KAPA Taq DNK polimeraze (5U/µl), 1,5 µl svakog prajmera (20 µM) i 1 µl DNK. Uslovi PCR-a su bili: početna denaturacija (94 °C, 3 min); 30 ciklusa denaturacije (94 °C, 1 min), hibridizacije prajmera (44.4 °C, 40 sekundi) i polimerizacije (72 °C, 2 min); konačna polimerizacija (72 °C, 10 min).

3.2.4.2. Ispitivanje antifungalne aktivnosti supernatanata *in vitro*

Antifungalno dejstvo supernatanata 33 *Bacillus* spp. soja ispitivano je difuzionom metodom u bunarićima protiv *T. aggressivum* f. *europaeum* T77, *T. harzianum* T54 i *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 *in vitro*.

Tečne kulture 33 *Bacillus* spp. soja u LB medijumu su inkubirane 72 h na 30 °C uz mućkanje na horizontalnom šejkeru na 180 rpm. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 4000×g, supernatanti su potpuno oslobođeni ćelija filtriranjem kroz Filtropur S membrane od polietersulfona (PES) sa porama prečnika 0,20 µm (Sarstedt, Nemačka). Supernatanti su koncentrisani 10 puta uparavanjem do suva na 40 °C i rastvaranjem u sterilnoj destilovanoj vodi.

Za pripremu suspenzije spora, *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *T. harzianum* T54 su gajene 72 h na 25 °C a *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 sedam dana na 20 °C. Micelija patogenih izolata gljiva prelivena je sterilnom destilovanom vodom sa jednom kapi Tween 20 (v/v 0,01%) i sastrugana sa površine KDA podloge. Micelija je odvojena od spora filtriranjem kroz sterilnu gazu. Koncentracija suspenzije spora određena je brojanjem spora na hemocitometru (Phase hemacytometer, Spencer, Bright-line®, USA) pomoću svetlosnog mikroskopa (Olympus CX41RF, Japan). Suspenzija spora je dodata u istopljenu KDA podlogu ohlađenu do 47 °C tako da je finalna koncentracija iznosila 10⁶ konidija/ml. U podlozi su bušeni bunari prečnika 10 mm. U svaki bunar dodato je 50 µl supernatanta. Nakon inkubacije od 48 h na 25 °C (*Trichoderma* spp.) i sedam dana na 20 °C (*L. fungicola*) mereni su prečnici zone inhibicije rasta micelije patogena. Svaki supernatant je ispitan u četiri ponavljanja. Negativnu kontrolu predstavljala je sterilna voda.

3.2.4.3. Etil-acetatna ekstrakcija lipopeptida

Ekstrakcija lipopeptida iz supernatanta soja *B. amyloliquefaciens* B-241 vršena je etil-acetatom (Slika 9). Tečna kultura *B. amyloliquefaciens* B-241 inkubirana je 72 h na 30 °C pri 180 rpm. Supernatant je oslobođen ćelija centrifugiranjem 20 minuta na 4000 rpm na 4 °C. U supernatant je dodat etil-acetat u odnosu 1:1 (v/v) sa 30 g NaCl po litru supernatanta. Nakon mešanja na magnetnoj mešalici preko noći, smeša je ostavljena u frižideru kako bi se faze razdvojile. Gornja etil-acetatna faza je pažljivo izdvojena i

uparavana do suva rotirajućim evaporatorom na temperaturi ≤ 50 °C (BÜCHI Rotavapor R-114, Švajcarska). Talog je rastvoren u dimetil sulfoksidu (DMSO) tako da je dobijen sirovi ekstrakt koncentracije 25 mg/ml.



Slika 9. Proces ekstrakcije lipopeptida etil-acetatom. Levo: smeša supernatanta soja *Bacillus amyloliquefaciens* B-241 (donja faza) i etil-acetata (gornja faza). Desno: uparavanje etil-acetatne faze rotirajućim evaporatorom (foto O. Stanojević).

3.2.4.4. Ispitivanje antifungalne aktivnosti lipopeptidnog ekstrakta *in vitro*

Ispitivanje dejstva etil-acetatnog lipopeptidnog ekstrakta soja *B. amyloliquefaciens* B-241 protiv 3 patogene gljive šampinjona vršeno je testom radijalne inhibicije rasta micelije. Na površinu KDA podloge utrljano je 100 μ l etil-acetatnog ekstrakta koncentracije 25 mg/ml. Na centar podloge inokulisan je odsečak sa micelijom patogenih izolata gljiva prečnika 10 mm. Nakon inkubacije na optimalnoj temperaturi meren je prečnik kolonije patogenih gljiva koji je poređen sa prečnikom u negativnoj netretiranoj kontroli. Takođe je ispitan i sam rastvarač, dok je pozitivnu kontrolu činio antimikotik nistatin rastvoren u DMSO-u (25 mg/ml). Eksperiment je urađen u tri ponavljanja. Inhibicija rasta patogenih gljiva prikazana je u vidu procenata.

3.2.5. Ispitivanje efekta *Bacillus* spp. sojeva na rast micelije šampinjona *in situ*

Ispitivanje uticaja antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva na rast micelije šampinjona vršeno je *in situ* u četiri ponavljanja (Salar and Aneja, 2007). Na dno sterilnih epruveta (25 mm × 160 mm) stavljeno je 10 „semena“ micelije *A. bisporus* A15 (Sylvane, Mađarska) koja su prekrivena sa 30 g pasterizovanog komposta (II faze). Kompost je prethodno tretiran sa 50 µl suspenzije bakterijske prekonoćne kulture, dok je negativna kontrola predstavljala netretiran kompost. Epruvete su prekrivene pamučnim tuferima i inkubirane na 25 °C u mraku, uz svakodnevno vlaženje. Nakon inicijalne inkubacije od sedam dana, svakodnevno je meren porast micelije šampinjona, sve dok micelija nije dostigla površinu komposta u bar jednoj epruveti. Porast micelije šampinjona je izražen u milimetrima po danu.

3.2.6. Efikasnost *Bacillus* spp. sojeva za suzbijanje patogena i uticaj na prinos šampinjona *in vivo*

3.2.6.1. Postavka *in vivo* eksperimenata

Uticaj odabranih *Bacillus* spp. sojeva na suzbijanje *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 i na prinos šampinjona ispitan je u oglednom gajilištu Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, *in vivo*. Eksperimenti su organizovani tako da nalikuju procesu komercijalne proizvodnje šampinjona u Srbiji. Svaki eksperiment se sastojao od dve grupe, neinokulisanih i inokulisanih patogenom, sa pet tretmana unutar svake grupe. Negativne kontrole su predstavljale netretirane inokulisane i neinokulisane varijante. Svaka od 12 varijanti je postavljena u šest ponavljanja. Kutije u gajilištu su bile raspoređene po potpuno slučajnom blok sistemu.

Plastične kutije dimenzija 0,340 m × 0,215 m × 0,130 m (dužina×širina×visina) sterilisane 96% etanolom su punjene sa 1,5 kg pasterizovanog komposta koji je zasejan sa 15 g micelije šampinjona, tzv. „semena“ *A. bisporus* A15. Kutije su inkubirane 14-20 dana na 24 °C („spawn-run“). Nakon što je micelija šampinjona potpuno prerasla

kompost, na površinu komposta je postavljano 1,3 kg pokrivke koja predstavlja crni treset (Terahum d.o.o., Veliko Gradište, Srbija) pomešan sa krečom (1,4%, Tara stil d.o.o., Dobanovci, Srbija), sterilisan persirćetnom kiselinom (90 ml/m², 15% Peral S, MidraEko, Beograd, Srbija). Dan postavljanja pokrivke označen je kao nulti dan eksperimenta. Nakon sedam dana inkubacije na 22 °C („case-run“) temperatura je spuštana na 17 °C kako bi se podstaklo obrazovanje plodonosnih tela. Pokrivka je temeljno rastresena grabuljanjem deset dana nakon njenog postavljanja u sva četiri *in vivo* eksperimenta, kako bi se omogućilo lakše prorastanje micelije kroz pokrivku i formiranje plodonosnih tela na celoj površini. Plodonosna tela su ručno brana svakog dana tokom dva talasa plodonosjenja. Plodonosna tela iz svake kutije klasifikovana su kao zdrava (bez simptoma zelene plesni/suve truleži) ili bolesna (sa simptomima bolesti), i zabeleženi su njihov broj i masa. Na osnovu dobijenih podataka za svaki tretman je izračunat procenat efikasnosti tretmana za suzbijanje patogena prema formuli (Gea et al., 2010): $E (\%) = [(I_c - I_t) / I_c] \times 100$, gde I_c predstavlja učestalost simptoma u kontroli a I_t u tretmanu. Prinos šampinjona u svih 12 varijanti, odnosno biološka efikasnost (BE), prikazana je kao odnos ukupne mase šampinjona (zdravih i bolesnih) i suve mase komposta, i izražena u procentima (Chrysay-Tokousbalides et al., 2007). Suva masa komposta određena je prema metodi Reeb and Milota (1999). Masa komposta izmerena je pre i nakon njegovog sušenja na 105 °C tokom 24 h. Izračunat je sadržaj vlage komposta nakon sušenja (suva masa/vlažna masa $\times 100$ [%]) a na osnovu dobijene vrednosti određena je masa suvog komposta u jednoj kutiji (vlažna masa komposta u jednoj kutiji \times sadržaj vlage komposta / 100 [g]).

3.2.6.2. Veštačka inokulacija patogena

Suspenzije spora za veštačku inokulaciju komposta i pokrivke patogenima *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V₆ pripremljene su na već opisan način (3.2.4.2).

Inokulacija komposta sa *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 izvršena je prvog dana od postavljanja komposta zasejanog micelijom šampinjona u kutije. Po 10 ml suspenzije spora *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 doze 10⁶ konidija po m² pokrivke je ispipetirano niz unutrašnje zidove kutija.

Inokulacija pokrivke sa *L. fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆ izvedena je sedam dana nakon postavljanja pokrivke, razvnomernim pipetiranjem 10 ml suspenzije spora (10⁶ konidija po m²) na površinu pokrivke.

3.2.6.3. Tretmani bio/fungicidima

Pokrivka je tretirana antagonističkim *Bacillus* spp. sojevima (*B. amyloliquefaciens* B-241, *B. pumilus* B-138, *B. subtilis* B-233, *B. subtilis* B-124, *B. subtilis* B-348) i komercijalnim biofungicidom na bazi *B. velezensis* QST 713, ranije *B. subtilis* QST 713 (Pandini et al., 2018b), dva dana nakon njenog postavljanja. Komercijalni fungicid na bazi prochloraz-mangana je primenjen četvrtog dana od postavljanja pokrivke. Svih pet tretmana je ponovljeno na kraju prvog talasa plodonošenja, otprilike 22 dana nakon postavljanja pokrivke. Tretiranje je izvedeno prskanjem tečnih suspenzija na površinu pokrivke odgovarajućih varijanti (30 ml/kutiji).

Antagonistički *Bacillus* spp. sojevi su pripremljeni za tretman inkubiranjem u hranljivom bujonu na 30 °C 24 h, pri 160 rpm. Koncentracija bakterijskih suspenzija je bila 10⁸ CFU/ml, što je određeno indirektnom metodom, zasejavanjem serijskih decimalnih razređenja na hranljivi agar i brojanjem kolonija nakon inkubacije.

Doze i stope primene komercijalnih preparata i *Bacillus* spp. sojeva korišćenih za tretmane prikazane su u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Bio/fungicidi i antagonistički sojevi korišćeni kao tretmani u gajilištu.

Bio/fungicidi	Koncentracija aktivnih supstanci	Doza po m ²	Stopa primene
Serenade® WP (AgraQuest, Canada)	<i>Bacillus velezensis</i> QST 713 15.7% (5.13×10^{10} CFU g ⁻¹)	3 g	410 ml/m ²
Octave® WP (Bayer, Germany)	Prohloraz-Mn 500 mg L ⁻¹	1,5 g	410 ml/m ²
<i>B. subtilis</i> B-124	<i>B. subtilis</i> B-124 10 ⁸ CFU/ml	4×10 ¹⁰ CFU	410 ml/m ²
<i>B. subtilis</i> B-233	<i>B. subtilis</i> B-233 10 ⁸ CFU/ml	4×10 ¹⁰ CFU	410 ml/m ²
<i>B. subtilis</i> B-348	<i>B. subtilis</i> B-348 10 ⁸ CFU/ml	4×10 ¹⁰ CFU	410 ml/m ²
<i>B. amyloliquefaciens</i> B-241	<i>B. amyloliquefaciens</i> B-241 10 ⁸ CFU/ml	4×10 ¹⁰ CFU	410 ml/m ²
<i>B. pumilus</i> B-138	<i>B. pumilus</i> B-138 10 ⁸ CFU/ml	4×10 ¹⁰ CFU	410 ml/m ²

3.2.7. Statističke analize

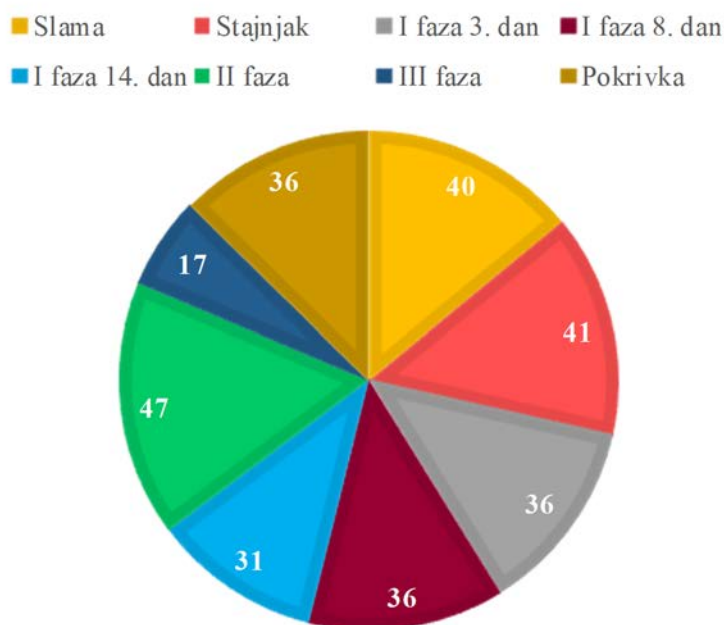
Rezultati dvojne kultivacije, ispitivanja uticaja supernatanata i lipopeptidnog ekstrakta na rast patogenih gljiva šampinjona i *in vivo* eksperimenata (efikasnosti i biološke efikasnosti) podvrgnuti su jednofaktorijalnoj analizi varijanse (ANOVA). Srednje vrednosti dobijene su upotrebom Tukey-evog HSD testa (honest significant difference) pri čemu je nivo statističke značajnosti bio $P < 0,05$ u svim testovima. Statističke analize su izvedene u programima Statistica v.7 (StatSoft Inc., SAD) i IBM SPSS Statistics v.19 (SPSS Inc., SAD).

4. REZULTATI

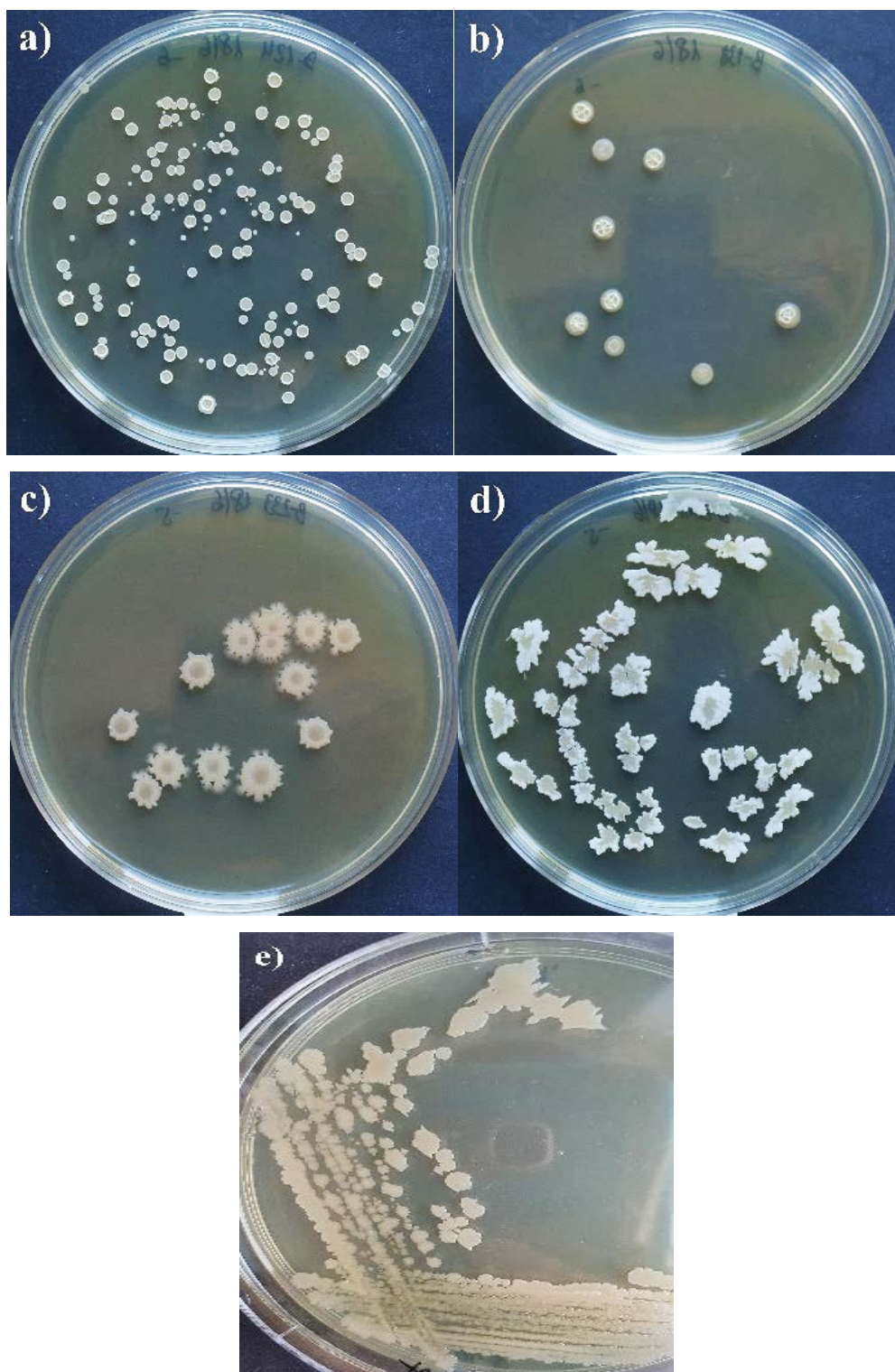
4. REZULTATI

4.1. Izolacija i formiranje kolekcije *Bacillus* spp.

Iz kompostnog materijala, komposta i pokrivke za gajenje šampinjona dobijeno je 284 *Bacillus* spp. izolata. Izolacija se zasnivala na selekciji bakterija koje formiraju endospore, tretiranjem uzoraka visokom temperaturom i inkubaciji pri aerobnim uslovima na 30 °C. Izolati *Bacillus* spp. dobijeni su iz svih tipova materijala korišćenih za izolaciju: slame, stajnjaka, komposta I faze (3, 8, i 14. dana kompostiranja), pasterizovanog komposta II faze, komposta III faze i pokrivke (treseta), pri čemu su preovladavali izolati iz komposta II faze (**Slika 10**). **Slika 11** prikazuje morfologiju kolonija odabranih izolata.



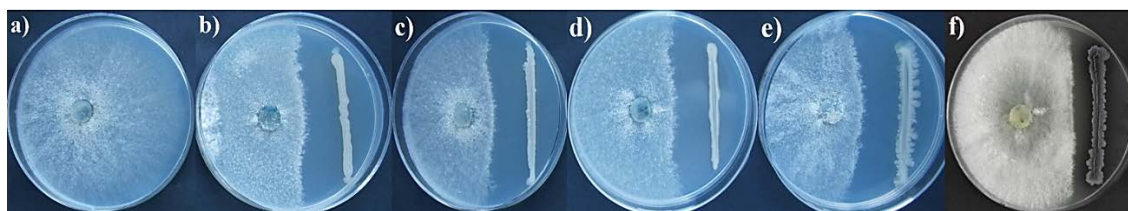
Slika 10. Broj *Bacillus* spp. izolata dobijen iz kompostnog materijala, komposta i pokrivke za gajenje šampinjona.



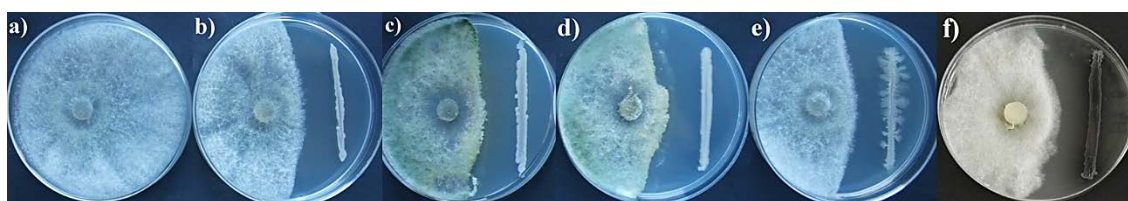
Slika 11. Morfologija kolonija *Bacillus* spp. sojeva na hranljivom agaru nakon 48 h inkubacije na 30 °C (foto O. Stanojević). a) *B. subtilis* B-124, b) *B. pumilus* B-138, c) *B. subtilis* B-233, d) *B. amyloliquefaciens* B-241, e) *B. subtilis* B-348.

4.2. Ispitivanje antagonističkog dejstva *Bacillus* spp. sojeva prema fungalnim patogenima šampinjona *in vitro*

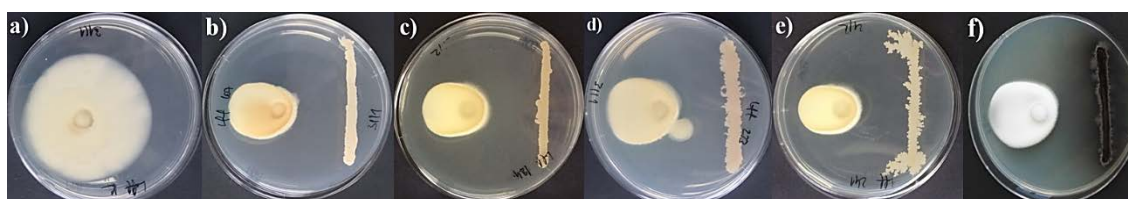
Antagonističko dejstvo *Bacillus* spp. izolata prema fungalnim patogenima šampinjona ispitan je metodom dvojne kultivacije *in vitro* (Slike 12.1, 12.2, 12.3).



Slika 12.1. Antagonističko dejstvo odabranih *Bacillus* spp. sojeva prema *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* T77 *in vitro* (foto O. Stanojević). a) kontrola, b) *B. subtilis* B-107, c) *B. subtilis* B-124, d) *B. subtilis* B-233, e) *B. amyloliquefaciens* B-241, f) *B. subtilis* B-348.



Slika 12.2. Antagonističko dejstvo odabranih *Bacillus* spp. sojeva prema *Trichoderma harzianum* T54 *in vitro* (foto O. Stanojević). a) kontrola, b) *B. subtilis* B-107, c) *B. subtilis* B-124, d) *B. subtilis* B-233, e) *B. amyloliquefaciens* B-241, f) *B. subtilis* B-348.



Slika 12.3. Antagonističko dejstvo odabranih *Bacillus* spp. sojeva prema *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆ *in vitro* (foto O. Stanojević). a) kontrola, b) *B. subtilis* B-107, c) *B. subtilis* B-124, d) *B. subtilis* B-233, e) *B. amyloliquefaciens* B-241, f) *B. subtilis* B-348.

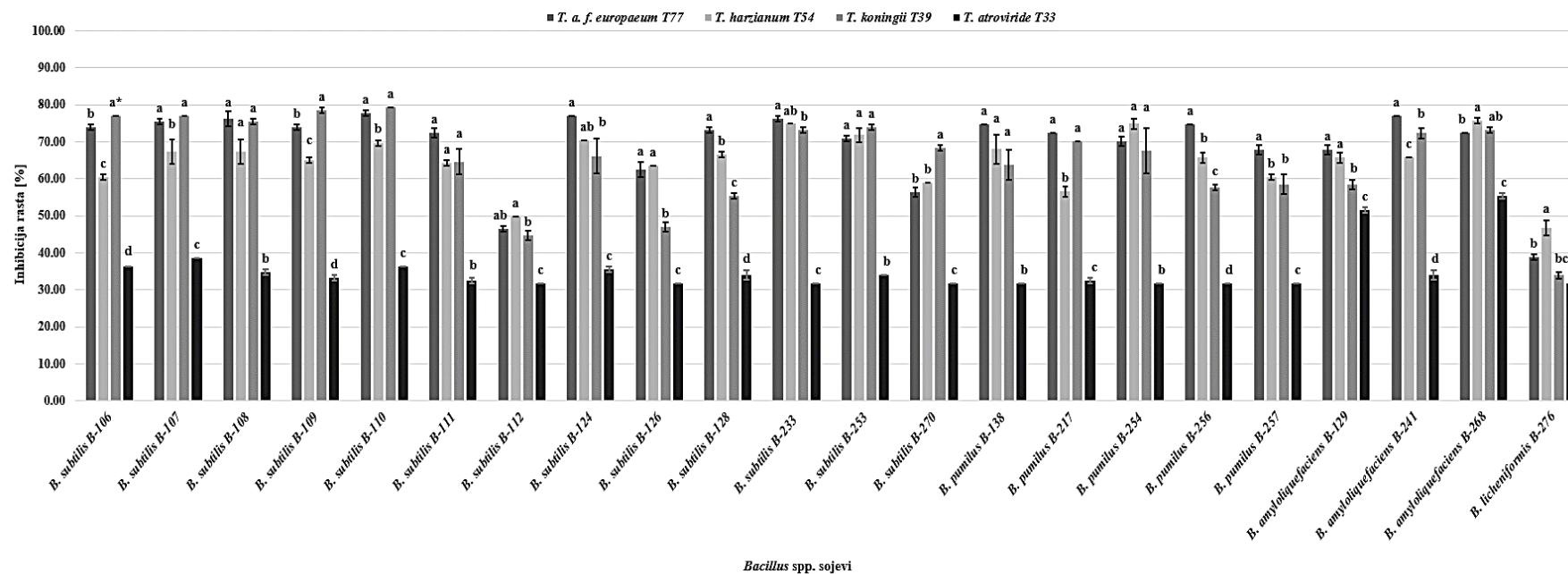
Preliminarno je ispitan efekat 101 *Bacillus* spp. izolata prema *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *T. harzianum* T54. Antifungalna aktivnost 22 izolata koji su pokazali inhibiciju rasta obe patogene gljive ispitan je i prema *T. koningii* T39 i *T. atroviride* T33. Najosetljivijom od četiri ispitivane gljive pokazala se *T. aggressivum* f. *europaeum* T77,

zatim *T. koningii* T39, *T. harzianum* T54 i *T. atroviride* T33 (**Slika 13**). Čak 16 *Bacillus* spp. sojeva je izazvalo inhibiciju rasta *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 veću od 70%. Sojevi *B. subtilis* B-107, B-108, B-110, B-124, B-233 i *B. amyloliquefaciens* B-241 su se pokazali kao najefikasniji antagonisti ove patogene gljive (PGI > 75%). Inhibicija rasta micelije *T. harzianum* T54 kretala se između 46,7% i 75,63%, koju su prouzrokovali sojevi *B. licheniformis* B-276 i *B. amyloliquefaciens* B-268, redom. Inhibiciju rasta patogena veću od 70% izazvalo je pet antagonističkih sojeva – *B. subtilis* B-124, B-233 i B-253, *B. pumilus* B-254 i *B. amyloliquefaciens* B-268. Najbolju inhibiciju rasta *T. koningii* T39 pokazao je soj *B. subtilis* B-110 (79,26%), dok je najmanje efikasan u inhibiciji bio soj *B. licheniformis* B-276 (33,93%). Čak deset *Bacillus* spp. sojeva je inhibiralo rast ove patogene gljive za preko 70%, a od toga je pet sojeva izazvalo inhibiciju rasta veću od 75%. Najmanje osetljiva na dejstvo *Bacillus* spp. sojeva bila je gljiva *T. atroviride* T33, kod koje su se procenti inhibicije rasta kretali između 31,82% i 55,31%.

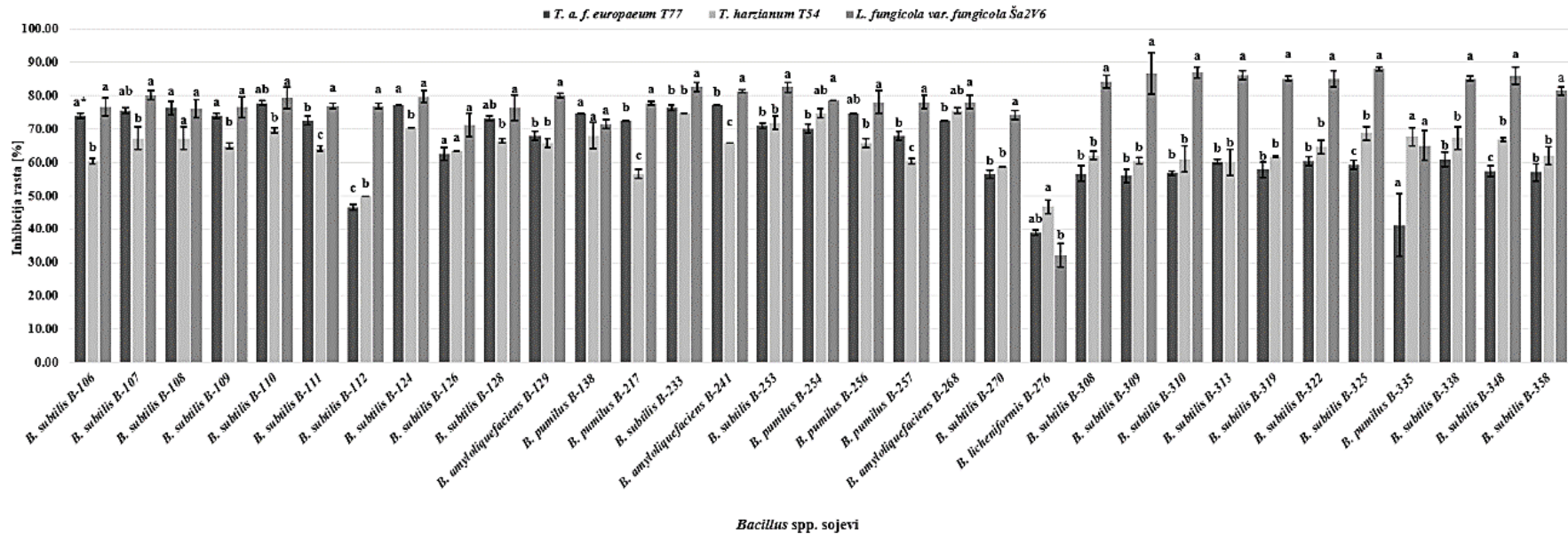
Sva dalja istraživanja su vršena sa izolatima *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *T. harzianum* T54, kao najznačajnijim prouzrokovateljima zelene plesni šampinjona.

Kako bi se proširila kolekcija antagonističkih sojeva, ispitana je antifungalna aktivnost 183 nova izolata *Bacillus* spp. (iz istih supstrata kao što je prethodno navedeno) prema *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *T. harzianum* T54, pri čemu je inhibiciju rasta obe patogene gljive izazvalo 53 izolata (**Prilog 1**).

Inhibitorno dejstvo 75 *Bacillus* spp. izolata (22 iz prve godine izolacije i 53 iz druge), antagonista *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *T. harzianum* T54, ispitano je metodom dvojne kultivacije *in vitro* i protiv *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V₆, prouzrokovачa suve truleži šampinjona. Do značajne inhibicije rasta patogena dovela su 33 izolata. Od sve tri patogene gljive, prouzrokovач suve truleži šampinjona je bio najosetljiviji na dejstvo *Bacillus* spp. izolata (**Slika 14**). Najmanje efikasni su bili sojevi *B. licheniformis* B-276 i *B. pumilus* B-335 koji su inhibirali rast *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V₆ za 32,14% i 65,10%, redom. Ostali sojevi su izazvali značajnu inhibiciju rasta micelije u opsegu između 71,19% i 88,19%. Čak 15 *Bacillus* spp. sojeva je inhibiralo rast patogena za preko 80%. Najizraženiju antifungalnu aktivnost pokazao je soj *B. subtilis* B-325.



Slika 13. *In vitro* antagonistička aktivnost 22 *Bacillus* spp. soja prema *Trichoderma* spp. Prikazane su srednje vrednosti (n=3) sa standardnim greškama. *Vrednosti obeležene istim slovom u okviru svakog testiranog *Bacillus* spp. soja nisu statistički značajno različite prema Tukey-evom HSD testu ($P < 0,05$).



Slika 14. *In vitro* antagonistička aktivnost 33 *Bacillus* spp. soja prema *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* T77, *Trichoderma harzianum* T54 i *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆. Prikazane su srednje vrednosti (n=3) sa standardnim greškama.* Vrednosti obeležene istim slovom i okviru svakog testiranog *Bacillus* spp. soja nisu statistički značajno različite prema Tukey-evom HSD testu ($P < 0,05$).

4.3. Identifikacija antagonističkih *Bacillus* spp.

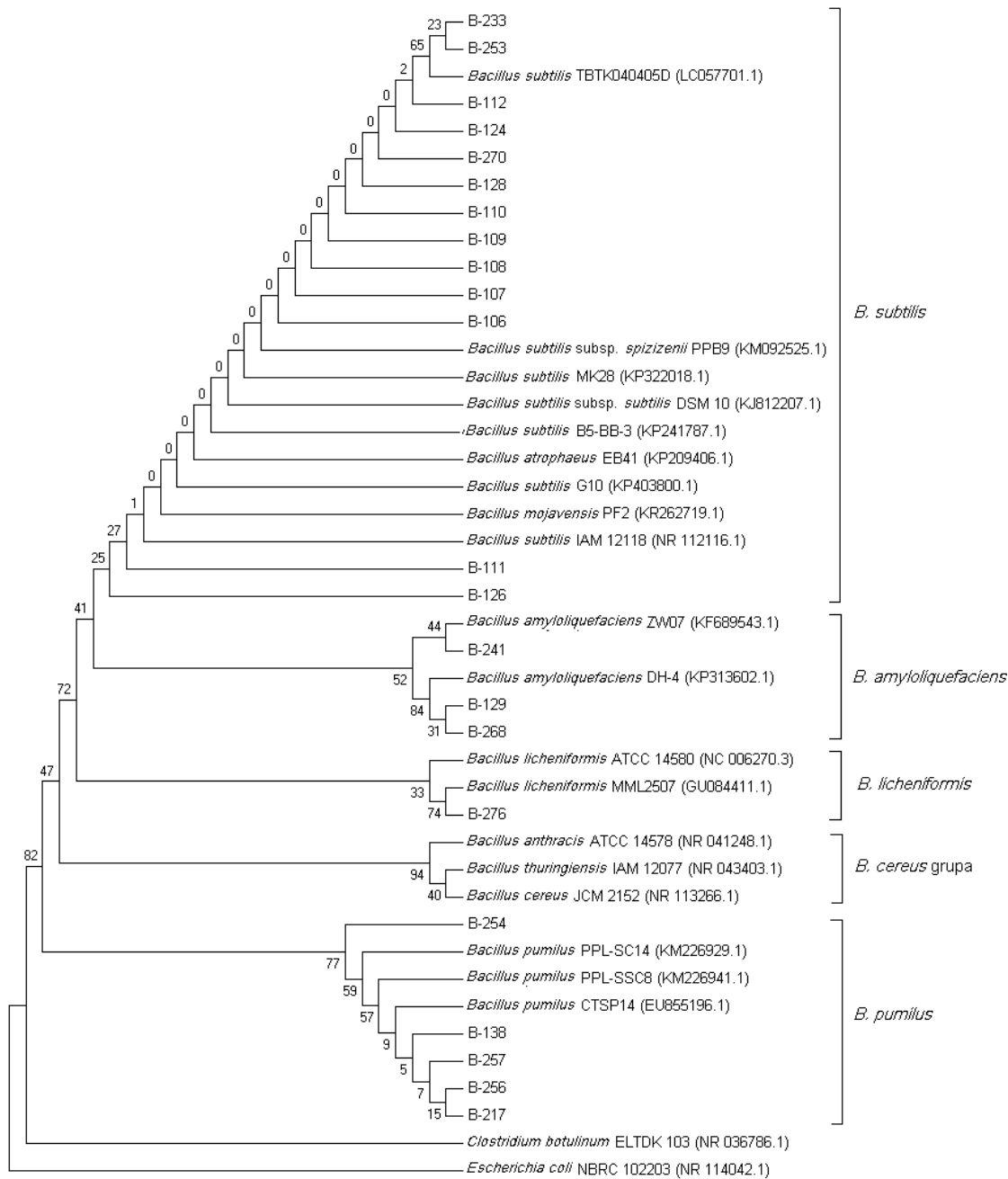
Izolati dobijeni nakon termalne inaktivacije na 80 °C i inkubacije u aerobnim uslovima, sa morfologijom kolonija tipičnom za vrste roda *Bacillus* su preliminarno identifikovani do nivoa roda putem KOH i katalaza testa. Pokazano je da su svih 284 izolata gram-pozitivne bakterije sa sposobnošću produkcije katalaze, odnosno da pripadaju rodu *Bacillus* (**Prilog 1**).

Identifikacija 33 antagonistička *Bacillus* spp. izolata do nivoa vrste izvršena je na osnovu delimične sekvence gena za 16S rRNK (hipervarijabilnog regiona) i *tuf* gena za elongacioni Tu faktor.

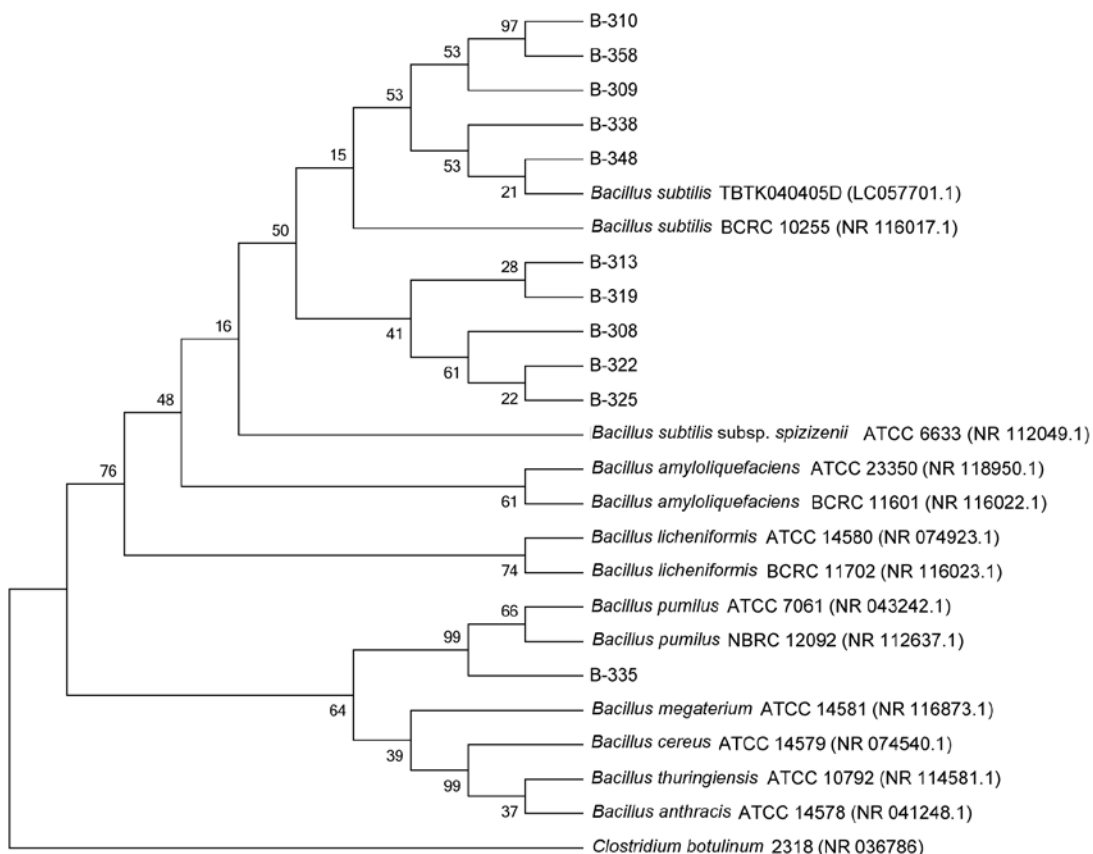
Na osnovu sekvenci hipervarijabilnog regiona 16S rDNK gena pokazano je jasno grupisanje izolata B-129, B-241 i B-268 sa sojevima vrste *B. amyloliquefaciens* dok je 6 izolata (B-138, B-217, B-254, B-256, B-257 i B-335) filogenetski najrodnije *B. pumilus* sojevima. Izolat B-276 identifikovan je kao pripadnik vrste *B. licheniformis*, dok je najveći broj izolata bio najrodniji vrsti *B. subtilis* (**Slike 15 i 16**). Pristupni brojevi za sve antagonističke *Bacillus* spp. sojeve prikazani su u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Identifikacija 33 antagonistička *Bacillus* spp. izolata na osnovu sekvence hipervarijabilnog regiona gena za 16S rRNK.

Vrsta	Izolat	Izvor	Pristupni broj
<i>B. subtilis</i>	B-106	Slama	KT692716
<i>B. subtilis</i>	B-107	Slama	KT692717
<i>B. subtilis</i>	B-108	Slama	KT692718
<i>B. subtilis</i>	B-109	Slama	KT692719
<i>B. subtilis</i>	B-110	Slama	KT692720
<i>B. subtilis</i>	B-111	Slama	KT692721
<i>B. subtilis</i>	B-112	Slama	KT692722
<i>B. subtilis</i>	B-124	I faza 8. dan	KT692723
<i>B. subtilis</i>	B-126	I faza 14. dan	KT692724
<i>B. subtilis</i>	B-128	II faza	KT692725
<i>B. amyloliquefaciens</i>	B-129	II faza	KT692726
<i>B. pumilus</i>	B-138	Stajnjak	KT692727
<i>B. pumilus</i>	B-217	I faza 14. dan	KT692728
<i>B. subtilis</i>	B-233	I faza 3. dan	KT692729
<i>B. amyloliquefaciens</i>	B-241	I faza 14. dan	KT692730
<i>B. subtilis</i>	B-253	Stajnjak	KT692731
<i>B. pumilus</i>	B-254	Stajnjak	KT692732
<i>B. pumilus</i>	B-256	Stajnjak	KT692733
<i>B. pumilus</i>	B-257	Stajnjak	KT692734
<i>B. amyloliquefaciens</i>	B-268	Pokrivka	KT692735
<i>B. subtilis</i>	B-270	III faza	KT692736
<i>B. licheniformis</i>	B-276	III faza	KT692737
<i>B. subtilis</i>	B-308	Stajnjak	MG845524
<i>B. subtilis</i>	B-309	Stajnjak	MG845525
<i>B. subtilis</i>	B-310	Stajnjak	MG845526
<i>B. subtilis</i>	B-313	Stajnjak	MG845527
<i>B. subtilis</i>	B-319	I faza 3. dan	MG845528
<i>B. subtilis</i>	B-322	I faza 3. dan	MG845529
<i>B. subtilis</i>	B-325	I faza 3. dan	MG845530
<i>B. pumilus</i>	B-335	I faza 8. dan	MG845531
<i>B. subtilis</i>	B-338	I faza 8. dan	MG845532
<i>B. subtilis</i>	B-348	II faza	MG845533
<i>B. subtilis</i>	B-358	III faza	MG845534

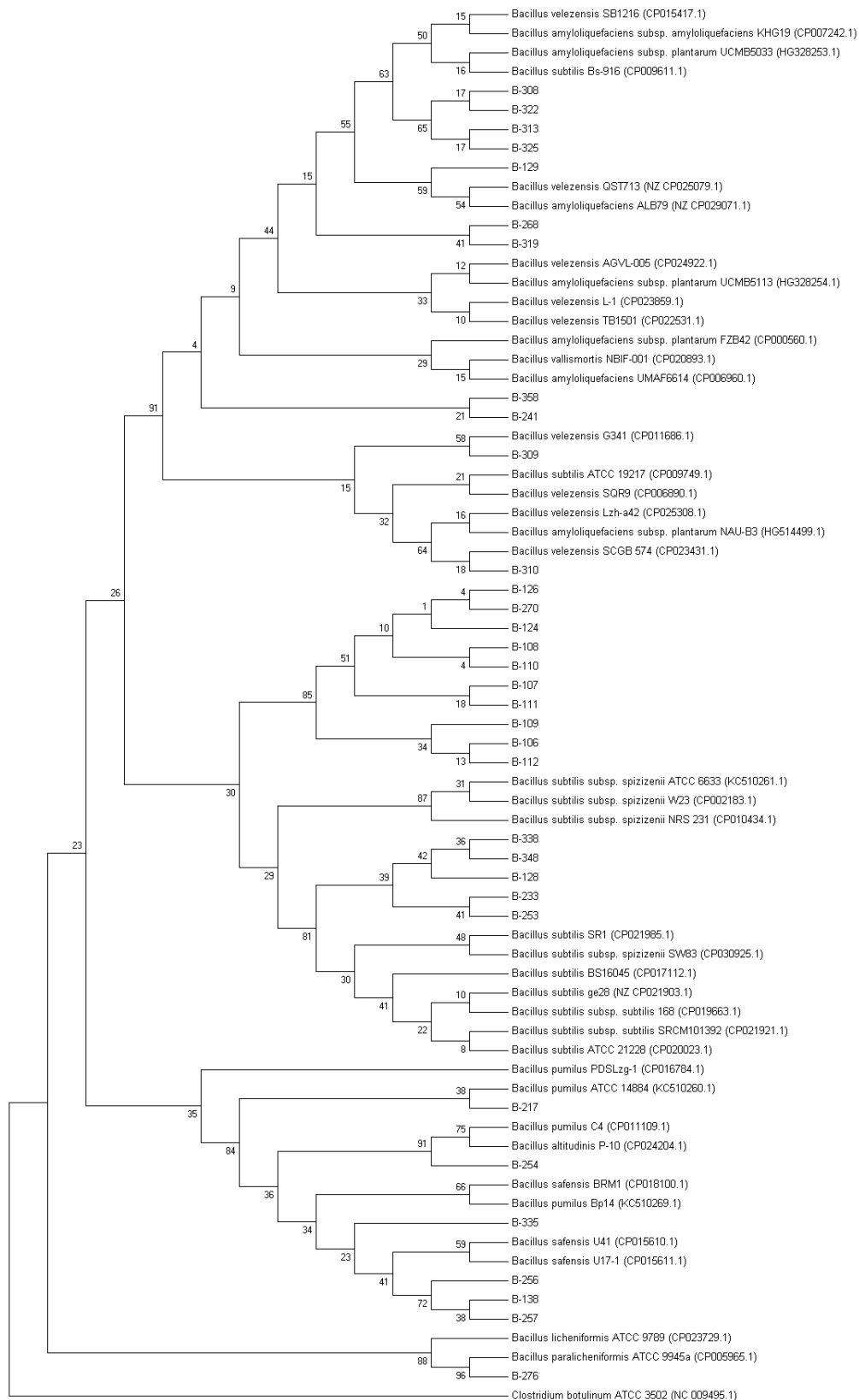


Slika 15. „Neighbour-joining” filogenetsko stablo bazirano na delimičnoj sekvenci gena za 16s rRNK (275 bp) 22 *Bacillus* spp. i referentnih sojeva roda *Bacillus*. Kao „out” grupa korišćeni su *Clostridium botulinum* (NR_036786.1) i *Escherichia coli* (NR_114042.1). Na tačkama grananja prikazane su „bootstrap” vrednosti.



Slika 16. „Neighbour-joining” filogenetsko stablo bazirano na delimičnoj sekvenci gena za 16s rRNK (275 bp) 11 *Bacillus* spp. i referentnih sojeva roda *Bacillus*. Kao „out” grupa korišćena je sekvenca *Clostridium botulinum* (NR_036786.1). Na tačkama grananja prikazane su „bootstrap” vrednosti.

Filogenetska analiza na osnovu sekvenci *tuf* gena nije rezultovala dovoljno diskriminatornom identifikacijom antagonističkih izolata *Bacillus* spp. (Slika 17). Čak 26 izolata nisu uspešno identifikovani do nivoa vrste, mada je potvrđena njihova srodnost vrstama *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* i *Bacillus velezensis*, svrstavanim u *B. subtilis* grupu. Takođe, pet izolata (B-138, B-217, B-254, B-256, B-257 i B-335) pripadalo je *B. pumilus* grupi, vrstama *B. pumilus*, *B. safensis* i *B. altitudinis*, ali nije postignuta njihova precizna identifikacija. Izolat B-276 je na osnovu sekvence *tuf* gena identifikovan kao vrsta *Bacillus paralicheniformis* koja je filogenetski bliska vrsti *B. licheniformis*.



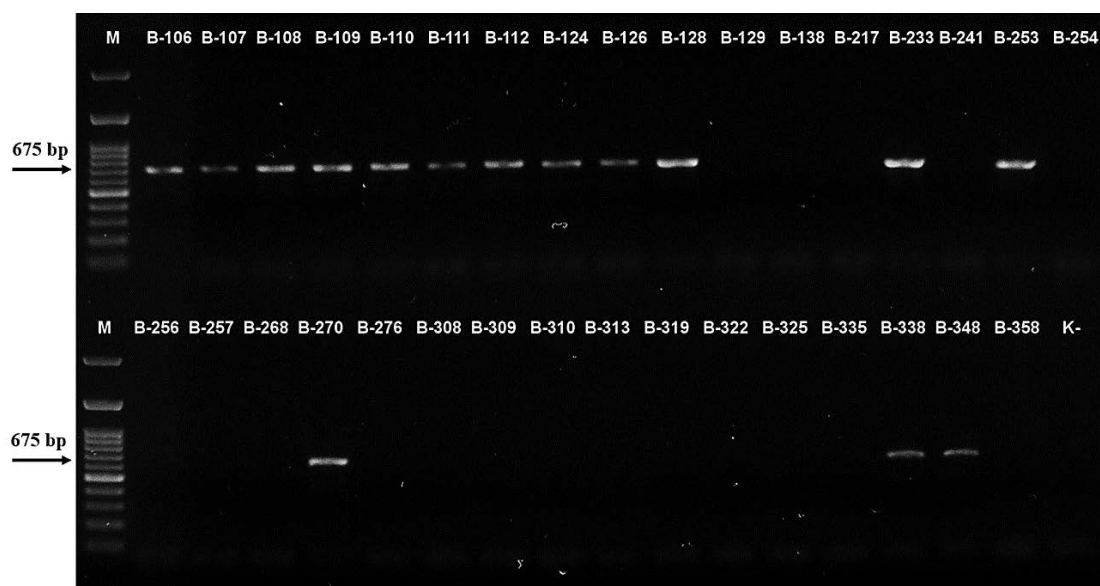
Slika 17. „Neighbour-joining” filogenetsko stablo bazirano na sekvenci *tuf* gena (791 bp) 33 izolata *Bacillus* spp. i referentnih sojeva roda *Bacillus*. Kao „out” grupa korišćena je sekvenca *Clostridium botulinum* (NC_009495.1). Na tačkama grananja prikazane su „bootstrap” vrednosti.

4.4. Ispitivanje mehanizama antagonističkog delovanja *Bacillus* spp. sojeva

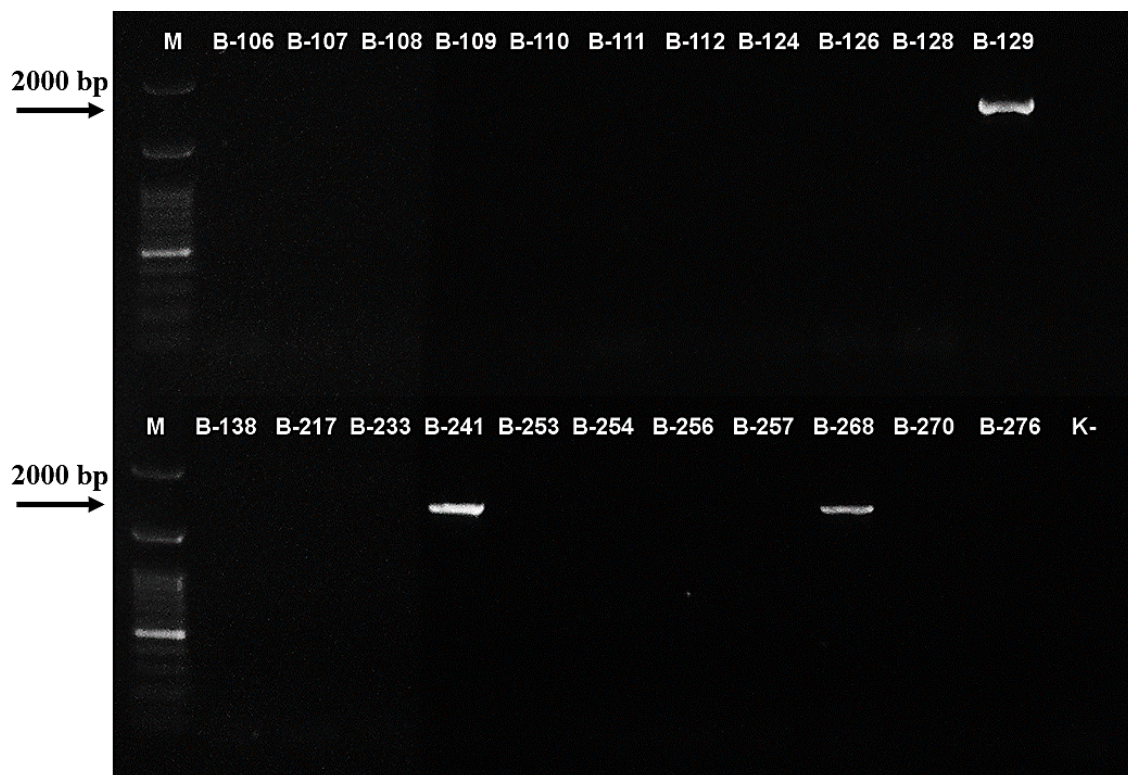
4.4.1. Molekularna detekcija gena za lipopeptide

Vrste roda *Bacillus* su poznate kao producenti raznovrsnih antimikrobnih supstanci. Lipopeptidi iz familija surfaktina, iturina, fengicina i kurstakina su u brojnim studijama pokazali antibakterijsko i antifungalno dejstvo. Antagonistički *Bacillus* spp. sojevi su testirani na prisustvo pet gena uključenih u biosintezu lipopeptida – surfaktina, iturina, bacilomicina D, fengicina i kurstakina.

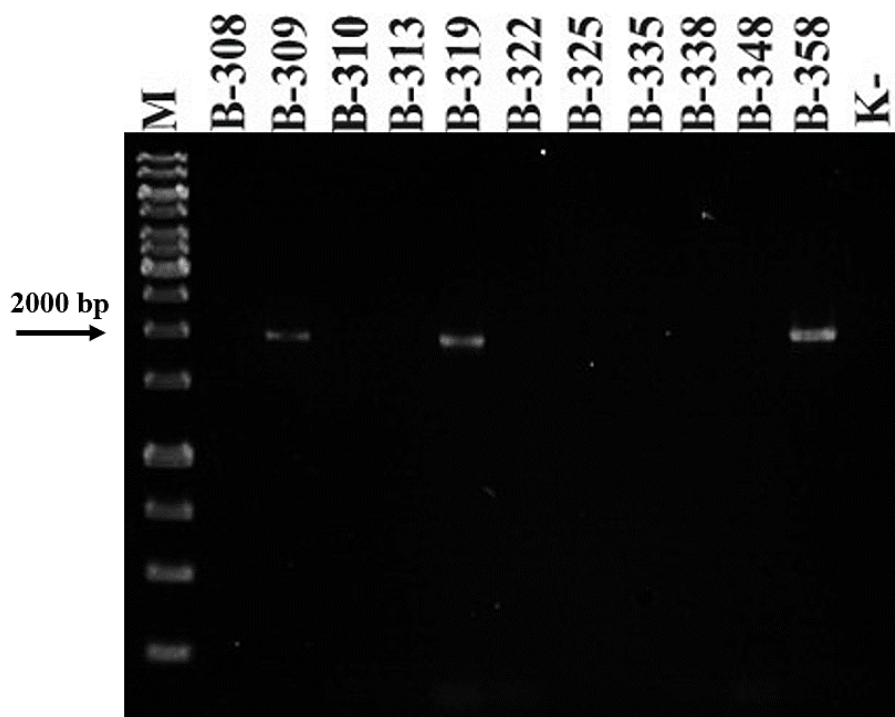
Analizom agaroznih gelova utvrđeno je prisustvo DNK fragmenata odgovarajuće veličine. Amplifikacija gena za surfaktin sintetazu izvršena je upotrebom P17 i P18 prajmera. DNK fragment dužine 675 bp detektovan je kod 15 od 33 *Bacillus* spp. soja (Slika 18). Fragment veličine 2 kb koji odgovara genima *ituA* i *ituB* sa intergenskim regionom umnožen je kod šest sojeva (Slike 19.1, 19.2), dok je gen za bacilomicin D sintetazu (875 bp) bio prisutan kod devet sojeva (Slika 20). Gen za fengicin sintetazu amplifikovan upotrebom FEND1-F i FEND1-R prajmera uočen je u vidu trake veličine 964 bp kod deset *Bacillus* spp. sojeva (Slika 21). Najveći broj sojeva, čak 32 od 33, je u svom genomu imao jedan od gena koji učestvuju u sintezi kurstakina (*krsA*, *krsB* i *krsC*) (Slika 22).



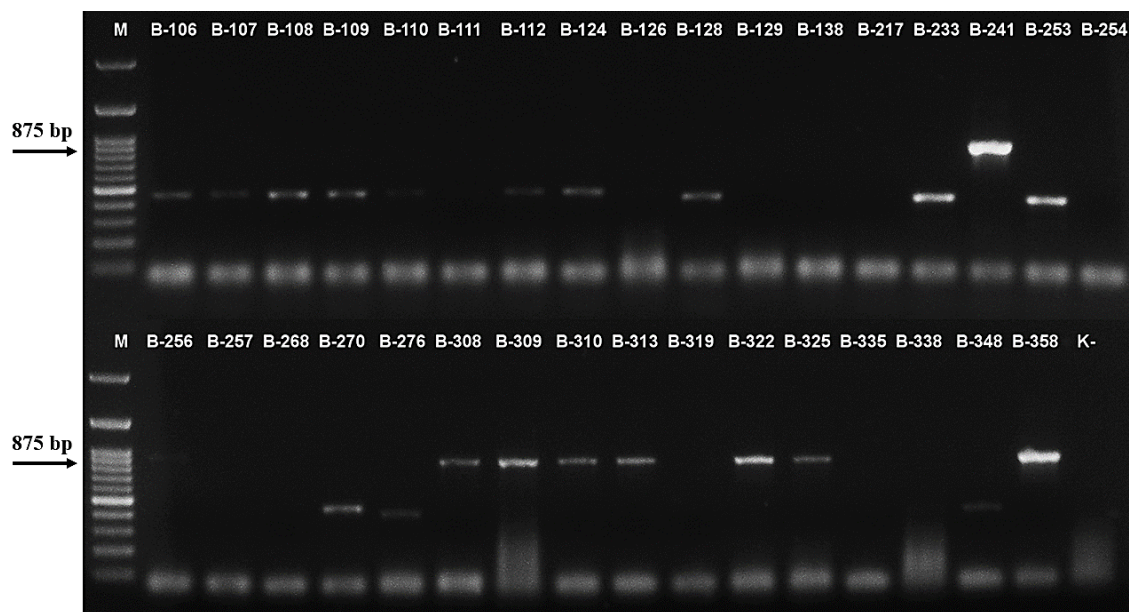
Slika 18. Amplifikovan gen za surfaktin sintetazu (675 bp): M = marker 100 bp; K- = negativna kontrola (foto O. Stanojević).



Slika 19.1. Amplifikovan deo iturinskog operona veličine 2000 bp: M = marker 100 bp; K- = negativna kontrola (foto O. Stanojević).



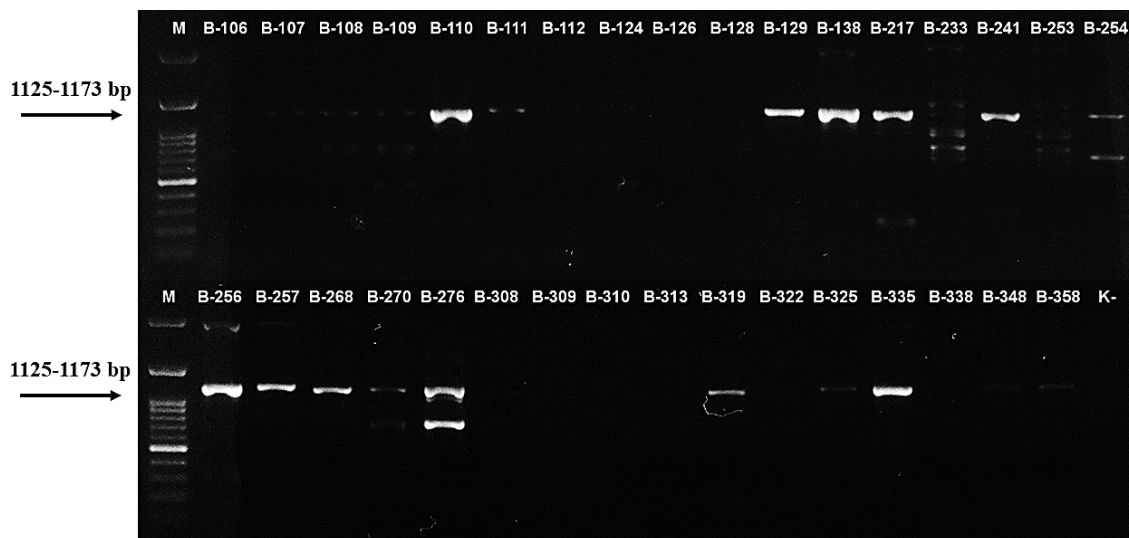
Slika 19.2. Amplifikovan deo iturinskog operona veličine 2000 bp: M = marker 1 kb; K- = negativna kontrola (foto O. Stanojević).



Slika 20. Amplifikovan gen za bacilomicin D sintetazu veličine 875 bp: M = marker 100 bp; K- = negativna kontrola (foto O. Stanojević).



Slika 21. Amplifikovan gen za fengicin sintetazu (964 bp): M = marker 100 bp; K- = negativna kontrola (foto O. Stanojević).



Slika 22. Amplifikovani geni kurstakinskog operona (1125, 1152, 1161, 1167, 1173 bp): M = marker 100 bp; K- = negativna kontrola (foto O. Stanojević).

Kod svih testiranih antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva utvrđeno je prisustvo bar jednog gena za biosintezu lipopeptida. Kod 13 sojeva je utvrđeno prisustvo tri od pet gena, 13 sojeva je imalo dva od pet gena a sedam sojeva je bilo pozitivno na jedan od pet testiranih gena (**Tabela 5**).

Zbog izraženog antifungalnog dejstva koji su lipopeptidi iz familije iturina pokazali u brojnim studijama, mogu se izdvojiti *B. amyloliquefaciens* sojevi B-129, B-241, B-268, *B. subtilis* B-309, B-319 i B-358 koji nose gen iturinskog operona, pri čemu sojevi B-241, B-309 i B-358 poseduju i gen za bacilomicin D koji pripada familiji iturina.

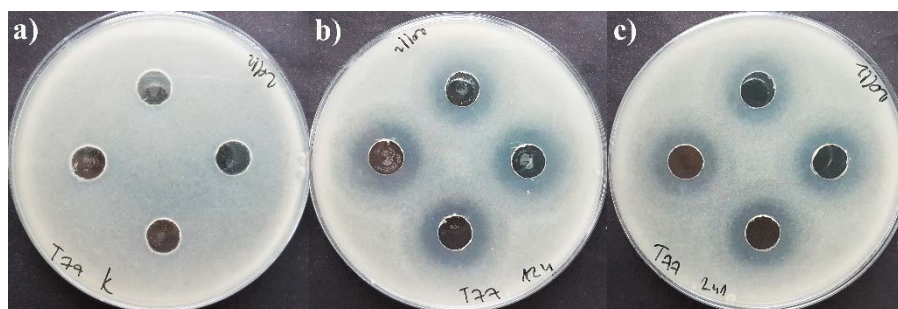
Tabela 5. Detekcija gena za sintezu lipopeptida (surfaktina, iturina, fengicina, kurstakina i bacilomicina D) kod antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva.

<i>Bacillus</i> spp. sojevi	<i>sfp</i>	<i>ituA; ituB</i>	<i>fenD</i>	<i>krsA; krsB; krsC</i>	<i>bamC</i>
<i>B. subtilis</i> B-106	+		+	+	
<i>B. subtilis</i> B-107	+		+	+	
<i>B. subtilis</i> B-108	+		+	+	
<i>B. subtilis</i> B-109	+		+	+	
<i>B. subtilis</i> B-110	+		+	+	
<i>B. subtilis</i> B-111	+		+	+	
<i>B. subtilis</i> B-112	+		+	+	
<i>B. subtilis</i> B-124	+		+	+	
<i>B. subtilis</i> B-126	+		+	+	
<i>B. subtilis</i> B-128	+			+	
<i>B. amyloliquefaciens</i> B-129		+		+	
<i>B. pumilus</i> B-138				+	
<i>B. pumilus</i> B-217				+	
<i>B. subtilis</i> B-233	+			+	
<i>B. amyloliquefaciens</i> B-241		+		+	+
<i>B. subtilis</i> B-253	+			+	
<i>B. pumilus</i> B-254				+	
<i>B. pumilus</i> B-256				+	+
<i>B. pumilus</i> B-257				+	
<i>B. amyloliquefaciens</i> B-268		+		+	
<i>B. subtilis</i> B-270	+		+	+	
<i>B. licheniformis</i> B-276				+	
<i>B. subtilis</i> B-308				+	+
<i>B. subtilis</i> B-309		+		+	+
<i>B. subtilis</i> B-310				+	+
<i>B. subtilis</i> B-313				+	+
<i>B. subtilis</i> B-319		+		+	
<i>B. subtilis</i> B-322				+	+
<i>B. subtilis</i> B-325				+	+
<i>B. pumilus</i> B-335				+	
<i>B. subtilis</i> B-338	+				
<i>B. subtilis</i> B-348	+			+	
<i>B. subtilis</i> B-358		+		+	+

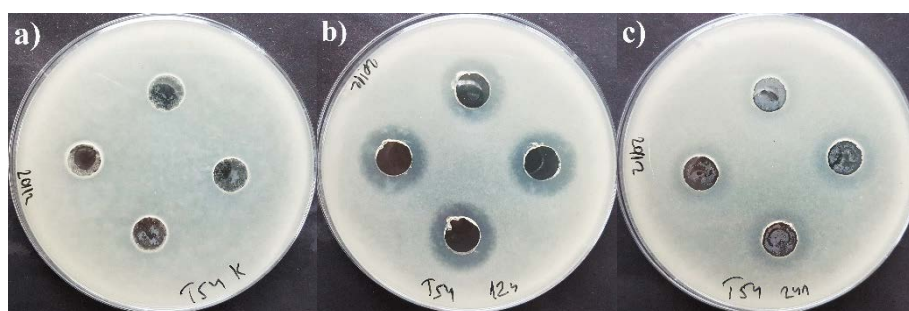
* Zelenom bojom su obeleženi sojevi kod kojih je detektovano tri gena za lipopeptide, ljubičastom sojevi kod kojih je prisutno dva gena a narandžastom sojevi koji nose samo jedan gen za lipopeptide.

4.4.2. Ispitivanje antifungalne aktivnosti supernatanata *in vitro*

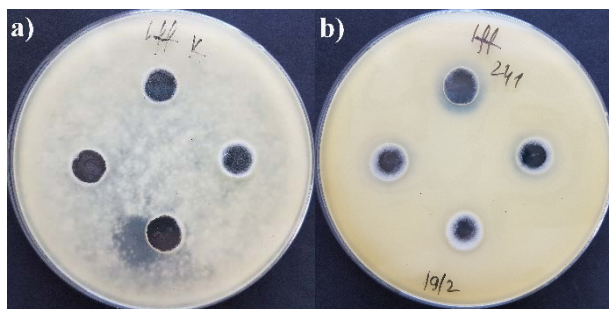
Uticaj supernatanata 33 antagonistička *Bacillus* spp. soja na rast patogena šampinjona *T. aggressivum* f. *europaeum* T77, *T. harzianum* T54 i *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 ispitan je difuzionom metodom u bunarićima (Slike 23.1, 23.2, 23.3). Nakon inkubacije na optimalnoj temperaturi za rast patogenih gljiva mereni su prečnici zone inhibicije rasta patogena (zajedno sa bunarićima prečnika 10 mm). Pojava zone inhibicije rasta izolata patogenih gljiva ukazuje na sposobnost *Bacillus* spp. sojeva za produkciju antimikrobnih supstanci dok njena veličina odgovara stepenu osetljivosti patogena.



Slika 23.1. Uticaj supernatanata *Bacillus* spp. sojeva na rast *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* T77 *in vitro*: a) kontrola, b) *Bacillus subtilis* B-124, c) *Bacillus amyloliquefaciens* B-241 (foto O. Stanojević).

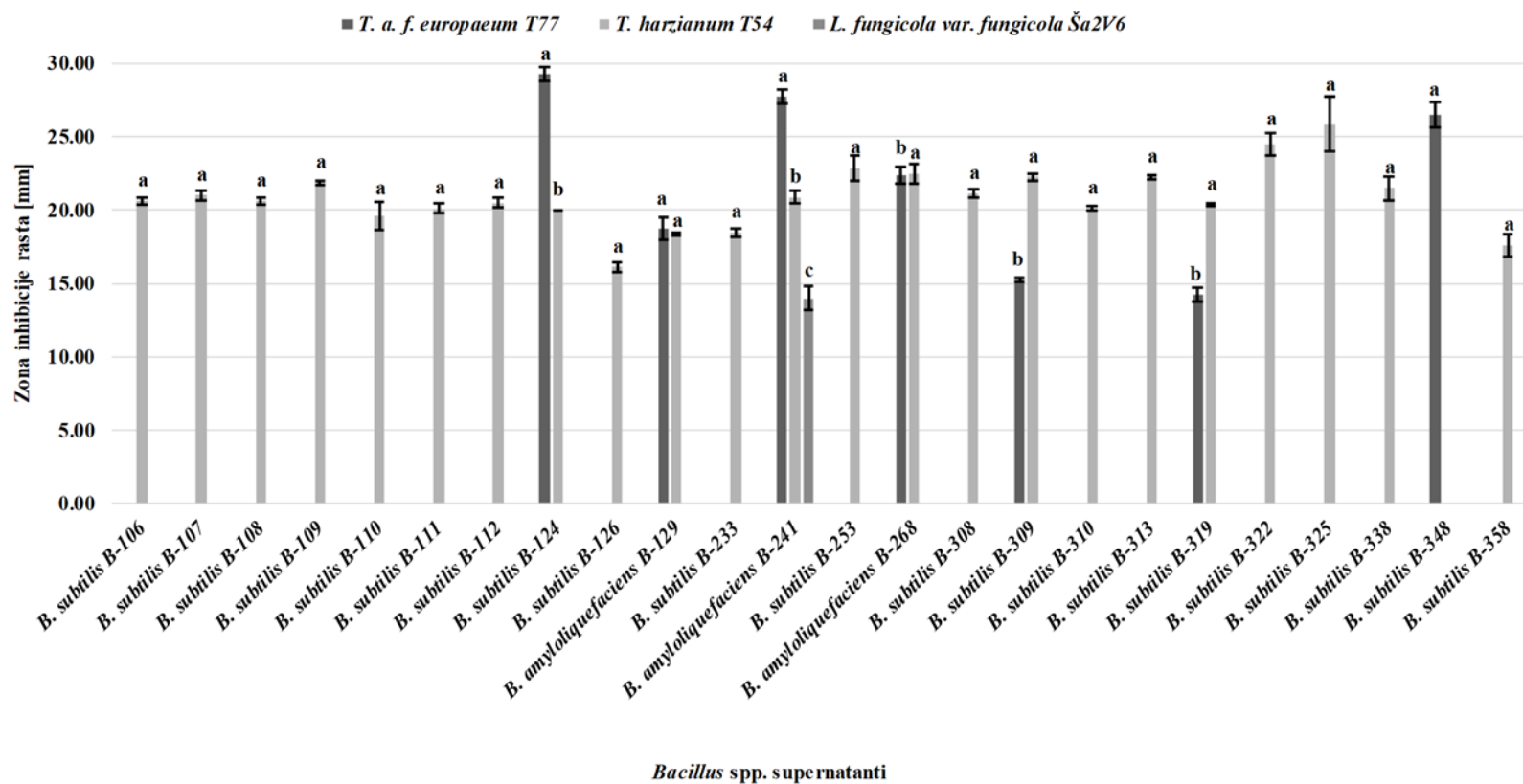


Slika 23.2. Uticaj supernatanata *Bacillus* spp. sojeva na rast *Trichoderma harzianum* T54 *in vitro*: a) kontrola, b) *Bacillus subtilis* B-124, c) *Bacillus amyloliquefaciens* B-241 (foto O. Stanojević).



Slika 23.3. Uticaj supernatanta *Bacillus* spp. sojeva na rast *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆ *in vitro*: a) kontrola, b) *Bacillus amyloliquefaciens* B-241 (foto O. Stanojević).

Najosetljivijom od tri gljive se pokazala *T. harzianum* T54 čiji su rast inhibirala 23 *Bacillus* spp. soja (Slika 24). Prečnici zona inhibicije rasta kretali su se između 16 mm i 25 mm, koje su izazvali sojevi *B. subtilis* B-126 i *B. subtilis* B-325, redom. Zone inhibicije veće od 20 mm prouzrokovalo je 17 od 33 soja *Bacillus* spp. Inhibiciju rasta *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 indukovalo je sedam *Bacillus* spp. sojeva. Najefikasnijim protiv datog patogena se pokazao supernatant soja *B. subtilis* B-124 dok je najslabiju inhibiciju izazvao supernatant soja *B. subtilis* B-319. Samo supernatant soja *B. amyloliquefaciens* B-241 doveo je do inhibicije rasta *L. fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆ (14 mm), pri čemu je osetljivost ovog patogena bila statistčki značajno manja od osetljivosti prouzrokovala zelene plesni šampinjona. Supernatanti pet *Bacillus* spp. sojeva inhibirali su rast dve testirane patogene gljive (*T. harzianum* i *T. aggressivum*) a samo jedan je izazvao inhibiciju sva tri izolata fungalnih patogena.



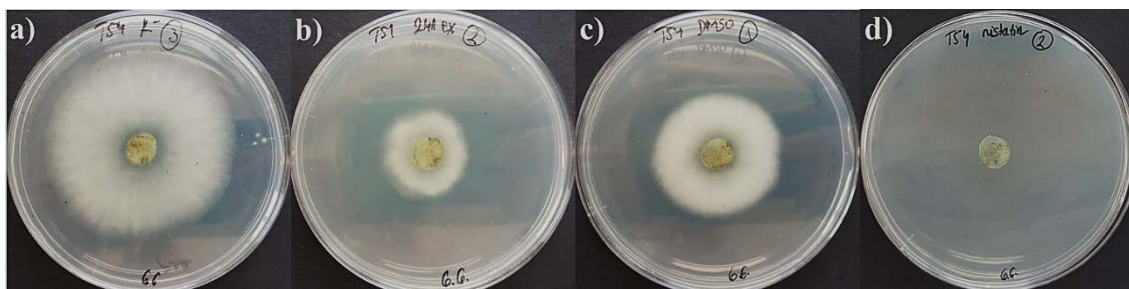
Slika 24. Uticaj supernatanta *Bacillus* spp. sojeva na rast patogena *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* T77, *Trichoderma harzianum* T54 i *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 *in vitro*. Prikazane su srednje vrednosti (n=4) i standardne greške. Vrednosti obeležene istim slovom u okviru svakog soja nisu statistički značajno različite, prema Tukey-evom HSD testu ($P < 0,05$).

4.4.3. Uticaj lipopeptidnog ekstrakta na rast patogenih gljiva šampinjona

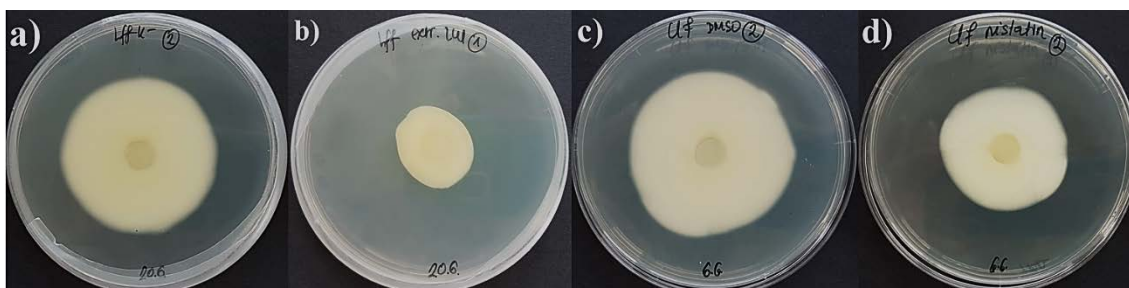
Efekat lipopeptidnog ekstrakta soja *B. amyloliquefaciens* B-241 prema *T. aggressivum* f. *europaeum* T77, *T. harzianum* T54 i *L. fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆ testiran je metodom radijalne inhibicije rasta patogenih gljiva (Slike 25.1, 25.2, 25.3).



Slika 25.1. Uticaj etil-acetatnog ekstrakta lipopeptida na rast *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* T77 *in vitro*: a) kontrola, b) ekstrakt soja *Bacillus amyloliquefaciens* B-241, c) DMSO, d) nistatin (foto O. Stanojević).

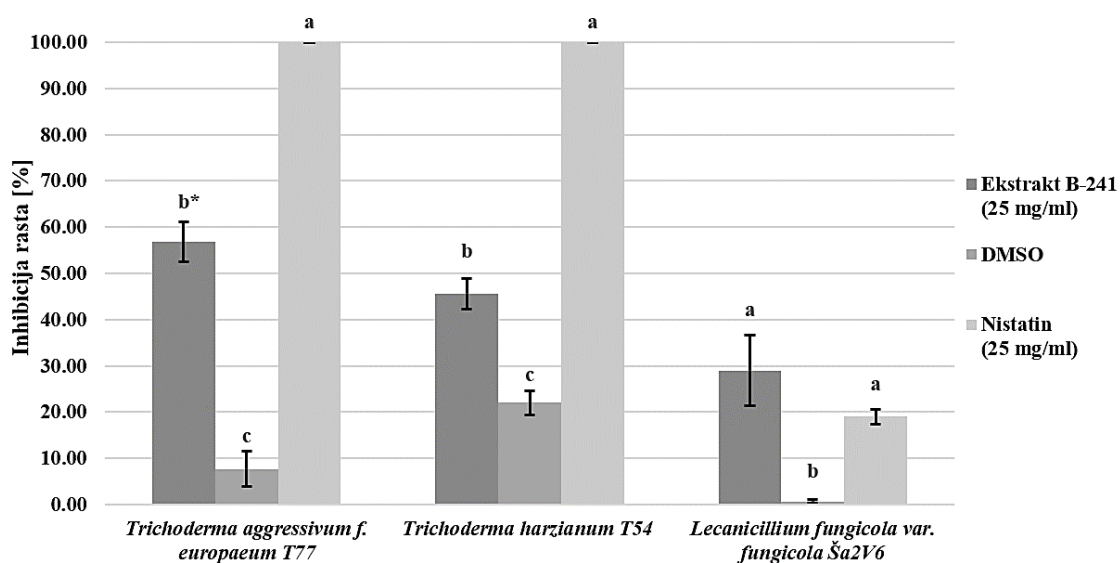


Slika 25.2. Uticaj etil-acetatnog ekstrakta lipopeptida na rast *Trichoderma harzianum* T54 *in vitro*: a) kontrola, b) ekstrakt soja *Bacillus amyloliquefaciens* B-241, c) DMSO, d) nistatin (foto O. Stanojević).



Slika 25.3. Uticaj etil-acetatnog ekstrakta lipopeptida na rast *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆ *in vitro*: a) kontrola, b) ekstrakt soja *Bacillus amyloliquefaciens* B-241, c) DMSO, d) nistatin (foto O. Stanojević).

U slučaju patogena *T. aggressivum f. europaeum* T77, antibiotik nistatin testiran kao pozitivna kontrola potpuno je inhibirao rast gljive dok je lipopeptidni ekstrakt soja *B. amyloliquefaciens* B-241 izazvao inhibiciju od 56,81%. Rastvarač DMSO je takođe pokazao inhibitorni efekat na gljivu od 7,70%. Patogen *T. harzianum* T54 je u istoj meri bio osetljiv na nistatin (100%), dok je pokazao manju osetljivost na dejstvo lipopeptidnog ekstrakta (45,62%) a veću osetljivost na DMSO (22,01%). Lipopeptidni ekstrakt soja *B. amyloliquefaciens* B-241 je inhibirao rast prouzrokovača suve truleži *L. fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆ za 28,94%. Dejstvo nistatina prema patogenu se nije statistički značajno razlikovalo od dejstva ekstrakta dok sam rastvarač nije imao inhibitorni efekat na ovog patogena (Slika 26).



Slika 26. *In vitro* uticaj lipopeptidnog ekstrakta soja *Bacillus amyloliquefaciens* B-241 na rast patogena *Trichoderma aggressivum f. europaeum* T77, *Trichoderma harzianum* T54 i *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆. Prikazane su srednje vrednosti (n=3) i standardne greške. *Vrednosti obeležene istim slovom u okviru svakog patogena nisu statistički značajno različite prema Tukey-evom HSD testu ($P < 0,05$).

4.5. Ispitivanje efekta *Bacillus* spp. sojeva na rast micelije šampinjona *in situ*

Nakon 11 dana merenja, porast micelije šampinjona kroz tretiran i netretiran kompost bio je: 10,4 mm/danu (*B. subtilis* B-348 i *B. subtilis* B-124); 9,9 mm/danu (kontrola); 9,8 mm/danu (*B. amyloliquefaciens* B-241 i *B. subtilis* B-233) i 9,7 mm/danu (*B. pumilus* B-138). Nisu uočene statistički značajne razlike između tretmana *Bacillus* spp. sojevima i negativne kontrole na porast micelije *A. bisporus* (prema Tukey-evom HSD testu $P=0,095$).

4.6. Efikasnost *Bacillus* spp. sojeva u suzbijanju patogena i uticaj na prinos šampinjona *in vivo*

Ispitivanje efikasnosti odabranih *Bacillus* spp. sojeva (*B. amyloliquefaciens* B-241, *B. pumilus* B-138, *B. subtilis* B-233, *B. subtilis* B-124, *B. subtilis* B-348) u suzbijanju prouzrokovača zelene plesni i suve truleži šampinjona, kao i njihovog uticaja na prinos šampinjona, izvedeno je u dva nezavisna *in vivo* eksperimenta po patogenu. Zaštitni efekat *Bacillus* spp. sojeva i njihov uticaj na prinos šampinjona poređen je sa komercijalno dostupnim biofungicidom na bazi soja *B. velezensis* QST 713 i komercijalnim fungicidom prochloraz-manganom. Ispitivanje suzbijanja prouzrokovača zelene plesni *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 izvršeno je u trajanju od jednog meseca i 23 dana (22. mart – 15. maj 2017. godine), a ponovljeni *in vivo* eksperiment trajao je jedan mesec i 28 dana (25. maj – 12. jul 2017. godine). U periodu od 14. novembra 2017. do 22. januara 2018. godine i od 14. marta do 21. maja 2018. godine izvedeni su *in vivo* eksperimenti sa ciljem ispitivanja efikasnosti *Bacillus* spp. sojeva za suzbijanje prouzrokovača suve truleži šampinjona *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6.

Zdravi šampinjoni i oni sa simptomima zelene plesni su ručno brani tokom 25 dana u prvom *in vivo* eksperimentu, a tokom 18 dana u drugom. Simptomi bolesti na plodonosnim telima u vidu smeđih nekrotičnih lezija pojavili su se 17. dana u prvom, odnosno 15. dana u drugom *in vivo* eksperimentu (**Slika 27**). Kolonije *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 smaragdno zelene boje nakon intenzivne sporulacije uočene su na

površini pokrivke dve nedelje kasnije (**Slika 28**). Sa odmicanjem eksperimenata povećavao se i broj plodonosnih tela sa simptomima zelene plesni, kao i broj kutija u kojima je došlo do pojave karakterističnih kolonija patogena.



Slika 27. Nekrotične lezije kao simptomi zelene plesni na plodonosnom telu šampinjona (foto O. Stanojević).



Slika 28. Kolonije *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* T77 smaragdno zelene boje na pokrivci (foto O. Stanojević).

Simptomi suve truleži šampinjona javili su se 21. i 26. dana u eksperimentu L-I i L-II, redom. Plodonošenje i branje šampinjona trajalo je 35 u prvom, odnosno 34 dana u drugom eksperimentu, pri čemu se učestalost simptoma povećavala kako se eksperiment bližio kraju. Sve vrste simptoma prouzrokovane patogenom *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 bile su uočene tokom oba *in vivo* eksperimenta – lezije na plodonosnim telima šampinjona, uzdužno cepanje drške i “suva trulež” (Slika 29).

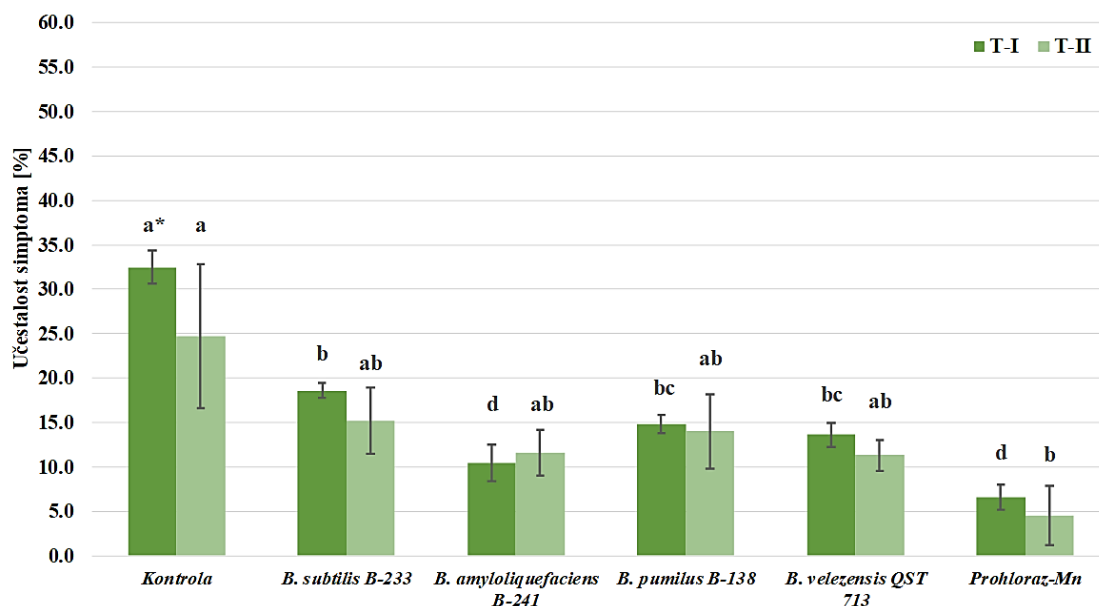


Slika 29. Simptomi suve truleži šampinjona: nekrotične lezije (levo), povijanje i početak uzdužnog cepanja drške (sredina), bezoblična micelijalna masa „suva trulež” (desno) (foto O. Stanojević).

4.6.1. Efikasnost tretmana za suzbijanje prouzrokovala zelene plesni i suve truleži šampinjona

Uspeh tretmana u suzbijanju prouzrokovala zelene plesni i suve truleži šampinjona ocenjen je na osnovu poređenja vrednosti pojave simptoma bolesti (I) u netretiranim inokulisanim i tretiranim varijantama. Na osnovu dobijenih vrednosti učestalosti simptoma određena je i efikasnost (E) svakog tretmana u sva četiri *in vivo* eksperimenta.

Učestalost simptoma zelene plesni šampinjona prikazana je na **Slici 30**.

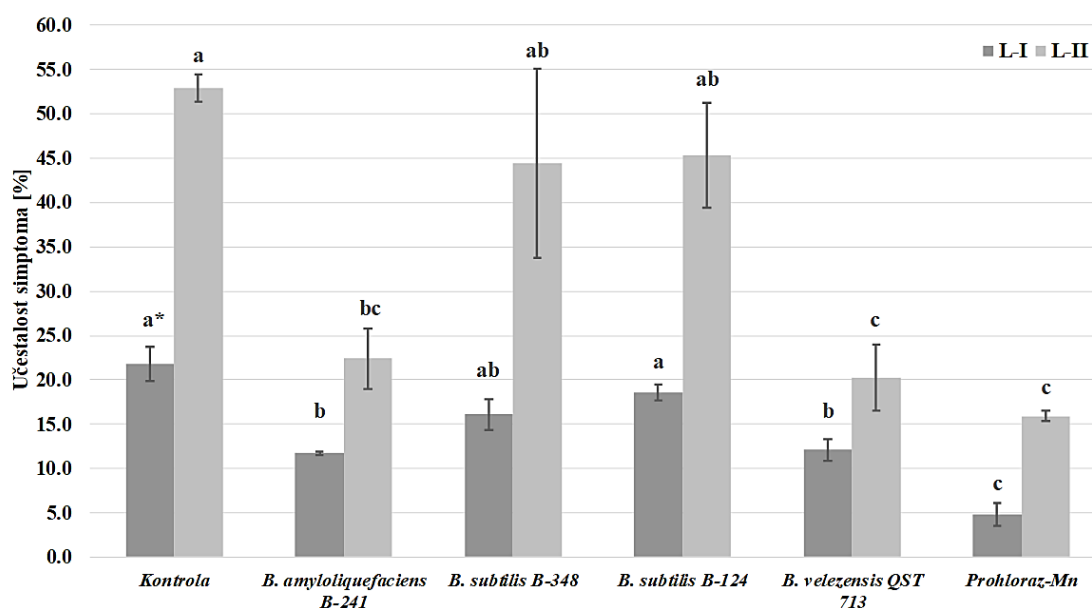


Slika 30. Učestalost simptoma zelene plesni šampinjona u dva nezavisna *in vivo* eksperimenta (T-I i T-II) u netretiranoj kontroli i nakon tretmana. Prikazane su srednje vrednosti (n=6) sa standardnim greškama. *Vrednosti obeležene istim slovom unutar serije nisu statistički značajno različite prema Tukey-evom HSD testu ($P < 0,05$).

Najveća učestalost simptoma u oba *in vivo* eksperimenta je zabeležena u netretiranim kontrolama, 32,5% u T-I i 24,7% u T-II. U prvom eksperimentu postojale su statistički značajne razlike između učestalosti simptoma u kontroli i svim tretmanima. Najniže I vrednosti su dobijene nakon tretmana sa prohloraz-Mn (6,6%) i *B. amyloliquefaciens* B-241 (10,4%), bez statistički značajnih razlika. U drugom eksperimentu T-II, statistički značajne razlike su postojale između učestalosti simptoma u kontroli i varijantama tretiranim komercijalnim fungicidom prohloraz-Mn (4,5%). Vrednosti I nakon tretmana komercijalnim biofungicidom na bazi *B. velezensis* QST 713 i novoizolovanim *Bacillus* spp. sojevima nisu se statistički značajno razlikovale.

Efikasnost tretmana u suzbijanju prouzrokovala zelene plesni šampinjona u T-I ogledu bila je (od najveće ka najmanjoj): prohloraz-Mn (80,1%), *B. amyloliquefaciens* B-241 (67,6%), *B. velezensis* QST 713 (57,3%), *B. pumilus* B-138 (56,3%) i *B. subtilis* B-233 (45,5%). U drugom T-II ogledu najveću efikasnost je takođe pokazao prohloraz-Mn (88,7%), zatim *B. velezensis* QST 713 (52,3%), *B. amyloliquefaciens* B-241 (51,7%), *B. pumilus* B-138 (40,0%) i *B. subtilis* B-233 (34,9%).

Učestalost simptoma suve truleži šampinjona u prvom *in vivo* eksperimentu L-I bila je najveća u netretiranoj inokulisanoj kontroli i varijanti tretiranoj sojem *B. subtilis* B-124, dok je najniža vrednost zabeležena nakon tretmana prohloraz-manganom (Slika 31).



Slika 31. Učestalost simptoma suve truleži šampinjona u dva nezavisna *in vivo* eksperimenta (L-I i L-II) u netretiranoj kontroli i nakon tretmana. Prikazane su srednje vrednosti (n=6) sa standardnim greškama. *Vrednosti obeležene istim slovom unutar serije nisu statistički značajno različite prema Tukey-evom HSD testu ($P < 0,05$).

Takođe, nije bilo statistički značajnih razlika između I vrednosti nakon primene biofungicida na bazi *B. velezensis* QST 713 i soja *B. amyloliquefaciens* B-241. Slično kao u prvom, u drugom L-II eksperimentu netretirana kontrola se odlikovala najvećom učestalošću simptoma (52,9%). Najmanja učestalost simptoma zabeležena je u varijantama tretiranim komercijalnim fungicidom (15,9%) i biofungicidom (20,3%), bez statistički značajnih razlika. Među sva tri *Bacillus* spp. soja, najmanja I vrednost je dobijena nakon tretmana sojem *B. amyloliquefaciens* B-241.

U prvom eksperimentu u gajilištu L-I, najefikasniji tretman bio je prohloraz-Mn koji je doveo do suzbijanja simptoma suve truleži za 77,3%. Sledeći po efikasnosti bili su tretmani sojevima *B. amyloliquefaciens* B-241 i *B. velezensis* QST 713, postigavši efikasnost u suzbijanju suve truleži od 45,1% i 42,9%, redom. Najmanje efikasni su bili tretmani sojevima *B. subtilis* B-348 (23,9%) i *B. subtilis* B-124 (12,3%). U drugom *in vivo* eksperimentu najveću efikasnost su pokazali redom: prohloraz-Mn (70,0%), *B. velezensis* QST 713 (62,0%), *B. amyloliquefaciens* B-241 (57,8%), *B. subtilis* B-348 (17,8%) i *B. subtilis* B-124 (14,8%).

4.6.2. Uticaj tretmana na prinos šampinjona

Uticaj sojeva na prinos šampinjona, odnosno biološka efikasnost (BE) ispitana je u inokulisanim i neinokulisanim kontrolama i tretmanima u sva četiri *in vivo* eksperimenta, kako bi se isključio negativan uticaj sojeva na domaćina. Masa suvog supstrata u prvom *in vivo* eksperimentu sa *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 iznosila je 910 g a u drugom 535 g. U eksperimentima sa *L. fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆, suva masa supstrata u L-I eksperimentu iznosila je 495 g dok je u L-II eksperimentu bila 454 g.

U prvom eksperimentu sa prouzročivačem zelene plesni šampinjona, prinos se kretao između 58,7% u neinokulisanjoj varijanti tretiranoj sojem *B. amyloliquefaciens* B-241 i 81,4% u inokulisanjoj varijanti tretiranoj sojem *B. velezensis* QST 713. U drugom *in vivo* eksperimentu je prinos šampinjona bio veći u svim varijantama i kretao se između 71,8% (neinokulisana varijanta tretirana prohloraz-manganom) i 87,2% (neikonkulisana varijanta tretirana sojem *B. subtilis* B-233). Nije bilo statistički značajnih razlika u BE vrednosti između 12 testiranih varijanti (**Tabela 6**).

Tabela 6. Uticaj tretmana na masu zdravih i bolesnih šampinjona i ukupni prinos (BE) u dva *in vivo* eksperimenta sa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* T77 (T-I i T-II).

	Tretmani	Masa šampinjona [g]*		BE (%)*	
		zdravi	bolesni		
T-I	Kontrola	460,4 ^{a**} ± 89,04	107,4 ^a ± 34,12	62,4 ^a ± 12,19	
	Neinokulisano	<i>B. subtilis</i> B-233	578,5 ^a ± 58,80	93,6 ^a ± 17,89	73,8 ^a ± 5,37
		<i>B. amyloliquefaciens</i> B-241	481,6 ^a ± 66,15	52,3 ^a ± 15,84	58,7 ^a ± 8,53
		<i>B. pumilus</i> B-138	548,5 ^a ± 34,61	121,2 ^a ± 51,14	73,6 ^a ± 3,17
		<i>B. velezensis</i> QST 713	529,0 ^a ± 61,64	141,1 ^a ± 44,69	73,6 ^a ± 3,67
		Prohloraz-Mn	653,0 ^a ± 75,65	54,5 ^a ± 23,41	77,7 ^a ± 7,75
		Kontrola	632,3 ^a ± 47,48	95,7 ^a ± 19,47	80,0 ^a ± 3,66
	Inokulisano	<i>B. subtilis</i> B-233	556,5 ^a ± 36,00	148,3 ^a ± 24,39	77,4 ^a ± 3,91
		<i>B. amyloliquefaciens</i> B-241	636,4 ^a ± 62,39	64,3 ^a ± 25,49	77,0 ^a ± 7,51
		<i>B. pumilus</i> B-138	524,9 ^a ± 53,87	114,5 ^a ± 25,85	70,2 ^a ± 5,89
		<i>B. velezensis</i> QST 713	642,5 ^a ± 29,04	98,8 ^a ± 9,77	81,4 ^a ± 3,23
		Prohloraz-Mn	648,8 ^a ± 41,40	38,7 ^a ± 17,05	75,5 ^a ± 4,04
		Kontrola	368,8 ^{a**} ± 6,82	32,7 ^a ± 8,67	75,0 ^a ± 2,16
	T-II	Kontrola	368,8 ^{a**} ± 6,82	32,7 ^a ± 8,67	75,0 ^a ± 2,16
Neinokulisano		<i>B. subtilis</i> B-233	404,6 ^a ± 16,64	61,7 ^a ± 20,16	87,2 ^a ± 2,03
		<i>B. amyloliquefaciens</i> B-241	350,6 ^a ± 23,35	62,1 ^a ± 20,70	77,1 ^a ± 6,19
		<i>B. pumilus</i> B-138	328,9 ^a ± 33,90	77,6 ^a ± 22,81	76,0 ^a ± 4,75
		<i>B. velezensis</i> QST 713	342,6 ^a ± 27,98	98,3 ^a ± 30,26	82,4 ^a ± 5,60
		Prohloraz-Mn	329,9 ^a ± 33,73	54,0 ^a ± 17,81	71,8 ^a ± 6,19
		Kontrola	352,2 ^a ± 27,08	85,7 ^a ± 22,72	81,9 ^a ± 2,86
Inokulisano		<i>B. subtilis</i> B-233	374,3 ^a ± 39,05	78,9 ^a ± 18,41	84,7 ^a ± 6,29
		<i>B. amyloliquefaciens</i> B-241	353,2 ^a ± 9,74	61,4 ^a ± 16,74	77,5 ^a ± 2,61
		<i>B. pumilus</i> B-138	376,0 ^a ± 24,82	89,0 ^a ± 22,17	86,9 ^a ± 1,26
		<i>B. velezensis</i> QST 713	386,1 ^a ± 26,19	40,1 ^a ± 11,53	79,7 ^a ± 5,03
		Prohloraz-Mn	401,5 ^a ± 30,94	33,5 ^a ± 18,33	81,3 ^a ± 3,86

* Srednje vrednosti (n=6) ± standardne greške

** Vrednosti obeležene istim slovom u okviru kolone nisu statistički značajno različite ($P < 0,05$).

U *in vivo* eksperimentima sa prouzročivačem suve truleži šampinjona, prinos je bio viši u odnosu na eksperimente sa zelenom plesni šampinjona. U prvom eksperimentu u gajilištu, najveći prinos šampinjona je uočen kod neinokulisanih varijanti tretiranih sojem *B. subtilis* B-348 (151,0%) a najniži kod neinokulisanih varijanti tretiranih sojem *B. subtilis* B-124 (129,0%). Sve varijante su se odlikovale prinosom većim od 100%. U drugom *in vivo* eksperimentu je biološka efikasnost veća od 100% zabeležena u samo

četiri varijante. U inokulisanoj varijanti tretiranoj komercijalnim fungicidom prochloraz-manganom dobijen je najveći prinos šampinjona od 110,4% dok je u neinokulisanoj kontroli zabeležen najmanji prinos (81,4%). Bez obzira na varijacije u biološkoj efikasnosti, analize nisu pokazale statistički značajne razlike između 12 ispitivanih varijanti (**Tabela 7**).

Tabela 7. Uticaj tretmana na masu zdravih i bolesnih šampinjona i ukupni prinos (BE) u dva *in vivo* eksperimenta sa *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆ (L-I i L-II).

	Tretmani	Masa šampinjona [g]*		BE (%)*	
		zdravi	bolesni		
L-I	Kontrola	632,1 ^{a**} ± 32,61	52,1 ^{bc} ± 14,47	138,2 ^a ± 4,42	
	Neinokulisano	<i>B. amyloliquefaciens</i> B-241	644,5 ^a ± 40,70	36,8 ^{bc} ± 10,41	137,6 ^a ± 7,65
		<i>B. subtilis</i> B-348	680,0 ^a ± 29,71	67,2 ^{bc} ± 23,85	151,0 ^a ± 8,48
		<i>B. subtilis</i> B-124	610,5 ^a ± 45,91	27,8 ^c ± 9,60	129,0 ^a ± 8,15
		<i>B. velezensis</i> QST 713	629,7 ^a ± 27,61	36,8 ^{bc} ± 19,13	134,7 ^a ± 7,82
		Prochloraz-Mn	620,1 ^a ± 16,95	41,2 ^{bc} ± 18,72	133,6 ^a ± 3,33
		Kontrola	580,1 ^a ± 54,85	78,8 ^{abc} ± 12,91	133,1 ^a ± 12,71
	Inokulisano	<i>B. amyloliquefaciens</i> B-241	583,0 ^a ± 39,56	127,6 ^{abc} ± 23,19	143,6 ^a ± 9,54
		<i>B. subtilis</i> B-348	576,8 ^a ± 21,70	131,5 ^{ab} ± 22,79	143,1 ^a ± 7,70
		<i>B. subtilis</i> B-124	511,8 ^a ± 31,46	179,4 ^a ± 22,89	139,6 ^a ± 9,29
		<i>B. velezensis</i> QST 713	569,8 ^a ± 85,34	117,5 ^{abc} ± 31,30	138,9 ^a ± 17,33
		Prochloraz-Mn	588,0 ^a ± 56,01	95,1 ^{abc} ± 31,30	138,0 ^a ± 8,06
Kontrola		330,7 ^{a**} ± 73,43	39,2 ^{abc} ± 17,95	81,4 ^a ± 19,20	
L-II	Kontrola	330,7 ^{a**} ± 73,43	39,2 ^{abc} ± 17,95	81,4 ^a ± 19,20	
	Neinokulisano	<i>B. amyloliquefaciens</i> B-241	337,8 ^a ± 76,35	34,5 ^{bc} ± 17,90	81,9 ^a ± 18,42
		<i>B. subtilis</i> B-348	405,0 ^a ± 73,20	71,8 ^{abc} ± 22,65	104,9 ^a ± 19,82
		<i>B. subtilis</i> B-124	316,9 ^a ± 75,42	8,1 ^c ± 4,35	85,8 ^a ± 8,29
		<i>B. velezensis</i> QST 713	347,7 ^a ± 77,90	37,4 ^{bc} ± 19,54	84,7 ^a ± 18,37
		Prochloraz-Mn	369,0 ^a ± 78,10	58,2 ^{abc} ± 21,32	94,0 ^a ± 20,81
		Kontrola	311,9 ^a ± 37,46	143,4 ^{ab} ± 24,96	100,2 ^a ± 4,52
	Inokulisano	<i>B. amyloliquefaciens</i> B-241	336,1 ^a ± 32,74	95,6 ^{abc} ± 22,57	95,0 ^a ± 3,59
		<i>B. subtilis</i> B-348	369,5 ^a ± 27,44	123,0 ^{ab} ± 35,68	108,4 ^a ± 2,39
		<i>B. subtilis</i> B-124	261,4 ^a ± 47,66	134,2 ^{ab} ± 31,91	87,1 ^a ± 16,65
		<i>B. velezensis</i> QST 713	341,6 ^a ± 53,28	77,8 ^{abc} ± 15,14	92,3 ^a ± 10,36
		Prochloraz-Mn	354,5 ^a ± 37,12	147,0 ^a ± 23,59	110,4 ^a ± 8,72

* Srednje vrednosti (n=6) ± standardne greške

** Vrednosti obeležene istim slovom u okviru kolone nisu statistički značajno različite ($P < 0,05$).

5. DISKUSIJA

5. DISKUSIJA

Poslednjih nekoliko decenija najveće štete u proizvodnji šampinjona u Srbiji i svetu izazivaju prouzrokovajući zelene plesni i suve truleži, gljive roda *Trichoderma* i vrsta *L. fungicola*. Zelena plesan dovodi do razvoja smeđih nekrotičnih lezija na plodonosnim telima šampinjona koja brzo trule i nisu podobna za tržište. U slučaju infekcije komposta kompetitivom vrstom *T. aggressivum* formiranje plodonosnih tela izostaje pa dolazi do velikih gubitaka u prinosu šampinjona. Simptomi suve truleži, nekrotične lezije, uzdužno cepanje drške ili bezoblična micelijalna masa, dovode do smanjenja kvaliteta plodonosnih tela i njihove tržišne vrednosti. Do sada je u Srbiji proučavana mogućnost hemijskog suzbijanja ovih patogenih gljiva (Potočnik et al., 2008; Kosanović et al., 2013; Kosanović et al., 2015). Međutim, zbog poteškoća u prevenciji i suzbijanju bolesti šampinjona u gajilištima koji su posledica smanjene efikasnosti hemijskih fungicida, kao i zbog štetnih efekata takvih supstanci na životnu sredinu i neciljane organizme, postoji potreba za pronalaskom drugih načina zaštite. Sa tim ciljem je u Srbiji započeto ispitivanje mogućnosti upotrebe biljnih etarskih ulja, komercijalnih biofungicida i antagonističkih bakterijskih sojeva za efikasno suzbijanje ovih bolesti (Tanović et al., 2009; Kosanović et al., 2015; Potočnik et al., 2016; Milijašević-Marčić et al., 2017; Potočnik et al., 2018). Cilj ovog istraživanja bio je da se identifikuju novi sojevi roda *Bacillus*, čije se mnogobrojne vrste koriste kao biokontrolni agensi, sa mogućnošću primene u gajilištima šampinjona radi suzbijanja prouzrokovача zelene plesni i suve truleži.

U ispitivanju novih sojeva za biološko suzbijanje patogena šampinjona, izvor potencijalnih antagonističkih bakterija mora biti adekvatan i pažljivo odabran. Čest problem biokontrolnih agenasa je njihova nedosledna i nepredvidiva efikasnost zbog nepoznatog sastava i funkcije autohtone mikrobijalne zajednice – sredine u koju se vrši njegova introdukcija. Imajući u vidu da je krajnji cilj istraživanja dobijanje biopesticida sa zadovoljavajućim učinkom u gajilištima šampinjona, izolacija ovih bakterija vršena je iz supstrata za gajenje *A. bisporus*.

U našem istraživanju, sojevi *Bacillus* spp. izolovani su iz svih korišćenih supstrata, kompostnog materijala (slame i pilećeg stajnjaka), komposta u svim fazama kompostiranja i pokrivke, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Ryckeboer et al., 2003; Stanković et al., 2012; Agrawal et al., 2011; Agrawal, 2014; Milijašević-Marčić et

al., 2017). Veliki broj izolata dobijen je iz komposta u II fazi, što znači da je zastupljenost *Bacillus* spp. sojeva u kompostu i nakon pasterizacije bila značajna, najverovatnije kao posedica njihove sposobnosti formiranja endospora otpornih na visoke temperature. Kao dobri kompetitori, njihovo prisustvo u kompostu može imati zaštitni efekat tokom prorastanja vegetativne micelije *A. bisporus* kroz supstrat, fazi kada je domaćin podložan infekciji patogenom gljivom *T. aggressivum* f. *europaeum*.

Supstrat za gajenje šampinjona se pokazao kao značajan izvor antagonističkih bakterija, naročito pripadnika roda *Bacillus* (Kim et al., 2008; Bhat et al., 2010; Nagy et al., 2012; Liu et al., 2015; Akond et al., 2016; Milijašević-Marčić et al., 2017). Na primer, dva *Bacillus* spp. izolata dobijena iz komposta od pamuka inhibirala su rast *T. harzianum*, *Trichoderma koningii* Oudem. i *Trichoderma viridescens* (A.S. Horne & H.S. Williamson) Jaklitsch & Samuels *in vitro* (Kim et al., 2008). Drugo istraživanje pokazalo je da tri soja *B. subtilis* imaju *in vitro* inhibitorno dejstvo prema *T. harzianum*, *Trichoderma viride* Schumach i *Trichoderma pseudokoningii* Rifai (Shah and Nasreen, 2011). Takođe, pet bakterijskih sojeva sa antagonističkom aktivnošću prema *L. fungicola* izolovani su iz komposta i pokrivke za gajenje šampinjona (Bhat et al., 2010).

U našem istraživanju testirana je antagonistička aktivnost izolata *Bacillus* spp. prema četiri vrste roda *Trichoderma* izolovanih iz gajilišta šampinjona u Srbiji: *T. harzianum* T54, *T. aggressivum* f. *europaeum* T77, *T. koningii* T39 i *T. atroviride* T33. Ukupno 22 *Bacillus* spp. soja inhibiralo je rast sve četiri vrste roda *Trichoderma*. S obzirom na to da su prouzrokovali najvećih šteta u gajilištima šampinjona vrste *T. aggressivum* f. *europaeum* i *T. harzianum*, izolati T77 i T54 odabrani su za sva dalja *in vitro* istraživanja. Kolekcija antagonističkih bakterija formirana 2015. godine proširena je naredne godine dodavanjem još 11 novoizolovanih sojeva *Bacillus* spp. sa antagonističkim dejstvom prema *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *T. harzianum* T54, a zatim je testirano inhibitorno dejstvo svih sojeva *Bacillus* spp. na rast *L. fungicola* var. *fungicola* Š₂V₆ *in vitro* s ciljem izdvajanja biokontrolnih agenasa sa širim spektrom delovanja. Ukupno 33 *Bacillus* spp. soja inhibiralo je rast sva tri fungalna patogena. Procenti inhibicije rasta *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 kretali su se između 38% i 78%, za *T. harzianum* T54 iznosili su 46–76%, a PGI vrednosti za *L. fungicola* var. *fungicola* Š₂V₆ bile su u opsegu između 30% i 90%. Prouzrokovalac suve truleži bio je

najosetljiviji na aktivnost *Bacillus* spp. sojeva. Neka od retkih istraživanja *in vitro* antagonističkog dejstva odabranih bakterijskih sojeva prema *L. fungicola* su studije Bhat et al. (2010) gde je zabeleženo inhibitorno dejstvo pet neidentifikovanih bakterijskih izolata na rast *L. fungicola in vitro*, i Berendsen et al. (2012) koji su dokazali *in vitro* antifungalnu aktivnost 16 *Pseudomonas* spp. sojeva prema istom patogenu, mada znatno slabiju od antagonističke aktivnosti *Bacillus* spp. sojeva testiranih u našem istraživanju.

Precizna identifikacija antagonističkih sojeva, za potencijalnu komercijalnu primenu u zaštiti useva, je ključan korak koji omogućava da se iz daljih istraživanja isključe one vrste koje mogu predstavljati opasnost po čoveka, životinje, useve ili životnu sredinu (Köhl et al., 2011). Zbog velikog broja vrsta roda *Bacillus*, kao i velike genetičke heterogenosti sojeva, identifikacija nekih predstavnika do nivoa vrste predstavlja pravi izazov, naročito unutar *B. subtilis* grupe. U našem istraživanju, 33 *Bacillus* spp. soja koja su pokazala antagonističko dejstvo prema prouzrokovateljima zelene plesni i suve truleži šampinjona u *in vitro* uslovima podvrgnuta su identifikaciji na osnovu sekvence hipervarijabilnog (HV) regiona gena za 16S rRNK i *tuf* gena. Analizom sekvence HV regiona otkriveno je da antagonistički sojevi pripadaju vrstama *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* i *B. licheniformis*, pri čemu je postignuto jasno razdvajanje *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens* filogenetskih grana (Slike 15 i 16). Ovi nalazi su u skladu sa studijom Goto et al. (2000) koji su zaključili da je hipervarijabilni region gena za 16S rRNK visoko konzervisan unutar vrsta i pogodan za diskriminaciju blisko srodnih vrsta *B. subtilis* grupe.

Radi još pouzdanije identifikacije i potvrde dobijenih rezultata, urađena je i filogenetska analiza antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva na osnovu sekvence *tuf* gena čiji je produkt neophodan za vršenje osnovnih ćelijskih funkcija („housekeeping“ gen). Caamaño-Antelo et al. (2015) proglasili su ovaj gen najadekvatnijim od tri ispitivana „housekeeping“ gena (*tuf*, *gyrB* i *rpoB*) za diskriminaciju vrsta unutar *B. subtilis* i *B. pumilus* grupa. Međutim, filogenetska analiza na osnovu sekvenci *tuf* gena nije rezultovala dovoljno diskriminatornom identifikacijom u ovom istraživanju (Slika 17), jer nije postignuta diferencijacija kako između vrsta *B. pumilus* grupe (*B. pumilus*, *B. safensis* i *B. altitudinis*), tako ni između pripadnika *B. subtilis* grupe (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* i *B. velezensis*).

Među 33 antagonistička *Bacillus* spp. soja nisu detektovani potencijalni patogeni pripadnici *B. cereus* grupe. Iako su zabeleženi slučajevi trovanja ljudi hranom prouzrokovani vrstama *B. subtilis* i *B. licheniformis* (Pavić et al., 2005), sve vrste roda *Bacillus* izolovane u ovom istraživanju nose GRAS status („*Generally Recognized As Safe*“) i zvanično su sigurne za primenu u agroekosistemima.

Sledeći korak u istraživanju bilo je određivanje mehanizama delovanja antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva. Vrste ovog roda mogu ostvariti biokontrolno dejstvo kroz sve poznate mehanizme, pri čemu je antibioza najčešće izučavana.

Da bi se eliminisala kompeticija za hranljive materije i prostor kao mehanizam delovanja antagonističkih sojeva, ispitivana je aktivnost bezćelijskih supernatata *Bacillus* spp. sojeva prema tri fungalna patogena šampinjona u *in vitro* eksperimentima, kao i detekcija gena za lipopeptide u njihovim genomima. Inhibitorna aktivnost supernatata različitih sojeva varirala je u zavisnosti od testiranog patogena. Najosetljivija od sve tri testirane mikopatogene gljive bila je *T. harzianum* T54, čiji su rast inhibirali supernatanti 23 *Bacillus* spp. sojeva. Rast *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 inhibiralo je samo sedam *Bacillus* spp. sojeva pri čemu su razlike u indukovanim zonama inhibicije rasta bile veće nego u slučaju *T. harzianum* T54. Za razliku od prozrokovača zelene plesni, *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 bio je osetljiv na dejstvo supernatanta samo jednog soja, *B. amyloliquefaciens* B-241. Mnogobrojni su nalazi aktivnosti supernatata *Bacillus* spp. sojeva prema fitopatogenim gljivama i bakterijama (Romero et al., 2007; Berić et al., 2012; Dimkić et al., 2013; Dimkić et al., 2015; Xu et al., 2019), ali ne i prema fungalnim patogenima šampinjona. Jedan od retkih primera je istraživanje Fernandes and Kerkar (2019) koji su pokazali da halotolerantni soj *B. subtilis* proizvodi supstance sa inhibitornim dejstvom na *in vitro* rast *T. harzianum* i *L. fungicola*, indukujući zone inhibicije rasta prečnika 15 mm odnosno 28 mm. Nasuprot tome, u našem istraživanju zona inhibicije rasta *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 prouzrokovana sojem *B. amyloliquefaciens* B-241 bila je prečnika 14 mm, dok su zone inhibicije rasta *T. harzianum* T54 iznosile 16–26 mm.

Skrining 33 *Bacillus* spp. sojeva na prisustvo gena za sintezu lipopeptida pokazao je da svi ispitivani sojevi nose u svom genomu barem jedan gen koji učestvuje u sintezi lipopeptida. Geni kurstakinskog operona su bili najzastupljeniji u kolekciji

antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva, praćeni genom za surfaktin sintetazu, *fenD*, *bamC* genom i iturinskim operonom. Podjednak broj *Bacillus* spp. sojeva bio je pozitivan na prisustvo dva od pet i tri od pet ispitivanih gena dok je sedam sojeva nosilo samo jedan od ispitivanih gena u svom genomu. U prethodnim istraživanjima antimikrobnih supstanci za primenu u biološkom suzbijanju fitopatogena, kolekcija od 205 *Bacillus* spp. izolata iz slame, sena, stajskog đubriva i zemljišta testirana je na prisustvo gena za lipopeptide (Stanković et al., 2012). Za razliku od našeg istraživanja, najveći broj izolata u navedenim istraživanjima je pokazao potencijal za sintezu bacilomicina D, zatim kurstakina, surfaktina, iturina i fengicina. Međutim, razlike u zastupljenosti grupa ispitivanih lipopeptida su mogle biti i očekivane s obzirom na to da je u našem istraživanju selekcija antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva prethodila molekularnoj detekciji lipopeptidnih operona, što nije bio slučaj u navedenim istraživanjima u kojima je ispitivana čitava kolekcija. Istraživanje Mora et al. (2015) pokazalo je sličnu distribuciju gena za lipopeptide kod kolekcije *Bacillus* spp. izolovanih iz okruženja gajenih i divljih biljaka. Berić et al. (2012) su ispitivanjem prisustva gena za lipopeptide kod 51-og antagonističkog *Bacillus* spp. izolata iz prirode pokazali da je 33 izolata bilo pozitivno na iturine, dok je kod samo šest izolata detektovano prisustvo gena za surfaktin sintetazu. Bitno je i naglasiti da je u ovom slučaju ispitivana antibakterijska aktivnost protiv biljnih patogena. Ovi rezultati su donekle kontradiktorni s obzirom na to da su u preglednom radu Ongena and Jacques (2007) iturini okarakterisani kao jedinjenja sa izuzetnom antifungalnom aktivnošću dok je za surfaktine uglavnom pokazano antibakterijsko dejstvo. Međutim, sa nakupljanjem novih podataka iz mnogobrojnih istraživanja, u koje se ubrajaju i navedene publikacije ali i rezultati ovog rada, čini se da aktivnost lipopeptida nije tako jednoznačna.

Kao rezultat umnožavanja gena za surfaktine, iturine, bacilomicin D i fengicine u ovom radu, detektovani su PCR produkti očekivane dužine, osim u slučaju soja *B. pumilus* B-217 gde je umesto gena za fengicin sintetazu umnožen neodgovarajući DNK region i 14 sojeva kod kojih je nespecifično umnožen fragment DNK veličine 400–500 bp koji ne odgovara veličini gena za bacilomicin D sintetazu. U slučaju amplifikacije *krs* gena, nakon elektroforeze PCR produkata, kod samo dva *Bacillus* spp. soja uočene su samostalne trake odgovarajuće dužine dok je kod ostalih sojeva uočen veliki broj traka sa različitom pozicijom na agaroznom gelu što je rezultat nespecifične amplifikacije regiona

DNK molekula (**Slika 22**). U istraživanju Dimkić (2015) primećeno je slično, mada je kod soja *B. pumilus* SS-10.7, koji u molekularnom skriningu nije bio pozitivan na prisustvo jednog od *krs* gena, MALDI-TOF masenom spektrometrijom dokazana sposobnost produkcije kurstakina. Ovaj rezultat ukazuje na neprikladnost prajmera AKS-F/TKS-R za specifičnu amplifikaciju gena kurstakinskog operona kod vrsta *B. subtilis* i *B. pumilus* grupe, dizajniranih prvenstveno sa ciljem detekcije ovih gena kod sojeva vrste *B. thuringiensis* (Abderrahmani et al., 2011).

Ako se uporede rezultati uticaja bezćelijskih supernatanata na rast patogena *in vitro* i molekularne detekcije gena za lipopeptide, bitno je naglasiti da je devet *Bacillus* spp. sojeva bilo pozitivno na prisustvo gena koji učestvuju u sintezi barem jedne grupe lipopeptida, ali da njihovi supernatanti nisu imali inhibitorno dejstvo na rast patogenih gljiva *in vitro*. Među njima, kod pet *B. pumilus* sojeva i *B. licheniformis* B-276 soja detektovan je samo gen kurstakinskog operona, a tri soja (*B. subtilis* B-128 i B-270 i *B. pumilus* B-256) su pored ovog gena bili pozitivni na još neki od gena za lipopeptide (surfaktine i/ili fengicine i bacilomicin D). Kako je *in vitro* produkcija surfaktina najintenzivnija u toku ekspanzijske faze, fengicina na samom početku stacionarne faze, a iturina u toku stacionarne faze rasta bakterijske populacije (Koumoutsis et al., 2004; Berić et al., 2012; Dimkić et al., 2013), moguće objašnjenje za odsustvo inhibitornog efekta supernatanata ovih sojeva je niska početna koncentracija bakterijskih ćelija u kulturi. Objašnjenje može biti i to da je uprkos genetičkom potencijalu *Bacillus* spp. sojeva, sinteza pretpostavljenih lipopeptida u čistoj kulturi izostala zbog odsustva patogena (Cawoy et al., 2015; Chowdhury et al., 2015; Zihalirwa Kulimushi et al., 2017). Naime, pokazano je da ekspresija gena za lipopeptide zavisi pre svega od biotičkih, ali i abiotičkih faktora sredine, što sa ekološke strane gledišta omogućava adekvatan odgovor bakterijskih sojeva na prisustvo autohtonih mikroorganizama i kompetitivnu prednost (Price et al., 2007). Stoga, odsustvo aktivnosti supernatanata spomenutih *Bacillus* spp. sojeva nije iznenađujuće, s obzirom na to da samo prisustvo operona u genomu ne garantuje biosintezu i sekreciju lipopeptida. Isto tako, u istraživanju Abderrahmani et al. (2011) pokazano je da kurstakini imaju značajnu ulogu u invazivnom rastu producenta što može dovesti do pogrešnog zaključka da oni imaju antimikrobnu aktivnost. To znači da bi se antagonistički efekat mogao uočiti samo kada se testira puna kultura ali ne i

supernatant. U stvari, antifungalna aktivnost kurstakina pokazana je u samo jednom istraživanju i to samo protiv *Stachyobotrys charatum* (Hathout et al., 2000).

Kako bi se potvrdila pretpostavka da su jedinjenja odgovorna za antagonizam soja *B. amyloliquefaciens* B-241 lipopeptidi, izvršena je njihova ekstrakcija etil-acetatom i ispitivanje uticaja ekstrakta na radialni rast micelije patogena *in vitro*. Kriterijumi za odabir ovog soja bili su zadovoljavajuća antifungalna aktivnost prema sva tri testirana patogena i prisustvo iturinskog operona i *bamC* gena u genomu što je ukazivalo na potencijal za sintezu supstanci sa izraženim anifungalnim efektom (Ongena and Jaques, 2007). Etil-acetatni ekstrakt lipopeptida soja B-241 je uzrokovao inhibiciju rasta sva tri ispitivana patogena, pri čemu je redosled osetljivosti gljiva (od najveće ka najmanjoj) bio sledeći: *T. aggressivum* f. *europaeum* T77, *T. harzianum* T54 i *L. fungicola* var. *fungicola* Ša₂V₆. Očekivano, antibiotik nistatin, koji je korišćen kao pozitivna kontrola, potpuno je inhibirao rast *Trichoderma* spp., dok je u slučaju prouzrokovala suve truleži šampinjona ekstrakt soja B-241 pokazao statistički značajno veću antifungalnu aktivnost od testiranog antibiotika. Prema trenutnim saznanjima, u dostupnoj literaturi nema podataka o uticaju lipopeptida vrsta roda *Bacillus* na rast fungalnih patogena šampinjona, mada je njihov efekat na fitopatogene gljive intenzivno proučavan (Zhao et al., 2014; Cawoy et al., 2015, Chowdhury et al., 2015; Luo et al., 2015). Na primer, lipopeptidni ekstrakti sojeva *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-13.1 inhibirali su rast deset fitopatogenih gljiva u opsegu 67–100% i 45–90%, redom (Dimkić et al., 2013), dok je ekstrakt soja SS-12.6 testiran i protiv 11 fitopatogenih i saprobnih gljiva sa semena nevena, gde je izazvao inhibiciju rasta između 5% i 80% (Dimkić et al., 2015).

Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti antibioza kao mehanizam delovanja antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva, osim u slučaju devet sojeva kod kojih nije zabeležena antifungalna aktivnost supernatanata. Međutim, ne može se isključiti mogućnost postojanja drugih vidova biokontrolnog delovanja, pre svega kompeticije za hranljive materije i kompeticije za prostor, na šta upućuju i rezultati u dualnoj kulturi, gde je do inhibicije rasta patogena došlo kada je testirana puna kultura *Bacillus* spp. sojeva. Pored toga, u slučaju soja *B. amyloliquefaciens* B-241 dokazana je funkcija lipopeptidnih jedinjenja u antagonizmu prema fungalnim patogenima šampinjona, mada bi za tačnu identifikaciju aktivnih jedinjenja ekstrakta bila potrebna hemijska analiza masenom

spektrometrijom i/ili testiranje antagonističke aktivnosti knock-out mutanata koji su uvođenjem mutacije izgubili sposobnost sinteze lipopeptida.

Danas se na tržištu nalazi veliki broj preparata na bazi vrsta roda *Bacillus* za primenu protiv fitopatogenih gljiva i bakterija u različitim usevima, ali je u proizvodnji šampinjona odobrena primena samo jednog preparata na bazi *B. velezensis* QST 713 od 2008. godine (Pandini et al., 2018b). Mehanizam delovanja komercijalno dostupnog *B. velezensis* soja u biološkom suzbijanju zelene plesni *T. aggressivum* proučava se poslednjih godina, ali je mali broj objavljenih radova koji ispituju *in vivo* efikasnost novih sojeva. Pored toga, do sada nije pronađena nijedna metoda za efikasnu zaštitu šampinjona od bolesti suve truleži (Geösel, 2011).

Kao živi organizmi, biokontrolni agensi često pokazuju nedoslednost u delovanju koja proističe iz kompleksnih ekoloških interakcija agensa i patogena, kao i zavisnosti od uslova i načina njihove primene (Cawoy et al., 2011). Česta je pojava da biokontrolni agensi sa izuzetnim *in vitro* potencijalom ne postignu zadovoljavajući nivo efikasnosti u *in vivo* eksperimentima. Stoga je pažljiv odabir sojeva na osnovu rezultata dobijenih *in vitro*, a potvrđen testiranjem *in vivo*, presudan za uspeh u ispitivanju mogućnosti komercijalne primene potencijalnih biokontrolnih agenasa.

Radi doprinosa sprečavanju znatnih gubitaka prinosa šampinjona u komercijalnoj proizvodnji, cilj ovog istraživanja bio je pronalazak najboljeg kandidata za suzbijanje prouzrokovala zelene plesni i suve truleži. Pored efikasnosti tretmana *Bacillus* spp. sojevima u suzbijanju oboljenja, u četiri *in vivo* eksperimenta ispitan je i njihov uticaj na produktivnost šampinjona, kao bitan faktor koji određuje podobnost novih sojeva za komercijalnu primenu, naročito u slučajevima kada su i domaćin i patogen pripadnici istog carstva. Od dva prouzrokovala zelene plesni šampinjona, za *in vivo* eksperimente odabrana je *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 kao štetnija za proizvodnju šampinjona, uprkos nižoj osetljivosti koju je ovaj patogen pokazao *in vitro*.

U kontekstu efikasne zaštite useva od patogena, ali i komercijalizacije biokontrolnog agensa, poželjno svojstvo potencijalnog kandidata jeste širok spektar delovanja. Iz tog razloga je odabir antagonističkih sojeva za ispitivanje *in vivo* efikasnosti vršen na osnovu prisustva više gena za lipopeptide, pored intenziteta postignute inhibicije rasta patogena. Za ispitivanje mogućnosti suzbijanja zelene plesni šampinjona odabrani su sojevi *B. pumilus* B-138, *B. subtilis* B-233 i *B. amyloliquefaciens* B-241, dok su za

ispitivanje efikasnosti suzbijanja suve truleži odabrani soj B-241 (kao najbolji kandidat za suzbijanje *T. aggressivum* f. *europaeum* T77) i sojevi *B. subtilis* B-124 i B-348 koji su izazvali zadovoljavajuću inhibiciju rasta oba fungalna patogena.

In vivo eksperimenti postavljeni su i osmišljeni tako da nalikuju procesu proizvodnje šampinjona u Srbiji, kako bi se dobio uvid u realne izgledе za komercijalnu primenu *Bacillus* spp. sojeva u gajilištu. Važno je naglasiti da način veštačke inokulacije patogenom i koncentracija inokuluma značajno utiču na krajnji ishod eksperimenta, s obzirom na to da veštačka inokulacija mora da obezbedi optimalan intenzitet simptoma radi pouzdanog tumačenja dobijenih rezultata. Usled razlika u ekologiji dva ispitivana patogena i činjenice da je izvor infekcije gljivom *T. aggressivum* u gajilištima kompost, a gljivom *L. fungicola* treset (Berendsen et al., 2010; Kredics et al., 2010), veštačka inokulacija patogenima u ovim istraživanjima vršena je na različit način i u različitim fazama eksperimenata.

Najveća redukcija učestalosti simptoma zelene plesni u T-I eksperimentu postignuta je dejstvom komercijalnog fungicida na bazi prohloraz-mangana i soja *B. amyloliquefaciens* B-241. U drugom eksperimentu rezultati nisu u potpunosti potvrđeni, jer se samo prohloraz-Mn pokazao efikasnijim od ostalih tretmana među kojima nije bilo statistički značajnih razlika. Slično ovome, soj *B. subtilis* B-38 je u poređenju sa netretiranom kontrolom značajno suzbio patogena *T. aggressivum* u gajilištu, pri čemu nisu zabeležene statistički značajne razlike između dejstva ovog soja, komercijalnog biofungicida na bazi *B. velezensis* QST 713 i prohloraz-mangana (Milijašević-Marčić et al., 2017). Pored toga, Potočnik et al. (2018) su ispitivali efikasnost (E) tretmana micelije tj. „semena” *A. bisporus* protiv zelene plesni šampinjona i tom prilikom zaključili da su najefikasniji tretmani bili prohloraz-Mn (70%) i *B. velezensis* QST 713 (50%). U oba naša eksperimenta, T-I i T-II, dobijeni rezultati su bili slični, ali sa nešto većom postignutom efikasnošću (80–90% za prohloraz-Mn i 50–60% za *B. velezensis* QST 713). Iz ovih eksperimenata se takođe može zaključiti da razlike u načinu primene tretmana (nanošenje na površinu pokrivke u odnosu na tretman „semena“) kao i vremenskom periodu izvođenja tretmana (nakon prorastanja micelije kroz pokrivku u odnosu na tretman pre zasejavanja komposta micelijom šampinjona) nemaju uticaj na efikasnost. Međutim, Kosanović et al., (2013) su ispitivanjem efikasnosti različitih koncentracija i kombinacija komercijalnih preparata za suzbijanje *T. harzianum* T91 zaključili da je soj *B. velezensis* QST 713 bio

manje efikasan od prochloraz-mangana, ali da postiže bolje suzbijanje bolesti nego biofungicid na bazi ulja čajnog drveta (Kosanović et al., 2013).

Prethodna istraživanja mogućnosti biološkog suzbijanja suve truleži šampinjona uglavnom su se odnosila na mogućnost upotrebe takozvanih „istrošenih supstrata za gajenje gljiva” kao zamene za hemijske fungicide, pri čemu su Gea et al. (2014) objavili da ovakav supstrat može da redukuje učestalost simptoma suve truleži bez negativnog efekta na rast šampinjona. Nasuprot tome, malo je istraživanja koja ispituju potencijal pojedinačnih antagonističkih bakterijskih sojeva za suzbijanje *L. fungicola*, naročito vrsta roda *Bacillus*. Berendsen et al. (2012) su ispitivali *in vivo* efikasnost antagonističkih *Pseudomonas* spp. izolata poreklom iz supstrata za rast šampinjona, ali su rezultati bili nezadovoljavajući, pošto su dva izolata Ab03038 i Ab03040 redukovala učestalost simptoma suve truleži za samo 9% odnosno 3%. U našem istraživanju, sva tri *Bacillus* spp. soja dovela su do redukcije simptoma bolesti u oba *in vivo* eksperimenta, među kojima se po efikasnosti posebno istakao soj *B. amyloliquefaciens* B-241. U poređenju sa komercijalnim bio/fungicidima, efikasnost soja B-241 u L-I eksperimentu je bila slična efikasnosti soja *B. velezensis* QST 713, drugog po redu najboljeg tretmana. U drugom eksperimentu, L-II, najefikasniji su bili tretmani komercijalnim fungicidom i biofungicidom (bez statistički značajnih razlika), praćeni sojem B-241. Ove razlike u efikasnosti tretmana mogu se donekle objasniti različitom učestalošću simptoma u dva eksperimenta. Naime, u drugom eksperimentu je registrovana značajno veća učestalost bolesti, pa je u takvim uslovima bila i očekivana manja efikasnost antagonističkog soja u odnosu na komercijalne bio/fungicide. Takođe je značajno napomenuti i da se u oba eksperimenta u gajilištu hemijski fungicid prochloraz-Mn pokazao kao najbolji tretman, sa efikasnošću 70–80%, uprkos sve češćim nalazima o razvoju rezistentnosti *L. fungicola* na ovu supstancu u Evropi (Gea et al., 2005).

Jedan od zahteva koje biokontrolni soj treba da zadovolji da bi bio prihvaćen za komercijalnu primenu je da ne utiče negativno na prinos gajene biljke ili gljive. U našim preliminarnim istraživanjima rađenim u *in situ* uslovima, pokazano je da sojevi *Bacillus* spp. korišćeni u eksperimentima nisu negativno uticali na porast micelije šampinjona u kompostu. Takođe, ispitivanjem uticaja tretmana na ukupan prinos šampinjona u *in vivo* eksperimentima u uslovima veštačke inokulacije gljivom *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 nisu zabeležene nikakve statistički značajne razlike. U drugom eksperimentu je

prinos šampinjona je bio nešto viši nego u prvom, ali je u oba ogleda bio manji od 100%. Isto tako, ni Milijašević-Marčić et al. (2017) nisu pronašli statistički značajne razlike između netretiranih inokuliranih kontrola i tretmana prochloraz-manganom, sojem *B. subtilis* B-38 i *B. velezensis* QST 713. Međutim, neki nalazi pokazali su da je prinos šampinjona nakon tretmana sojem *B. velezensis* QST 713 bio manji nego u neinokuliranim kontrolama, kontroli inokuliranoj sa *T. harzianum* T91 (Kosanović et al., 2013) i *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 (Potočnik et al., 2018). Nasuprot ovim istraživanjima, zabeležen je i pozitivan uticaj komercijalnog soja na povećanje prinosa šampinjona u odnosu na netretiran kompost inokulisan sa *T. aggressivum* f. *europaeum* (Pandini et al., 2018).

Izostajanje smanjenja ukupnog prinosa šampinjona koje je uobičajeno u slučaju infekcije komposta patogenom gljivom *T. aggressivum* može da se objasni složenim interakcijama između patogena i domaćina. Pokazano je da *T. aggressivum* i *A. bisporus* utiču međusobno i obostrano na rast i razvoj. Brzina i stepen kolonizacije komposta patogenom zavise od ključnih karakteristika supstrata, kao što su procenat vlage, sadržaj pepela i stepen fermentacije (Sharma et al., 1999; Kredics et al., 2010), a uslovi koji pogoduju rastu micelije šampinjona pogodni su i za razvoj patogena. Iako *T. aggressivum* može da raste u kompostu samostalno, prisustvo micelije *A. bisporus* je neophodno za njegovu intenzivnu sporulaciju što omogućava brzu kolonizaciju komposta patogenom. Naime, na početku njihove interakcije u kompostu, rast *T. aggressivum* je stimulisan metabolitima koje proizvodi *A. bisporus* dok šampinjon nije osetljiv na toksine patogena, što omogućava njihov istovremeni rast. Međutim, sa iscrpljivanjem nutrijenata u kompostu, kompetitivnija *T. aggressivum* će prevladati i prouzrokovati značajne gubitke u prinosu šampinjona. Pretpostavlja se da je kompost korišćen u ovom istraživanju bio bogat nutrijentima pa kompeticija između *T. aggressivum* f. *europaeum* i *A. bisporus* nije bila izražena, što je rezultovalo uniformnim vrednostima ukupnog prinosa u svim varijantama, inokuliranim i neinokuliranim patogenom.

Za razliku od *T. aggressivum*, infekcija pokrivke gljivom *L. fungicola* ne sprečava formiranje micelije šampinjona, pa ne dolazi do smanjenja u ukupnom prinosu šampinjona u tom smislu, mada plodonosna tela narušenog kvaliteta (sa simptomima suve truleži) nisu pogodna za tržište tako da su gubici u proizvodnji šampinjona izvesni (Calonje et al., 2000; Gea et al., 2013). U eksperimentu L-I, sve testirane varijante su se odlikovale

prinosom većim od 100% dok je tako visoka produktivnost u L-II eksperimentu bila zabeležena samo u četiri varijante (neinokulisana tretirana sa *B. subtilis* B-348, inokulisana netretirana, i inokulisana tretirana sojem *B. subtilis* B-348 i prochloraz-manganom), bez statistički značajnih razlika između varijanti. Pored toga, nisu zabeležene statistički značajne razlike u ukupnoj masi zdravih i ukupnoj masi bolesnih šampinjona između testiranih varijanti. Slično tome, prethodno je zaključeno da veštačka inokulacija pokrivke gljivom *L. fungicola* ne redukuje ukupnu masu šampinjona, ali dovodi do povećanja ukupnog broja plodonosnih tela (Largeteau and Savoie, 2008; Gea et al., 2013). Suprotno zapažanjima iz *in vivo* eksperimenata sa zelenom plesni šampinjona u ovom istraživanju, prinos u prvom L-I eksperimentu je bio znatno veći nego u drugom L-II. Uopšteno gledano, ukupan prinos šampinjona bio je veći u oba *in vivo* eksperimenta sa suvom truleži nego u eksperimentima sa *T. aggressivum*. U sva četiri eksperimenta nije pokazano smanjenje prinosa šampinjona u inokulisanim netretiranim varijantama, što implicira da je produktivnost šampinjona zavisila prvenstveno od osnovnih karakteristika komposta, a ne od inokulacije supstrata patogenima ili od tretmana.

Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da je od svih ispitivanih antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva najveći potencijal za suzbijanje zelene plesni i suve truleži šampinjona pokazao soj *B. amyloliquefaciens* B-241, čija se efikasnost u *in vivo* eksperimentima najčešće mogla porediti sa komercijalnim biofungicidom na bazi soja *B. velezensis* QST 713. Iako aktivnost soja B-241 nije povećala prinos, takođe nije zabeležen ni štetni efekat soja na rast šampinjona.

Značaj ovog istraživanja ogleda se u pronalasku autohtonog antagonističkog soja koji postiže zadovoljavajuću efikasnost u suzbijanju dva najvažnija fungalna patogena šampinjona *in vivo*, čime je predviđen njegov potencijal za komercijalnu primenu u gajilištima kao zamena za hemijske fungicide. Dobijeni rezultati takođe predstavljaju prvi nalaz efikasnog biološkog suzbijanja suve truleži šampinjona *in vivo*. Važno je naglasiti da je dobijene rezultate potrebno potvrditi u eksperimentima većih razmera, u uslovima prirodne infekcije u proizvodnji šampinjona u gajilištima.

Otvorene su mnoge mogućnosti za nastavak istraživanja koja bi obuhvatala temeljnije ispitivanje mehanizma delovanja potencijalnog biokontrolnog agensa prema *T.*

aggressivum i *L. fungicola* kao i istraživanje eventualnih opasnosti njegove primene po životnu sredinu, ne ciljane organizme i potrošače. Pored toga, kako bi se obezbedila optimalna zaštita šampinjona, neophodno je ispitati efikasnost biokontrolnog agensa primenjenog u različitim koncentracijama, samostalno i u kombinaciji sa komercijalnim preparatima. Osim patogena ispitivanih u ovom istraživanju, u gajilištima se javljaju i drugi fungalni i bakterijski patogeni, usled čega bi bilo poželjno ispitati efikasnost soja *B. amyloliquefaciens* B-241 za njihovo suzbijanje, radi postizanja sveobuhvatne zaštite šampinjona od bolesti.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

Iz rezultata prikazanih u ovom radu mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Ukupno 284 bakterijska izolata dobijeno je iz supstrata za gajenje šampinjona (slame, pilećeg stajnjaka, komposta 3, 8, i 14. dana I faze kompostiranja, pasterizovanog komposta II faze, komposta III faze i pokrivke). Najveći broj izolata poticao je iz komposta II faze.
- Svi izolati su okarakterisani kao gram-pozitivne bakterije sa sposobnošću produkcije enzima katalaze i preliminarno su identifikovani kao pripadnici roda *Bacillus*.
- Ispitivanjem uticaja *Bacillus* spp. izolata na rast fungalnih patogena šampinjona *in vitro* dokazano je inhibitorno dejstvo 33 izolata prema prouzročivačima zelene plesni (*T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *T. harzianum* T54) i suve truleži šampinjona (*L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6). Prouzročivač suve truleži šampinjona se pokazao najosetljivijim na dejstvo *Bacillus* spp. izolata. Procenti inhibicije rasta *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 kretali su se između 38% i 78%, inhibicija rasta *T. harzianum* T54 iznosila je 46–76% dok je rast *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 inhibiran za 32–88%.
- Na osnovu sekvence hipervarijabilnog regiona gena za 16S rRNK pokazano je da antagonistički sojevi pripadaju vrstama *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* i *B. licheniformis*. Na osnovu sekvence *tuf* gena, jedan izolat identifikovan je kao soj *B. paralicheniformis*, 26 *Bacillus* spp. izolata bilo je srodno vrstama *B. subtilis* grupe dok je šest sojeva pripadalo vrstama *B. pumilus* grupe, ali nije postignuta zadovoljavajuća identifikacija izolata do nivoa vrste.
- Skriningom 33 antagonistička soja *Bacillus* spp. na prisustvo gena odgovornih za proizvodnju lipopeptida utvrđeno je da najveći broj sojeva (32) nosi gen kurstakinskog operona. Gen za surfaktin sintetazu detektovan je kod 15 sojeva

dok je deset sojeva nosilo gen fengicinskog operona. Gen za bacilomicin D sintetazu bio je prisutan kod devet sojeva dok je deo iturinskog operona detektovan kod šest sojeva.

- Kod svih testiranih sojeva utvrđeno je prisustvo bar jednog gena za sintezu lipopeptida. Kod 13 sojeva je utvrđeno prisustvo tri od pet gena, 13 sojeva je imalo dva od pet gena, a sedam sojeva je bilo pozitivno na jedan od pet testiranih gena.
- U *in vitro* ispitivanju aktivnosti bezćelijskih supernatanata 33 *Bacillus* spp. soja prema tri fungalna patogena šampinjona, najosetljivijom se pokazala *T. harzianum* T54 čiji je rast inhibirao supernatant čak 23 soja. Supernatanti sedam *Bacillus* spp. sojeva inhibirali su rast *T. aggressivum* f. *europaeum* T77. Supernatant soja *B. amyloliquefaciens* B-241 jedini je izazvao inhibiciju rasta *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6.
- Soj *B. amyloliquefaciens* B-241 istakao se po zadovoljavajućem inhibitornom efektu supernatanta prema sva tri ispitivana patogena šampinjona, i kao nosilac tri gena odgovorna za proizvodnju lipopeptida (iturina, bacilomicina D i kurstakina).
- Etil-acetatni lipopeptidni ekstrakt soja *B. amyloliquefaciens* B-241 inhibirao je rast patogena *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 57%, *T. harzianum* T54 46% i *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 29%, čime je potvrđena uloga lipopeptida u antagonizmu i antibioza kao mehanizam antagonističkog delovanja ovog soja.
- U ispitivanju efikasnosti tri odabrana *Bacillus* spp. soja, komercijalnog biofungicida i fungicida za suzbijanje prouzrokovala zelene plesni šampinjona *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 *in vivo*, najveća redukcija učestalosti simptoma zelene plesni postignuta je dejstvom fungicida prochloraz-mangana i soja *B. amyloliquefaciens* B-241, dok se u ponovljenom eksperimentu samo prochloraz-Mn pokazao efikasnijim od ostalih tretmana među kojima nije bilo statistički značajnih razlika.

- U ispitivanju efikasnosti tri odabrana *Bacillus* spp. soja, komercijalnog biofungicida i fungicida za suzbijanje prouzrokovača suve truleži šampinjona *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6 *in vivo*, najefikasniji je bio fungicid prochloraz-Mn, a zatim biofungicid na bazi *B. velezensis* QST 713 i soj *B. amyloliquefaciens* B-241 među kojima nije bilo statistički značajnih razlika. U ponovljenom eksperimentu, najveća redukcija učestalosti simptoma suve truleži postignuta je primenom komercijalnog fungicida i biofungicida (bez statistički značajnih razlika), dok je soj *B. amyloliquefaciens* B-241 bio drugi najefikasniji tretman.
- Preliminarnim ispitivanjima u *in situ* uslovima pokazano je da sojevi *Bacillus* spp. korišćeni u *in vivo* eksperimentima nemaju inhibitorni efekat na porast micelije šampinjona u kompostu.
- U *in vivo* eksperimentima, u uslovima veštačke inokulacije gljivom *T. aggressivum* f. *europaeum* T77, pokazano je da ni inokulacija ni tretmani nisu uticali na ukupnu masu šampinjona. Prinos šampinjona je u svim testiranim varijantama u oba eksperimenta bio niži od 100%, pri čemu su više vrednosti zabeležene u drugom eksperimentu.
- U prvom *in vivo* eksperimentu izvedenom sa ciljem suzbijanja *L. fungicola* var. *fungicola* Ša2V6, u svim testiranim varijantama prinos šampinjona bio je veći od 100% dok su u ponovljenom eksperimentu tako visoke vrednosti bile zabeležene u samo četiri varijante. Inokulacija i tretmani nisu imali negativan uticaj na ukupnu masu šampinjona.
- Od svih ispitivanih antagonističkih *Bacillus* spp. sojeva, *B. amyloliquefaciens* B-241 se istakao po izvrsnoj efikasnosti u suzbijanju zelene plesni i suve truleži šampinjona *in vivo*, bez negativnog uticaja na rast samog šampinjona. Ovim je dokazana mogućnost njegove primene u toku proizvodnje šampinjona, kao zamene za sintetičke fungicide.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

- Abderrahmani, A., Tapi, A., Nateche, F., Chollet, M., Leclère, V., Wathelet, B., Hacene, H., & Jacques, P. (2011). Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(3), 571–581.
- Abosriwil, S. O., & Clancy, K. J. (2003). A mini-bag technique for evaluation of fungicide effects on *Trichoderma* spp. in mushroom compost. *Pest Management Science*, 60, 350–358.
- Agrawal, P. K., Chaudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2011). Bacterial diversity in a bagasse-based compost prepared for the cultivation of edible mushrooms *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural Technology*, 7(5), 2103–2111.
- Agrawal, P. K. (2014). Microbial ecology of compost ecosystem: with special reference to mushroom compost. *Journal of Biological and Scientific Opinion*, 2(1), 45–50.
- Akond, M. M., Zohora, F. T., Jolly, S. N., Mubassara, S., Hossain, Md., A., & Noor, R. (2016). Isolation of a potential antifungal *Bacillus subtilis* 37-JM07 strain from straw and its biocontrol efficacy to combat green mold disease of commercial mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Environmental Science: An Indian Journal*, 12(1), 1–14.
- Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology*, 114(3), 329–341.
- Allan, J., Shah, F. A., & Khan, I. (2008). Establishing a baseline for fungicide sensitivity of three major mushroom pathogens in Australia. In: Van Greuning, M. Ed. Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII, Proceeding of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science (pp. 565–569). ISMS, Cape Town, South Africa.
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., & Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 8, 63–74.

- Bais, H. P., Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Pathology*, *134*(1), 307–319.
- Ballschmide, K., Hackenberg, R., Jarman, W. M., & Looser, R. (2002). Man-made chemicals found in remote areas of the world: the experimental definition for POPs. *Environmental Science and Pollution Research International*, *9*(4), 274–288.
- Berendsen, R. L., Baars, J. J., Kalkhove, S. I. C., Lugones, L. G., Wösten, H. A. B., & Bakker, P. A. H. M. (2010). *Lecanicillium fungicola*: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. *Molecular Plant Pathology*, *11*(5), 585–595.
- Berendsen, R. L., Kalkhove, S. I. C., Lugones, L. G., Baars, J. J., Wösten, H. A. B., & Bakker, P. A. H. M. (2012). Effects of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from mushroom cultures on *Lecanicillium fungicola*. *Biological Control*, *63*, 210–221.
- Berendsen, R. L., Kalkhove, S. I. C., Lugones, L. G., Baars, J. J. P., Wosten, H. A. B., & Bakker, P. A. H. M. (2013a.) Effects of the mushroom-volatile 1-octen-3-ol on dry bubble disease. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*, 5535–5543.
- Berendsen, R. L., Schrier, N., Kalkhove, S. I. C., Lugones, L. G., Baars, J. J. P., Zijlstra, C., De Weerd, M., Wösten, H. A., & Bakker, P. A. (2013b). Absence of induced resistance in *Agaricus bisporus* against *Lecanicillium fungicola*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *103*(3), 539–550.
- Berić, T., Kojić, M., Stanković, S., Topisirović, Lj., Degrassi, G., Myers, M., Venturi, V., & Fira, Đ. (2012). Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, *50*(1), 25–31.
- Bhat, M. A., Simon, S., Munshi, N. A., & Bhat, Z. A. (2010). *In vitro* efficacy of casing and compost isolated bacterial inoculants against *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk and *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Journal of Biological Control*, *24*(2), 137–141.
- Bhatt, N., & Singh, R. E. (2000). Chemical and biological management of major fungal pathogens of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *The International Society for Mushroom Science*, *15*(2), 16.

- Bhatt, N., & Singh, R. P. (2002). Casing soil bacteria as biocontrol agents against the mycoparasitic fungi of *Agaricus bisporus*. *Proceedings of the 4th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, 1–9.
- Bhattacharya, S., Das, A., Samadder, S., & Rajan S. S. (2016). Biosynthesis and characterization of a thermostable, alkali-tolerant chitinase from *Bacillus pumilus* JUBCH08 displaying antagonism against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. *3 Biotech*, 6(1), 87.
- Bollen, G. J., & Van Zaayen, A. (1975). Resistance to benzimidazole fungicides in pathogenic strains of *Verticillium fungicola*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 81(5), 157–167.
- Bonnen A. M., & Hopkins C. (1997). Fungicide resistance and population variation in *Verticillium fungicola*, a pathogen of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 101(1), 89–96.
- Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents. In: Maheshwari, D. K. ed. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* (pp. 41–76). Springer, Berlin.
- Budzinski, H., & Couderchet, M. (2018). Environmental and human health issues related to pesticides: from usage and environmental fate to impact. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 14277–14279.
- Caamaño-Antelo, S., Fernández-No, I. C., Böhme K., Ezzat-Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2015). Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. *Food Microbiology*, 46, 288–298.
- Cai, W., Yao, H., Feng, W., Jin, Q., Liu, Y., Li, N., & Zheng, Z. (2009). Microbial community structure of casing soil during mushroom growth. *Pedosphere*, 19(4), 446–452.
- Calonje, M., Garcia Mendoza, C., Perez Cabo, A., Bernardo, D., & Novaes-Ledieu, M. (2000). Interaction between the mycoparasite *Verticillium fungicola* and the vegetative mycelial phase of *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 104, 988–992.
- Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D., & Bissett, J. (1998). Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North

- American mushroom farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 133–137.
- Cawoy, H., Bettioli, W., Fickers, P., & Ongena, M. (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases. Pesticides in the modern world-pesticides use and management. *In Tech*, Rijeka, pp. 273–302.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 281–295.
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987–1998.
- Chandler, S., Van Hese, N., Coutte, F., Jacques, P., Höfte, M., De Vleeschauwer, D. (2015). Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 91, 20–30.
- Chavagnat, F., Haueter, M., Jimeno, J., & Casey, M. G. (2002). Comparison of partial tuf gene sequences for the identification of lactobacilli. *FEMS Microbiology Letters*, 217, 177–183.
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., & Guo, J. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 15(3), 848–864.
- Chen, L., Heng, J., Qin, S. & Bian, K. (2018). A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. *PLoS One*, 13(6), e0198560.
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 289–297.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X. W., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Frontiers in Microbiology*, 6, 780.

- Chrysay-Tokousbalides, M., Kastanias, M. A., Philippoussis, A., & Diamantopoulou, P. (2007). Selective fungitoxicity of famaxadone, tebuconazole and trifloxystrobin between *Verticillium fungicola* and *Agaricus bisporus*. *Crop Protection*, 26, 469–475.
- Clift, A. D., & Shamshad, A. (2009). Modeling mites, molds and mushroom yields in the Australian Mushroom Industry. In Anderssen, R. S., Braddock, R. D. and Newham, L. T. H. eds. *Proceedings of the 18th World IMACS/MODSIM09 Congress* (pp. 491–497). IMACS/MODSIM, Cairns, Australia.
- Collopy, P. D., Largeteau-Mamoun, M. L., Romaine, C. P., & Royse, D. J. (2001). Molecular phylogenetic analyses of *Verticillium fungicola* and related species causing dry bubble disease of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Phytopathology*, 90, 905–912.
- Contesini, F. J., Melo, R. R., & Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3), 321–334.
- Cui, N., Xu, H., Yao, S., He, Y., Zhang, H., & Yu, Y. (2018). Chiral triazole fungicide tebuconazole: enantioselective bioaccumulation, bioactivity, acute toxicity, and dissipation in soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 25468–25475.
- De Trogoff, H., & Ricard, J. L. (1976). Biological control of *Verticillium malthousei* by *Trichoderma viride* spray on casing soil in commercial mushroom production. *Plant Disease Reports*, 60, 677680.
- Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., De Brogniez, A., Willems, L., Clément, C., Dorey, S., De Pauw, E., & Ongena, M. (2015). Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environmental Microbiology Reports*, 7(3), 570–582.
- Di, S., Liu, R., Tian, Z., Cheng, C., Chen, L., Zhang, W., Zhou, Z., & Diao, J. (2017). Assessment of tissue-specific accumulation, elimination and toxic effects of dichlorodiphenyltrichloroethanes (DDTs) in carp through aquatic food web. *Scientific Reports*, 7(1), 2288.

- Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., & Fira, D. (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*, 65(3), 312–321.
- Dimkić, I. (2015). Karakterizacija antimikrobnih supstanci prirodnih izolata *Bacillus* sp. za primenu u biološkoj kontroli fitopatogenih bakterija i gljiva. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Dimkić, I., Berić, T., Stević, T., Pavlović, S., Šavikin, K., Fira, D., & Stanković, S. (2015). Additive and synergistic effects of *Bacillus* spp. isolates and essential oils on the control of phytopathogenic and saprophytic fungi from medicinal plants and marigold seeds. *Biological Control*, 87, 6–13.
- Dimkić, I., Stanković, S., Nišavić, M., Petković, M., Ristivojević, P., Fira, D., & Berić, T. (2017). The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in Microbiology*, 8, 925.
- Doyle, O. (1991). *Trichoderma* green mould update. *Irish Mushroom Review*, 3, 13-17.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V., & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 749–59.
- Dunlap, C. A., Schisler, D. A., Price, N. P., & Vaughn, S. F. (2011). Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of Fusarium head blight. *Journal of Microbiology*, 49(4), 603–609.
- Etchegaray, A., Bueno, C. D., De Melo, I. S., Tsai, S. M., Fiore, M. F., Silva-Stenico, M. E., De Moraes, L. A., & Teschke, O. (2008). Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of Microbiology*, 190, 611–622.
- European Food Safety Authority (2013). Reasoned opinion on the modification of the existing MRLs for metrafenone in various crops. *EFSA Journal*, 11(1), 3075, 30 pp.
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X. & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2491.

- Fernandes, M. S., & Kerkar, S. (2019). Halotolerant *Bacillus* sp. as a source of antifungal agents against major mushroom pathogens. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 8(5), 1125–1129.
- Ferreira, C. M. H., Vilas-Boas, Â., Sousa, C. A., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2019). Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express*, 9, 78.
- Fira, Đ., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44–55.
- Fletcher, J. T., & Gaze, R. H., (2008). *Mushrooms Pest and Disease Control: A Color Handbook*. Academic Press, London, 195 p.
- Fokkema, N. J. (1978). Fungal antagonism in the phyllosphere. *Annals of Applied Biology*, 89, 115–119.
- Francis, I., Holsters, M., & Vereecke, D. (2010). The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental Microbiology*, 12(1), 1–12.
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 337–359.
- Gea, F. J., Tello, J. C., & Honrubia, M. (1996). *In vitro* sensitivity of *Verticillium fungicola* to selected fungicides. *Mycopathologia*, 136, 133–137.
- Gea, F. J., Tello, J. C., & Navarro, M. J. (2003). Occurrence of *Verticillium fungicola* var. *fungicola* on *Agaricus bitorquis* mushroom crops in Spain. *Journal of Phytopathology*, 151, 98–100.
- Gea, F.J., Navarro, M.J., & Tello, J.C. (2005). Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese *in vitro*. *Mycological Research*, 109, 741–745.
- Gea, F. J., Tello, J., & Navarro, M. J. (2010). Efficacy and effect on yield of different fungicides for control of wet bubble disease of mushroom caused by the mycoparasite *Mycogone perniciosa*. *Crop Protection*, 29, 1021–1025.
- Gea, F. J., Carrasco, J., Santos, M., Diáñez, F., & Navarro, M. J. (2013). Incidence of *Lecanicillium fungicola* in white-button mushroom (*Agaricus bisporus*) cultivated with two types of casing soil. *Journal of Plant Pathology*, 95(1), 161–164.
- Gea, F. J., Carrasco, J., Diáñez, F., Santos, M., & Navarro, M. J. (2014). Control of dry bubble disease (*Lecanicillium fungicola*) in button mushroom (*Agaricus bisporus*)

- by spent mushroom substrate tea. *European Journal of Plant Pathology*, 138, 711–720.
- Geels, F. P., Van de Geijn, J., & Rutjens, A. J. (1988). *Pests and diseases*. In: Van Griensven, L. J. L. D. ed. *The cultivation of mushrooms* (pp. 361–422). Darlington Mushroom Laboratories Ltd, Rustington, Sussex, England.
- Geels, F. P. (1997). Rondetafel – bijeenkomst over *Trichoderma*. *Champignoncultuur*, 41, 13.
- Geösel, A. (2011). New developments in integrated pest management for mushroom culture, challenges and opportunities in quality mushroom production. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, 495–499.
- Gilden, R., Huffling, K., & Sattler, B. (2010). Pesticides and health risks. *Journal of Obstetric, Gynecologic and Neonatal Nursing*, 39, 103–110.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Kohl, J., Marrone, P., Morin, L., & Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, 30, 250–288.
- Goto, K., Omura, T., Hara, Y., & Sadaie, Y. (2000). Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 46, 1–8.
- Grogan, H. M., & Gaze, R. H. (2000). Fungicide resistance among *Cladobotryum* spp. – causal agents of cobweb disease of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 104(3), 357–364.
- Grogan, H. M., Keeling, C., & Jukes, A. A. (2000). *In vitro* response of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* (dry bubble) to prochloraz-manganese. *Proceedings from the Crop Protection Conference*, In: *Pests and Diseases*, Brighton, UK, pp. 273–278.
- Grogan, H. M. (2001). *Verticillium* – an interesting experiment. *Mushroom Journal*, 622, 18–19.
- Grogan, H. M. (2008). Challenges facing mushroom disease control in the 21st century. In: *Lelley, J. I., Buswell, J. A., Eds. Proceeding of the Sixth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products* (pp. 120–127). WSMBMP, Bonn, Germany.

- Györfi, J., & Geösel, A. (2008). Biological control against *Trichoderma* species in *Agaricus* cultivation. *Proceedings of the 6th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. pp. 158–164.
- Hathout, Y., Ho, Y. P., Ryzhov, V., Demirev, P., & Fenselau, C. (2000). Kurstakins: a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Natural Products*, 63(11), 1492–1496.
- Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Nagy, A., Nagy, E., Vágvölgyi, C., & Kredics, L. (2007). Green mould diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology*, 97(4), 532–537.
- Hatvani, L., Kocsubé, S., Menczinger, L., Antal, Z., Szekeres, A., Druzhina, I.S., Komoń-Zelazowska, M., Kubicek, C. P., Nagy, A., Vágvölgyi, C., & Kredics, L. (2008). The green mould disease global threat to the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*): a review. In: Van Greuning, M. Ed. Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII, Proceeding of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science (CD-ROM, pp 485–495). ISMS, Cape Town, South Africa.
- Hatvani, L., Sabolić, P., Kocsubé, S., Kredics, L., Vágvölgyi, C., Kaliterna, J., Ivić, D., Đermić, E., & Kosalec, I. (2012). The first report on mushroom green mold in Croatia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63, 481–487.
- Hermosa, M. R., Grondona, I., & Monte, E. (1999). Isolation of *Trichoderma harzianum* Th 2 from commercial mushroom compost in Spain. *Plant Disease*, 83(6), 591.
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27(5), 637–657.
- Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., & Fujii, Y. (2002). Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 61, 693–698.
- Holmes, J. (1971). Effect of time of inoculation on incidence and control of *Verticillium* disease of the commercial mushroom. *The Plant Disease Reporter*, 55, 643–645.
- Hsieh, F. C., Li, M. C., Lin, T. C., & Kao, S. S. (2004). Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Current Microbiology*, 49(3), 186–191.

- Kertesz, M. A., & Thai, M. (2018). Compost bacteria and fungi that influence growth and development of *Agaricus bisporus* and other commercial mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(4), 1639–1650.
- Kiewnick, S. (2007). Practicalities of developing and registering microbial biological control agents. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources*, *2*, 1–11.
- Kim, W. G., Weon, H. Y., Seok, S. J., & Lee, K. H. (2008). *In vitro* antagonistic characteristics of Bacilli isolates against *Trichoderma* spp. and three species of mushrooms. *Mycobiology*, *36*(4), 266–269.
- Kim, P. I., Ryu, J., Kim, Y. H., & Chi, Y. T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*(1), 138–145.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, *94*(11), 1259–1266.
- Köhl, J., Postma, J., Nicot, P., Ruocco, M., & Blum, B. (2011). Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control*, *57*, 1–12.
- Korsten, L., & De Jager, E. S. (1995). Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, *18*, 124–130.
- Kosanović, D., Potočnik, I., Duduk, B., Vukojević, J., Stajić, M., Rekanović, E., & Milijašević-Marčić, S. (2013). *Trichoderma* species on *Agaricus bisporus* farms in Serbia and their biocontrol. *Annals of Applied Biology*, *163*(2), 218–230.
- Kosanović, D., Potočnik, I., Vukojević, J., Stajić, M., Rekanović, E., Stepanović, M., & Todorović, B. (2015). Fungicide sensitivity of *Trichoderma* spp. from *Agaricus bisporus* farms in Serbia. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *50*(8), 607–613.
- Koumoutsis, A., Chen, X., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., & Borriss, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, *186*(4), 1084–1096.

- Kredics, L., García Jimenez, L., Naeimi, S., Czifra, D., Urbán, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., & Hatvani, L. (2010). A challenge to mushroom growers: the green mould disease of cultivated champignons. In: Méndez-Vilas, A. ed. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (pp. 295–305). Formatex, Badajoz, Spain.
- Krupke, O., Castle, A., & Rinker, D. (2003). The North American mushroom competitor, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, produces antifungal compounds in mushroom compost that inhibit mycelial growth of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, *107*, 1467–1475.
- Kumar, S., & Singh, A. (2015). Biopesticides: Present status and the future prospects. *Journal of Fertilizers and Pesticides*, *6*, e129.
- Largeteau, M. L., Rodier, A., Rousseau, T., Juarez del Carmen, S., Védie, R., & Savoie, J.-M. (2004). *Agaricus* susceptibility to *Verticillium fungicola*. In: Romaine, C. P., Keil, C. B., Rinker, D. L., Royse, D. J. Eds., *Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi* (pp. 515–523). PennState University, University Park.
- Largeteau, M. L., Mata, G., & Savoie, J.-M. (2007). *Verticillium fungicola* var. *fungicola* affects *Agaricus bisporus* cultivation in Mexico. *FEMS Microbiology Letters*, *236*(2), 191–196.
- Largeteau, M. L., & Savoie, J.-M. (2008). Effect of the fungal pathogen *Verticillium fungicola* on fruiting initiation of its host, *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, *112*, 825–828.
- Largeteau, M. L., & Savoie, J.-M. (2010). Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*, 63–73.
- Lelliott, R. A., & Stead, D. E. (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In: Preece, T. F. Ed. *Methods in Plant Pathology* (vol 2, pp 216). Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Leng, P., Zhang, Z., Pan, G., & Zhao, M. (2011). Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology*, *10*(86), 19864–19873.
- Li, J. G., Jiang, Z. Q., Xu, P., Sun, F. F., & Guo, J. H. (2008). Characterization of chitinase secreted by *Bacillus cereus* strain CH2 and evaluation of its efficacy against *Verticillium* wilt of eggplant. *Biocontrol*, *53*, 931–944.

- Lim, S. M., Yoon, M., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., Park, H. W., Yu, N. H., Kim, Y. H., & Kim, J. (2017). Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *Plant Pathology Journal*, *33*(5), 488–498.
- Liu, C., Sheng, J., Chen, L., Zheng, Y., Lee, D. Y. W., Yang, Y., Xu, M., & Shen, L. (2015). Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* isolated from *Agaricus bisporus* mushroom compost against pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(26), 6009–6018.
- Liu, K., McInroy, J. A., Hu, C., & Kloepper, J. W. (2017). Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. *Plant Disease*, *102*(1), 67–72.
- Lo, C. (1998). General mechanisms of action of microbial biocontrol agents. *Plant Pathology Bulletin*, *7*, 155–166.
- Lolloo, R., Maharaih, D., Görgens, J., & Gardiner, N. (2010). A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*, 499–508.
- Luo, C., Zhou, H., Zou, J., Wang, X., Zhang, R., Xiang, Y., & Chen, Z. (2015). Bacillomycin L and surfactin contribute synergistically to the phenotypic features of *Bacillus subtilis* 916 and the biocontrol of rice sheath blight induced by *Rhizoctonia solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(4), 1897–910.
- Maheshwari, S. (2013). A guide for white button mushroom (*Agaricus bisporus*) production. *Open Access Scientific Reports*, *2*(3), 668.
- Maheshwari, D. K., Dheeman, S., & Agarwal, M. (2014). Decomposition of Organic Materials into High Value Compost for Sustainable Crop Productivity. In: Maheshwari, D. K. Ed. *Composting for Sustainable Agriculture, Sustainable Development and Biodiversity 3*, (pp. 245–267), Springer International Publishing, Switzerland.
- Mamiro, D. P., Royse, D. J., & Beelman, R. B. (2007). Yield, size, and mushroom solids content of *Agaricus bisporus* produced on non-composted substrate and spent mushroom compost. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*(9), 1289–1296.

- Mamoun, M. L., Iapicco, R., Savoie, J.-M., & Olivier, J. M. (2000). Green mould disease in France: *Trichoderma harzianum* Th2 and other species causing damages on mushroom farms. *Mushroom Science*, *15*, 625–632.
- Manjula, K., & Podile, A. R. (2005). Production of fungal cell wall degrading enzymes by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1. *Indian Journal of Experimental Biology*, *43*(10), 892–896.
- Milijašević-Marčić, S., Stepanović, M., Todorović, B., Duduk, B., Stepanović, J., Rekanović, E., & Potočnik, I. (2017). Biological control of green mould on *Agaricus bisporus* by a native *Bacillus subtilis* strain from mushroom compost. *European Journal of Plant Pathology*, *148*, 509–519.
- Miller, F. C. (1993). Conventional composting system. In: Tan Nair, N. G. ed. Proceedings of the second AMGA/ISMS International Workshop-Seminar on Agaricus Compost, Sydney, pp. 1–18.
- Monteiro, S. M., Clemente, J. J., Henriques, A. O., Gomes, R. J., Carrondo, M. J., & Cunha, A. E. (2005). A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*, *21*(4), 1026–1031.
- Mora, I., Cabrefiga, J., & Montesinos, E. (2015). Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. *PLoS One*, *10*(5), e0127738.
- Mousivand, M., Jouzani, G. S., Monazah, M., & Kowsari, M. (2012). Characterization and antagonistic potential of some native biofilm-forming and surfactant-producing *Bacillus subtilis* strains against six pathotypes of *Rhizoctonia solani*. *Journal of Plant Pathology*, *94*(1), 171–180.
- Muthumeenakshi, S., Brown, A. E., & Mills, P. R. (1998). Genetic comparison of the aggressive weed mould strains of *Trichoderma harzianum* from mushroom compost in North America and British Isles. *Mycological Research*, *102*(4), 385–390.
- Nagy, A., Manczinger, L., Tombácz, D., Hatvani, L., Györfi, J., Antal, Z., Sajben, E., Vágvölgyi, C., & Kredics, L. (2012). Biological control of oyster mushroom green mould disease by antagonistic *Bacillus* species. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens, IOBC-WPRS Bulletin*, *78*, 289–293.

- Nair N. G. & Macauley B. J. (1987). Dry bubble disease of *Agaricus bisporus* and *Agaricus bitorquis*, and its control by prochloraz-manganese complex. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30, 107–116.
- Nicolaus, B., Lama, L., Esposito, E., Bellitti, M. R., Improta, R., Panico, A., & Gambacorta, A. (2000). Extremophiles in Antarctica. *Italian Journal of Zoology*, 67:S1, 169–174.
- Noble, R., Fermor, T. R., Lincoln, S., Dobrovin-Pennington, A., Evered, C., Mead, A., & Li, R. (2003). Primordia initiation of mushroom (*Agaricus bisporus*) strains on axenic casing materials. *Mycologia*, 95(4), 620–629.
- North, L. H. & Wuest, P. J. (1993). The infection process and symptom expression of *Verticillium* disease of *Agaricus bisporus*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 15, 74–80.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2007). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J. L., & Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology*, 9(4), 1084–1090.
- Pal, K. K., & McSpadden Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 2, 1117–1142.
- Pandin, C., Le Coq, D., Canette, A., Aymerich, S., & Briandet, R. (2017). Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? *Microbial Biotechnology*, 10, 719–734.
- Pandin, C., Védie, R., Rousseau, T., Le Coq, D., Aymerich, S., & Briandeta, R. (2018a). Dynamics of compost microbiota during the cultivation of *Agaricus bisporus* in the presence of *Bacillus velezensis* QST713 as biocontrol agent against *Trichoderma aggressivum*. *Biological Control*, 127, 39–54.
- Pandin, C., Le Coq, D., Deschamps, J., Védie, R., Rousseau, T., Aymerich, S., & Briandet, R. (2018b). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* QST713: a biocontrol agent that protects *Agaricus bisporus* crops against the green mould disease. *Journal of Biotechnology*, 278, 10–19.

- Paoletti, M. G., & Pimentel, D. (2000). Environmental risks of pesticides versus genetic engineering for agricultural pest control. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 12(3), 279–303.
- Patil, S., Bheemaraddi, M. C., Shivannavar, C. T., & Gaddad, S. M. (2014). Biocontrol activity of siderophore producing *Bacillus subtilis* CTS-G24 against wilt and dry root rot causing fungi in chickpea. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 7(9), 63–68.
- Patyshakuliyeva, A., Post, H., Zhou, M., Jurak, E., Heck, A. J., Hildén, K. S., Kabel, M. A., Mäkelä, M. R., Altelaar, M. A., & De Vries, R. P. (2015). Uncovering the abilities of *Agaricus bisporus* to degrade plant biomass throughout its life cycle. *Environmental Microbiology*, 17(8), 3098–3109.
- Pavić, S., Brett, M., Petrić, N., Laštre, D., Smoljanović, M., Atkinson, M., Kovačić, A., Cetinić, E. & Ropac, D. (2005). An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* *Bacillus licheniformis*. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 56(1), 1–24.
- Pérez-García, A., Romero, D., & De Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 187–193.
- Potočnik, I., Vukojević, J., Stajić, M., Tanović, B., & Todorović, B. (2008). Fungicide sensitivity of selected *Verticillium fungicola* isolates from *Agaricus bisporus* farms. *Archives of Biological Sciences*, 60(1), 151–157.
- Potočnik, I., Todorović, B., Đurović-Pejčev, R., Stepanović, M., Rekanović, E., & Milijašević-Marčić, S. (2016). Antimicrobial activity of biochemical substances against pathogens of cultivated mushrooms in Serbia. *Pesticides & Phytomedicine*, 31(1-2), 19–27.
- Potočnik, I., Todorović, B., Rekanović, E., Luković, J., Paunović, D., & Milijašević-Marčić, S. (2018). Impact of *Bacillus subtilis* QST713 mushroom grain spawn treatment on yield and green mould control. *Pesticides & Phytomedicine*, 33(3–4), 205–211.
- Price, N. P. J. , Rooney, A. P., Swezey, J. L., Perry, E., & Cohan, F. M. (2007). Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. *FEMS Microbiology Letters*, 271, 83–89.

- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037–1062.
- Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernando, W. D., Xuewen, G., & De Kievit, T. (2007). Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(7), 901–911.
- Reeb, J. E., & Milota, M. R. (1999). Moisture content by the oven-dry method. *Proceeding of the 50th Meeting of Western Dry Kiln Association*, May 1999, State University Corvallis, Portland, OR, pp 66–74.
- Rinker, D. L. (1993). Disease management strategies for *Trichoderma* mould. *Mushroom World*, 4, 3–5.
- Rinker, D. L., & Alm, G. (2008). Management of casing *Trichoderma* using fungicides. In: Van Greuning, M. Ed. Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII, Proceeding of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science (pp. 496–509). ISMS, Cape Town, South Africa.
- Romaine, C. P., Royse, D. J., Wuest, P. J., & Beyer, D. M. (1996). Mushroom green mold: Cause, edaphic factors and control. *Mushroom News*, 44, 20–23.
- Romaine, C. P., Royse, D. J., & Schlaghauser, C. (2005). Superpathogenic *Trichoderma* resistant to Topsin M found in Pennsylvania and Delaware. *Mushroom News*, 53, 6–9.
- Romero, D., De Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M., & Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430–440.
- Romero-Arenas, O., Lara, M. H., Huato, M. A. D., Hernandez, F. D., & Victoria, D. A. A. (2009). The characteristics of *Trichoderma harzianum* as a limiting agent in edible mushrooms. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11, 143–151.
- Royse, D. J. (2014). A global perspective on the high five: Agaricus, Pleurotus, Lentinula, Auricularia & Flammulina. In: Singh, M. Ed. Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. New Delhi, India. pp. 1–6, ref.18.

- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., & Swings, J. (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology*, 53(4), 349–410.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3), 1017–1026.
- Salar, R. K., & Aneja, K. R. (2007). Significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation: effect on growth and yield of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Journal of Agricultural Technology*, 3(2), 241–253.
- Salvatierra-Martinez, R., Arancibia, W., Araya, M., Aguilera, S., Olalde, V., Bravo, J., & Stoll, A. (2018). Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity – an example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes. *Journal of Phytopathology*, 166(9), 601–612.
- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlebury, L. A., & Petrini, O. (2002). *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94, 146–170.
- Savoie, J.-M., Iapicco, R., & Largeteau-Mamoun, M. (2001). Factors influencing the competitive saprophytic ability of *Trichoderma harzianum* Th2 in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost. *Mycological Research*, 105, 1348–1356.
- Savoie, J.-M., & Mata, G. (2016). Growing *Agaricus bisporus* as a contribution to sustainable agricultural development. In: Petre, M. Ed. *Mushroom Biotechnology: Developments and Applications* (pp. 69–91). Academic Press, Elsevier Ltd., London.
- Savoie, J.-M., Mata, G., & Largeteau, M. (2016). New prospects in pathogen control of button mushroom cultures. In: Petre, M. Ed. *Mushroom Biotechnology: Developments and Applications* (p. 93–109). Academic Press, Elsevier Ltd., London.
- Schallmey, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1–17.
- Seaby, D. A. (1987). Infection of mushroom compost by *Trichoderma* species. *Mushroom Journal*, 179, 147–151.

- Seaby, D. A. (1996). Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant Pathology*, 45, 905–912.
- Shah, S., & Naasren, S. (2011). Evaluation of bioagents against the infection of green mould (*Trichoderma* spp.) in *Pleurotus sajor-caju* cultivation. *International Journal of Plant Pathology*, 2(2), 81–88.
- Sharma, H. S. S., Kilpatrick, M., Ward, F., Lyons, G., & Burns, L. (1999). Colonisation of phase II compost by biotypes of *Trichoderma harzianum* and their effect on mushroom yield and quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 572–578.
- Siyoum, N. A., Surrige, K., Van der Linde, E. J., & Lise, K. (2016). Microbial succession in white button mushroom production systems from compost and casing to a marketable packed product. *Annals of Microbiology*, 66, 151–164.
- Soković, M., & Van Griensven, L. J. L. D. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated buttonmushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, 116, 211–224.
- Stanković, S., Mihajlović, S., Draganić, V., Dimkić, I., Vukotić, G., Berić, T., & Fira, Đ. (2012). Screening for the presence of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates of *Bacillus* sp. *Archives of Biological Sciences*, 64(4), 1425–1432.
- Staunton, L., Dunne, R., Cormican, T., & Donovan, M. (1999). Chemical and Biological Control of Mushroom, Pests and Diseases. Horticulture and Farm Forestry, Series No. 14, TEAGASC, Kinsealy Research Centre, Dublin, Republic of Ireland.
- Staunton, L., & Dunne, R. (2001). Integrated disease and pest control in Irish mushroom tunnels. Horticulture and Farm Forestry, Series No. 24, TEAGASC, Kinsealy Research Centre, Dublin, Republic of Ireland.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857.
- Suslow, T. V., Schroth, M. N., & Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72, 917–918.

- Szczzech, M., Staniaszek, M., Habdas, H., Ulinski, Z., & Szymanski, J. (2008). *Trichoderma* spp. – the cause of green mould on Polish mushroom farms. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 69, 105–114.
- Takami, H., Takaki, Y., Chee, G. J., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, H., Matsui, S., & Uchiyama, I. (2004). Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Nucleic Acids Research*, 32(21), 6292–6303.
- Tanović, B., Potočnik, I., Delibašić, G., Ristić, M., Kostić, M., & Marković, M. (2009). *In vitro* effect of essential oils from aromatic and medicinal plants on mushroom pathogens: *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Mycogone pernicioso*, and *Cladobotryum* sp. *Archives of biological sciences*, 61(2), 231–238.
- Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2(3), 194–208.
- Toumela, M., Vikman, M., Hatakka, A., & Itavaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72, 169–183.
- Tsuge, K., Inoue, S., Ano, T., Itaya, M., & Shoda, M. (2005). Horizontal transfer of iturin A operon, *itu*, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), 4641–4648.
- Van Griensven, L. J. L. D., & Van Roestel, A. J. J. (2004). The cultivation of the button mushroom, *Agaricus bisporus*, in The Netherlands: a successful industry. *Revista Mexicana de Micologia*, 19, 95–102.
- Védie, R., & Rousseau, T. (2008). Serenade biofungicide: une innovation majeure dans les champignonnières françaises pour lutter contre *Trichoderma aggressivum*, agent de la moisissure verte du compost. *La Lettre du CTC*, 21, 1–2.
- Wang, J., Liu, J., Chen, H., & Yao, J. (2007). Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 889–894.
- Wang, G., Cao, X., Ma, X., Guo, M., Liu, C., Yan, L., & Bian, Y. (2016). Diversity and effect of *Trichoderma* spp. associated with green mold disease on *Lentinula edodes* in China. *MicrobiologyOpen*, 5(4), 709–718.

- Williams, J., Clarkson, J. M., Mills, P. R., & Cooper, R. M. (2003). Saprotrophic and mycoparasitic components of aggressiveness of *Trichoderma harzianum* groups toward the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 4192–4199.
- Wood, D. A. (1976). Primordium formation in axenic cultures of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Journal of General Microbiology*, *95*, 313–323.
- Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q., & Zhanga, R. (2013). Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(3), 808–815.
- Xu, W., Wang, H., Lv, Z., Shi, Y., & Wang, Z. (2019). Antifungal activity and functional components of cell-free supernatant from *Bacillus amyloliquefaciens* LZN01 inhibit *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* growth. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *33*(1), 1042–1052.
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., & Huang, Q. (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(16), 5942–5944.
- Zeriouh, H., De Vicente, A., Pérez-García, A., & Romero, D., (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental Microbiology*, *16*, 2196–2211.
- Zhang, X., Li, B., Wang, Y., Guo, Q., Lu, X., Li, S., & Ma, P. (2013). Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atrophaeus* CAB-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(21), 9525–9534.
- Zhang, X., Zhong, Y. H., Yang, S. D., Zhang, W. X., Xu, M. Q., Ma, A. Z., Zhuang, G. Q., Chen, G. J., & Liu, W. F. (2014). Diversity and dynamics of the microbial community on decomposing wheat straw during mushroom compost production. *Bioresource Technology*, *170*, 183–195.
- Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y. M. E., & Liu, Y. (2014). Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS One*, *9*(3), e92486.
- Zihalirwa Kulimushi, P., Argüelles Arias, A., Franzil, L., Steels, S., & Ongena, M. (2017). Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus*

amyloliquefaciens in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 850.

8. PRILOZI

8. PRILOZI

Prilog 1. Spisak izolata, izvor, antagonističko dejstvo prema fungalnim izolatima T77 (*Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*), T54 (*Trichoderma harzianum*) i Ša₂V₆ (*Lecanicillium fungicola* var. *fungicola*), Gram reakcija (G), katalaza test (K) i godina izolacije.

Redni broj	Šifra izolata	Izvor izolacije	Antagonizam prema T77	Antagonizam prema T54	Antagonizam prema Ša ₂ V ₆	G	K	Godina izolacije
1	B-101	Slama	+	-	-	+	+	2015
2	B-102	Slama	+	-	-	+	+	2015
3	B-103	Slama	+	-	-	+	+	2015
4	B-104	Slama	+	-	-	+	+	2015
5	B-105	Slama	+	-	-	+	+	2015
6	B-106	Slama	+	+	+	+	+	2015
7	B-107	Slama	+	+	+	+	+	2015
8	B-108	Slama	+	+	+	+	+	2015
9	B-109	Slama	+	+	+	+	+	2015
10	B-110	Slama	+	+	+	+	+	2015
11	B-111	Slama	+	+	+	+	+	2015
12	B-112	Slama	+	+	+	+	+	2015
13	B-113	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
14	B-114	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
15	B-115	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
16	B-116	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
17	B-117	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
18	B-118	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
19	B-119	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
20	B-120	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
21	B-121	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2015
22	B-122	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2015
23	B-123	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2015
24	B-124	I faza 8. dan	+	+	+	+	+	2015
25	B-125	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2015
26	B-126	I faza 14. dan	+	+	+	+	+	2015
27	B-127	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2015

28	B-128	II faza	+	+	+	+	+	2015
29	B-129	II faza	+	+	+	+	+	2015
30	B-130	Stajnjak	-	-	-	+	+	2015
31	B-131	Stajnjak	-	-	-	+	+	2015
32	B-132	Stajnjak	-	-	-	+	+	2015
33	B-133	Stajnjak	-	-	-	+	+	2015
34	B-134	Stajnjak	-	-	-	+	+	2015
35	B-135	Stajnjak	-	-	-	+	+	2015
36	B-136	Stajnjak	-	-	-	+	+	2015
37	B-137	Stajnjak	-	-	-	+	+	2015
38	B-138	Stajnjak	+	+	+	+	+	2015
39	B-139	Stajnjak	-	-	-	+	+	2015
40	B-204	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
41	B-205	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
42	B-206	II faza	-	-	-	+	+	2015
43	B-207	II faza	-	-	-	+	+	2015
44	B-208	II faza	-	-	-	+	+	2015
45	B-209	II faza	-	-	-	+	+	2015
46	B-210	II faza	-	-	-	+	+	2015
47	B-211	II faza	-	-	-	+	+	2015
48	B-212	II faza	-	-	-	+	+	2015
49	B-213	II faza	-	-	-	+	+	2015
50	B-214	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2015
51	B-215	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2015
52	B-216	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2015
53	B-217	I faza 14. dan	+	+	+	+	+	2015
54	B-220	Slama	-	-	-	+	+	2015
55	B-221	Slama	-	-	-	+	+	2015
56	B-222	Slama	+	-	-	+	+	2015
57	B-223	Stajnjak	-	-	-	+	+	2015
58	B-224	Stajnjak	+	-	-	+	+	2015
59	B-225	Stajnjak	+	-	-	+	+	2015
60	B-226	II faza	-	-	-	+	+	2015

61	B-227	II faza	-	-	-	+	+	2015
62	B-228	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2015
63	B-229	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2015
64	B-230	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2015
65	B-231	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2015
66	B-232	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2015
67	B-233	I faza 3. dan	+	+	+	+	+	2015
68	B-234	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
69	B-235	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
70	B-241	I faza 14. dan	+	+	+	+	+	2015
71	B-242	II faza	-	-	-	+	+	2015
72	B-243	II faza	-	-	-	+	+	2015
73	B-244	II faza	-	-	-	+	+	2015
74	B-245	II faza	-	-	-	+	+	2015
75	B-246	II faza	-	-	-	+	+	2015
76	B-251	Slama	-	-	-	+	+	2015
77	B-252	Slama	+	+	-	+	+	2015
78	B-253	Stajnjak	+	+	+	+	+	2015
79	B-254	Stajnjak	+	+	+	+	+	2015
80	B-255	Stajnjak	+	-	-	+	+	2015
81	B-256	Stajnjak	+	+	+	+	+	2015
82	B-257	Stajnjak	+	+	+	+	+	2015
83	B-258	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
84	B-259	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
85	B-260	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2015
86	B-261	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2015
87	B-262	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2015
88	B-263	Pokrivka	-	-	-	+	+	2015
89	B-264	Pokrivka	-	-	-	+	+	2015
90	B-265	Pokrivka	-	-	-	+	+	2015
91	B-266	Pokrivka	-	-	-	+	+	2015
92	B-267	Pokrivka	-	-	-	+	+	2015
93	B-268	Pokrivka	+	+	+	+	+	2015

94	B-269	Pokrivka	-	-	-	+	+	2015
95	B-270	III faza	+	+	+	+	+	2015
96	B-271	III faza	-	-	-	+	+	2015
97	B-272	III faza	-	-	-	+	+	2015
98	B-273	III faza	-	-	-	+	+	2015
99	B-274	III faza	-	-	-	+	+	2015
100	B-275	III faza	-	-	-	+	+	2015
101	B-276	III faza	+	+	+	+	+	2015
102	B-301	Slama	-	-	-	+	+	2016
103	B-302	Slama	-	-	-	+	+	2016
104	B-303	Slama	-	-	-	+	+	2016
105	B-304	Slama	-	-	-	+	+	2016
106	B-305	Slama	-	-	-	+	+	2016
107	B-306	Slama	-	-	-	+	+	2016
108	B-307	Slama	-	-	-	+	+	2016
109	B-308	Slama	+	+	+	+	+	2016
110	B-309	Slama	+	+	+	+	+	2016
111	B-310	Slama	+	+	+	+	+	2016
112	B-311	Slama	-	-	-	+	+	2016
113	B-312	Slama	+	+	-	+	+	2016
114	B-313	Slama	+	+	+	+	+	2016
115	B-314	Slama	-	-	-	-	+	2016
116	B-315	Slama	+	+	-	+	+	2016
117	B-316	Slama	+	+	-	+	+	2016
118	B-317	Slama	-	-	-	-	+	2016
119	B-318	Slama	-	-	-	+	+	2016
120	B-319	I faza 3. dan	+	+	+	+	+	2016
121	B-320	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2016
122	B-321	I faza 3. dan	+	+	-	-	+	2016
123	B-322	I faza 3. dan	+	+	+	+	+	2016
124	B-323	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2016
125	B-324	I faza 3. dan	+	+	-	+	+	2016
126	B-325	I faza 3. dan	+	+	+	+	+	2016

127	B-326	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2016
128	B-327	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2016
129	B-328	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2016
130	B-329	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
131	B-330	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
132	B-331	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
133	B-332	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
134	B-333	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
135	B-334	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
136	B-335	I faza 8. dan	+	+	+	+	+	2016
137	B-336	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
138	B-337	I faza 8. dan	+	+	-	+	+	2016
139	B-338	I faza 8. dan	+	+	+	+	+	2016
140	B-339	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
141	B-340	I faza 14. dan	-	-	-	-	+	2016
142	B-341	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
143	B-342	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
144	B-343	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
145	B-344	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
146	B-345	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
147	B-346	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
148	B-347	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
149	B-348	II faza	+	+	+	+	+	2016
150	B-349	II faza	-	-	-	+	+	2016
151	B-350	II faza	-	-	-	+	+	2016
152	B-351	II faza	-	-	-	+	+	2016
153	B-352	II faza	-	-	-	+	+	2016
154	B-353	II faza	-	-	-	+	+	2016
155	B-354	II faza	-	-	-	+	+	2016
156	B-355	II faza	-	-	-	+	+	2016
157	B-356	III faza	-	-	-	+	+	2016
158	B-357	III faza	-	-	-	+	+	2016
159	B-358	III faza	+	+	+	+	+	2016

160	B-359	III faza	-	-	-	+	+	2016
161	B-360	III faza	-	-	-	+	+	2016
162	B-361	III faza	-	-	-	+	+	2016
163	B-362	III faza	-	-	-	+	+	2016
164	B-363	III faza	-	-	-	+	+	2016
165	B-364	III faza	-	-	-	+	+	2016
166	B-365	III faza	-	-	-	+	+	2016
167	B-383	Stajnjak	-	-	-	+	+	2016
168	B-384	Stajnjak	+	+	-	+	+	2016
169	B-385	Stajnjak	+	+	-	+	+	2016
170	B-386	Stajnjak	+	+	-	+	+	2016
171	B-387	Stajnjak	+	+	-	+	+	2016
172	B-388	II faza	-	-	-	+	+	2016
173	B-389	II faza	-	-	-	+	+	2016
174	B-390	II faza	-	-	-	+	+	2016
175	B-391	II faza	+	+	-	+	+	2016
176	B-392	II faza	-	-	-	+	+	2016
177	B-393	I faza 3. dan	+	+	-	+	+	2016
178	B-394	Stajnjak	+	+	-	+	+	2016
179	B-395	Stajnjak	+	+	-	+	+	2016
180	B-396	Stajnjak	+	+	-	+	+	2016
181	B-397	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
182	B-398	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
183	B-399	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
184	B-400	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
185	B-401	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
186	B-402	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
187	B-403	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
188	B-404	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
189	B-405	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
190	B-406	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
191	B-407	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
192	B-408	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016

193	B-409	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
194	B-410	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
195	B-411	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
196	B-412	Pokrivka	+	+	-	+	+	2016
197	B-413	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
198	B-415	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
199	B-416	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
200	B-417	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
201	B-418	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
202	B-419	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
203	B-420	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
204	B-421	Pokrivka	+	+	-	+	+	2016
205	B-422	Pokrivka	+	-	-	+	+	2016
206	B-423	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
207	B-424	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
208	B-425	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
209	B-426	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
210	B-427	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
211	B-428	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
212	B-429	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
213	B-430	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
214	B-431	Pokrivka	+	-	-	+	+	2016
215	B-432	Pokrivka	+	+	-	+	+	2016
216	B-433	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
217	B-434	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
218	B-435	Pokrivka	-	-	-	+	+	2016
219	B-436	Pokrivka	+	+	-	+	+	2016
220	B-437	Pokrivka	+	+	-	+	+	2016
221	B-438	Slama	+	+	-	+	+	2016
222	B-439	Slama	+	+	-	+	+	2016
223	B-440	Slama	+	+	-	+	+	2016
224	B-441	Slama	+	+	-	+	+	2016
225	B-442	Stajnjak	-	-	-	+	+	2016

226	B-443	Stajnjak	-	-	-	+	+	2016
227	B-444	Stajnjak	+	+	-	+	+	2016
228	B-445	Stajnjak	-	-	-	+	+	2016
229	B-446	Stajnjak	-	-	-	+	+	2016
230	B-447	Stajnjak	+	+	-	+	+	2016
231	B-448	Stajnjak	-	-	-	+	+	2016
232	B-449	Stajnjak	-	-	-	+	+	2016
233	B-450	Stajnjak	-	-	-	+	+	2016
234	B-451	Stajnjak	-	-	-	+	+	2016
235	B-452	Stajnjak	+	+	-	+	+	2016
236	B-453	Stajnjak	-	-	-	+	+	2016
237	B-454	Stajnjak	+	+	-	+	+	2016
238	B-455	Stajnjak	+	-	-	+	+	2016
239	B-456	Stajnjak	-	-	-	+	+	2016
240	B-457	I faza 3. dan	+	+	-	+	+	2016
241	B-458	I faza 3. dan	+	+	-	+	+	2016
242	B-459	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2016
243	B-460	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2016
244	B-461	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2016
245	B-462	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2016
246	B-463	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2016
247	B-464	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2016
248	B-465	I faza 3. dan	-	-	-	+	+	2016
249	B-466	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
250	B-467	I faza 8. dan	+	+	-	+	+	2016
251	B-468	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
252	B-469	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
253	B-470	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
254	B-471	I faza 8. dan	+	+	-	+	+	2016
255	B-472	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
256	B-473	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
257	B-474	I faza 8. dan	+	+	-	+	+	2016
258	B-475	I faza 8. dan	+	+	-	+	+	2016

259	B-476	I faza 8. dan	-	-	-	+	+	2016
260	B-477	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
261	B-478	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
262	B-479	I faza 14. dan	+	+	-	+	+	2016
263	B-480	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
264	B-481	I faza 14. dan	-	-	-	+	+	2016
265	B-482	I faza 14. dan	+	+	-	+	+	2016
266	B-483	I faza 14. dan	+	+	-	+	+	2016
267	B-484	II faza	-	-	-	+	+	2016
268	B-485	II faza	-	-	-	+	+	2016
269	B-486	II faza	-	-	-	+	+	2016
270	B-487	II faza	-	-	-	+	+	2016
271	B-488	II faza	-	-	-	+	+	2016
272	B-489	II faza	-	-	-	+	+	2016
273	B-490	II faza	+	+	-	+	+	2016
274	B-491	II faza	-	-	-	+	+	2016
275	B-492	II faza	-	-	-	+	+	2016
276	B-493	II faza	-	-	-	+	+	2016
277	B-494	II faza	-	-	-	+	+	2016
278	B-495	II faza	+	+	-	+	+	2016
279	B-496	II faza	-	-	-	+	+	2016
280	B-497	II faza	-	-	-	+	+	2016
281	B-498	II faza	-	-	-	+	+	2016
282	B-499	II faza	-	-	-	+	+	2016
283	B-500	II faza	+	+	-	+	+	2016
284	B-502	Slama	+	+	-	+	+	2016

* Zelenim su obojeni izolati koji su pokazali antagonističko dejstvo prema sva tri fungalna patogena i koji su korišćeni u daljim istraživanjima.

BIOGRAFIJA

Olja J. Stanojević rođena je 23.10.1991. godine u Beogradu gde je završila osnovnu školu „Vojvoda Mišić“, osnovnu muzičku školu „Josif Marinković“ odseci klavir i solo pevanje i „IV gimnaziju“. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2010/2011. godine, studijska grupa Biologija, a diplomirala je 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,19. Školske 2014/2015. godine upisala je Master akademske studije, studijska grupa Biologija, modul Biologija mikroorganizama. Master rad je odradila u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu a master tezu “Izolovanje i identifikacija *Bacillus* spp. iz kompostnog materijala, komposta i pokrivke za gajenje šampinjona aktivnih protiv *Trichoderma* spp.” odbranila je 2015. godine sa ocenom 10. Iste godine upisala je Doktorske akademske studije, modul Mikrobiologija. Od 2016. godine angažovana je kao istraživač-pripravnik a od 2017. kao istraživač saradnik na projektu „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“ (OI 173026) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Učestvuje na bilateralnim projektima Republike Srbije sa Slovenijom („New approach: natural products as potential agents for the control of olive scab disease“), Austrijom („*Trichoderma* spp. – a causative agent of green mould disease on cultivated mushrooms; identification and disease control with antagonistic microorganisms“) i Hrvatskom („Biološka zaštita šampinjona od bolesti i štetočina pomoću korisnih antagonističkih i entomopatogenih organizama“). Od školske 2016/2017. godine uključena je u praktičnu nastavu na Katedri za mikrobiologiju na predmetima Mikrobiologija, Mikrobiološki praktikum i Metode u mikrobiologiji. Olja J. Stanojević je član Društva za zaštitu bilja Srbije, Srpskog biološkog društva, Udruženja mikrobiologa Srbije, Društva genetičara Srbije i Federacije evropskih mikrobioloških društava (FEMS). Dobitnica je stipendije za učešće na Desetom balkanskom kongresu mikrobiologije 2017. i FEMS stipendije za učešće na Osmom kongresu evropskih mikrobiologa održanom 2019. godine. Dobila je sertifikat za pohađanje radionice Američkog društva za mikrobiologiju pod nazivom „ASM Workshop on Scientific Writing and Publishing“. Do sada je objavila sedam naučnih radova od kojih su tri iz kategorije M21, dva iz kategorije M23 i dva iz kategorije M24. Takođe je učestvovala sa 12 saopštenja na naučnim skupovima, domaćim i u inostranstvu.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Оља Станојевић _____

Број индекса _____ Б3008/2015 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Идентификација и карактеризација *Bacillus* spp. изолата са потенцијалом за биоконтролу фунгалних патогена шампињона

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

Потпис аутора

У Београду, 14.10.2019.

Olja Stanoević

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

Име и презиме аутора Оља Станојевић

Број индекса Б3008/2015

Студијски програм Биологија

Наслов рада Идентификација и карактеризација *Bacillus* spp. изолата са потенцијалом за биоконтролу фунгалних патогена шампињона

Ментор Проф. др Тања Берић

Потписана Оља Станојевић

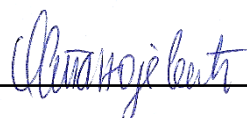
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 14.10.2019.



Изјава о коришћењу

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

Идентификација и карактеризација *Bacillus* spp. изолата са потенцијалом за биоконтролу фунгалних патогена шампињона

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

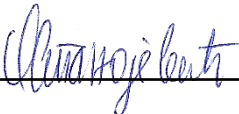
1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 14.10.2019.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.